

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN AGROBIOTECNOLOGÍA (CIALE)



TESIS DOCTORAL

Caracterización del volatiloма y efecto de la inoculación de cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Priestia* y *Rhizobium* en la variación de la expresión génica referida a la mitigación del estrés salino vegetal y análisis de la influencia de los compuestos fenólicos en el sistema modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*.

Memoria presentada por **Miguel Ayuso Calles** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Fdo. Miguel Ayuso Calles.

Salamanca, 2024

Dr. Raúl Rivas González, Catedrático del Área de Microbiología del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y Dr. José David Flores Félix del área de Microbiología del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

AUTORIZAN:

La presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada “Caracterización del volatilo y efecto de la inoculación de cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Priestia* y *Rhizobium* en la variación de la expresión génica referida a la mitigación del estrés salino vegetal y análisis de la influencia de los compuestos fenólicos en el sistema modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*”, elaborada por Don Miguel Ayuso Calles y realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, para la obtención del grado de Doctor.

Y para que así conste, extendemos la presente autorización en Salamanca, a 23 de mayo de 2024.

Fdo. Raúl Rivas González

Fdo. José David Flores Félix

A mis directores de tesis, el Catedrático Raúl Rivas González y el Dr. José David Flores Félix, por haber permitido adentrarme en el mundo científico, por guiarme en todos los pasos a lo largo de este camino y, sobre todo, por la independencia, el apoyo y la dedicación que me habéis ofrecido desde el primer momento.

A mis compañeros de laboratorio, a todos, por haber estado ahí siempre que lo he necesitado, no solo a nivel científico, sino también a nivel humano. Por todos los cafés charlas, cervezas, dramas, risas y experiencias vividas que han hecho que no solo seamos compañeros de laboratorio, sino también amigos.

A todas las personas que a lo largo de mi etapa predoctoral han influido positivamente en mí.

Y, especialmente, a mi familia: mis padres, mi hermano e Inés. A los que tengo que agradecer profundamente todo el apoyo y los ánimos que me han dado, la paciencia que han tenido, los consejos que me han brindado, y todas las sonrisas que habéis conseguido sacarme en los peores momentos. Sin vosotros no habría llegado a ser quien soy. Os quiero.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. La agricultura en el contexto del cambio climático.	3
1.1.1. La salinidad como factor limitante de la producción agrícola.....	4
2. Cultivos hortícolas y su relevancia económica y productiva.	8
2.1. <i>Lactuca sativa</i> L.....	8
2.2. <i>Apium graveolens</i> L.	10
2.3. <i>Valerianella locusta</i> L.....	12
2.4. Compuestos fenólicos en plantas y sus implicaciones biológicas.	14
2.4.1. Evaluación de la actividad biológica en modelos biológicos.	16
2.5. Efectos negativos de la salinidad sobre los cultivos hortícolas.	18
3. Alternativas en la agricultura frente al estrés salino.	19
3.1. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB).	20
3.1.1. Mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal.	22
3.1.1.1. Fijación Biológica del Nitrógeno.....	22
3.1.1.2. Solubilización de fosfato.	24
3.1.1.3. Solubilización de potasio.	25
3.1.1.4. Producción de sideróforos.	26
3.1.1.5. Síntesis de fitohormonas.	27
3.1.2. Mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal.	29
3.1.2.1. Sustancias inhibitorias extracelulares.	29
3.1.2.2. Síntesis de ACC-desaminasa.	30
3.1.2.3. Producción de exopolisacáridos.....	30
3.1.2.4. Producción de compuestos orgánicos volátiles.	31
3.1.2.5. Inducción de resistencia sistémica.	31
3.1.3. Principales mecanismos de tolerancia/resistencia a la salinidad inducidos por PGPB.	32
3.1.3.1. Regulación del balance osmótico.	33
3.1.3.2. Regulación del contenido iónico.....	35
3.1.3.3. Regulación del estrés oxidativo.	37
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	43

1. Microorganismos utilizados en el estudio.	45
1.1. Recolección de muestras.	45
1.2. Aislamiento de cepas bacterianas.	46
1.3. Mantenimiento y conservación de las cepas.	48
2. Caracterización de los aislados.	48
2.1. Caracterización genotípica y proteómica.	48
2.1.1. MALDI-TOF.	48
2.1.2. Extracción y purificación de ADN.	49
2.1.3. Amplificación de ADN mediante PCR.	50
2.1.4. Electroforesis.	51
2.1.5. Obtención de los perfiles RAPD.	51
2.1.6. Análisis matemático de los perfiles RAPD.	52
2.1.7. Amplificación y secuenciación del gen ribosómico rRNA 16S.	52
2.1.8. Análisis de las secuencias de ADN.	52
2.1.9. Amplificación del gen <i>betB</i>	53
2.1.10. Secuenciación de genomas y análisis de la información genómica.	53
2.1.11. Análisis filogenómicos.	53
2.2. Caracterización fenotípica.	54
2.2.1. Determinación del rango de crecimiento bajo condiciones de salinidad.	54
2.2.2. Determinación del rango de crecimiento en diferentes condiciones de pH. ..	54
2.2.3. Determinación del rango de crecimiento bajo diferentes temperaturas.	55
2.3. Análisis de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal <i>in vitro</i>	55
2.3.1. Solubilización de fosfato.	55
2.3.2. Producción de sideróforos.	57
2.3.3. Producción de auxinas y ácido indol acético.	58
2.3.4. Crecimiento en medios libres de nitrógeno.	61
2.4. Estudio de la capacidad de colonización sobre superficies abióticas.	62
2.4.1. Determinación cuantitativa de la capacidad de producción de <i>biofilms</i>	62
2.4.2. Determinación cualitativa de la capacidad de producción de <i>biofilms</i>	63
3. Métodos de marcaje fluorescente de bacterias y microscopía.	64
3.1. Marcaje fluorescente de cepas del género <i>Rhizobium</i> mediante conjugación biparental.	64

3.2. Métodos de inmunolocalización.	67
4. Análisis de la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) bajo condiciones salinas y no salinas.	68
5. Ensayos en plantas.	69
5.1. Esterilización y germinación de semillas.....	69
5.2. Análisis de la colonización de las cepas seleccionadas sobre las raíces de las plántulas mediante microscopía óptica de fluorescencia.	70
5.3. Inoculación de plántulas en placa bajo condiciones no salinas.	71
5.4. Inoculación de plántulas en placa bajo condiciones de salinidad por NaCl.	71
5.5. Inoculación de plántulas en placa bajo condiciones de salinidad por Na ₂ SO ₄	71
5.6. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles bajo condiciones no salinas.....	72
5.7. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles bajo estrés por NaCl.....	72
5.8. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles bajo estrés por Na ₂ SO ₄	72
5.9. Ensayos de invernadero bajo condiciones no salinas y de estrés salino por NaCl y Na ₂ SO ₄	73
5.9.1. Análisis químico de micro y macroelementos en muestras vegetales.....	74
5.9.2. Análisis de compuestos fenólicos en muestras vegetales.	74
5.9.3. Análisis de la expresión génica en muestras de lechuga por PCR cuantitativa (q-PCR).....	76
5.9.3.1. Preparación de las muestras.	76
5.9.3.2. Extracción de ARN y obtención de cDNA.	76
5.9.3.3. Análisis de la expresión de genes por q-PCR.	77
6. Evaluación de la influencia de extractos ricos en compuestos fenólicos de plantas de lechuga en la supervivencia de <i>Caenorhabditis elegans</i>	79
6.1. Crecimiento de <i>Caenorhabditis elegans</i> en medios de cultivo.....	79
6.2. Métodos de manejo de <i>Caenorhabditis elegans</i>	80
6.3. Ensayos de estrés inducido térmicamente.....	81
7. Tratamiento estadístico de los datos.....	82
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
CAPÍTULO I	85

1. Características edáficas de los suelos utilizados para el aislamiento bacteriano.	88
2. Aislamiento de cepas bacterianas procedentes del interior de nódulos de <i>Trifolium repens</i> L., y de suelo rizosférico e interior de raíces de <i>Plantago maritima</i> L. y <i>Camphorosma monspeliaca</i> L.....	89
3. Identificación de aislados patógenos por MALDI-TOF	91
4. Análisis de la diversidad bacteriana mediante perfiles RAPD.....	92
5. Identificación de las cepas mediante secuenciación del gen ribosómico rRNA 16S..	101
6. Amplificación del gen <i>betB</i>	113
CAPÍTULO II	115
1. Caracterización fenotípica de los aislados seleccionados.	118
1.1. Determinación del rango decrecimiento bajo condiciones de salinidad.....	118
1.2. Determinación del rango de crecimiento en diferentes condiciones de pH.....	122
1.3. Determinación del rango de crecimiento bajo diferentes temperaturas.	123
2. Análisis <i>in vitro</i> de los mecanismos PGP.....	123
2.1. Solubilización de fosfato.....	125
2.2. Producción de sideróforos.....	127
2.3. Producción de auxinas y ácido indol acético.	128
2.4. Crecimiento en medios libres de nitrógeno.	131
2.5. Estudio de la capacidad de producción de <i>biofilms in vitro</i>	132
2.5.1. Determinación cuantitativa de la producción de <i>biofilms in vitro</i>	133
2.5.2. Determinación cualitativa de la producción de <i>biofilms in vitro</i>	135
3. Análisis <i>in silico</i> de los genomas de los aislados seleccionados.....	138
3.1. Análisis filogenómico de los aislados seleccionados.....	138
3.1.1. SCPM31 y SCCME10.....	139
3.1.2. SCPM81.....	142
3.1.3. SCCM01.	144
3.1.4. HUTR05 y GPTR29.	147
3.2. Análisis <i>in silico</i> de los genomas de las cepas seleccionadas.....	151
3.2.1. Descripción general de los genomas.	151
3.2.2. Análisis de genes implicados en la promoción del crecimiento vegetal.	153
3.2.2.1. Genes relacionados con la solubilización de fosfato.	153
3.2.2.2. Genes relacionados con la producción de sideróforos.....	154

3.2.2.3. Genes implicados en la síntesis de ácido indol acético.	156
3.2.2.4. Genes relacionados con la producción de <i>biofilms</i> y la colonización.....	157
3.2.2.5. Genes relacionados con la fijación del nitrógeno.	160
3.2.2.6. Genes implicados en la síntesis de VOCs.....	161
3.2.3. Análisis de genes implicados en la resistencia/tolerancia a la salinidad.	163
3.2.3.1. Genes relacionados con la respuesta al estrés osmótico e iónico.	163
3.2.3.2. Genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo.....	165
CAPÍTULO III	167
1. Estudio de la capacidad de colonización mediante microscopía óptica de fluorescencia.	170
1.1. Análisis de la colonización en raíces de lechuga.	170
1.2. Análisis de la colonización en raíces de apio.....	174
1.3. Análisis de la colonización en raíces de canónigo.....	176
2. Ensayos de inoculación en plántulas de lechuga, apio y canónigo.	178
2.1. Ensayos de inoculación en plántulas crecidas en condiciones no salinas.....	178
2.2. Ensayos de inoculación en plántulas crecidas en salinidad por NaCl.	183
2.3. Ensayos de inoculación en plántulas crecidas en salinidad por Na ₂ SO ₄	188
3. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles en plántulas de lechuga, apio y canónigo.	193
3.1. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles bajo condiciones no salinas.....	194
3.2. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles bajo salinidad por NaCl.	198
3.3. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles bajo salinidad por Na ₂ SO ₄	203
4. Análisis del volatiloma de los aislados seleccionados.	207
CAPÍTULO IV	219
1. Estudio de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal y el alivio del estrés salino por NaCl y Na ₂ SO ₄ de los aislados seleccionados sobre plantas de lechuga, apio y canónigos, bajo condiciones de invernadero.	222
1.4. Ensayo de invernadero bajo condiciones normales y de estrés salino (NaCl y Na ₂ SO ₄) en plantas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.).....	223
1.5. Ensayo de invernadero bajo condiciones normales y de estrés salino (NaCl y Na ₂ SO ₄) en plantas de apio (<i>Apium graveolens</i> L.).....	226

1.6. Ensayo de invernadero bajo condiciones normales y de estrés salino (NaCl y Na ₂ SO ₄) en plantas de canónigo (<i>Valerianella locusta</i> L.).....	228
2. Análisis del contenido en micro y macronutrientes de las plantas de lechuga, apio y canónigo desarrolladas en invernadero bajo condiciones normales y salinas (NaCl y Na ₂ SO ₄).....	232
2.1. Análisis del contenido en micro y macronutrientes de las plantas de lechuga. ...	232
2.2. Análisis del contenido en micro y macronutrientes de las plantas de apio.....	236
2.3. Análisis del contenido en micro y macronutrientes de las plantas de canónigo..	239
3. Análisis del contenido en compuestos fenólicos de las plantas de lechuga, apio y canónigo desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na ₂ SO ₄).....	242
3.1. Determinación del contenido en compuestos fenólicos de las plantas de lechuga. ..	243
3.2. Determinación del contenido en compuestos fenólicos de las plantas de apio....	246
3.3. Determinación del contenido en compuestos fenólicos de las plantas de canónigo.	251
4. Análisis de la expresión génica en muestras de lechuga desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na ₂ SO ₄).	255
4.1. Análisis de la expresión del gen <i>LsPIP2</i>	256
4.2. Análisis de la expresión de los genes <i>LsHKT1;6</i> y <i>LsNHX2</i>	260
4.3. Análisis de la expresión de los genes <i>LsPAL</i> y <i>LsSOD</i>	264
5. Evaluación de la influencia de extracto ricos en compuestos fenólicos de plantas de lechuga en la supervivencia de <i>Caenorhabditis elegans</i>	270
DISCUSIÓN GENERAL	277
CONCLUSIONES	285
BIBLIOGRAFÍA	289

INTRODUCCIÓN

1. La agricultura en el contexto del cambio climático.

Según el IPCC (Grupo Intergubernamental de Expertos sobre Cambio Climático) el cambio climático es definido como la variación del estado del clima identificable en las variaciones del valor medio y/o en la variabilidad de sus propiedades, que persiste durante largos periodos de tiempo, y que puede deberse a procesos naturales o antropogénicos (IPCC, 2013). El aumento de la temperatura de la atmósfera y el océano, la disminución de los niveles de hielo y nieve, la elevación del nivel del mar, y el aumento de los gases de efecto invernadero (GEI) (principalmente CO₂, CH₄ y N₂O) son cambios que evidencian un actual cambio climático. Además, la influencia humana en el sistema climático es clara, y es muy probable que haya sido la causa principal del calentamiento observado desde mediados del siglo XX (IPCC, 2013). A pesar del alto grado de incertidumbre de los modelos climáticos, existe un consenso sobre las tendencias básicas: los cambios en los patrones climáticos afectan de forma principal y significativa a las precipitaciones, la evapotranspiración potencial (ET) y la temperatura (Corwin, 2019). Las implicaciones que esto tiene se traducen en el aumento de la probabilidad de fenómenos meteorológicos y climáticos extremos, que provocan impactos negativos sobre sistemas naturales y humanos (IPCC, 2014). Por tanto, el cambio climático no solo está asociado con las repercusiones ambientales, sino que también presenta transcendencias económicas y sociales (Hernández et al., 2015; Corwin, 2019).

La agricultura está íntimamente ligada al cambio climático. Por una parte, los eventos extremos como temperaturas altas (con su consiguiente aumento de ET), sequías frecuentes o precipitaciones inusualmente elevadas, incendios, etc. presentan un impacto sustancial sobre los sistemas agrícolas, al reducir su productividad, así como la calidad nutricional de los cultivos (Del Buono, 2021). Estos eventos pueden afectar a la disponibilidad de agua, el retraso/adelanto de cosechas, la expansión de plagas/patógenos a nuevas zonas, la desertificación o deficiencia en nutrientes de terrenos aprovechables, entre otros (Arora, 2019). Por otra parte, la agricultura es una actividad que contribuye de manera significativa sobre el cambio climático al presentar una elevada huella de carbono. La emisión de GEI de esta actividad sobre la atmósfera es destacable, con niveles comparables a los liberados por la calefacción doméstica, los transportes y la producción de energía, estimándose entre un 14 y 30 % del total de las emisiones antropogénicas (Del Buono, 2021; Yohannes, 2016). Sin embargo, la agricultura tiene un gran potencial para mitigar el cambio climático. Así, los sistemas agrícolas sostenibles pueden reducir las emisiones de GEI, al reducir los insumos, secuestrar

carbono en el suelo y ser un sumidero de CO₂ (derivado de la actividad fotosintética) (Yohannes, 2016).

La agenda política internacional ha tomado consciencia sobre este grave problema, al considerar que los cambios bruscos de las condiciones climáticas amenazan la seguridad alimentaria a escala mundial (Arora, 2019). En consecuencia, entre las metas del Objetivo 2 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible establecidos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), se plantea para el año 2030: “*asegurar la sostenibilidad de los sistemas de producción de alimentos y aplicar prácticas agrícolas que (...) fortalezcan la capacidad de adaptación al cambio climático, los fenómenos meteorológicos extremos*”. Además, mediante el Programa Horizonte Europa (2021-2027), la Unión Europea establece como aspecto prioritario en investigación e innovación, conseguir la neutralidad climática de los sistemas de producción primaria, y establecer modelos de gobernanza que favorezcan la transición hacia la sostenibilidad.

1.1.1. La salinidad como factor limitante de la producción agrícola.

Según estableció Levitt (1980), desde el punto de vista biológico, el término estrés puede ser definido como cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para los organismos. Las condiciones ambientales, tanto físicas como químicas, son las responsables de producir el estrés abiótico en plantas: salinidad del suelo, sequía, inundaciones, temperaturas extremas, radiación ultravioleta (UV), toxicidad mineral, o déficit de nutrientes (Khalid et al., 2019; Minhas et al., 2017). La frecuencia y magnitud de estos factores se ven incrementadas por el impacto de la variabilidad climática, suponiendo unos de los desafíos más importantes para los sistemas agrícolas. De hecho, se estima que la reducción del rendimiento en la mayoría de los cultivos por estreses abióticos puede llegar a ser mayor del 50 % (Khalid et al., 2019; Kumar et al., 2019; Minhas et al., 2017). En este sentido, estos eventos climáticos extremos están directamente relacionados con la salinización del suelo, ya que inducen la acumulación de sales y la posterior degradación del mismo (Corwin, 2019). Por ejemplo, el aumento de los regímenes de temperaturas, que dan lugar a una mayor ET, y la irregularidad de las precipitaciones provocan la acumulación de sales en las capas superficiales del suelo, debido al ascenso por capilaridad del agua en la que se encuentran disueltas (Hayat et al., 2020).

La acumulación de sales solubles en el suelo debida a factores naturales (primarios) o antropogénicos (secundarios) da lugar a la salinidad del suelo, que es considerada una de las principales causas de estrés abiótico en plantas, además de la segunda causa más importante de

degradación del suelo (Ayuso-Calles et al., 2023; Zaman et al., 2018). El uso excesivo de fertilizantes, las prácticas de riego inadecuadas, el cambio climático, la intrusión de agua de mar y otros procesos naturales (meteorización de las rocas y material parental) son las principales causas del proceso de salinización (Hayat et al., 2020; Safdar et al., 2019; Zaman et al., 2018).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y diversas publicaciones científicas, se estima que más de 900 millones de hectáreas podrían estar afectadas por el aumento de la concentración salina, lo que supone un 20 % de las tierras cultivables (Abrol et al., 1988; Hayat et al., 2020; Zaman et al., 2018). Y aunque es considerado un problema a escala mundial, afecta especialmente a regiones áridas y semiáridas, donde la evapotranspiración supera a la precipitación, siendo España un claro ejemplo, con un 20 % de la superficie cultivable degradada (desértica o no productiva) (Figura 1) (Safdar et al., 2019; Zaman et al., 2018). El impacto económico asociado a esta problemática es significativo, no solo por el coste directo procedente de la pérdida de rendimiento de los cultivos, sino por los diferentes costes indirectos derivados, como la aplicación de medidas paliativas o correctoras, i.e. la recuperación de las tierras degradadas. Así, las pérdidas anuales por salinidad en tierras productivas para la agricultura podrían llegar a cerca de 30.000 millones de dólares (Qadir et al., 2014; Zaman et al., 2018).

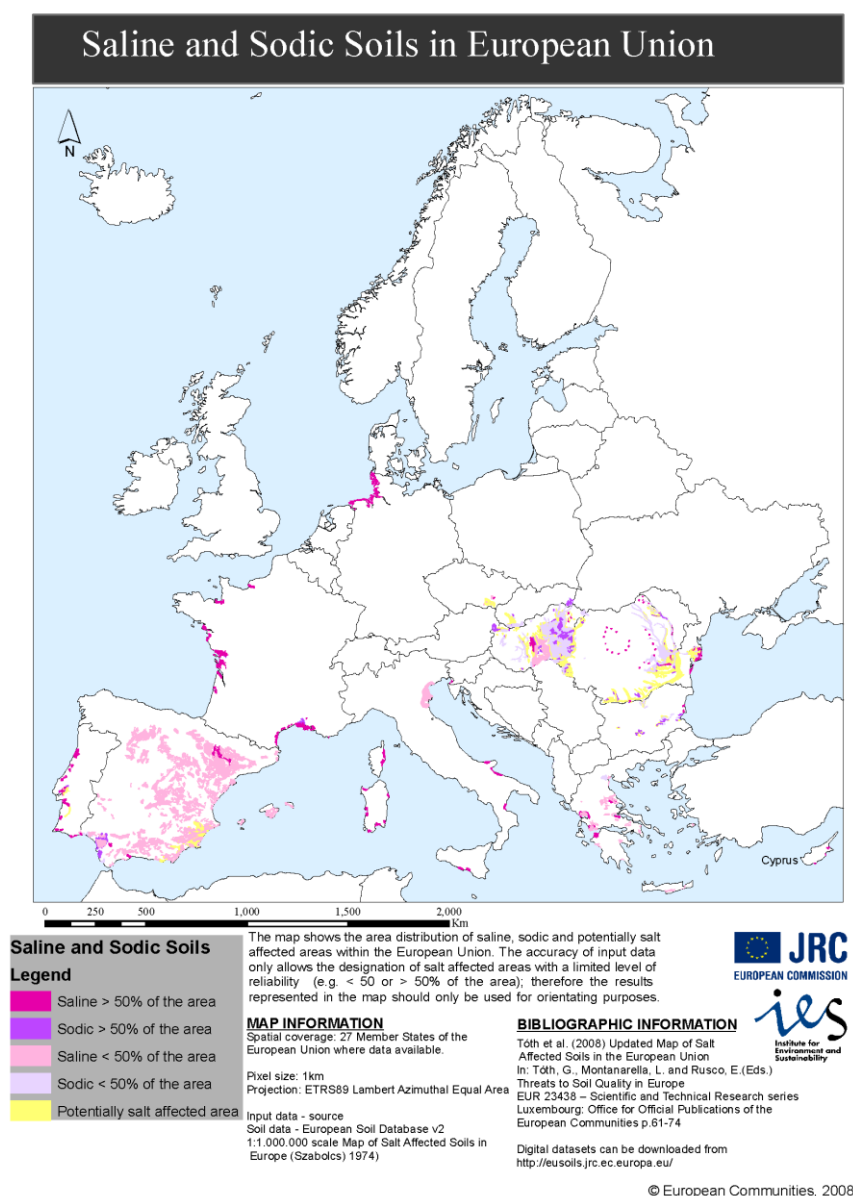


Figura 1: Mapa de suelos salinos y sódicos, y de áreas potencialmente afectadas por sal en la Unión Europea.
Fuente: Tóth et al., 2008.

La definición más aceptada para un suelo salino es aquel que presenta una conductividad eléctrica (EC) del extracto de saturación (ECe) igual o superior a 4 dS m⁻¹ a 25 °C (aproximadamente 40 mM NaCl), y tiene un sodio intercambiable del 15 % (Ayuso-Calles et al., 2021; Hayat et al., 2020; Munns & Tester, 2008; Safdar et al., 2019; Zaman et al., 2018). Además, aquellos que exceden de 15 dS m⁻¹ ya se consideran fuertemente salinos (Safdar et al., 2019). Por lo tanto, el aumento de la concentración de iones en el suelo da lugar a la salinización. Los cationes más habituales asociados a la salinidad son Na⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺, mientras que los aniones son Cl⁻, SO₄²⁻ y HCO₃³⁻ (Corwin, 2019, Safdar et al., 2019; Zaman et al., 2018). Entre ellos, Na⁺ y Cl⁻ son considerados los más dañinos, seguidos de SO₄²⁻, debido

a los efectos negativos que causan sobre las plantas y el suelo (Ayuso-Calles et al., 2021; Hayat et al., 2020; Safdar et al., 2019).

Los impactos provocados por la salinidad sobre la agricultura son complejos, y van desde efectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en las plantas, hasta la erosión y la reducción de la productividad del suelo (Ilangumaran & Smith, 2017; Shrivastava & Kumar, 2015). A nivel vegetal, la salinidad afecta a casi todos los aspectos del desarrollo de las plantas, al imponer diferentes tipos de estrés:

- **Estrés osmótico:** es la primera fase en el desarrollo del estrés salino, y ocurre debido a la acumulación de sales en el sistema radicular, lo que genera un déficit hídrico en las raíces (Ilangumaran & Smith, 2017; Munns & Tester, 2008). Esta presión osmótica provoca una disminución de la tasa de crecimiento y el cierre estomático, con el objetivo de reducir el agua utilizada por la planta (Ayuso-Calles et al., 2021; Mukhopadhyay et al., 2021).
- **Estrés iónico:** la fase de toxicidad iónica ocurre en segundo lugar, cuando la velocidad de acumulación de iones supera a la de exclusión, acumulándose hasta alcanzar niveles dañinos (Munns & Tester, 2008; Mukhopadhyay et al., 2021). Estos radicales se acumulan en el citoplasma y vacuolas (principalmente en hojas), provocando alteraciones estructurales y funcionales de las células (Ayuso-Calles et al., 2021; Ilangumaran & Smith, 2017). Además, las altas concentraciones de estos iones (principalmente Na^+ , Cl^- o SO_4^{2-}) limita la absorción de otros macro y micronutrientes (P, N, Mg, Fe, Cu o Zn) (Safdar et al., 2019).
- **Estrés oxidativo:** los efectos provocados en las dos primeras fases dan lugar a un desequilibrio metabólico en la planta, lo que conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno o ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Ilangumaran & Smith, 2017; Shrivastava & Kumar, 2015). Todos estos subproductos metabólicos ($^1\text{O}_2^*$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2^* , u OH^*) son profundamente reactivos con los componentes celulares, pudiendo causar daños en lípidos, proteínas, ADN y pigmentos fotosintéticos, o inducir la muerte celular programada (Ayuso-Calles et al., 2021; Safdar et al., 2019).

Como consecuencia, diferentes aspectos del desarrollo de las plantas son alterados por la acción de todos estos efectos, como la germinación, el crecimiento vegetativo y el desarrollo reproductivo (Ilangumaran & Smith, 2017). Todo ello ocurre cuando la conductividad eléctrica en el suelo supera el umbral establecido (4 dS m^{-1}), aunque la respuesta varía entre especies e,

incluso, variedades vegetales (Munns & Tester, 2008). De esta manera las plantas halófitas son capaces de crecer en suelos altamente salinos (plantas tolerantes), mientras que las glicófitas son incapaces de soportar ciertas condiciones salinas (plantas sensibles). Las glicófitas incluyen la mayoría de los cultivos alimentarios, donde la inhibición o muerte del crecimiento se produce de 100 a 200 mM NaCl, como en el caso del arroz o el trigo (Munns & Tester, 2008; Safdar et al., 2019). Diversos estudios estiman que la reducción de rendimiento de este tipo de cultivos en los suelos o condiciones salinas puede llegar a ser superior al 40% en comparación con los suelos no salinos, dentro de los umbrales de salinidad de plantas glicófitas (Munns & Rawson, 1999; Qadir et al., 2014; Shrivastava & Kumar, 2015; Tripathi, 2009). Los mecanismos de tolerancia a la salinidad representan costes energéticos adicionales para que la planta pueda hacer frente a dicho estrés, por lo que, a medida que aumenta la concentración de iones, estos costes superan la energía obtenida, lo que da lugar a los problemas comentados previamente (Zörb et al., 2019).

Por lo tanto, ante las condiciones ambientales adversas que repercuten negativamente en el sistema agrícola actual, así como el alarmante aumento de la población mundial, la búsqueda de alternativas ambiental y económicamente sostenibles que permitan mantener la demanda de alimentos debe considerarse una prioridad máxima.

2. Cultivos hortícolas y su relevancia económica y productiva.

2.1. *Lactuca sativa* L.

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una planta herbácea anual y autógama perteneciente a la familia Asteraceae, ampliamente cultivada y consumida por todo el mundo (Kim et al., 2016; Quintero, 1977). Presenta una raíz primaria pivotante y corta, de la que surgen raíces secundarias; las hojas son lampiñas y dentadas, y brotan de un tallo ramificado; las flores son hermafroditas y están reunidas en capítulos (Figura 2) (Quintero, 1977; Pink & Keane, 1993). Esta hortaliza puede presentar una gran diversidad de colores, tamaños y formas, que dan lugar a un elevado número de variedades agronómicas, aunque no existe un sistema estandarizado de clasificación (Kim et al., 2016; Mou, 2008). Por ejemplo, las hojas comienzan a desarrollarse en forma de roseta, y a lo largo de su desarrollo pueden mantenerse desplegadas (como en el caso de var. *longifolia* o var. *romana*), o agruparse en un cogollo más o menos apretado (var. *capitata* o var. *secalina*) (Quintero, 1977; Kim et al., 2016).



Figura 2: Ilustración botánica de *Lactuca sativa* L. Fuente: Johann Wilhelm Weinmann, Phytanthoza Iconographia, 1745.

La lechuga presenta una gran adaptabilidad a distintos climas, por lo que es cultivada extensamente en todos los continentes, especialmente en áreas templadas y subtropicales (Mou, 2008; Quintero, 1977). De acuerdo con datos de la FAO, la producción de lechuga y achicoria en el año 2021 fue de más de 27 millones de toneladas, lo que supone un aumento de casi el 50 % en los últimos 20 años (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2023). China destaca como principal productor de esta hortaliza (más de 10 millones de toneladas), seguido por Estados Unidos de América (más de 4 millones de toneladas) (FAO, 2023). España es el tercer mayor productor de lechuga a nivel mundial, con una producción de casi 1 millón de toneladas en el año 2022 y una superficie dedicada a este cultivo de más de 33.000 hectáreas, principalmente en Murcia y Andalucía (FAO, 2023; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación [MAPA], 2023).

Es una de las verduras más populares a nivel mundial y suele ser consumida en crudo. Desde el punto de vista nutricional, la lechuga se caracteriza por su bajo contenido calórico, debido a su alto porcentaje en agua (~95 %) (Kim et al., 2016; Mou, 2008) aunque la composición nutricional es equivalente a otras verduras (Kim et al., 2016). Además, destaca por su contenido en vitaminas como vitamina A (carotenoides), B (incluyendo folato, riboflavina o niacina), C (ácido ascórbico) y E. Por otra parte, es considerada una fuente importante de compuestos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos (~75 %, destacando el ácido caféico o cicórico), aunque también flavonoles (derivados de la quercetina y el kaempferol) (Mou, 2008; Kim et al., 2016; Santander et al., 2022).

2.2. *Apium graveolens* L.

El apio (*Apium graveolens* L.) es una planta herbácea bienal (aunque es cultivada en ciclos anuales) y monocárpica, perteneciente a la familia Apiaceae y es originaria de la zona Mediterránea (Singh et al., 2022; Tan et al., 2023). En cuanto a la descripción botánica (Figura 3), presenta un tubérculo blanco-grisáceo del que surgen numerosas raíces; el tallo foliar es largo y las hojas tienen una formación característica en roseta; las flores son blancas o crema y están dispuestas en una inflorescencia (umbela) (Marakova et al., 2022). A nivel intraespecífico, la especie *Apium graveolens* L. se divide en 4 variedades: var. *graveolens* (variedad salvaje), var. *dulce* (variedad cultivada más común), var. *rapaceum* (conocido como apio de raíz), var. *secalinum* (conocido como apio de hoja) (Marakova et al., 2022; Singh et al., 2022).



Figura 3: Ilustración botánica de *Apium graveolens* L. Fuente: Prof. Dr. Otto Wilhelm Thomé *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* 1885, Gera, Alemania.

El cultivo de apio tiene una gran importancia económica mundial, no solo por su uso culinario, sino también por sus aplicaciones medicinales y farmacéuticas (Singh et al., 2022). De acuerdo con datos proporcionados por el Banco Mundial (World Integrated Trade Solution [WITS], 2023), la cantidad de apio exportada globalmente durante 2022 fue de 383.629 toneladas, esto supone un aumento cercano al 65 % respecto a las exportaciones en el año 2002. Entre los principales exportadores de esta hortaliza se encuentran México (casi 95.000 toneladas en 2022), EE. UU. (cerca de 90.000 toneladas en 2022), y España (con alrededor de 90.000 toneladas en 2022) (WITS, 2023). Aunque según datos del MAPA (2023), la producción de apio en España en el año 2022 fue de 159.781 toneladas, y una superficie de 2.673 hectáreas, concentradas principalmente en la Región de Murcia.

El uso gastronómico, medicinal y farmacéutico del apio radican en su composición bioquímica única (Marakova et al., 2022). Su porcentaje en agua es cercano al 95 %, lo que da lugar a un bajo contenido calórico (Singh et al., 2022). A nivel vitamínico y mineral destaca su riqueza en vitaminas A, C y E, así como Ca, Fe, P, K y Na, respectivamente (Marakova et al., 2022; Singh

et al., 2022). Además, cabe mencionar de manera especial la elevada cantidad de aceites esenciales presentes en el apio, principalmente los terpenos limoneno y selineno, que pueden alcanzar el 2 % del peso en semillas (Marakova et al., 2022; Singh et al., 2022; Tan et al., 2023). También es destacable su contenido en compuestos fenólicos, tanto ácidos fenólicos (principalmente ácidos hidroxicinámicos, como el ácido p-cumárico), como flavonoides (kaempferol, apigenina o luteolina) (Kooti & Daraei, 2017; Marakova et al., 2022; Singh et al., 2022; Tan et al., 2023). Todo ello da lugar a las diversas propiedades biológicas de gran interés para el consumidor: antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, o anticancerígenas, entre otras (Kooti & Daraei, 2017; Marakova et al., 2022; Singh et al., 2022).

2.3. *Valerianella locusta* L.

El canónigo (*Valerianella locusta* L.) es una herbácea anual y autógama de la familia Valerianaceae (Caprifoliaceae), que se distribuye de manera natural por la región mediterránea y el norte de América, aunque es cultivada y consumida globalmente (Berger et al., 2021; Muminovic et al., 2004). Esta especie vegetal se caracteriza por sus tallos bifurcados repetidamente, con hojas verdes oscuras, opuestas y dispuestas basalmente en forma de roseta; y sus flores hermafroditas, blancas y agrupadas en inflorescencia (Figura 4) (Berger et al., 2021; Parnell & Foley, 2000).



Figura 4: Ilustración botánica de *Valerianella locusta* L. Fuente: Prof. Dr. Otto Wilhelm Thomé *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* 1885, Gera, Alemania.

El cultivo de canónigos no se considera mayoritario, la cantidad producida no es tan elevada como en el caso de la lechuga o el apio. Francia es uno de los principales productores de esta especie hortícola, principalmente en la zona de Nantes, con cerca 50.000 toneladas recolectadas en el año 2022, lo que supone más del 80 % de la producción en Europa y gran parte de la producción mundial (Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire, 2023; Péron & Rees, 1996; Verdin et al., 2018). La producción en España es menor, alrededor de 1000 toneladas cosechadas en el año 2022, distribuidas entre Murcia, Andalucía y Navarra (MAPA, 2023).

El principal uso del canónigo es gastronómico, consumiéndolo crudo en ensaladas, gracias a su agradable sabor y su riqueza en compuestos nutraceuticos (Grzegorzewski et al., 2010; Verdin et al., 2018). Su porcentaje de humedad es similar al de otras hortalizas (90-95 %), pero destaca su riqueza en Fe (Muminovic et al., 2004; Ramos-Bueno et al., 2016). Además, se ha establecido que el cultivo del canónigo constituye una fuente saludable de compuestos

bioactivos, como: carotenoides (neoxantina, violaxantina, luteína, zeaxantina, o β -caroteno), esteroides (principalmente β -sitosterol), ácidos grasos (destacando el ácido α -linoléico) o compuestos fenólicos (Ramos-Bueno et al., 2016). Entre los compuestos fenólicos aparecen ácidos fenólicos (principalmente ácido clorogénico) y flavonoides (como luteolina o kaempferol), que hacen que este alimento presente propiedades nutraceuticas de interés para el consumidor (Grzegorzewski et al., 2010; Ramos-Bueno et al., 2016). Por ejemplo, Ramos-Bueno y colaboradores (2016) comprobaron que los extractos obtenidos de plantas de canónigos inducían efectos antitumorales, al inhibir la viabilidad de líneas celulares cancerígenas.

2.4. Compuestos fenólicos en plantas y sus implicaciones biológicas.

Las verduras y frutas forman parte de la base de la pirámide nutricional, por lo que son una parte esencial de la alimentación humana. Son fuente de micro y macronutrientes, vitaminas, fibra, y otros compuestos químicos con características bioactivas (Yahia et al., 2019). Entre ellos, los compuestos fenólicos son el grupo de compuestos químicos vegetales más numerosos en las plantas (Yahia et al., 2019).

Los compuestos fenólicos son un grupo diverso de metabolitos secundarios vegetales derivados de las rutas de la pentosa fosfato, el ácido shikímico y el fenilpropanoide (Balasundram et al., 2006; Kumar et al., 2020). Estructuralmente, están formados por un anillo aromático (C₆) unido a uno (fenol) o más (polifenol) grupos hidroxilo (-OH) y otros sustituyentes, dando lugar a moléculas fenólicas simples (como los ácidos fenólicos) o más complejas (como los flavonoides) (Figura 5) (Balasundram et al., 2006; Cheynier, 2012; Kulbat, 2016). La formación de compuestos fenólicos comienza con la conversión de la fenilalanina en ácido cinámico, catalizado por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Figura 5) (Kulbat, 2016; Kumar et al., 2020).

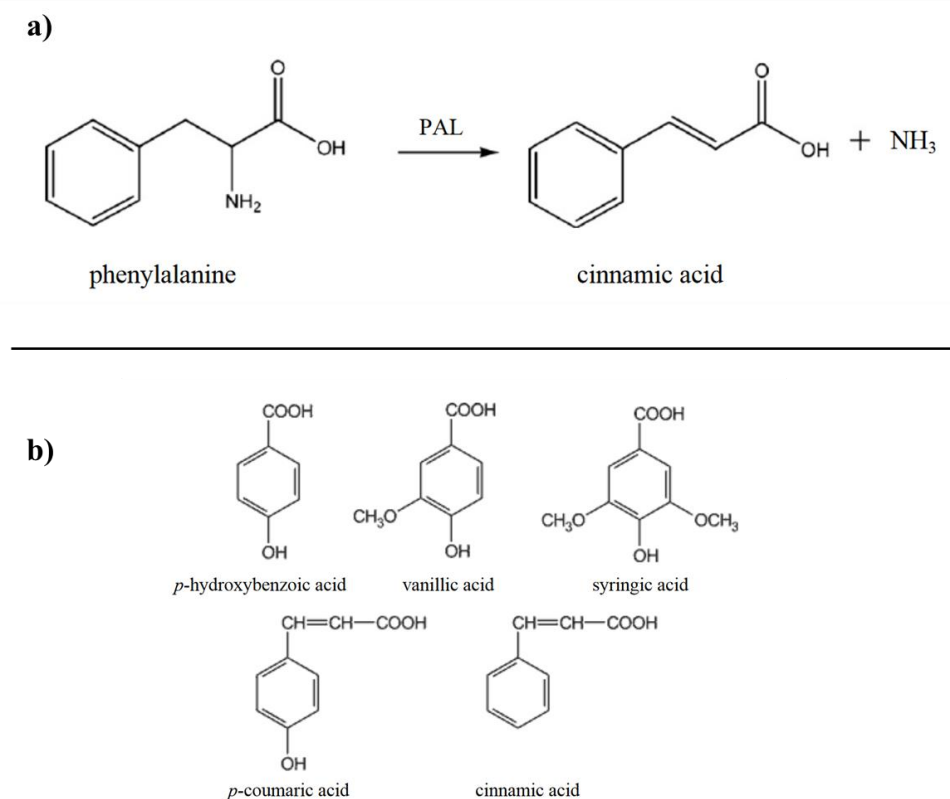


Figura 5: a) Conversión enzimática de la fenilalanina en ácido cinámico por la enzima PAL. b) Ejemplos de compuestos fenólicos simples. Fuente: Balasudram et al., 2006.

Existe una gran variedad de compuestos fenólicos (más de 8.000 tipos diferentes), algunos de ellos están ampliamente extendidos en las plantas, mientras que otros se acumulan de manera específica en ciertas especies o, incluso, en ciertos órganos o momentos de desarrollo (Cheynier, 2012). Esta gran variedad suele estar asociada a los diferentes roles o funciones específicas que tienen en la planta y su ciclo de vida (Jaganath & Crozier, 2010). Entre ellas se incluyen funciones de crecimiento y desarrollo, estructurales en tejidos, defensivas (como agentes alelopáticos, o respuesta frente a estreses abióticos y bióticos), o señalizadoras en las interacciones entre la planta y el entorno (agentes alelopáticos, atrayentes de polinizadores/dispersores de semillas, o de señalización para microorganismos noduladores) (Cheynier, 2012; Jaganath & Crozier, 2010; Kumar et al., 2020; Naikoo et al., 2019).

Está descrito que los estreses abiótico y biótico inducen la acumulación de compuestos fenólicos en muchas plantas superiores (Jaganath & Crozier, 2010). De acuerdo con lo indicado previamente, la salinidad del suelo induce la aparición de estrés osmótico e iónico, que acaban provocando la formación de ROS en la planta (Ilanguvaran & Smith, 2017; Shrivastava & Kumar, 2015). Por ello, las plantas han desarrollado mecanismos enzimáticos (superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa o glutatión reductasa) y no enzimáticos para poder mitigar los

efectos citotóxicos generados por el estrés oxidativo (Kumar et al., 2020). Entre los mecanismos no enzimáticos destaca la producción de compuestos con actividad antioxidante, como los ácidos fenólicos o los flavonoides, que ayudan a equilibrar el efecto de las especies reactivas de oxígeno, quelando los iones redox-activos o neutralizando los radicales libres (Kumar et al., 2020; Naikoo et al., 2019). La acumulación de compuestos fenólicos es considerada una respuesta adaptativa de las plantas a las condiciones ambientales adversas, lo que ha favorecido su aptitud evolutiva (Naikoo et al., 2019).

Los compuestos fenólicos también juegan un papel importante en la calidad de los alimentos, al influir en su color, sabor o textura (por ejemplo, las antocianinas y derivados son responsables del color de frutos rojos, o los taninos de la astringencia en vinos) (Cheynier, 2012). Además, en los últimos años, ha adquirido gran relevancia la investigación de los efectos beneficiosos de los compuestos fenólicos de frutas y verduras sobre la salud humana (Jaganath & Crozier, 2010). En este sentido, se ha definido que estos compuestos poseen una gran variedad de actividades biológicas: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, vasodilatadora, cardioprotectora, anticancerígena y, sobre todo, antioxidante (Balasundram et al., 2006; Kumar et al., 2020). Una ingesta moderada a largo plazo podría modular el metabolismo de forma favorable, previniendo o reduciendo el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad o cáncer (Jaganath & Crozier, 2010; Yahia et al., 2019). Dado que el estrés oxidativo impuesto por las ROS desempeña un papel crucial en fisiopatologías asociadas a ciertas de estas enfermedades, el efecto antioxidante de los compuestos fenólicos ayuda a la prevención o reducción de sus riesgos (Jaganath & Crozier, 2010). Por ejemplo, ciertos flavonoides, como la quercetina, tienen capacidad para inhibir los procesos de iniciación de carcinogénesis, al inhibir las enzimas que activan a ciertos carcinógenos químicos (Yahia et al., 2019).

2.4.1. Evaluación de la actividad biológica en modelos biológicos.

Los polifenoles procedentes de la dieta han sido el centro de atención de numerosos estudios, al estar relacionados con la prevención de diversas patologías crónicas (Balasundram et al., 2006; Kumar et al., 2020). En este sentido, el envejecimiento es un proceso degenerativo causado por diversas fuentes de daño molecular y celular, como es la acumulación de daño oxidativo (Ayuda-Durán et al., 2019a). Por tanto, evaluar la capacidad de los compuestos fenólicos en la modulación del envejecimiento (y sus trastornos y enfermedades asociados)

puede servir de modelo para determinar la actividad biológica (antioxidante) de estos compuestos (Ayuda-Durán et al., 2019a).

Existen diversidad de métodos para la evaluación de la actividad biológica de compuestos fenólicos, desde metodología *in vitro* (DPPH, FRAP, etc.), pasando por cultivos celulares, hasta modelos *in vivo* (Niki, 2010). Entre los modelos *in vivo*, *Caenorhabditis elegans* se ha convertido en un organismo modelo de gran interés en diferentes campos de investigación, gracias a las numerosas ventajas que presenta. *Caenorhabditis elegans* es un nematodo de vida libre del suelo perteneciente a la familia Rhabditidae, que presenta un tamaño pequeño (1 mm en fase adulta), un ciclo de vida corto (aproximadamente 3,5 días para llegar a fase adulta y vida media de 18-20 días a 20 °C), autofertilización con alta tasa de reproducción (al ser hermafroditas), y un sistema de órganos y tejidos bien definido (sistema reproductor, digestivo, inmune, nervioso, y secretor) (Ayuda-Durán et al., 2019a; Olsen et al., 2006). Su genoma es pequeño y está completamente secuenciado, además, se estima que entre el 60-80 % de los genes tienen un ortólogo en humanos (Ayuda-Durán et al., 2019a; Shen et al., 2018). Asimismo, su cultivo en laboratorio es barato y sencillo (por su vida corta y su alimentación con bacterias), y se dispone de una amplia colección de mutantes y gusanos transgénicos, así como de herramientas genéticas desarrolladas para el trabajo con este gusano (Ayuda-Durán et al., 2019a; Shen et al., 2018). También cabe destacar que, al ser invertebrado, no existen límites éticos a su uso experimental (Ayuda-Durán et al., 2020).

El ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans* es adecuado para realizar estudios de longevidad (Ayuda-Durán et al., 2020; Olsen et al., 2006). Un ciclo de vida completo de *Caenorhabditis elegans* (Figura 6), hasta la formación del individuo adulto, dura aproximadamente 3,5 días a 20 °C y comprende un estado embrionario y 4 estados larvarios (L1-L2-L3-L4). Bajo condiciones desfavorables (comida insuficiente, sobrepoblación, o temperaturas muy bajas/altas) el nematodo desarrolla un estado larvario conocido como larva *dauer*, que se caracteriza por una cutícula especializada y una ralentización del metabolismo (Ayuda-Durán et al., 2020; Shen et al., 2018).

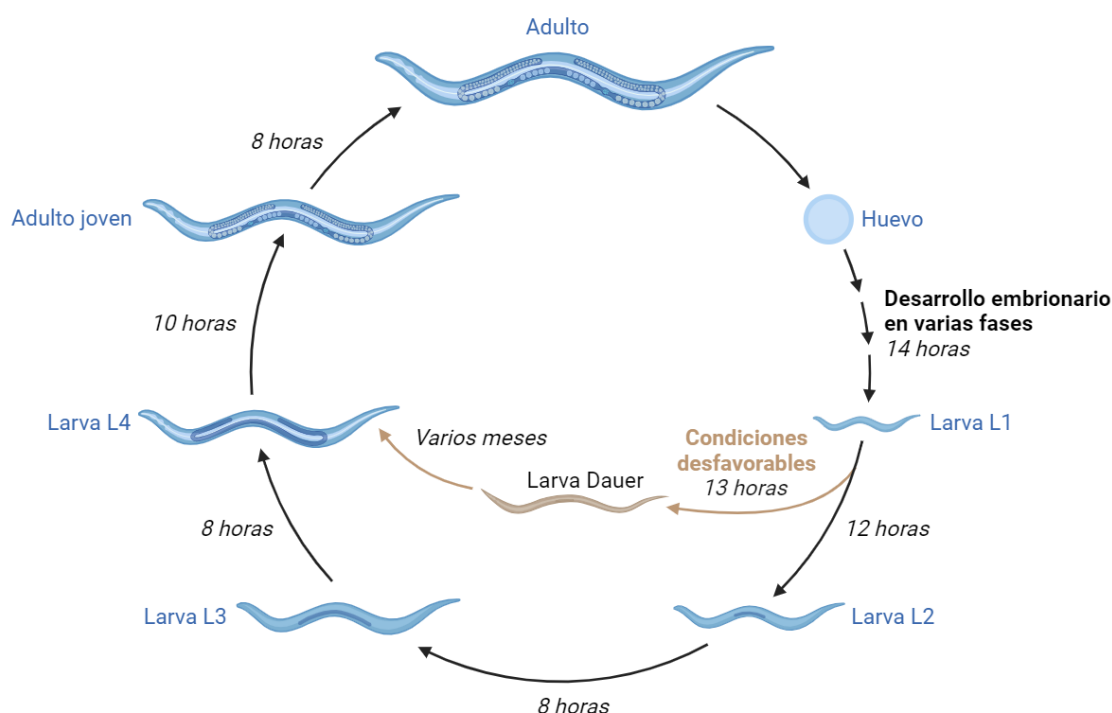


Figura 6: Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans* a 22 °C. Fuente: Elaboración propia.

Gracias a estas características, dicho nematodo se ha utilizado para estudiar el proceso de envejecimiento, así como para comprobar los efectos biológicos de los compuestos fenólicos (o de extractos ricos en ellos) sobre la supervivencia y la resistencia al estrés (Ayuda-Durán et al., 2019a). Así, el enfoque más directo para explorar la actividad antioxidante sobre *Caenorhabditis elegans* consiste en someterlo a un desafío oxidativo, inducido por estreses químicos o físicos (por ejemplo, temperaturas de 35 °C), después de ser expuesto a la sustancia con dicha actividad (Ayuda-Durán et al., 2020). De esta manera, puede evaluarse la capacidad del compuesto para reducir el estrés oxidativo analizando la supervivencia de los gusanos en diferentes momentos de su ciclo de vida (Ayuda-Durán et al., 2019a; Ayuda-Durán et al., 2020; Kampkötter et al., 2007).

2.5. Efectos negativos de la salinidad sobre los cultivos hortícolas.

Los cultivos hortícolas suponen una parte fundamental de la dieta humana, y tienen una gran influencia sobre nuestra salud. Como ha sido comentado anteriormente, constituyen una fuente saludable de nutrientes y compuestos nutraceuticos, como es el caso de compuestos bioactivos con actividad antioxidante (Yahia et al., 2019). Además, este tipo de cultivos presentan un gran valor económico gracias a su gran rendimiento por unidad de superficie (Niu et al., 2019). Sin embargo, frente al contexto climático al que nos enfrentamos, conseguir alcanzar una elevada productividad de manera sostenible entraña un reto de gran importancia, especialmente en

zonas áridas y semiáridas donde, además, se concentra gran parte de esta producción hortícola (MAPA, 2023; Safdar et al., 2019; Zaman et al., 2018).

La sensibilidad a la sal de los cultivos hortícolas suele ser alta, aunque depende de diferentes factores, como: el estado de crecimiento del cultivo, o la especie y variedad utilizadas. Por ejemplo, durante la fase de plántula (germinación y emergencia), la sensibilidad al estrés abiótico es mayor que en fase adulta (Niu; 2019; Zörb et al., 2019). Por otro lado, cada especie hortícola presenta un umbral de tolerancia a la salinidad. La lechuga (*Lactuca sativa* L.) se clasifica como una especie sensible a la salinidad, con un umbral de tolerancia alrededor de 1,3 dS/m (Maas, 1993; Maas & Grattan, 1999; Villalobos-Martín et al., 2017). Lo mismo ocurre con el apio (*Apium graveolens* L.), cuyo umbral es 1,8 dS/m y, por lo tanto, también es considerado sensible a la salinidad (Maas, 1993; Maas & Grattan, 1999; Villalobos-Martín et al., 2017). Al no ser un cultivo mayoritario, la disponibilidad de información sobre el canónigo es reducida, pero un estudio reciente lo considera como moderadamente sensible a la salinidad por NaCl, al presentar reducción del crecimiento bajo concentraciones de 20 mM NaCl (alrededor de 2 dS/m) (Voutsinos-Frantzis et al., 2023). Asimismo, dentro de una misma especie, las distintas variedades o cultivares utilizados también pueden tener diferentes niveles de tolerancia a la salinidad (Adhikari et al., 2021; Mahmoudi et al., 2010).

3. Alternativas en la agricultura frente al estrés salino.

Teniendo en cuenta el contexto planteado previamente, la salinidad plantea graves amenazas, tanto a nivel ambiental y ecosistémico, como a nivel agrícola y económico. Por esta razón, la búsqueda de alternativas que permitan hacer frente a este problema supone una necesidad urgente, ya sea mediante la adaptación y mitigación de los efectos negativos, o la gestión, mejora, rehabilitación o recuperación de los suelos afectados (Hayat et al., 2020; Zaman et al., 2018). El enfoque tradicional se ha basado, principalmente, en dos alternativas: las prácticas de gestión adecuada y el fitomejoramiento (Hayat et al., 2020; Jamil et al., 2011). La primera es una aproximación tecnológica que consiste en la aplicación de planes de ingeniería para la recuperación, el drenaje y el riego con agua de alta calidad, como, por ejemplo: aplicación de enmiendas orgánicas e inorgánicas (como compost o yeso), fertilización, o estrategias de lixiviación y recarga (Hayat et al., 2020; Mukhopadhyay et al., 2021; Safdar et al., 2019). Este enfoque puede ser eficaz, aunque depende, en gran medida, de las condiciones fisicoquímicas del suelo o el estado de las aguas subterráneas, por lo que suele tener unos costes asociados muy elevados y suele proporcionar una solución temporal al problema al inducir un aumento

de la salinización secundaria a largo plazo (Hayat et al., 2020; Jamil et al., 2011). La segunda aproximación está basada en la selección de especies halotolerantes, o el desarrollo de cultivos tolerantes a la salinidad, bien mediante métodos tradicionales de mejora, o bien mediante el desarrollo de ingeniería genética (cultivos transgénicos) (Hayat et al., 2020; Jamil et al., 2011; Safdar et al., 2019). Sin embargo, hay que tener en cuenta la complejidad fisiológica y genética de los mecanismos de tolerancia de las plantas a la salinidad, así como la influencia de otros factores sobre estos mecanismos (como la etapa de desarrollo de la planta, o las condiciones ambientales externas), que hacen que este enfoque sea caro y de lento desarrollo (Hayat et al., 2020; Jamil et al., 2011; Shrivastava & Kumar, 2015).

El elevado coste y tiempo requeridos para el desarrollo de estas estrategias no se traducen en una gestión eficiente del problema. Por tanto, es necesaria la búsqueda de alternativas que permitan gestionar el impacto de la salinidad de una manera barata, rápida, y ambientalmente sostenible. En este sentido, la utilización de microorganismos beneficiosos para las plantas ha emergido en los últimos años como una estrategia de gran interés para mitigar los efectos del estrés salino sobre los cultivos (Ilanguvaran & Smith, 2017; Hayat et al., 2020; Shrivastava & Kumar, 2015).

3.1. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB).

La microbiota del suelo es definida como la comunidad de microorganismos que habitan en el suelo, formada, entre otros, por bacterias, arqueas, hongos, protozoos, oomicetos, microalgas, o virus, y es considerada un factor fundamental para los sistemas agrícolas (Santoyo et al., 2021a). Los microorganismos del suelo constituyen menos del 0,5 % (p/v) de la masa del suelo, pero juegan un papel clave en sus propiedades, por ejemplo, al ser una parte esencial de los ciclos biogeoquímicos (Yan et al., 2015). Dentro de este sistema, las plantas presentan una gran variedad de interacciones ecológicas con estos organismos: mutualistas, simbióticas, neutras, comensalistas, competitivas, entre otras (Jacoby et al., 2017). En esta compleja interacción, las especies vegetales pueden influir en la microbiota del suelo mediante la liberación de exudados radiculares, o ser las comunidades microbianas las que induzcan cambios en la liberación de estos metabolitos vegetales (Hakim et al., 2021; Jacoby et al., 2017). Por lo tanto, los microorganismos del suelo deben considerarse dentro de los análisis de los sistemas agrarios, ya que una microbiota adecuada es un factor esencial para favorecer el desarrollo de las plantas, al facilitar nutrientes o, incluso, prevenir diversos estreses bióticos o abióticos (García-Fraile et al., 2015; Jacoby et al., 2017; Yan et al., 2015).

Dentro de los microorganismos del suelo capaces de interactuar positivamente con las plantas encontramos las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o PGPB (del inglés *Plant Growth Promoting Bacteria*), que son bacterias capaces de promover el crecimiento de las plantas, así como su inmunidad, a través de diversos mecanismos (directos y/o indirectos), denominados mecanismos PGP (García-Fraile et al. 2015; Shrivastava & Kumar, 2015). Estos microorganismos pueden encontrarse en la rizosfera (PGPR: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), la parte del suelo influenciada por las raíces de las plantas y sus exudados, o establecerse en el interior de las plantas formando relaciones más directas (endófitos) (García-Fraile et al. 2015; Ilangumaran & Smith, 2017; Menéndez & García-Fraile, 2017; Santoyo et al., 2021a). La mayoría de las bacterias endofíticas viven en los espacios intercelulares de la planta huésped, sin embargo, hay algunas bacterias capaces de penetrar en el interior de las células vegetales e, incluso, generar estructuras especializadas como, por ejemplo, los nódulos formados por los *rhizobia* en leguminosas (García-Fraile et al. 2015; Ilangumaran & Smith, 2017; Menéndez & García-Fraile, 2017).

Dado el contexto climático actual que amenaza la seguridad alimentaria, así como el aumento de la población mundial y su demanda asociada de alimentos, es necesaria la búsqueda de alternativas sostenibles que permitan mantener el nivel productivo y reducir los problemas de la agricultura intensiva, incluso bajo condiciones ambientalmente estresantes (Menéndez & García-Fraile, 2017). En este sentido, en los últimos años ha aumentado el uso de biofertilizantes bacterianos, es decir, productos formulados con PGPB, capaces de aumentar la productividad, el contenido nutricional e, incluso, aliviar o mitigar los estreses ambientales de los cultivos, pudiendo mejorar, a su vez, la calidad de los suelos (Ayuso-Calles et al., 2021; García-Fraile et al., 2015; Ilangumaran & Smith, 2017; Rashid et al., 2016). En la actualidad se han aislado y caracterizado gran cantidad de cepas PGPB pertenecientes a diversos géneros bacterianos: *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Frankia*, *Herbaspirillum*, *Mesorhizobium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces*, etc. (Flores-Félix et al., 2013; Flores-Félix et al., 2015b; García-Fraile et al., 2012; García-Fraile et al., 2015; Jiménez-Gómez et al., 2020; Mellidou & Karamanoli, 2022; Menéndez & García-Fraile, 2017; More et al., 2022). Además, diversas compañías fabrican y venden biofertilizantes por todo el mundo, comercializándose diferentes cepas o consorcios bacterianos bajo diversos tipos de formulaciones (líquidas, en polvo, granuladas, o recubrimiento de semillas), tal y como analizan García-Fraile y colaboradores (García-Fraile et al., 2015; García-Fraile et al., 2017).

Las bacterias PGP, por tanto, desempeñan un papel crucial en el desarrollo de las plantas, la tolerancia al estrés y la prevención de enfermedades, gracias a un amplio rango de mecanismos PGP (Figura 7) (García-Fraile et al., 2015; García-Fraile et al., 2017; Glick, 2012; Menéndez & García-Fraile, 2017; More et al., 2022; Santoyo et al., 2021a). Según el modo de acción, estos mecanismos se han clasificado en directos e indirectos. Como mecanismos directos se establecen aquellos que directamente afectan al crecimiento vegetal (facilitando la adquisición de nutrientes o modulando los niveles hormonales de las plantas). Mientras que se consideran mecanismos indirectos a aquellos que disminuyen los efectos inhibidores de diversos agentes patógenos sobre el crecimiento y desarrollo vegetal, estimulan el sistema inmunitario de las plantas, cambian las propiedades fisicoquímicas de la rizosfera, o reducen la susceptibilidad a estreses (Glick, 2012; More et al., 2022; Santoyo et al., 2021a).

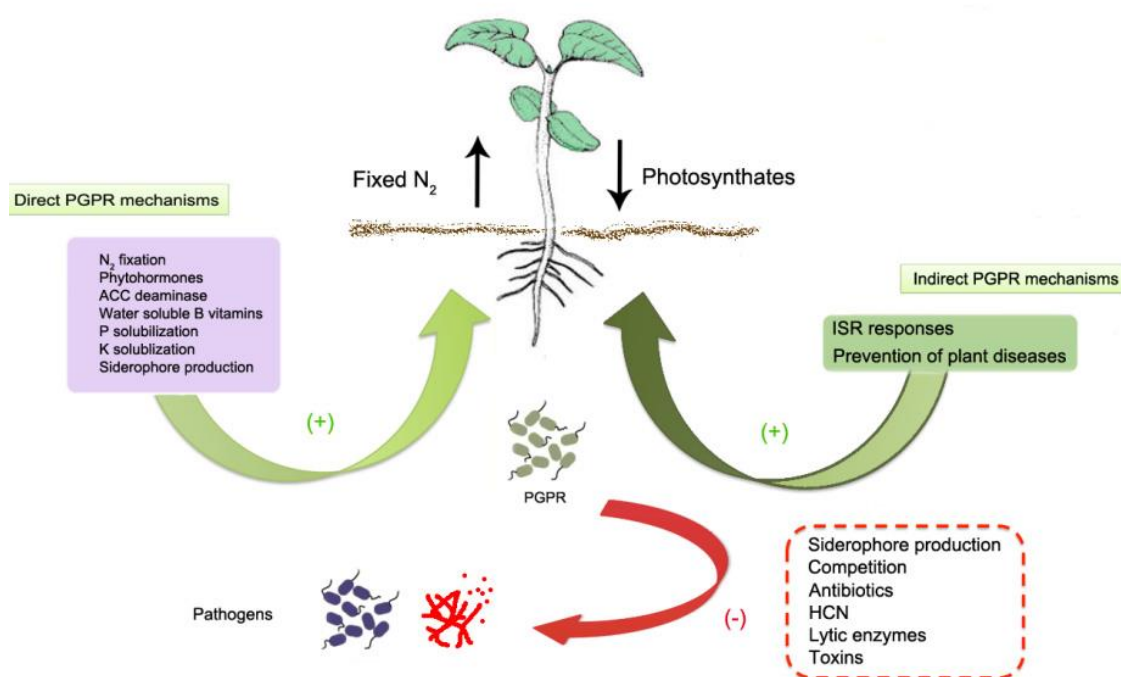


Figura 7: Resumen de diversos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de las PGPBs. Fuente: García-Fraile et al., 2015.

3.1.1. Mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal.

3.1.1.1. Fijación Biológica del Nitrógeno.

El nitrógeno es el nutriente más limitante para el desarrollo de las plantas, ya que es necesario para la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y compuestos orgánicos (García-Fraile et al., 2015; Menéndez & García-Fraile, 2017). Sin embargo, a pesar de representar casi el 80 % de los gases presentes en la atmósfera (N_2), sólo es accesible para las plantas en formas de amonio

o nitrato presentes en el suelo, a través de las raíces (Hakim et al., 2021). El proceso por el que el nitrógeno atmosférico es transformado en formas orgánicas asimilables para eucariotas se conoce como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y, hasta la fecha, se creía que era un mecanismo exclusivo de algunos procariotas (García-Fraile et al., 2015; Hakim et al., 2021; Menéndez & García-Fraile, 2017). No obstante, Coale y colaboradores (2024) han informado del proceso por el cual una cianobacteria fijadora de N_2 ha evolucionado más allá de la endosimbiosis con un alga marina unicelular, actuando como un orgánulo fijador de N_2 o “nitroplasto” en una etapa evolutiva temprana.

La FBN se realiza gracias a la acción de un complejo enzimático, denominado complejo nitrogenasa, que es sumamente sensible a la presencia de oxígeno, y cuya expresión es regulada por los genes *nif* (Glick, 2012; Hakim et al., 2021). Los microorganismos capaces de realizar la FBN se conocen como diazotrofos, y se categorizan en: i) fijadores de vida libre o no simbióticos o ii) simbióticos. Entre los fijadores en vida libre encontramos miembros de diferentes géneros bacterianos, como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Gluconoacetobacter* o *Herbaspirillum* (Pi et al., 2024). Se han descrito que diferentes cepas de estos géneros actúan como fijadores de nitrógeno en vida libre, lo que provoca una promoción del crecimiento vegetal de diferentes cultivos, como arroz (Sahoo et al., 2014), caña de azúcar (Tejera et al., 2005), o maíz (Puri et al., 2016).

Por otra parte, ciertas bacterias diazotróficas son capaces de establecer relaciones mutualistas (simbióticas) como ocurre con los *rhizobia* (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, etc.) y las leguminosas, *Frankia* y plantas actinorrícicas, o cianobacterias con las cicadáceas, llevando a cabo la FBN en el interior de las mismas (García-Fraile et al., 2015; Menéndez & García-Fraile, 2017). La nodulación de los *rhizobia* en leguminosas ha sido ampliamente descrita, e implica la invasión bacteriana a través de la epidermis de la raíz y la posterior organogénesis del nódulo (Sharma et al., 2020). La infección de los *rhizobia* sobre el sistema radicular puede tener lugar a través de la entrada por grietas o heridas naturales en la base de la raíz (*crack entry*), aunque el mecanismo más común suele ser la infección a través de pelos radiculares, como ocurre en leguminosas como *Trifolium* sp., *Pisum* sp. o *Medicago* sp. (Figura 8) (Mendoza-Suárez et al., 2021; Sharma et al., 2020). El proceso comienza con un diálogo molecular específico entre la planta y los microorganismos, que permite la adhesión de los *rhizobia* a la superficie de los pelos radiculares; posteriormente tiene lugar la infección, la cual induce la formación de la estructura especializada (nódulo) por parte de la planta, dentro de la cual se encontrarán los microorganismos fijadores de nitrógeno

atmosférico, en estado de bacteroides (formas diferenciadas y especializadas de las bacterias en las que fijan nitrógeno atmosférico dentro de los nódulos) (Hakim et al., 2021; Mendoza-Suárez et al., 2021; Perret et al., 2000; Sharma et al., 2020).

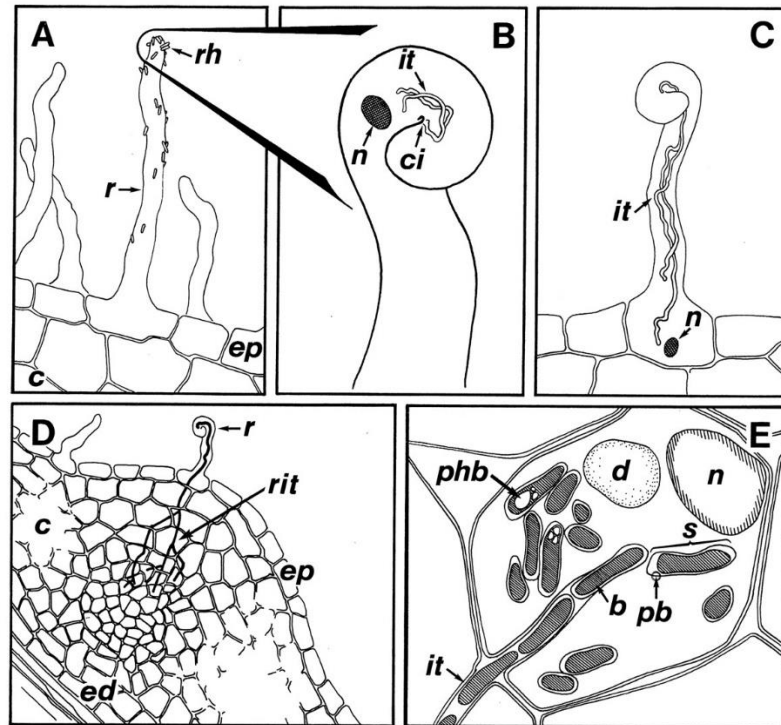


Figura 8: (A) Bacterias del género *Rhizobium* adheriéndose al pelo radicular. (B) Factores *nod* (lipochitooligosacáridos) inducen la curvatura del pelo radicular y permiten la penetración bacteriana, y el inicio del desarrollo del canal de infección. (C) El canal de infección alcanza la base del pelo radicular. (D) El canal de infección se ramifica y alcanza el primordio nodular. (E) Liberación de las bacterias al primordio y transformación en bacteroides. Fuente: Perret et al., 2000.

3.1.1.2. Solubilización de fosfato.

El fósforo (P) es un elemento químico necesario para muchos procesos metabólicos, y se considera el segundo nutriente esencial para las plantas, después del nitrógeno (N) (Hakim et al., 2021; More et al., 2022). El suelo es un gran reservorio de P, no obstante, la mayor parte se encuentra en formas insolubles y, por tanto, no disponibles para las plantas, por lo que actúa como factor limitante para su crecimiento (Glick, 2012). En consecuencia, la agricultura tradicional ha aplicado fertilizantes químicos con P de forma exógena. Sin embargo, este P del fertilizante precipita rápidamente a formas insolubles, lo que obliga a aplicar un exceso de producto, dando lugar problemas económicos y ambientales (Hakim et al., 2021; Menéndez & García- Fraile, 2017).

La literatura científica establece que una gran variedad de microorganismos presentan mecanismos para solubilizar P, formando parte esencial del ciclo del fósforo y actuando como una alternativa frente a esta problemática. Entre ellos, las bacterias que presentan esta capacidad se conocen como bacterias solubilizadoras de fósforo o PSB (*P-Solubilizing Bacteria*) (Hakim et al., 2021; Menéndez & García-Fraile, 2017). El principal mecanismo utilizado para la solubilización de P es la producción de ácidos orgánicos (ácido acético, cítrico, málico, succínico, etc.), que forman complejos con cationes unidos a los grupos fosfato, convirtiendo estos en formas solubles para las plantas (HPO_4^{-2} o H_2PO_4) (Glick, 2012; Hakim et al., 2021). Además, la síntesis de diferentes enzimas fosfatasas (ácidas o alcalinas) da lugar a la mineralización del fósforo orgánico, de manera que el P orgánico insoluble del suelo también pase a estas formas solubles (Glick, 2012; Hakim et al., 2021). Diferentes cepas de varios géneros como *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Deftia*, *Azotobacter*, *Pantoea* o *Flavobacterium* han sido descritas como eficientes solubilizadoras de fosfato (García-Fraile et al., 2015; Hakim et al., 2021; Mellidou & Karamanoli, 2022; Menéndez & García-Fraile, 2017; More et al., 2022), encontrándose aumentos de más del 15 % en la disponibilidad de P en la rizosfera gracias a la inoculación con PSB (Rasul et al., 2019; Suleman et al., 2018).

3.1.1.3. Solubilización de potasio.

El potasio (K) es el tercer macronutriente esencial para el crecimiento vegetal, tras el nitrógeno y el fósforo, y está presente en el suelo en forma de minerales de silicato y rocas insolubles (solo entre el 1 y 2 % es soluble para las plantas) (Don & Diep, 2014; More et al., 2022). La aplicación de fertilizantes químicos con K es una de las principales fuentes de este macronutriente para las plantas, pero son productos caros y su uso excesivo puede dar lugar a grandes costes económicos, ambientales y productivos (su aplicación excesiva reduce la absorción de magnesio) (Wang et al., 2022).

Al igual que en el caso del P, las interacciones bacteria-suelo-planta juegan un papel importante en el ciclo del K (Don & Diep, 2014). Las bacterias solubilizadoras de potasio se conocen como *K-Solubilizing Bacteria* o KSB (Menéndez & García-Fraile, 2017), y el principal mecanismo de acción descrito es la producción de ácidos orgánicos e inorgánicos (ácido glucónico, oxálico, succínico, cítrico, tartárico etc.), que da lugar a una disminución del pH (lo que puede provocar la disolución del K mineral) y un aumento de la quelación de cationes unidos al K (Meena et al., 2016). Aunque la producción de polisacáridos también puede ayudar en la disolución de

minerales, liberando potasio (Meena et al., 2016). Entre los taxones más abundantes de KSB encontramos bacterias Gram +, de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Niallia*, *Microbacterium* o *Arthrobacter*, aunque también aparecen bacterias Gram – de géneros como *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, o *Frateuria* (Meena et al., 2016; Menéndez & García-Fraile, 2017; García-Fraile et al., 2015). Por ejemplo, la aplicación de una cepa KSB del género *Bacillus* dio lugar a un aumento del 18 % del K disponible en el suelo (Wang et al., 2022), por otra parte, la aplicación de una cepa perteneciente al género *Klebsiella* provocó un aumento del 22 % aplicada sola y del 52 % aplicada junto a feldespato potásico (Zhang & Kong, 2014).

3.1.1.4. Producción de sideróforos.

A pesar de que el hierro (Fe) es un elemento abundante en la corteza terrestre, su disponibilidad para las plantas es baja. En suelos neutros o básicos la forma más común del hierro es Fe^{3+} (el Fe^{2+} suele oxidarse a Fe^{3+} en presencia de oxígeno y pH neutro), que tiende a formar óxidos e hidróxidos insolubles e inaccesibles para las plantas (Ferreira et al., 2019; Glick, 2012; Hakim et al., 2021). Los organismos rizosféricos requieren elevadas cantidades de hierro, al ser un micronutriente esencial para el desarrollo de proteínas o la regulación de procesos metabólicos, entre otros. Sin embargo, su baja disponibilidad y la competencia entre los organismos del suelo hacen que sea un factor limitante (Glick, 2012; Hakim et al., 2021). Por ello, las plantas, bacterias y hongos han desarrollado estrategias para la movilización y absorción de este nutriente esencial, como es la producción de sideróforos.

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular (< 1500 Da) con alta afinidad por el Fe^{3+} , que forman complejos con el Fe libre permitiendo su transporte a interior celular a través de sistemas de captación específicos (Glick, 2012). Los sideróforos bacterianos se dividen en tres categorías principales, hidroxamatos, catecolatos y carboxilatos, dependiendo del grupo funcional utilizando para formar complejos con el Fe (Hakim et al., 2021). Además, los sistemas de captación entre bacterias Gram + y Gram – son distintos, debido a las diferencias estructurales de la membrana celular (Ferreira et al., 2019).

Aunque las plantas son capaces de obtener este oligoelemento a través de diversas vías, algunas de ellas derivadas de la producción de sideróforos, una estrategia complementaria, pero importante, es la absorción de hierro mediada por microorganismos (Ferreira et al., 2019). Si bien estos mecanismos no están del todo claros, la absorción del Fe podría producirse cuando los receptores específicos presentes en la membrana celular de las raíces reconocen el complejo Fe-sideróforo microbiano, siendo captado por las células vegetales (Ferreira et al., 2019; Hakim

et al., 2021). Así, el uso de sideróforos microbianos radiomarcados ha permitido analizar las estrategias usadas por las plantas para absorber Fe procedente de sideróforos microbianos, confirmando lo anteriormente expuesto (Duijff et al., 1994; Yehuda et al., 1996). También se ha observado que la limitación de hierro puede provocar cambios en la composición de los exudados radiculares que, a su vez, favorecen las comunidades microbianas productoras de sideróforos (Jin et al., 2010). Además, se han descrito cepas rizobianas y endofíticas capaces de producir sideróforos y promover el crecimiento vegetal de lechuga (Ayuso-Calles et al., 2023; Flores-Félix et al., 2013), tomate y pimiento (García-Fraile et al., 2012), fresa (Flores-Félix et al., 2015b) o la lila (Verma et al., 2011). Es por ello por lo que la producción de sideróforos por PGPB se considera un mecanismo directo.

3.1.1.5. Síntesis de fitohormonas.

Las fitohormonas son sustancias que actúan como mensajeros químicos a concentraciones bajas (< 1 mM) e influyen en las funciones fisiológicas de las plantas, al promover o inhibir el crecimiento y desarrollo vegetal (Hakim et al., 2021; More et al., 2022). Las hormonas vegetales desempeñan un papel clave en la respuesta de la planta a su entorno, por ejemplo, ante condiciones ambientales adversas el ajuste de los niveles hormonales permite disminuir los efectos negativos a los que se encuentra sometida la planta (Glick, 2012). Tradicionalmente, las fitohormonas se han dividido en cinco clases diferentes, auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Aunque existen otras hormonas vegetales que también desempeñan funciones importantes en el crecimiento y desarrollo de las plantas, especialmente en condiciones de estrés biótico y abiótico, como el jasmonato, los brasinoesteroides y el ácido salicílico (Hakim et al., 2021). Una amplia variedad de bacterias rizosféricas son capaces de sintetizar fitohormonas y, por tanto, alterar los niveles hormonales de las plantas, facilitando su crecimiento o induciendo una respuesta frente al estrés ambiental (Glick, 2012; Hakim et al., 2021).

Las auxinas son un tipo de fitohormonas que influyen en una amplia variedad de procesos de desarrollo de las plantas, al coordinar diferentes funciones de las células vegetales: tamaño, división y diferenciación. Estas moléculas tienden a concentrarse en los meristemos y los tejidos jóvenes de las hojas (Li & Chen, 2023). La auxina más común y estudiada es el ácido indol-3-acético (*indoleacetic acid* o IAA). En las plantas, el IAA desempeña un papel importante en la dominancia apical, la división y la diferenciación celular, así como en la germinación de las semillas, el desarrollo radicular, la respuesta a estímulos externos (luz o gravedad), la

fotosíntesis, la producción de metabolitos, o la resistencia al estrés (Ayuso-Calles et al., 2021; Glick, 2012; Hakim et al., 2021). Muchas bacterias PGPB son capaces de producir IAA, principalmente a través de vías biosintéticas que tienen el triptófano como precursor, como las vías del ácido indol-3-pirúvico, aldehído indol-3-acético, o indol-3-acetamida (Hakim et al., 2021; Pantoja-Guerra et al., 2023). Se ha demostrado que existe una correlación entre la producción bacteriana de IAA y la modificación del estado hormonal de la planta, que tiene efectos positivos sobre su crecimiento y desarrollo radicular. Esto se ha comprobado mediante la inoculación con cepas mutadas deficientes en IAA y la aplicación de IAA exógeno (Dobbelaere et al., 1999; Remans et al., 2008). Además, en diversas revisiones se establece que cepas productoras de IAA pertenecientes a numerosos géneros bacterianos (*Rhizobium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Priestia*, *Azospirillum*, *Streptomyces*, etc.) son capaces de mejorar el desarrollo vegetal de diferentes cultivos e, incluso, mitigar los efectos de estreses abióticos (como la salinidad) (Ayuso-Calles et al., 2021; García-Fraile et al., 2015; Menéndez & García-Fraile, 2017). Esta fitohormona puede tener efectos beneficiosos sobre las plantas cuando se encuentra en niveles óptimos, pero cantidades excesivas de esta auxina pueden causar toxicidad, como se ha observado al analizar el modo de acción de algunos microorganismos fitopatógenos (Ayuso-Calles et al., 2021; García-Fraile et al., 2015; Menéndez & García-Fraile, 2017; Pantoja-Guerra et al., 2023).

Las citoquininas son importantes moléculas de señalización que intervienen en la regulación del crecimiento y el desarrollo de las plantas (Hakim et al., 2021). Su estructura es similar a la de la adenina, siendo la forma más común de esta fitohormona la zeatina (Orozco-Mosqueda et al., 2023). Estas hormonas vegetales desempeñan un papel crucial en diversos procesos fisiológicos y de desarrollo, como la división celular, dominancia apical, la germinación de semillas, la formación de nódulos, el desarrollo de flores y frutos, la elongación de raíces, el desarrollo vascular y las interacciones planta-patógeno (Orozco-Mosqueda et al., 2023). Ciertas cepas con capacidades PGP son capaces de sintetizar citoquininas, además, se cree que las liberan a la rizosfera, aumentando su contenido en la solución del suelo y pudiendo estimular el desarrollo vegetal (Hakim et al., 2021). Por ejemplo, se ha comprobado el efecto beneficioso de una cepa de *Pseudomonas* productora de citoquininas sobre el crecimiento y la tolerancia a la sequía de plantas de tomate, al compararla con esta cepa mutante deficiente en la síntesis de citoquininas (Mekureyaw et al., 2022). También se han aislado otras bacterias rizosféricas productoras de citoquininas que generan efectos positivos sobre el crecimiento y la mitigación

del estrés hídrico, como el caso de *Bacillus subtilis* sobre *Platycladus orientalis* L. (Liu et al., 2013).

Las giberelinas son hormonas vegetales derivadas del hidrocarburo ent-kuareno, que cumplen diversas funciones en el ciclo de vida de las plantas: germinación de las semillas, crecimiento de tallos y hojas, inducción de la floración, crecimiento de los frutos, o retraso de la senescencia (Maheshwari et al., 2015). Al igual que con las auxinas y citoquininas, algunas bacterias también son capaces de sintetizar giberelinas, aunque no se tiene muy clara su función en procariotas, pero podría estar relacionada con la interacción entre bacteria y planta (Hakim et al., 2021). Diversos estudios han evidenciado la estimulación del crecimiento y la mejora del rendimiento en diferentes cultivos gracias a la aplicación de bacterias productoras de giberelinas o los extractos producidos por estas bacterias, como: *Bacillus licheniformis* y *pumilis* sobre *Pinus pinea* L. (Probanza et al., 2002), *Sphingomonas* en tomate (Khan et al., 2014), *Pseudomonas* sobre soja (Kang et al., 2014b), o *Leifsonia* en plantas de pepino, tomate y rábano (Kang et al., 2014a).

3.1.2. Mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal.

3.1.2.1. Sustancias inhibitorias extracelulares.

Diversas bacterias PGP son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de otros organismos, como antibióticos, sideróforos, enzimas que degradan la pared celular (celulasas, quitinasas, proteasas, o glucanasas), o ácido cianhídrico (Jacob & Sudini, 2016; Kundan et al., 2015; Menéndez & García-Fraile, 2017).

Por una parte, los antibióticos son metabolitos secundarios muy diversos químicamente y producidos por microorganismos que matan o inhiben el crecimiento de otros microbios. El género *Streptomyces* es considerado uno de los principales productores de antibióticos, aunque dentro de los géneros *Bacillus* o *Pseudomonas* hay diversidad de cepas productoras de estos metabolitos (Hakim et al., 2021; Jacob & Sudini, 2016; Menéndez & García-Fraile, 2017). Por otra parte, las enzimas líticas degradan componentes de la pared celular de bacterias y, sobre todo, hongos, por lo que su producción es considerada un mecanismo efectivo de biocontrol (Hakim et al., 2021; Jacob & Sudini, 2016; Menéndez & García-Fraile, 2017). El ácido cianhídrico (HCN) también es un metabolito secundario utilizado como agente de inhibición de otros organismos (biocontrol), al inhabilitar el suministro de energía en la célula u otros procesos enzimáticos (Kundan et al., 2015). Además, la síntesis de sideróforos no solo se considera un mecanismo PGP directo, sino que también es considerada un mecanismo PGP

indirecto, al reducir la disponibilidad de hierro en el suelo suponiendo una forma de competencia con otros microorganismos, como los patógenos (Jacob & Sudini, 2016). Existe un elevado número de cepas bacterianas productoras de sustancias inhibitorias extracelulares, entre ellas destacan las pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, ya que poseen un amplio metabolismo secundario (Jacob & Sudini, 2016; Kundan et al., 2015; Menéndez & García-Fraile, 2017).

3.1.2.2. Síntesis de ACC-desaminasa.

El etileno es una fitohormona sintetizada en respuesta al estrés biótico y abiótico, y cuya sobreproducción da lugar a la inhibición del crecimiento de la planta (Arora et al., 2011). Algunas bacterias PGP pueden influir en el ciclo del etileno mediante la producción de ACC-desaminasa, una enzima involucrada en la degradación del ácido 1-aminociclopropano-2-carboxílico (ACC), precursor de la síntesis de esta fitohormona (Arora et al., 2011; Vaishnav et al., 2016b). La ACC-desaminasa convierte el ACC en amoníaco y α -cetobutirato, utilizados como posibles fuentes de N y C para las bacterias, inhibiendo así la síntesis de etileno (Vaishnav et al., 2016b). De esta manera, las bacterias productoras de ACC-desaminasa pueden mitigar los síntomas del estrés e impulsar el desarrollo vegetal, reduciendo los niveles de esta hormona del estrés y evitando la inhibición del crecimiento asociada, como confirman diversos trabajos (Ali et al., 2014; Nadeem et al., 2009; Orozco-Mosqueda et al., 2019).

3.1.2.3. Producción de exopolisacáridos.

Los polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos (EPS) son polímeros orgánicos complejos y de alto peso molecular sintetizados por una amplia variedad de bacterias, que forman parte de las biopelículas bacterianas (*biofilms*) y presentan diversas funciones (More et al., 2022). Tienen un papel fundamental en: la adhesión a superficies bióticas y abióticas, la defensa frente a condiciones ambientales desfavorables (pH, temperatura, salinidad, etc.), o la interacción con las raíces vegetales y sus procesos asociados (Ayuso-Calles et al., 2021). Indirectamente pueden favorecer el crecimiento vegetal, al influir positivamente sobre las condiciones del suelo y mejorar su estructura. Está demostrado que la producción de polisacáridos microbianos favorece la agregación y adhesión de las partículas del suelo en microagregados, lo que da lugar a un aumento de su porosidad y aireación, y mejora su capacidad de retención de agua (Ayuso-Calles et al., 2021; More et al., 2022; Qurashi & Sabri, 2012).

3.1.2.4. Producción de compuestos orgánicos volátiles.

Los compuestos orgánicos volátiles o VOCs (del inglés *Volatile Organic Compounds*) son sustancias químicas que contienen carbono, que pueden ser emitidos por las PGPBs, y que tienen masas moleculares y puntos de ebullición bajos (Ayuso-Calles et al., 2021). Entre los volátiles bacterianos más comunes encontramos alcoholes, cetonas, aldehídos, y sulfuros, aunque la naturaleza y la cantidad de los compuestos liberados pueden variar de una cepa a otra (Cappellari & Banchio, 2020; Jacob & Sudini, 2016). Se ha demostrado que los VOCs juegan un papel importante en las interacciones planta-microorganismo, pudiendo desencadenar promoción del crecimiento vegetal, inhibir el desarrollo de fitopatógenos, aliviar el estrés abiótico, o inducir resistencia sistémica en plantas (Ayuso-Calles et al., 2023; Farag et al., 2006; Ilangumaran & Smith, 2017; Jacob & Sudini, 2016). Por ejemplo, la emisión de volátiles bacterianos desencadenó la expresión de transcritos en *Arabidopsis* relacionados con el metabolismo primario y secundario, así como de la respuesta al estrés (Zhang et al., 2008). Además, se ha comprobado que la acetoina, un compuesto común en las emisiones de volátiles por bacterias provoca efectos positivos sobre el desarrollo del sistema radicular de *Mentha piperita* L., tanto en condiciones normales como bajo salinidad (Cappellari & Banchio, 2020).

Gran parte de los estudios realizados con volátiles bacterianos se han centrado en cepas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Burkholderia* (Cappellari & Banchio, 2020; Farag et al., 2006; Groenhagen et al., 2013; Vaishnav et al., 2016a). Sin embargo, los efectos de los VOCs en las plantas dependen, en gran medida, de la mezcla de compuestos emitida por cada cepa (Cappellari & Banchio, 2020; Farag et al., 2006; Vaishnav et al., 2016a).

3.1.2.5. Inducción de resistencia sistémica.

La resistencia sistémica inducida o ISR (del inglés *Induced Systemic Response*) es definida como el estado de resistencia que protege a las plantas no expuestas a patógenos frente a un ataque futuro de estos, y está desencadenado por un microorganismo beneficioso (Pieterse et al., 2014). La ISR se considera un mecanismo PGP indirecto, al conferir protección frente a patógenos de manera no específica, incluso en las partes de la planta no expuestas al estímulo (Jacob & Sudini, 2016; Kundan et al., 2015). El ácido jasmónico y el etileno son los principales reguladores de la ISR, y suelen actuar sin la activación de genes relacionados con la patogénesis (Pieterse et al., 2014; Romera et al., 2019).

La ISR puede ser activada por una gran variedad de microorganismos beneficiosos, desde hongos o micorrizas (por ejemplo, *Trichoderma*), hasta bacterias (*Pseudomonas*, *Bacillus*,

Serratia, etc.) (Pieterse et al., 2014). Diferentes componentes bacterianos pueden estar involucrados en la inducción de resistencia sistémica: VOCs, exopolisacáridos, sideróforos, o flagelos, entre otros (Hakim et al., 2021; Romera et al., 2019). Por ejemplo, la producción de volátiles, como el 2,3-butanodiol, por parte de dos cepas del género *Bacillus* indujo la ISR en plantas de *Arabidopsis*, activando una vía de señalización dependiente de etileno, lo que provocó una reducción de la infección por el patógeno *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ryu et al., 2004).

3.1.3. Principales mecanismos de tolerancia/resistencia a la salinidad inducidos por PGPB.

Los efectos fisiológicos de la salinidad sobre las plantas (estrés osmótico, iónico y oxidativo) provocan reducciones significativas en la productividad de los cultivos (Ilangumaran & Smith, 2017). Sin embargo, está demostrado que la aplicación de PGPB puede reducir o regular los efectos perjudiciales derivados de la salinidad del suelo sobre las plantas, gracias a los diversos mecanismos que pueden exhibir (Figura 9) (Ayuso-Calles et al., 2021; Dodd & Pérez-Alfocea, 2012; Ilangumaran & Smith, 2017; Shrivastava & Kumar, 2015).

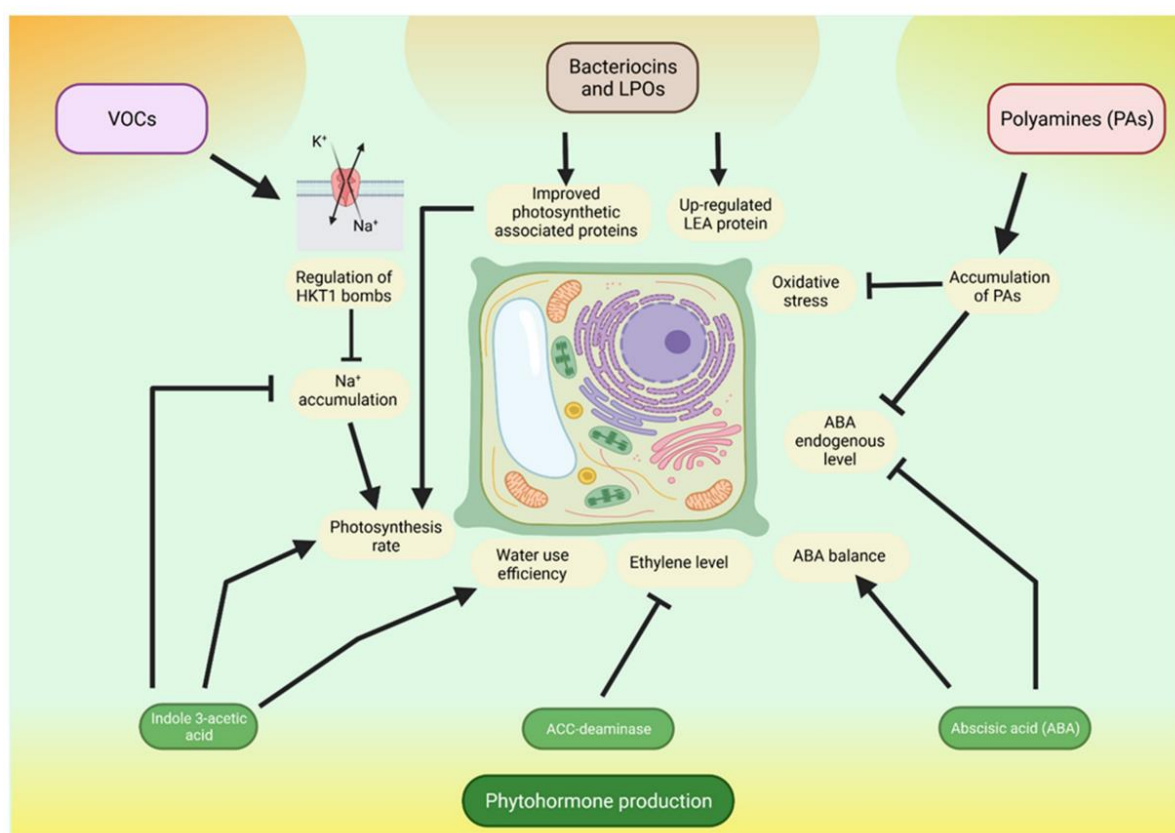


Figura 9: Moléculas producidas por PGPBs relacionadas con la tolerancia a la salinidad en plantas. Fuente: Ayuso-Calles et al., 2021.

3.1.3.1. Regulación del balance osmótico.

El estrés osmótico es la primera fase del desarrollo de la salinidad, como se ha comentado previamente, y provoca una alteración del balance hídrico en la planta, que da lugar al cierre estomático (Mukhopadhyay et al., 2021; Shrivastava & Kumar, 2015). La tasa fotosintética disminuye, debido al desequilibrio en el intercambio gaseoso y la reducción del área foliar (Ilangumaran & Smith, 2017). Esta reducción del crecimiento provoca la inhibición de la retroalimentación de fotosintatos, es decir, su acumulación en órganos de almacenamiento en lugar de su uso para proliferación y desarrollo de nuevos tejidos (Dodd & Pérez-Alfocea, 2012; Ilangumaran & Smith, 2017). Por ello, las plantas necesitan mantener la homeostasis del agua y la función y estructuras fotosintéticas y, en este sentido, el uso de PGPB supone una alternativa para mitigar el impacto de la salinidad sobre las plantas, al favorecer su equilibrio osmótico (Figura 10).

La producción de EPS puede mejorar la estructura del suelo, al aumentar la adherencia de las partículas en microagregados y, por tanto, aumentar la capacidad de retención del agua (More et al., 2022; Rashid et al., 2016). Por tanto, los efectos iniciales del estrés osmótico podrían disminuir, gracias a la mejora de las condiciones del suelo (Shrivastava & Kumar, 2015). Según Qurashi y Sabri (2012), la inoculación con dos cepas PGPB sobre plantas de garbanzo crecidas bajo salinidad provocó una mayor estabilización de los agregados del suelo, así como aumentos significativos de biomasa vegetal.

Los microorganismos pueden modular las relaciones fuente-sumidero de los fotosintatos, evitando la inhibición metabólica por retroalimentación en la fotosíntesis (fotoinhibición), de manera que se mejora el balance osmótico en la fase inicial de la salinidad (Dodd & Pérez-Alfocea, 2012; Ilangumaran & Smith, 2017). Por ejemplo, las raíces de las plantas son un fuerte sumidero de carbohidratos y su desarrollo puede estar mediado por la respuesta hormonal (AIA) asociada a la acción del microbio, o las relaciones directas (simbióticas) entre el microorganismo y la planta. En este sentido, se ha observado que los cambios y la señalización hormonal (AIA, ABA y CKs) en los nódulos de diferentes líneas de *Medicago ciliaris* L., juegan un papel importante en las relaciones fuente-sumidero para la tolerancia de las condiciones de salinidad (Salah et al., 2013).

Al igual que las plantas, las bacterias también son capaces de producir osmolitos orgánicos que acumulan en el citoplasma con el objetivo de mantener la presión osmótica y evitar la pérdida de agua intracelular durante el estrés osmótico, entre ellos: prolina, glicina, betaína o trehalosa

(Dodd & Pérez-Alfocea, 2012; Egamberdieva et al., 2019; Ilangumaran & Smith, 2017). Se ha comprobado que la inoculación con bacterias PGP provoca aumentos en el contenido de osmoprotectores en plantas, aunque no se tiene claro este efecto es debido a la absorción de estos solutos bacterianos a través de las raíces ya que la biosíntesis en bacterias es más rápida que en plantas, o a la inducción de la síntesis *de novo* en las plantas (Dodd & Pérez-Alfocea, 2012; Egamberdieva et al., 2019; Ilangumaran & Smith, 2017). Así, la inoculación con la cepa silvestre de *Pseudomonas*, y con mutantes *knockout* y de sobreexpresión del gen *treS* (trehalosa sintasa) ha demostrado que la acumulación de trehalosa en plantas de tomate sometidas a estrés salino es dependiente de la inoculación con esta PGPB.

Asimismo, la primera fase del estrés salino provoca una alteración del potencial hídrico en las plantas, pero la inoculación con PGPB puede mejorar la conductividad hidráulica (Dodd & Pérez-Alfocea, 2012; Groppa et al., 2012; Ilangumaran & Smith, 2017). De esta manera, se ha comprobado que la inoculación con PGPB puede desencadenar una mayor expresión de acuaporinas, proteínas transmembrana que transportan agua y pequeños solutos mediante gradientes de presión (Gond et al., 2015; Marulanda et al., 2010). Además, el ácido abscísico (ABA), hormona involucrada en la respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico, tiene función reguladora de la expresión de acuaporinas, por lo que su producción puede traducirse en mejoras de la conductividad hidráulica en las plantas (Groppa et al., 2012). Por ello, las bacterias productoras o inductoras de la producción de ABA en plantas pueden tener un importante papel en la defensa del estrés osmótico vegetal (Salomon et al., 2014).

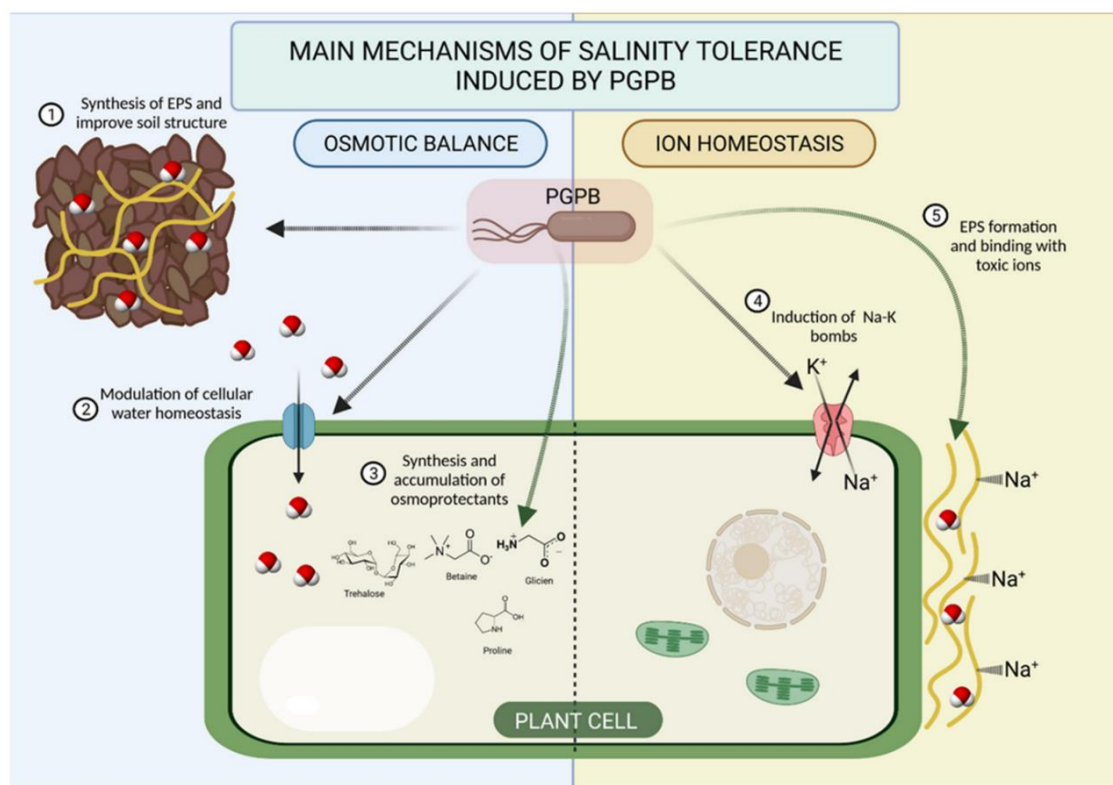


Figura 10: Principales mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas inducidos por las PGPBs. Fuente: Ayuso-Calles et al., 2021.

3.1.3.2. Regulación del contenido iónico.

La prolongada exposición de las plantas a altas concentraciones de iones (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} y HCO_3^-) da lugar a la fase de toxicidad iónica, que ocurre cuando la tasa de acumulación de estos radicales supera a la de exclusión (Munns & Tester, 2008). Los iones son transportados desde las raíces hacia las hojas a través de xilema, donde se acumulan en las vacuolas y el citoplasma, hasta alcanzar niveles tóxicos (Ilanguvaran & Smith, 2017). El exceso en la concentración de estos radicales (principalmente Na^+) afecta a la absorción de K^+ (y de otros micronutrientes) y, por tanto, a procesos bioquímicos dependientes de K^+ , debido a la competencia de ambos iones por el mismo sustrato (Ilanguvaran & Smith, 2017; Shrivastava & Kumar, 2015). Todo ello causa alteraciones estructurales y funcionales de la célula: restricción de enzimas implicadas en la fotosíntesis y respiración, inhibición de actividades citosólicas, o interferencias en el tráfico vesicular (Ilanguvaran & Smith, 2017; Munns & Tester, 2008; Shrivastava & Kumar, 2015). Sin embargo, se ha demostrado que los microorganismos PGP son capaces de favorecer la homeostasis iónica en las plantas, lo que resulta en efectos positivos sobre la tolerancia a la salinidad y el crecimiento vegetal (Figura 10).

Existe una dependencia entre la reducción de la productividad vegetal y el balance iónico, determinado por los ratios Mg:Na, Ca:Na y, sobre todo, K:Na (Munns & Tester, 2008; Rasheed et al., 2020). En este sentido, el mantenimiento de un ratio elevado K:Na es una de las formas en las que las PGPB pueden regular la toxicidad iónica, ya sea impidiendo la entrada de iones tóxicos y su acumulación, o favoreciendo su expulsión por las raíces (Dodd & Pérez-Alfocea, 2012; Ilangumaran & Smith, 2017). Por ejemplo, la producción de EPS por parte de los microorganismos puede reducir la absorción de iones tóxicos en las plantas, al actuar como una barrera física alrededor del sistema radicular (Arora et al., 2011; Etesami & Adl, 2020; Vaishnav et al., 2016b). Los exopolisacáridos producidos se unen a los cationes y los retienen, reduciendo la accesibilidad y la absorción por parte de las raíces (Arora et al., 2011; Etesami & Adl, 2020; Shrivastava & Kumar, 2015). Según Ashraf et al. (2004) y Telabi Atouei et al. (2019), la inoculación de bacterias PGP productoras de EPS sobre plantas de trigo sometidas a condiciones de estrés salino provocó una mejora de los parámetros productivos de este cultivo, así como una reducción del contenido de Na^+ y un aumento de la concentración de K^+ y Ca^{2+} . Además, también se ha observado que la inoculación con bacterias productoras de ACC-desaminasa provocaron ratios K:Na más elevados que las plantas control, mejorando el rendimiento vegetal bajo estrés salino (Nadeem et al., 2009).

Los transportadores de iones desempeñan un papel crucial en la homeostasis de iones de plantas sometidas a salinidad (Jia et al., 2018). Entre ellos se encuentran los transportadores de K^+ de alta afinidad o HKT (del inglés *High-Affinity K^+ Transporters*), proteínas de membrana que median el transporte de Na^+ en plantas, por ejemplo, recuperado el Na^+ del xilema hacia el floema, y recirculándolo de brotes a raíces; o los antiportadores de cationes/protones NHX o SOS (*Sodium Proton Exchanger* y *Salt Overly Sensitive*, respectivamente), enzimas de membrana que transportan el Na^+ fuera de la célula o hacia la vacuola (Jia et al., 2018; Zhang et al., 2008). Está descrito que la modulación de la expresión de transportadores de iones por parte de las PGPB es un mecanismo de interés para la tolerancia a este tipo de estrés. Así, la exposición a los VOCs producidos por *Bacillus subtilis* GB03 mejoró el crecimiento de *Puccinellia tenuiflora* Scribn. & Merr. bajo condiciones de salinidad, favoreció la absorción de K^+ y redujo la de Na^+ , al regular positivamente los genes *PtHKT1;5* y *PtSOS1* (Niu et al., 2016). Además, el tratamiento con *Kocuria rhizophila* Y1 en plantas de maíz mitigó los efectos del estrés salino gracias a la regulación hormonal de las plantas (AIA y ABA), provocando una reducción en los niveles de Na^+ y un aumento de expresión de transportadores iónicos (*ZmHKT1*, *ZmNHX1*, *ZmNHX2*, y *ZmNHX3*) (Li et al., 2020). Sin embargo, es importante

matizar que es necesaria una regulación específica de tejido para una adecuada homeostasis iónica en plantas sometidas a salinidad (Niu et al., 2016; Zhang et al., 2008). Zhang y colaboradores (2008) comprobaron que los volátiles liberados por la cepa *B. subtilis* GB03 conferían tolerancia frente a la salinidad a plantas de *Arabidopsis thaliana* L., debido a la reducción en la expresión de *HKT1* en la raíz (limitando la entrada de Na^+) y al aumento en la parte aérea (favoreciendo la recirculación hacia la raíz).

Las bacterias PGP también pueden regular el intercambio de macro y micronutrientes en plantas desarrolladas bajo salinidad, favoreciendo la acumulación de elementos como K, Mg, Ca, N o P y reduciendo la acumulación de los iones Na^+ y Cl^- (Shukla et al., 2012; Yao et al., 2010a). En este sentido, las PGPB poseen mecanismos para facilitar la adquisición de nutrientes como la solubilización de P o K, o la producción de sideróforos (Dodd & Pérez-Alfocea, 2012; Vaishnav et al., 2016a). Asimismo, la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal puede inducir la regulación positiva de proteínas con actividad fosfatasa en plantas sometidas a estrés abiótico, ya sea por inoculación directa o por exposición a volátiles bacterianos (Kohler et al., 2008; Vaishnav et al., 2015).

3.1.3.3. Regulación del estrés oxidativo.

El desequilibrio metabólico originado por las fases de estrés osmótico e iónico da lugar al estrés o daño oxidativo, que conlleva la formación de ROS (Kumar et al., 2020; Shrivastava & Kumar, 2015). Las plantas deben responder ante este desafío a través de ajustes fisiológicos y bioquímicos, que permitan una correcta adaptación del estado redox celular (Jha & Subramanian, 2014). Para ello, las especies vegetales han desarrollado sistemas antioxidantes, los cuales pueden estar comprendidos por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, que previenen los daños oxidativos en los tejidos mediante la eliminación y detoxificación de las ROS (Ilanguvaran & Smith, 2017; Jha & Subramanian, 2014; Kumar et al., 2020). Se ha comprobado que estos procesos fisiológicos/bioquímicos no solo están controlados por la propia especie vegetal, sino que la presencia de PGPBs puede influir en el sistema antioxidante de la planta, jugando un papel importante en la adaptación de las plantas al daño oxidativo.

Las enzimas antioxidantes controlan la biosíntesis de metabolitos con poder antioxidante, como: glutatión, superóxido dismutasa o caspasas (Jha & Subramanian, 2014). Se ha comprobado el efecto de la aplicación de una cepa PGPB (*Bacillus amyloliquefaciens* SQR9) sobre la tolerancia a la salinidad en plantas de *Arabidopsis* y maíz, al desencadenar un aumento de niveles de glutatión (GHS) derivados del incremento en la transcripción de genes

relacionados con su biosíntesis. Además, mediante la construcción de mutantes, se demostró que esta reducción del daño oxidativo estaba mediada por la producción de espermidina (Chen et al., 2016; Chen et al., 2017a). La espermidina junto a la espermina y la putrescina son las principales poliaminas (PAs), aminos alifáticas con un gran poder antioxidante, que pueden ser producidas por bacterias, plantas y resto de organismos vivos, y que juegan un papel importante en la respuesta al estrés abiótico (Figura 9) (Ilangumaran & Smith, 2017).

Como se ha comentado previamente, las plantas también tienen mecanismos no enzimáticos para mitigar los efectos tóxicos del estrés oxidativo, como es la producción de compuestos fenólicos (Kumar et al., 2020). Estos metabolitos secundarios tienen una elevada actividad antioxidante, desempeñando un papel fundamental en la respuesta vegetal al daño oxidativo (Naikoo et al., 2019). Por ello, el desarrollo de plantas en condiciones de estrés salino desencadena aumentos del contenido en ácidos fenólicos y flavonoides, como se ha comprobado con anterioridad (Mahmoudi et al., 2010; Santander et al., 2022). Asimismo, en los últimos años se ha descrito que la inoculación de PGPB permite mejorar los niveles de diferentes compuestos fenólicos en plantas, tanto desarrolladas en condiciones de estrés abiótico, como en condiciones no estresantes (Flores-Félix et al., 2018; García-Seco et al., 2015; Jiménez-Gómez et al., 2020; Jiménez-Gómez et al., 2021; Rojas-Tapias et al., 2012). Aunque es necesario mencionar que la variación de la composición fenólica depende de diferentes factores, como las condiciones de cultivo y el tipo de estrés sometido (Mahmoudi et al., 2010; Santander et al., 2022), la especie vegetal o variedad utilizada (Mahmoudi et al., 2010; Santander et al., 2020), o incluso el tipo de inóculo aplicado (Flores-Félix et al., 2018; García-Seco et al., 2015; Jiménez-Gómez et al., 2020; Jiménez-Gómez et al., 2021; Rojas-Tapias et al., 2012; Santander et al., 2020). Por ejemplo, las inoculaciones con bacterias PGP de los géneros *Rhizobium*, *Bacillus* y *Azotobacter*, sobre diferentes cultivos sometidos a salinidad provocaron aumentos en los niveles individuales de ácidos fenólicos y flavonoides, o fenólicos totales, que se relacionaron con la protección frente a este tipo de estrés (Jiménez-Gómez et al., 2020; Jiménez-Gómez et al., 2021; Rojas-Tapias et al., 2012). En cambio, la aplicación de hongos micorrícicos arbusculares sobre dos variedades de lechuga desarrolladas bajo estrés salino disminuyó el contenido fenólico, pero provocó mejoras en diferentes actividades enzimáticas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa), lo que se relacionó positivamente con un aumento del crecimiento vegetal y una disminución del daño oxidativo (Santander et al., 2020).

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis doctoral es el desarrollo de bioinoculantes bacterianos multifuncionales, obtenidos mediante el aislamiento y la caracterización de bacterias rizosféricas y endófitas de especies vegetales, y el análisis funcional y molecular de su capacidad para mitigar los efectos dañinos del estrés salino y de mejorar las propiedades nutricionales de cultivos hortícolas de interés agroalimentario. Para cumplir este objetivo general planteamos los siguientes objetivos específicos:

- I. Aislamiento y caracterización genotípica y fenotípica de bacterias procedentes del interior de nódulos de *Trifolium repens* L., y de suelo rizosférico e interior de raíces de *Plantago maritima* L. y *Camphorosma monspeliaca* L.
- II. Evaluación de los mecanismos PGP mediante técnicas *in vitro* e *in silico* de los aislados, para seleccionar aquellos con un mayor potencial de promoción del crecimiento vegetal.
- III. Análisis de la capacidad de colonización radicular y estudio del efecto de la inoculación y de la producción de compuestos orgánicos volátiles en la promoción del crecimiento vegetal y la mitigación del estrés salino por NaCl y Na₂SO₄ en plántulas de lechuga, apio y canónigo, por parte de los aislados seleccionados.
- IV. Estudio del potencial de los aislados seleccionados para promover el crecimiento vegetal y mitigar el estrés salino inducido por NaCl y Na₂SO₄, en plantas de lechuga, apio y canónigo desarrolladas en condiciones de invernadero.
- V. Determinación del contenido en elementos químicos y compuestos fenólicos de las plantas procedentes de los ensayos en invernadero, y evaluación de los cambios derivados de la inoculación bacteriana y la salinidad.
- VI. Análisis transcriptómico del efecto de la inoculación bacteriana y la salinidad en la variación de la expresión génica de las plantas de lechuga cultivadas en condiciones de invernadero.
- VII. Estudio de los efectos biológicos de los extractos ricos en compuestos fenólicos obtenidos de plantas de lechuga bioinoculadas sobre la supervivencia del organismo modelo *Caenorhabditis elegans* bajo estrés oxidativo

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos utilizados en el estudio.

1.1. Recolección de muestras.

Los microorganismos utilizados en el estudio fueron aislados de diferentes tipos de muestras. En primer lugar, realizamos aislamientos a partir de nódulos presentes en raíces de *Trifolium repens* L. La obtención de los nódulos fue llevada a cabo mediante plantas trampa, sembrando para ello semillas de esta especie vegetal en suelos obtenidos de dos ubicaciones de la provincia de Salamanca (Figura 11):

- I. **Golpejas:** localidad situada a 24 km al oeste de Salamanca. El suelo fue obtenido en las inmediaciones de la antigua mina de estaño situada en dicha localidad (41°00'57.0"N, 5°55'19.7"W).
- II. **Huerta:** localidad situada a 20 km al este de Salamanca. El suelo fue obtenido en una zona de cultivo situada en la llanura de inundación del río Tormes (40°58'17.5"N, 5°28'14.5"W).

En segundo lugar, realizamos aislamientos del interior de raíces de dos plantas dicotiledóneas halófilas, *Plantago maritima* L. y *Camphorosma monspeliaca* L., así como de suelo rizosférico asociado a cada una de ellas. Tanto las plantas como el suelo rizosférico fueron recolectados de una zona agrícola en las que se desarrollan eflorescencias salinas (41°02'29.4"N, 5°38'02.4"W), perteneciente al término municipal de San Cristóbal de la Cuesta, localidad situada a 8 km de Salamanca (Figura 11).

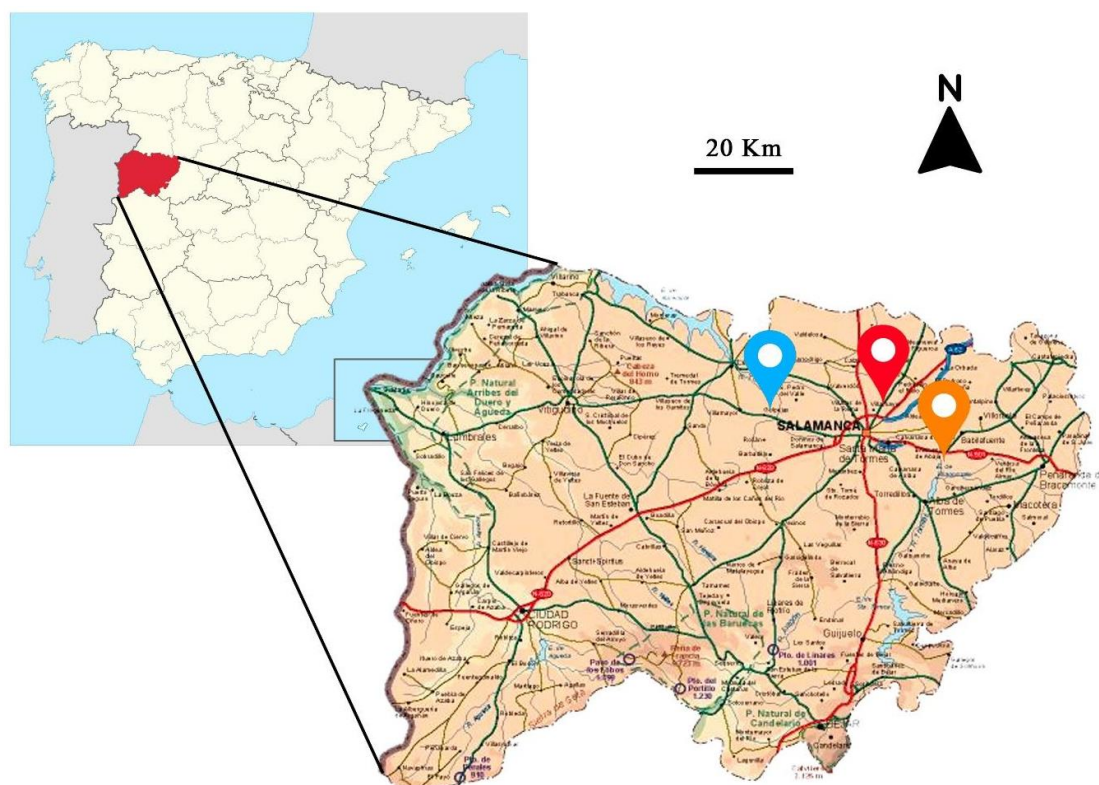


Figura 11: Mapa de localización de las 3 zonas de muestreo de este estudio: Golpejas (azul), Huerta (naranja) y San Cristóbal de la Cuesta (rojo).

1.2. Aislamiento de cepas bacterianas.

En primer lugar, para el aislamiento de bacterias del interior de nódulos de *Trifolium repens* L., las semillas de dicha planta fueron sembradas sobre los suelos correspondientes (Golpejas y Huerta), contenidos en recipientes de plástico de 1 L de capacidad, donde crecieron durante 7 semanas. Una vez que las plantas hubieron desarrollado nódulos, realizamos una selección de nódulos efectivos, los cuales fueron retirados de la planta y lavados con agua destilada para eliminar los restos de suelo que pudiesen quedar. Posteriormente fueron esterilizados en superficie, sumergiéndolos en hipoclorito sódico (NaClO 2%v/v) durante 1 minuto. Los restos de hipoclorito sódico que pudieron quedar sobre la superficie de los nódulos fueron retirados mediante 5 lavados con agua destilada estéril. Una vez estériles, fueron triturados con ayuda de una varilla de vidrio estéril. El triturado fue estriado en una placa Petri que contenía medio de cultivo YMA (*Yeast Mannitol Agar*) (Vincent, 1970) (Tabla 1). Todo el procedimiento fue realizado en condiciones de asepsia.

En segundo lugar, para las muestras obtenidas de las plantas y los suelos de San Cristóbal de la Cuesta, seguimos una metodología de aislamiento distinta en función del tipo de muestra, utilizando en todos los casos los medios de cultivo TSA (*Tryptic Soy Agar*) (Tabla 2) e YMA,

suplementados con dos concentraciones de NaCl distintas: 1,5 % y 3,0 %. Para el aislamiento de microorganismos de las dos muestras de suelo rizoférico llevamos a cabo la dilución de 10 g de suelo en 90 ml de agua destilada estéril, dejando dicha solución en agitación, durante 1 hora a 120 rpm (revoluciones por minuto) y 28 °C. Transcurrido ese tiempo realizamos diluciones seriadas a partir de la solución original, desde 10^{-1} a 10^{-6} , sembrando 100 μ l de cada dilución en placas Petri con cada uno de los medios de cultivo utilizados (TSA 1,5 % y 3,0 % NaCl; e YMA 1,5 % y 3,0 % NaCl). Por otro lado, el aislamiento de microorganismos presentes en el interior de las raíces vegetales fue llevado a cabo a través del protocolo descrito a continuación. En primer lugar, seleccionamos raíces de unos 10 cm de longitud, limpiando con agua destilada estéril los restos de suciedad presentes en ellas. Posteriormente, fueron esterilizadas en superficie sumergiéndolas durante 60 segundos en etanol (70 %) y, a continuación, en hipoclorito sódico (NaClO 2%v/v) durante 3 min, todo ello en agitación, aplicando en último lugar 5 lavados con agua destilada estéril para eliminar los restos de etanol e hipoclorito sódico. Consecutivamente y manteniendo las condiciones asépticas, las raíces fueron cortadas en fragmentos de unos 5 mm de longitud y trituradas con la ayuda de una varilla de cristal estéril. Sobre el triturado añadimos 10 mL de agua destilada estéril y la solución resultante fue llevada a agitación (1 hora, 160 rpm y 45° de inclinación, 28 °C). A partir de la solución original preparamos diluciones seriadas, desde 10^{-1} a 10^{-6} , sembrando 100 μ L de cada dilución en placas Petri con los medios de cultivo indicados anteriormente.

Las placas inoculadas en cada una de las metodologías fueron incubadas a 28 °C durante 5 días. A partir de las colonias obtenidas, realizamos aislamientos por agotamiento en estría, hasta obtener cultivos puros que fueron sembrados en el mismo medio y a la misma temperatura.

Tabla 1: Medio YMA.

Medio YMA	
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	0,2 g
Agar	20,0 g
H ₂ O destilada	1 L

Tabla 2: Medio TSA.

Medio TSA	
Peptona de caseína	15,0 g
Peptona de soja	5,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	20,0 g
H ₂ O destilada	1 L

1.3. Mantenimiento y conservación de las cepas.

Para su uso rutinario, el mantenimiento de las cepas fue realizado en placas de YMA o TSA (en el caso de las muestras procedentes de San Cristóbal de la Cuesta, suplementados con NaCl al 1,5 % o 3,0 %, dependiendo de las condiciones originales de aislamiento), conservándolas a 4 °C una vez hubieron crecido. Además, la conservación de los aislados a largo plazo fue llevada a cabo por criopreservación a -80 °C, utilizando una solución crioprotectora estéril de glicerol al 25 %, que fue repartida en criotubos de 1 ml. A partir de cultivos puros de cada aislado preparamos suspensiones celulares que fueron guardadas en sus correspondientes criotubos. Realizamos tres copias de criotubos por cada cepa.

2. Caracterización de los aislados.

2.1. Caracterización genotípica y proteómica.

2.1.1. MALDI-TOF.

A partir de cultivos puros, procedimos a realizar la extracción de las proteínas de acuerdo con el protocolo proporcionado por Bruker Daltonics GmbH (Alemania). Utilizando cultivos al comienzo de la fase exponencial (24 horas), seleccionamos colonias que fueron transferidas a un tubo tipo Eppendorf, donde fueron resuspendidas en 300 mL de agua MilliQ estéril. A continuación, añadimos 900 µL de etanol, centrifugándose a velocidad máxima (15.500 rpm) durante 2 minutos. El sobrenadante fue desechado, añadiendo sobre el precipitado seco 50 µL de ácido fórmico (70% v/v) (mezclado con vórtex), agregando, posteriormente, 50 µL de acetonitrilo. La muestra fue centrifugada de nuevo durante 2 min, transfiriendo 1 µL del sobrenadante sobre los pocillos de la placa metálica para secar a temperatura ambiente. Para

finalizar, cada pocillo fue cubierto con 1 μ L de la solución matriz (ácido α -hidroxi-cinámico-HCCA) para secar de nuevo.

Los espectros de proteínas de las cepas aisladas fueron obtenidos utilizando espectrómetro de masas MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics GmbH, Alemania) entre 2-20 kD de forma automática. Para calibrar al inicio del procedimiento fueron empleados los estándares proporcionados por la casa comercial (BTS): RL36, 4365.3 Da; RS22, 5096,8 Da; RL34, 5381.4 Da; RL33meth, 6255,4 Da; RL29, 7274,5 Da; RS19, 10300.1 Da; RNasa A, 13683.2 Da y mioglobina, 16952.3 Da. Los espectros fueron analizados mediante el programa MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Alemania) y comparados con una biblioteca de referencia de la base de datos MALDI Biotyper 3.0. En el caso de los aislados procedentes de nódulos de trébol blanco, los espectros también fueron comparados con una base de datos local en un servidor propio, que incluye numerosas cepas de especies pertenecientes al género *Rhizobium* (Ferreira et al., 2011). Los resultados fueron interpretados de acuerdo con los scores de similitud recogidos en la Tabla 3.

Tabla 3: score de similitud y correspondencia de identificación.

Score	Descripción
2.300 ... 3.000	alta probabilidad de identificación de la especie
2.000 ... 2.299	identificación segura del género, identificación probable de la especie
1.700 ... 1.999	identificación probable del género
0.000 ... 1.699	identificación poco fiable

2.1.2. Extracción y purificación de ADN.

Para llevar a cabo la extracción del ADN de las cepas aisladas, utilizamos el kit de extracción “REDExtract -N- AmpTM Plant PCR kit” (Sigma-Aldrich®, Alemania). En primer lugar, recogimos células del cultivo fresco que fueron pasadas a un tubo tipo Eppendorf, sobre el que añadimos 100 μ L de la solución de extracción, agitando con el vórtex suavemente. Para favorecer la lisis celular, los tubos fueron incubados a 95 °C en un termobloque (J.P-SelectaTM, España), durante 10 minutos. Posteriormente, añadimos 100 μ L de la solución de dilución, centrifugando los tubos a 6.000 rpm, durante 4 minutos. Por último, recogimos 100 μ L de la

fase superior acuosa libre de restos celulares, que fueron pasados a un nuevo tubo tipo Eppendorf. Las soluciones finales con el ADN fueron conservadas a -20 °C.

Para la obtención de ADN puro de alta calidad, necesario para una correcta secuenciación de genomas, utilizamos el kit comercial “ZR Fungal/Bacterial ADN MiniPrep” (Zymo Research™, EE. UU.), siguiendo las especificaciones marcadas por el fabricante. La cuantificación de la concentración de ADN fue realizada mediante el kit “Qubit™ dsDNA Broad Range Assay” y el equipo Qubit™ Invitrogen (Thermo Fisher scientific™). El ADN fue conservado a -20 °C.

2.1.3. Amplificación de ADN mediante PCR.

La amplificación del ADN fue realizada a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction* o PCR). Los reactivos y concentraciones utilizados variaron en función del objetivo de la amplificación: análisis de los perfiles RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) o amplificación y secuenciación de diversos genes. Los datos de los reactivos y concentraciones están recogidos en la Tabla 4, y las condiciones de las PCR en la Tabla 5.

Tabla 4: Concentración de los reactivos de PCR para cada una de las técnicas utilizadas.

Perfiles RAPD		Amplificación del gen rRNA 16S		Amplificación del gen <i>betB</i>	
Dream Taq Green (Thermo-fisher™)	12,5 µL	Red Mix PCR (Sigma™)	10 µL	Dream Taq Green (Thermo-fisher™)	12,5 µL
Primer M13 (20 µM)	2,5 µL	Primer 27F (2 µM)	2,5 µL	Primer betBR (2 µM)	2,5 µL
		Primer 1522R (2 µM)	2,5 µL	Primer betBR (2 µM)	2,5 µL
Agua libre de nucleasas	8 µL	Agua libre de nucleasas	5 µL	Agua libre de nucleasas	6,5 µL
ADN molde	2 µL	ADN molde	2 µL	ADN molde	2 µL

Tabla 5: Condiciones de PCR utilizadas.

Método		Obtención de perfiles RAPD	Amplificación del gen rRNA 16S	Amplificación del gen <i>betB</i>
Predesnaturalización		95 °C (9')		93 °C (2')
35 ciclos	Desnaturalización	94 °C (1')		93 °C (45'')
	Anillamiento	45 °C (1')	54,6 °C (1' 30'')	55,7 °C (1')
	Extensión	72 °C (2')		72 °C (2'')
Extensión final		72 °C (7')		72 °C (5')

2.1.4. Electroforesis.

La electroforesis fue realizada en geles de agarosa al 1,0 % cuando el objetivo fue la obtención de bandas de ADN para secuenciar, y al 1,5 % cuando analizamos perfiles RAPD. El tampón utilizado para la preparación de geles y la electroforesis fue TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1Mm, pH 8,0 Millipore). El marcador de peso molecular utilizado fue el GeneRuler 1Kb ladder (Thermo Fisher ScientificTM). La electroforesis fue llevada a cabo aplicando un campo eléctrico de 60 V/cm, durante 120 minutos, utilizando una fuente eléctrica Power PAC 300 (Bio-Rad®, EE. UU.). Para la visualización del ADN, los geles fueron teñidos con una solución del reactivo MIDORI^{Green} Advance (NIPPON Genetics EUROPE, Alemania), que fue añadida antes de la solidificación del gel a una concentración del 0,002 %. Una vez realizada la electroforesis, los geles fueron fotografiados con luz U.V., a través del equipo Gel Doc 2000 (Bio-RadTM, EE. UU.).

2.1.5. Obtención de los perfiles RAPD.

Para la obtención de los perfiles RAPD, realizamos una amplificación del ADN a través del *primer* M13 (5'-CAGGGTGGCGGTTCT-3'), diseñado a partir de la región central del fago del mismo nombre (Schönian et al., 1993). Los reactivos y concentraciones utilizados para dicha amplificación se recogen en la Tabla 4.

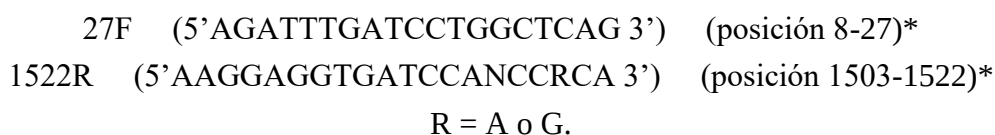
Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a electroforesis, siguiendo las condiciones explicadas en el apartado 2.1.4 de Materiales y Métodos, con el objetivo de separar las distintas bandas amplificadas y obtener así los perfiles RAPD de nuestros aislados.

2.1.6. Análisis matemático de los perfiles RAPD.

El análisis matemático de los perfiles RAPD fue llevado a cabo utilizando el *software* Bionumerics (Applied MathsTM, Nv; EE. UU.). Los perfiles de cada cepa fueron evaluados utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y el método de construcción de dendrogramas UPGMA. A partir de los resultados obtenidos, el programa generó una matriz de similitud, utilizada para desarrollar un mapa de escalado multidimensional o dendrograma.

2.1.7. Amplificación y secuenciación del gen ribosómico rRNA 16S.

Para la amplificación del gen ribosómico 16S utilizamos los *primers* 27F y 1522R (Rivas et al., 2002), en las condiciones de PCR descritas en la Tabla 5, utilizando los reactivos y concentraciones indicados en la Tabla 4. El diseño de estos *primers* fue realizado en base a consenso de secuencias de ADN ribosómico de diferentes microorganismos:



(*) La posición de los *primers* utilizados tanto para la amplificación, corresponden con la numeración de la secuencia del ADN ribosómico 16S de *Escherichia coli* ATCC 8739 (NC010468).

Los productos amplificados mediante PCR fueron sometidos a electroforesis, según lo descrito en el apartado 2.1.4 de Materiales y Métodos, y purificados siguiendo el protocolo comercial del “GeneJET Gel Extraction Kit and DNA Cleanup Micro Kit” (Thermo Fisher ScientificTM).

La secuenciación de los genes fue llevada a cabo en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca, utilizando el kit “Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” y el equipo de secuenciación ABI PRISM (Applied Biosystem®, EE. UU). Para llevar a cabo la secuenciación del gen ribosómico 16S fueron utilizados los *primers* 800R (5' TACCAGGGTATCTAATCC 3') y 1522R, descritos por Rivas et al. (2001) y Chávez-Díaz et al. (2013).

2.1.8. Análisis de las secuencias de ADN.

Para editar y ensamblar los fragmentos de secuencias generados fue utilizado el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (versión 7.0.5.3). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con aquellas secuencias depositadas en las bases de datos públicas, a través de la plataforma *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Brenner, 1995).

El análisis filogenético fue realizado mediante el alineamiento de las secuencias de las cepas seleccionadas con secuencias de cepas tipo de referencia próximas a estas, y la posterior construcción del árbol filogenético, a través del programa Mega 7.0 (Kumar et al., 2016), utilizando el método Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987) y el coeficiente de Kimura 2 *parameters* (Kimura, 1980), seleccionando un *bootstrap* de 1000.

2.1.9. Amplificación del gen *betB*.

La amplificación del gen *betB*, relacionado con la síntesis de la betaína, fue realizada utilizando los *primers* betBR (5'-ATYGGYGCMTGGAAGTAYCC-3') y betBF (5'-ACCGGBCCRAARATYTCYTC-3') (Navarro-Torre et al., 2017). Las condiciones de amplificación por PCR y los reactivos aparecen indicadas en las Tablas 4 y 5. Los productos de PCR amplificados fueron sometidos a electroforesis, según lo descrito en el apartado 2.1.4 de Materiales y Métodos, comprobando la presencia de bandas de 700 pb (pares de bases) aproximadamente (Navarro-Torre et al., 2017).

2.1.10. Secuenciación de genomas y análisis de la información genómica.

La secuenciación de los genomas fue llevada a cabo utilizando la plataforma Illumina Miseq (2x250pb). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas mediante Velvet 1.2.10 en base Linux (Zerbino & Birney, 2008), y la anotación fue llevada a cabo utilizando el programa RAST 4.0 (<http://rast.theseed.org>) que permite la anotación automática de los genomas obtenidos (Overbeek et al., 2014).

La integridad o completitud de los genomas ensamblados fue evaluada mediante el *software* BUSCO (Versión 5.5.0) (*Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*), seleccionando manualmente el linaje más cercano para realizar la comparación del genoma y utilizando los parámetros de búsqueda por defecto (Manni et al., 2021; Simão et al., 2015). Además, las anotaciones de otras herramientas bioinformáticas de análisis automatizado fueron utilizadas para buscar y encontrar genes con funciones específicas. Así, el programa antiSMASH fue utilizado para la búsqueda específica de genes que puedan estar implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Weber et al., 2015).

2.1.11. Análisis filogenómicos.

Los análisis filogenómicos fueron realizados mediante los algoritmos computacionales ANIb (*Average Nucleotide Identity base don BLAST*) y dDDH (*digital DNA-DNA hybridation*).

La identidad nucleotídica promedio basada en BLAST (ANIb) entre los genomas de las distintas cepas aisladas y los genomas de las cepas tipo de las especies filogenéticamente próximas (usando como referencia la similitud de la secuencia del gen ribosómico 16S) fue calculada a través del servidor online JSpeciesWS (<https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>) (Richter et al., 2016).

Para el cálculo de la hibridación digital ADN-ADN (dDDH) la secuencia de los genomas de las distintas cepas aisladas y de los genomas de las cepas tipo de especies filogenéticamente próximas fueron cargados en la plataforma bioinformática *Type (Strain) Genome Server* (TYGS) (<https://tygs.dsmz.de>), que utiliza el enfoque *Genome BLAST Distance Phylogeny* (GBDP) para realizar un análisis taxonómico basado en el genoma completo (Meier-Kolthoff & Göker, 2019; Meier-Kolthoff et al., 2022). Además, este servidor permite inferir un árbol filogenómico de evolución mínima con soporte de ramas (100 réplicas pseudo-*bootstrap* por cada rama), partir de las distancias intergenómicas resultantes (Lefort et al., 2015).

2.2. Caracterización fenotípica.

2.2.1. Determinación del rango de crecimiento bajo condiciones de salinidad.

La capacidad de las cepas para crecer en presencia de distintas concentraciones de NaCl y Na₂SO₄ fue analizada utilizando como medios base TSA e YMA, sobre los que añadimos concentraciones crecientes de NaCl y Na₂SO₄ (1,0 %, 2,5 %, 5,0 % y 7,0 %). Inoculamos 10 µl de una suspensión de cada cepa (10⁶ UFC/mL, según la escala McFarland) sobre la superficie del respectivo medio de cultivo, que fueron incubados durante 7 días a 28 °C, determinando a continuación la presencia o ausencia de crecimiento de las cepas.

2.2.2. Determinación del rango de crecimiento en diferentes condiciones de pH.

La capacidad de las cepas para crecer en presencia de distintas condiciones de pH fue analizada utilizando como medios base TSA e YMA, sobre los que ajustamos el pH (4,5, 5,5, 6,5, 8,0 y 9,0). Para la preparación de medios con pH ácido utilizamos tampón PCA, obtenido mezclando distintas proporciones de Na₂HPO₄ 0,4 M y ácido cítrico monohidratado 0,2 M (Tabla 6). Para ajustar los medios a pH básico utilizamos tampón Tris-HCl, procedente de la mezcla de una solución Tris 0,2 M y una solución HCl 0,2 M en diferentes proporciones para cada condición de pH (Tabla 7). Una vez añadidos los tampones sobre el medio, el pH fue medido. Inoculamos 10 µl de una suspensión de cada cepa (10⁶ UFC/mL, según la escala McFarland) sobre el

respectivo medio de cultivo, que fueron incubados durante 7 días a 28 °C, determinando a continuación la presencia o ausencia de crecimiento de las cepas.

Tabla 6: Proporciones de Na₂HPO₄ 0,4M y ácido cítrico 0,2M por cada 100 mL, para obtener tampón PCA a los pHs indicados.

pH	mL ácido cítrico	mL de Na ₂ HPO ₄
4,5	37,8	22,2
5	24,3	25,7
5,5	22,2	27,8
6,5	13,6	36,4

Tabla 7: Cantidad de la solución de HCl 0,2M a añadir a la solución de Tris 0,2M por cada 50 mL, para obtener tampón a los pHs indicados.

pH	mL de HCl
8,0	29,2
9,0	0,2

2.2.3. Determinación del rango de crecimiento bajo diferentes temperaturas.

La capacidad de las cepas para crecer a diferentes temperaturas fue analizada utilizando como medios base TSA e YMA. 10 µl de una suspensión de cada cepa (10⁶ UFC/mL, según la escala McFarland) fueron inoculados sobre la superficie del respectivo medio de cultivo, e incubados a 4 °C, 10 °C, 15 °C, 28 °C, 37 °C y 42 °C. Tras 7 días de incubación la presencia o ausencia de crecimiento de las cepas fue comprobada.

2.3. Análisis de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*.

2.3.1. Solubilización de fosfato.

La capacidad de solubilización de fosfato inorgánico por parte de las cepas aisladas fue evaluada a través de dos formas distintas del medio Pikovskaya Agar (Pikovskaya, 1948), cada una de las cuales presentaba una fuente distinta de fosfato: bicálcico (Ca₂PO₃) y tricálcico (Ca₃(PO₃)₂) (Tabla 8). Asimismo, este mecanismo PGPR también fue evaluado mediante el medio de cultivo NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*),

que utiliza la hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) como fuente de fosfato (Tabla 9) (Nautiyal, 1999).

Inoculamos 10 μl de una suspensión de cada cepa (10^6 UFC/mL, según la escala McFarland) sobre la superficie del respectivo medio de cultivo, siendo incubados durante 15 días a 28 °C. Pasado este tiempo comprobamos si las cepas habían formado halos de solubilización alrededor de la colonia.

Tabla 8: Medio Pikovskaya Agar.

Medio Pikovskaya Agar	
Extracto de levadura	0,5 g
Dextrosa	10,0 g
$\text{Ca}_2\text{PO}_3/\text{Ca}_3(\text{PO}_3)_2$	5,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
KCl	0,2 g
MgSO_4	0,1 g
$\text{MnSO}_4 (\text{H}_2\text{O})$	0,0001 g
FeSO_4	0,0001 g
Agar	20,0 g
H_2O destilada	1 L

Tabla 9: Medio NBRIP.

Medio NBRIP	
Glucosa	10,0 g
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	5,0 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	5,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
KCl	0,2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1 g
Agar	20,0 g
H_2O destilada	1 L

2.3.2. Producción de sideróforos.

La capacidad de producción de sideróforos fue evaluada mediante el medio de cultivo M9-CAS-AGAR, una modificación del medio utilizado por Schwyn y Neilands (1987). La modificación consiste en la adición de un disolvente catiónico, HDTMA, que estabiliza el complejo Fe-CAS y le otorga un color azul característico al medio M9, que presenta un indicador de color (HDTMA) y un agente quelante del hierro (EDTA) (Alexander y Zuberer, 1991). La preparación del medio M9-CAS-AGAR se basa en la elaboración de cuatro soluciones diferentes, esterilizadas de forma individual y mezcladas a continuación.

Solución 1

Esta solución fue preparada mezclando 10 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM (disueltos en HCl 10 mM), con una solución acuosa de 50 mL de CAS (Chromeazurol S, 1,21mg/mL), obteniendo una solución de color púrpura intenso, que posteriormente fue mezclada con 40 mL de una solución acuosa de HDTMA (1,82 mg/mL). La solución resultante presentó un color azul marino denso.

Solución 2

La preparación de esta solución partió de la mezcla de varios reactivos: KH_2PO_4 , NaCl, NH_4Cl y H_2O . Sobre ella fue añadido, posteriormente, el reactivo PIPES (piperazina-N,N'-bis[ácido 2-ethanesulfónico]), ajustando el pH a 6,8 (Tabla 10).

Tabla 10: Solución 2 del medio M9-CAS-AGAR.

Solución 2	
PIPES	30,24 g
KH_2PO_4	0,3 g
NaCl	0,5 g
NH_4Cl	1,0 g
Agar	15,0 g
H_2O destilada	750 mL

Solución 3

Para la obtención de esta solución los compuestos indicados en la Tabla 11 fueron disueltos en 70 mL de H_2O destilada.

Tabla 11: Solución 3 del medio M9-CAS-AGAR.

Solución 3	
Sacarosa	2,0 g
Manitol	2,0 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	493,0 mg
CaCl ₂	11,0 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,17 mg
H ₃ BO ₃	1,4 mg
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,04 mg
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	1,2 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	1,0 mg
H ₂ O destilada	70 mL

Solución 4

La solución 4 contenía 30 mL de cas-aminoácidos (proveniente de la degradación parcial de la caseína) al 10 % p/v, que fueron esterilizados mediante filtración en una membrana de 0,22 µm (Millipore®, Amicon, EEUU).

Tras la preparación de las 4 soluciones, todas ellas fueron esterilizadas mediante autoclave, excepto la solución 4. La mezcla de todas ellas fue realizada una vez hubieron adquirido una temperatura de 50 °C (añadiéndose en último lugar la solución 4).

El medio M9-CAS-AGAR obtenido fue servido sobre placas Petri, y, tras su solidificación, fueron inoculados 10 µl de una suspensión de cada cepa (10⁶ UFC/mL, según la escala McFarland) sobre la superficie del medio, dejándolas incubar durante 15 días a 28 °C. La presencia de halos de color anaranjado alrededor de las cepas indicó capacidad de producción de sideróforos.

2.3.3. Producción de auxinas y ácido indol acético.

El análisis de la capacidad producción de auxinas por parte de las cepas fue realizado mediante el medio JMM (John Howieson *minimal medium*) (Khalid et al., 2004) para *rhizobia* y JMM-DF sales (Flores-Félix, 2018) para el resto de aislados. Para la preparación de ambos medios partimos de la solución base de cada uno de ellos (Tabla 12), en la cual todos los componentes fueron añadidos, excepto la solución de vitaminas. Además, el pH fue ajustado con el objetivo

de obtener un pH neutro (7,0 – 7,2). Utilizamos ácido cítrico (0,55 M) para realizar el ajuste de pH, al ser una solución básica (si el pH hubiera estado por debajo de 7, hubiéramos añadido KH_2PO_4). A continuación, fueron añadidos 3 mL de la solución correspondiente en viales, siendo posteriormente autoclavados. Seguidamente, añadimos 3 μL de solución de vitaminas a cada vial (a una concentración de 1X). La solución de vitaminas fue preparada según la Tabla 13, en la que todos los componentes estaban disueltos en Na_2HPO_4 0,05 M (pH 7,0), y esterilizados por filtración, utilizando filtros de 22 μm de tamaño de poro. El siguiente paso consistió en añadir 30 μL de triptófano (100X) a cada vial. Para la preparación de la solución de triptófano realizamos un stock a 100X, para obtener una concentración final de 0,167 g/L (Tabla 14), la cual fue esterilizada por filtración, y almacenada a una temperatura de 4 °C.

Tabla 12: Medios JMM y JMM-DF sales base.

	Medio JMM base	Medio JMM-DF sales base
D-(+)- galactosa	1,8 g	
L-(+)- arabinosa	1,5 g	
Glucosa		4,0 g
Manitol		8,0 g
Piruvato		4,0 g
K_2HPO_4	$26,1 \cdot 10^{-3}$ g	0,6 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$		0,4 g
NaCl		0,2 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$5,5 \cdot 10^{-3}$ g	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$147 \cdot 10^{-3}$ g	
Solución vitaminas (Tabla 13)	1,0 mL	1,0 mL
Solución de elementos traza (Tabla 15)		1,0 mL
H_2O destilada	1 L	1 L

Tabla 13: Componentes de la solución de vitaminas.

Solución de vitaminas	
Riboflavina	20,0 mg
Ácido P-amino benzoico	20,0 mg
Ácido nicotínico	20,0 mg
Biotina	20,0 mg
Tiamina-HCl	20,0 mg
Piridoxina-HCl	20,0 mg
Pantotenato cálcico	20,0 mg
Inositol	120,0 mg
H ₂ O destilada	1 L

Tabla 14: Reactivo y concentración de triptófano a suplementar en el medio JMM base.

Reactivo	Suplemento al medio base	g/L
Medio Triptófano	L-Triptófano	0,167

Tabla 15: Solución de elementos traza.

Solución de elementos traza	
H ₃ BO ₃	145,0 mg
FeSO ₄ · H ₂ O	125,0 mg
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	59,0 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	5,0 mg
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	4,3 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	108,0 mg
Na ₂ MoO ₄ · 7 H ₂ O	125,0 mg
H ₂ O destilada	1 L

Tras la preparación del medio, fueron añadidos 300 µL de una solución bacteriana de cada cepa (10⁶ UFC/mL, según la escala McFarland) en los viales, incubándose 72 horas a 28 °C, en oscuridad. Realizamos tres réplicas por cada cepa. Transcurrido ese tiempo, 1,5 mL de cada vial fueron recogidos y pasados a su respectivo tubo tipo Eppendorf, centrifugándose a 14.000 rpm y 1 minuto. Una vez centrifugado, pasamos 1 mL de cada sobrenadante a su respectivo

tubo de medición y añadimos agente Salkowski (2 mL de FeCl_3 0,5 M + 98 mL de HClO_4 al 35 % (Gordon y Weber, 1951)) en proporción 2:1, es decir, 500 μL /vial, dejándolo reaccionar durante 20 minutos. Los medios en los que había cepas con capacidad de producción de auxinas tornaron de color rosado/rojizo, una vez añadido el agente Salkowski. La concentración de auxinas fue cuantificada a través de una reacción colorimétrica, utilizándose un espectrofotómetro de absorción ATI Unicam 8625 (Mattson®, EEUU) para medir la intensidad de dicho color, en una longitud de onda de 550 nm. La recta patrón obtenida para conocer la concentración de auxinas producida por cada una de las cepas, a partir de la medida de absorbancia, fue: $y = 2,4637 \cdot x + 0,0053$ (donde: $y = \text{Abs}$, $x = \text{Concentración}$).

Además, también fue determinada la capacidad de producción de ácido 3-indolacético por parte de las cepas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (*High-Performance Liquid Chromatography* o HPLC). Para ello seguimos el procedimiento descrito en el presente apartado, recogiendo 1 mL de los viales en los que habíamos inoculado cada cepa, filtrándolos con un filtro de tamaño de poro de 22 μm , y analizando la concentración de esta auxina por HPLC. La medida fue llevada a cabo en el Servicio Análisis Elemental, Cromatografía y Masas de la Universidad de Salamanca.

2.3.4. Crecimiento en medios libres de nitrógeno.

La capacidad de las bacterias para crecer en medios libres de nitrógeno fue analizada mediante el medio JMM-DF sales (Tabla 12), sin añadir fuentes de nitrógeno, pero suplementado con 1,0 mL/L de metavanadato (0,1 g/L). Fueron repartidos 7 mL de la solución resultante en viales, posteriormente autoclavados. A continuación, fueron añadidos 7 μL de la solución de vitaminas (Tabla 13), previamente esterilizada mediante filtración (filtro de tamaño de poro de 22 μm), a cada vial.

Tras la preparación del medio, 700 μL de una solución bacteriana de cada cepa (10^{-6} UFC/mL, según la escala McFarland) fueron añadidos a cada vial. Realizamos 3 réplicas por cepa. En paralelo, inoculamos controles positivos, que consistían en viales preparados de la misma manera a lo descrito en el párrafo anterior, pero que presentaban fuente de nitrógeno (0,4 g/L de NH_4NO_3). De los tubos de medio sin nitrógeno donde observamos crecimiento tras 15 días de incubación a 28 °C, fueron transferidos 100 μL a un segundo tubo, que fue incubado en las mismas condiciones y tiempos. Transcurrido este tiempo, de los tubos que presentaban crecimiento volvimos a transferir la misma cantidad a un tercer tubo, incubándose en esas

condiciones de nuevo. Se tomaron como resultados positivos los tubos del tercer pase en los que se observó una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) igual a los controles positivos.

2.4. Estudio de la capacidad de colonización sobre superficies abióticas.

2.4.1. Determinación cuantitativa de la capacidad de producción de *biofilms*.

La determinación cuantitativa de la formación de *biofilms in vitro* fue realizada siguiendo la metodología descrita por Fujishige et al. (2006), que permite cuantificar la biopelícula formada por un microorganismo sobre una superficie de plástico, utilizando para ello placas multipocillo (96 pocillos).

En primer lugar, realizamos un pre-cultivo de las cepas seleccionadas en medio líquido (YMB -*Yeast Mannitol Broth*- o TSB -*Tryptic Soy Broth*-, dependiendo de las necesidades específicas de crecimiento -Tablas 16 y 17-), incubado en agitación (180 rpm y 28 °C) durante 48 horas, hasta alcanzar una DO_{600nm} de 2,0. Una vez obtenido, realizamos una dilución 1:5 del mismo (con el propio medio de cultivo), hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,2.

Tabla 16: Medio YMB.

Medio YMB	
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	0,2 g
H ₂ O destilada	1 L

Tabla 17: Medio TSB.

Medio TSB	
Peptona de caseína pancreática	17,0 g
Peptona de soja	3,0 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Glucosa	2,5 g
H ₂ O destilada	1 L

A continuación, fueron inoculados 100 μ L de la suspensión bacteriana en cada pocillo (8 pocillos por cada cepa), dejando los pocillos de las filas externas a las inoculadas como controles negativos (rellenados con 100 μ L de medio de cultivo estéril). Una vez rellenas, las placas fueron selladas e incubadas a 28 °C. A tiempos definidos (24, 48 y 72 horas *post* inoculación), realizamos lecturas de las placas; para ello, el medio de cultivo fue descartado de los pocillos por aspiración, añadiendo a continuación 100 μ L/pocillo de una solución de cristal violeta (0,3% p/v), la cual fue eliminada por aspiración tras 10 minutos. El exceso de cristal violeta fue eliminado mediante tres lavados de 5 minutos con 100 μ L/pocillo de agua destilada estéril. Las placas fueron secadas en campana con flujo laminar, limpiando los restos de cristal violeta que no estuvieran dentro de los pocillos. Posteriormente, añadimos 100 μ L/pocillo de una solución 80 % etanol y 20 % acetona que permitió solubilizar el cristal violeta que hubiera quedado unido al *biofilm*, incubándose durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, realizamos medidas de la absorbancia a una DO_{570nm}, obteniendo así una medida indirecta de la cantidad de *biofilm* formado por cada cepa (a las 24, 48 y 72 horas *post* inoculación). Las medidas de absorbancia fueron realizadas con un lector de placas Asys UVM-340 (Biochron®, Reino Unido).

2.4.2. Determinación cualitativa de la capacidad de producción de *biofilms*.

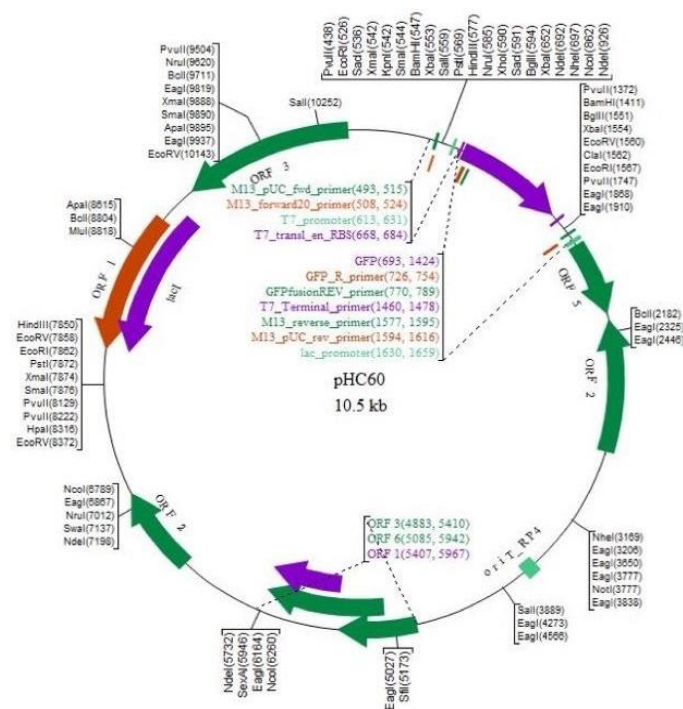
El análisis cualitativo de la capacidad de las cepas para la formación de *biofilms* fue realizado mediante microscopía óptica de campo claro y microscopía óptica de fluorescencia. Observamos la biopelícula formada por los aislados seleccionados sobre un portaobjetos de vidrio, mediante la metodología descrita a continuación.

Sobre un tubo tipo Falcom estéril (50 mL), añadimos 25 mL de medio de cultivo líquido (TSB o YMB, dependiendo del aislado analizado), y un portaobjetos estéril (previamente lavado con etanol al 70 % y esterilizado en el autoclave). Una vez preparado el material anterior, realizamos la inoculación con el aislado a analizar, dejando el tubo inoculado en incubación, a 120 rpm y 28 °C, con una inclinación de 45 °, durante 5 días. Preparamos tres tubos por cada cepa analizada, así como tres tubos con un control sin inocular. Transcurridos 5 días de incubación y con ayuda de unas pinzas estériles, extrajimos el portaobjetos del tubo, y este fue introducido en una solución de naranja de acridina (40 mg/L en una solución de tampón fosfato) durante 30 segundos, seguido por tres lavados en agua destilada estéril, con el objetivo de eliminar aquellas bacterias que no formaran parte del *biofilm*, así como el naranja de acridina no unido.

3. Métodos de marcaje fluorescente de bacterias y microscopía.

3.1. Marcaje fluorescente de cepas del género *Rhizobium* mediante conjugación biparental.

El marcaje fluorescente de las cepas del género *Rhizobium* seleccionadas en este estudio fue realizada mediante conjugación biparental con una cepa donadora competente de *Escherichia coli* S17.1 (Sp^r/Sm^r), portadora del plásmido pHC60 (Cheng and Walker, 1998). Este plásmido contiene un gen que expresa constitutivamente una proteína verde fluorescente (GFP o *Green Fluorescent Protein*), y un gen de resistencia a tetraciclina (Tc), utilizado como marcador de selección (Figura 12). El protocolo seguido había sido previamente puesto a punto en el laboratorio (García-Fraile et al., 2012). La tetraciclina fue añadida a los medios oportunos a una concentración de 10 µg/mL (Tc¹⁰), una vez filtrada y tras haber autoclavados los medios.



Para llevar a cabo la conjugación, las cepas donadoras (*Escherichia coli* S17.1 pHC60) y receptoras (cepas de *Rhizobium*) fueron incubadas durante 24 y 48 h, a 37 y 28 °C, en medios LB (Luria Bertani) Tc¹⁰ (Tabla 18) y TY (Tryptone Yeast) (Tabla 19), respectivamente. Posteriormente, y con la ayuda de un asa de siembra, células de las cepas receptoras (*Rhizobium* spp.) y donadoras (*Escherichia coli* S17.1 pHC60) fueron mezcladas en proporción 2:1 (en este orden), en medio sólido TY. Tras una incubación overnight (28 °C), realizamos un agotamiento en estría del cultivo, sobre una placa de medio mínimo Tc¹⁰ (Tabla 20) (O’Gara y Shanmugan, 1976), que fue incubado a 28 °C hasta la aparición de colonias individuales.

Tabla 18: Medio LB.

Medio LB	
Triptona de caseína	10,0 g
NaCl	10,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Agar	20,0 g
H ₂ O destilada	1 L

Tabla 19: Medio TY.

Medio TY	
Triptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,5 g
Agar (no añadir en medio líquido)	20,0 g
H ₂ O destilada	1 L

Tabla 20: Medio mínimo.

Medio mínimo*	
K ₂ HPO ₄	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,15 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,05 g
NaCl	0,1 g
NH ₄ NO ₃	0,1 g
Manitol	10,0 g
H ₂ O destilada	1 L

*El medio mínimo se ajustó a pH 7,0 con K₂HPO₄ o KH₂PO₄ y después de su esterilización se agregaron las cantidades necesarias de las soluciones de vitaminas (1 ml/L) (Tabla 13) y elementos traza (1 ml/L) (Tabla 15).

Aquellas colonias que presentaron la morfología característica del género *Rhizobium* fueron seleccionadas y sembradas de manera simultánea en placas de medio VRB (*Violet Red Bile*) (diferencial para coliformes) (Tabla 21) y medio mínimo Tc¹⁰, incubándose a 37 y 28 °C, respectivamente. El medio VRB fue usado para determinar la posible presencia de coliformes, facilitando así únicamente la selección de cepas de *Rhizobium* conjugadas. Tras la comprobación de que las cepas conjugadas estaban libres de coliformes, se sembraron en medio YMA Tc¹⁰.

Tabla 21: Medio VRB

Medio VRB	
Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	7,0 g
Sales Biliares	1,5 g
Lactosa	10,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal Violeta	0,002 g
H ₂ O destilada	1 L

La capacidad de colonización e interacción entre las raíces de los cultivos y las cepas conjugadas con el plásmido pH60 fue analizada mediante microscopía óptica de fluorescencia, utilizando para ello un microscopio Nikon Eclipse i80, acoplado a una lámpara LED pE-300^{lite} que emite luz ultravioleta, y aplicando con un filtro a 488 nm. En las preparaciones directas de las raíces utilizamos blanco de calcofluor o yoduro de propidio como colorantes diferenciales. En las raíces teñidas en rojo con yoduro de propidio (Sigma®), añadimos 5 µL de una solución de este compuesto a una concentración 10 µM (que se excita a 617 nm). Las tinciones de las paredes celulares vegetales en azul fueron realizadas añadiendo 20 µL de una solución de blanco de calcofluor (Sigma®) (1:20, en H₂O destilada estéril) directamente a la muestra (la excitación se produce en los 420 nm) (Flores-Félix et al., 2015a).

3.2. Métodos de inmunolocalización.

Para el análisis de la colonización en las raíces de los cultivos por parte de las cepas pertenecientes a los géneros *Priestia* y *Pseudomonas*, llevamos a cabo métodos de inmunolocalización en el Servicio de Patología Molecular Comparada (CIC-IBMCC, USAL-CSIC).

Las raíces de las plantas inoculadas fueron cortadas en fragmentos de 2 cm de longitud y colocadas en tubos tipo Eppendorf que contenían PBS estéril (Tabla 22). Sumergimos los fragmentos radiculares en una solución de leche (3 %) y Triton (0,03 %) en PBS, durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las raíces fueron lavadas con PBS durante 5 minutos, tres veces. Una vez lavadas, el anticuerpo primario (diluido 1/50 en diluyente comercial DAKO) fue añadido, incubándose *overnight* a 4 °C. En el caso de la cepa perteneciente al género *Priestia*, utilizamos anticuerpos policlonales comerciales anti-uricasa (Novus Biologicals LtdTM), mientras que para las muestras de colonización del género *Pseudomonas*, utilizamos un anticuerpo policlonal comercial *Pseudomonas* (Invitrogen, Thermo FisherTM). Las raíces fueron lavadas de nuevo con PBS durante 5 minutos, tres veces. Posteriormente, el anticuerpo secundario anti FITC GOAT, diluido 1/200 en diluyente comercial DAKO, fue añadido, incubándose durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras un nuevo paso de lavado en PBS durante 5 min y tres veces, las raíces fueron teñidas con DAPI (*4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride*) durante 10 minutos, y lavadas de nuevo con PBS. Las muestras fueron conservadas a 4 °C y en oscuridad, hasta ser analizadas.

El anticuerpo secundario estaba marcado con un fluoróforo que emite fluorescencia en verde, en la longitud de onda de la GFP (488 nm). Además, la tinción con DAPI, un colorante de unión

específica a ADN, permite observar los núcleos de las células y los tejidos vegetales en color azul.

La capacidad de colonización e interacción entre las raíces de los cultivos y las cepas inmunolocalizadas mediante anticuerpos específicos fue analizada mediante microscopía óptica de fluorescencia, utilizando para ello un microscopio Nikon Eclipse i80, acoplado a una lámpara LED pE-300^{lite} que emite luz ultravioleta, y aplicando con un filtro a 488 nm.

Tabla 22: Tampón PBS.

Tampón PBS	
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O destilada	1 L

4. Análisis de la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) bajo condiciones salinas y no salinas.

La capacidad de producción de VOCs por parte de las cepas fue evaluada en tubos de rosca de 20 mL sellados por tapones con septum de silicona (Sigma-Aldrich®, Alemania). Sobre los tubos añadimos 4 mL del medio de cultivo líquido óptimo para el crecimiento de cada cepa (YMB en el caso de las cepas del género *Rhizobium*, y TSB en el caso de las cepas de los géneros *Priestia* y *Pseudomonas*), suplementados con NaCl a una concentración de 100 mM en el caso de los ensayos bajo condiciones de salinidad. Inoculamos 100 µL de una suspensión de cada cepa a una DO_{600nm} de 0,6. Los tubos fueron incubados en agitación (150 rpm) e inclinación (45°) a 28 °C, durante 5 días. Además, añadimos controles sin inocular. Incluimos 3 réplicas por cada tratamiento.

Transcurrido ese tiempo llevamos a cabo la detección de los compuestos orgánicos volátiles, mediante HS-SPME-GC-MS (*Headspace Solid Phase MicroExtraction coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry*), siguiendo la metodología previamente descrita por Amaro et al. (2020) con modificaciones mínimas.

Brevemente, los VOCs presentes en el medio de cultivo fueron extraídos por HS-SPME utilizando una fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) bajo agitación continua (250 rpm) con un tiempo de incubación de 5 min y un tiempo de extracción

de 30 min a 45 °C. A continuación, la detección fue llevada a cabo utilizando un sistema 436-GC (Bruker Daltonics, Fremont, CA) acoplado a un detector de masas SCION Single Quadrupole (SQ) y al software de la estación de trabajo MS de Bruker Daltonics (versión 8.2). Los análisis fueron realizados con un automuestreador Combi-PAL (Varian Pal Autosampler, Suiza). Para la separación cromatográfica fue utilizada una columna capilar de sílice fundida GC Rxi-5Sil MS (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm de espesor de película, RESTEK Corporation, EE.UU., Bellefonte, Pensilvania), aplicando helio C-60 (Gasin, Portugal) como gas portador a un caudal constante de 1,0 mL min⁻¹. Las inyecciones fueron realizadas en modo *split* con una relación 1:5. El programa de temperatura del horno fue de 40 °C (1 min) a 250 °C (5 min) a 5 °C min⁻¹, seguido de un aumento a 300 °C (1 min) a 5 °C/min. El detector de MS funcionó en modo de impacto de electrones (EI) (70 eV). La temperatura de la línea de transferencia fue de 250 °C, la del colector de 40 °C y la del EI de 260 °C. El intervalo de masas fue de 40-250 *m/z*, con una velocidad de barrido de 6 barridos/s. El análisis cromatográfico fue realizado en modo de barrido completo. Los VOCs fueron identificados mediante patrones químicos de referencia, o por comparación entre la fragmentación MS obtenida con los espectros de masas presentes en la base de datos del *National Institute of Standards and Technology* (NIST 14) y con el índice de retención de Kovats.

5. Ensayos en plantas.

5.1. Esterilización y germinación de semillas.

Las condiciones de esterilización de las semillas utilizadas en este estudio variaron en función de la planta utilizada. Los protocolos de esterilización están recogidos en la Tabla 23. La germinación de las semillas fue realizada en placas Petri cuadradas (140 x 140 mm) con medio de cultivo agar-agua (1,5 % p/v) (Tabla 24). Las semillas fueron incubadas en oscuridad: 28 °C durante 2 días para la lechuga (*Lactuca sativa* L. var. *romana*), 20 °C durante 5 días en el caso del canónigo (*Valerianella locusta* L. var. *verte de Cambrai*), y 20 °C y 7 días para el apio (*Apium graveolens* L. var. *dulce*).

Tabla 23: Protocolos de esterilización de las semillas utilizadas en este estudio.

Cultivo	Etanol (70 % v/v)	NaClO (comercial)	H ₂ O destilada	Imbibición
Lechuga	30''	3'	x5 lavados	2 h
Apio	30''	3'	x5 lavados	2 h
Canónigos	30''	15'	x5 lavados	2 h

Tabla 24: Medio agar-agua.

Medio agar-agua	
Agar	20,0 g
H ₂ O destilada	1 L

5.2. Análisis de la colonización de las cepas seleccionadas sobre las raíces de las plántulas mediante microscopía óptica de fluorescencia.

La capacidad de colonización de las cepas seleccionadas fue evaluada mediante la inoculación de las cepas marcadas con el plásmido pHc60 o inmunolocalizadas sobre las raíces de las plántulas de lechuga, apio y canónigo crecidas en placas Petri cuadradas (140 x 140 mm).

Las semillas de cada cultivo fueron esterilizadas y germinadas siguiendo los protocolos indicados en el apartado 5.1. de Materiales y Métodos. Colocamos 5 semillas germinadas por placa Petri cuadrada, que contenía medio de cultivo Rigaud and Puppo al 1,5 % de agar (Tabla 25). Las semillas fueron ubicadas sobre papel Whatman estéril (para mantener las condiciones de humedad) e inoculadas con 300 µL/raíz de una suspensión de cada cepa a una DO_{600nm} de 0,6. Además, incluimos controles negativos sin inocular, en los que fueron añadidos 300 µL/raíz de agua destilada estéril. En total fueron incluidas 3 placas por cada tratamiento (15 plantas).

Tabla 25: Medio Rigaud and Puppo.

Medio Rigaud and Puppo	
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
KCl	0,2 g
NH ₄ NO ₃	0,4 g
EDTA Fe Na ₂	0,0025 g
Na ₂ Mo ₄	0,004 g
H ₃ BO ₃	0,018 g
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	0,02 g
ZnSO ₄	0,003 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,002 g
H ₂ O destilada	1 L

Las placas fueron selladas con ParafilmTM, colocando, además, material opaco en la parte inferior de la placa, para simular un suelo que cubriera 2/3 partes de esta. Las placas permanecieron en cámara iluminada (fotoperiodo 16/8, 60 % humedad relativa, temperaturas 25/17 °C día/noche, cantidad de luz de 400 $\mu\text{Einstein}/\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ y longitud de onda de entre 400 y 700 nm), y tras 7 y 14 días *post* inoculación (DPI) tomamos imágenes del proceso, siguiendo el protocolo descrito en los apartados 3.1 y 3.2 de Materiales y Métodos.

5.3. Inoculación de plántulas en placa bajo condiciones no salinas.

Los ensayos de interacción planta-microorganismo fueron llevados a cabo en placas Petri cuadradas (140 x 140 mm). Las semillas de cada cultivo (lechuga, apio y canónigo) fueron esterilizadas y germinadas siguiendo los protocolos indicados en el apartado 5.1. de Materiales y Métodos. La disposición en placa e inoculación de las semillas fueron realizadas de igual manera a lo descrito en el apartado 5.2. de Materiales y Métodos.

Las placas permanecieron en cámara iluminada, realizando mediciones y fotografías de las plántulas de cada cultivo a los 7 y 14 DPI.

5.4. Inoculación de plántulas en placa bajo condiciones de salinidad por NaCl.

Los ensayos de interacción planta-microorganismo bajo condiciones de estrés salino por NaCl fueron realizados siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 5.3. de Materiales y Métodos, modificando las condiciones de crecimiento de las semillas. En este caso colocamos 5 semillas germinadas por placa Petri, que contenía medio de cultivo Rigaud and Puppo al 1,5 % de agar, suplementado con una concentración de 100 mM NaCl en el caso de las semillas de lechuga y apio, y 50 mM NaCl, en el caso de las semillas de canónigo.

5.5. Inoculación de plántulas en placa bajo condiciones de salinidad por Na₂SO₄.

Los ensayos de interacción planta-microorganismo bajo condiciones de estrés salino por Na₂SO₄ fueron realizados siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 5.3. de Materiales y Métodos, modificando las condiciones de crecimiento de las semillas. En este caso colocamos 5 semillas germinadas por placa Petri, que contenía medio de cultivo Rigaud and Puppo al 1,5 % de agar, suplementado con una concentración de 50 mM Na₂SO₄ para todas las semillas.

5.6. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles bajo condiciones no salinas.

El estudio de la capacidad de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las bacterias para promover el crecimiento vegetal bajo condiciones no salinas fue realizado en sistemas de placas Petri con 2 compartimentos, con el objetivo de evitar el contacto directo entre plántula y bacteria. Las semillas de los tres cultivos fueron esterilizadas y germinadas siguiendo los protocolos indicados en el apartado 5.1. de Materiales y Métodos. Colocamos 5 semillas germinadas en uno de los compartimentos de la placa Petri, que contenía medio de cultivo Rigaud and Puppo al 1,0 % de agar. En el otro compartimento de la placa Petri inoculamos cada una de las cepas sobre su medio de cultivo correspondiente (TSA en el caso de las cepas pertenecientes a los géneros *Priestia* y *Pseudomonas*, e YMA en el caso de las cepas pertenecientes al género *Rhizobium*), añadiendo para ello 100 µL de una suspensión bacteriana a una DO_{600nm} 0,6. Además, incluimos controles negativos sin inocular, en los que añadimos 100 µL de agua destilada estéril en dicho compartimento. En total incluimos 3 placas por cada tratamiento (15 plantas).

Las placas fueron selladas con ParafilmTM, y colocadas en cámara iluminada. Llevamos a cabo mediciones y fotografías de las plántulas de cada cultivo a los 5 y 10 DPI.

5.7. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles bajo estrés por NaCl.

El estudio de la capacidad de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las bacterias para promover el crecimiento vegetal bajo salinidad por NaCl fue realizado siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 5.6. de Materiales y Métodos, modificando las condiciones de crecimiento de las semillas. En este caso, colocamos 5 semillas germinadas en el compartimento que contenía medio de cultivo Rigaud and Puppo al 1,0 % de agar, suplementado con una concentración de 100 mM NaCl (en el caso de las semillas de lechuga y apio) o de 50 mM NaCl (en el caso de las semillas de canónigo). Asimismo, en el otro compartimento inoculamos cada una de las cepas sobre su medio de cultivo correspondiente, suplementado con 50 o 100 mM de NaCl, de acuerdo con lo previamente indicado.

5.8. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles bajo estrés por Na₂SO₄.

El estudio de la capacidad de los compuestos orgánicos volátiles emitidos por las bacterias para promover el crecimiento vegetal bajo salinidad por Na₂SO₄ fue realizado siguiendo el mismo

procedimiento descrito en el apartado 5.6. de Materiales y Métodos, modificando las condiciones de crecimiento de las semillas. En este caso, colocamos 5 semillas germinadas en el compartimento que contenía medio de cultivo Rigaud and Puppo al 1,0 % de agar, suplementado con una concentración de 50 mM Na_2SO_4 para todas las semillas. Asimismo, en el otro compartimento inoculamos cada una de las cepas sobre su medio de cultivo correspondiente, suplementado con 50 mM de Na_2SO_4 .

5.9. Ensayos de invernadero bajo condiciones no salinas y de estrés salino por NaCl y Na_2SO_4 .

Los ensayos de invernadero fueron realizados en las instalaciones del Instituto de Investigación en Agrobiotecnología (CIALE), con unas condiciones de humedad relativa del 50-60%, una temperatura entre 20 y 25 °C, y un fotoperiodo 16/8 h (luz/oscuridad) de luz natural.

Las semillas de lechuga, apio y canónigo utilizadas para estos ensayos fueron esterilizadas y germinadas de acuerdo con los protocolos indicados en el apartado 5.1. de Materiales y Métodos. Una vez germinadas, fueron pasadas a macetas de plástico de 2,4 L de capacidad (1 semilla por maceta) que contenían una mezcla 3:1 v/v de suelo no esterilizado y vermiculita "SEED PRO 6040" (PROJAR, Madrid, España). Las condiciones del suelo utilizado fueron: arcilloso limoso (arcilla: 19,80%; limo: 56,23%; arena: 23,97%), pH 8,4, CE 0,1 dS m^{-1} , carbono orgánico 1,44%, N 0,157%, materia orgánica 2,49%, relación C/N 9,2, P disponible 0,10 cmol (+) kg^{-1} , K disponible 0,30 cmol (+) kg^{-1} , Mg disponible 0,51 cmol (+) kg^{-1} .

A los 5 días, las plantas fueron inoculadas con 5 mL de una suspensión bacteriana de cada una de las cepas o agua destilada estéril (en el caso de los controles negativos), según el tratamiento correspondiente. La suspensión bacteriana fue preparada a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0,6. Se utilizaron 20 plantas por tratamiento, dispuestas de manera aleatoria en el invernadero y con rotaciones semanales.

Los ensayos fueron realizados bajo condiciones de crecimiento normal y de estrés salino por NaCl y por Na_2SO_4 , incluyendo en todas ellas sus respectivos tratamientos inoculados con cada una de las cepas y tratamientos control (sin inocular). En el caso del estrés salino por NaCl establecimos una concentración de 100 mM para las plantas de lechuga y apio, y 50 mM para las de canónigo. Para el estrés salino por Na_2SO_4 establecimos una concentración de 50 mM para todas las plantas. Para inducir las condiciones de estrés salino, aplicamos riegos de 50 mL de una solución acuosa de NaCl (50 o 100 mM) o Na_2SO_4 (50 mM) cada 72 h, mientras que las plantas desarrolladas en condiciones no salinas fueron regadas sólo con agua destilada estéril,

en las mismas condiciones. La conductividad eléctrica del suelo fue monitoreada antes y después de cada riego mediante un conductímetro HI993310 de medida directa en suelo (HANNA Instruments, EE. UU.), regando en las condiciones previamente indicadas hasta alcanzar la concentración salina deseada en cada caso, y ajustando posteriormente los riegos para mantener la concentración indicada.

Tras la inoculación, la lechuga y el canónigo permanecieron 25 días en el invernadero, y el apio 55 días. Previamente a la recogida, la cantidad de clorofila presente en las hojas de las plantas fue medida con un Chlorophyll meter SPAD-502 PLUS (Konica Minolta, Japón). Transcurrido ese tiempo la parte aérea de las plantas fue recogida para analizar su peso húmedo y seco (secadas en estufa a 70 °C durante 3 días). Además, recogimos muestras representativas de la parte aérea de las plantas para la evaluación del contenido en compuestos fenólicos, los análisis de transcriptómica y de supervivencia de *Caenorhabditis elegans*.

5.9.1. Análisis químico de micro y macroelementos en muestras vegetales.

A partir de muestras procedentes de los ensayos en invernadero con los tres cultivos de interés, procedimos al análisis de su contenido en micro y macronutrientes en el Servicio de Análisis e Instrumentación del IRNASA-CSIC (Salamanca, España).

Tras secar y homogeneizar (triturar) las muestras, el contenido en carbono y nitrógeno totales fue analizado por el método Dumas, utilizando un Analizador de Combustión CN628 (LECO, EE. UU.). Además, la composición mineral de dichos tejidos vegetales fue determinada mediante espectrometría de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente con un sistema Varian 720-ES ICP-OES (Richmond Scientific, Reino Unido), tras digestión en horno microondas ETHOS™ UP (Milestone Srl., Italia) utilizando ácido nítrico diluido y peróxido de hidrógeno.

5.9.2. Análisis de compuestos fenólicos en muestras vegetales.

El contenido en compuestos fenólicos de las plantas procedentes de los ensayos en invernadero fue analizado en colaboración con el Grupo de Investigación en Polifenoles del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca.

Para ello recogimos muestras representativas de cada uno de los tres ensayos (lechuga, apio y canónigo), que fueron congeladas a – 80 °C con el fin de evitar la posible degradación de los compuestos de interés. A continuación, las muestras fueron liofilizadas y sobre ellas realizamos una extracción, utilizando MeOH:H₂O 80:20. Un total de 0,2 g por muestra fueron separados

en tubos Falcom (tres tubos por muestra), sobre los que añadimos 8 mL de la solución hidroalcohólica para extraer en un baño de ultrasonidos (30 min). A continuación, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 10.000 rpm y 10 °C, los sobrenadantes fueron filtrados con papel de filtro y recogidos en balones de destilación. Realizamos este proceso tres veces, obteniendo un volumen final de 24 mL por cada 0,2 g de muestra, eliminando las clorofilas mediante extracción líquido-líquido con hexano. El extracto final fue concentrado a presión reducida, utilizando un rotavapor Büchi R-124 acoplado a un baño de agua caliente B-480 y una bomba de vacío B-270 (Marshall Scientific, EE. UU.). El residuo fue solubilizado en un volumen final de 2 mL de agua destilada.

La determinación de la composición fenólica de los extractos vegetales fue realizada mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección mediante red de diodos y espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS). Las muestras fueron inyectadas en un cromatógrafo de líquidos Hewlett-Packard de la serie 1200 (Agilent Technologies, Alemania) utilizando una columna Spherisorb® S3 ODS-2 C18 de fase reversa (3 µm, 150 × 4,6 mm) (Waters Corporation, EE. UU.) termostatzada a 35 °C. Como eluyentes se utilizaron una solución acuosa de ácido fórmico (0.1% v/v) (A) y acetonitrilo (B) siguiendo el gradiente previamente descrito (Jiménez-Gómez et al., 2020). La detección fue llevada a cabo a 280, 330 y 370 nm como longitudes de onda preferentes y los espectros fueron registrados entre 220 y 600 nm. El espectrómetro de masas estaba conectado al sistema HPLC a través de la salida de la celda DAD (Detector de Red de Diodos). La detección por espectrometría de masas (MS) fue realizada utilizando un API 3200 Qtrap (Sciex, Alemania) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un analizador de masas de triple cuadrupolo-trampa de iones, empleando la metodología desarrollada previamente para compuestos no antociánicos (Dueñas et al., 2015). Brevemente, se utilizó aire de grado cero como gas nebulizador (30 psi) y gas turbo (40 psi, 400 °C), y nitrógeno como gas de cortina (20 psi) y gas de colisión (medio). El voltaje de ionización fue fijado en - 4500 V y los espectros se registraron en modo negativo entre m/z 100 y 1700. El detector de MS fue programado para realizar el análisis completo de masas (*full scan* – EMS), seguido de un análisis de MS/MS (EPI) para mostrar el patrón de fragmentación del principal ion detectado.

La identificación de los compuestos fue realizada a partir de los espectros UV-vis, los tiempos de retención y los espectros de masas, comparándolos con los estándares comerciales cuando estaban disponibles. Los compuestos individuales fueron cuantificados a partir de los valores del área del pico obtenidos en los cromatogramas registrados a 280 nm (glucósido del ácido

protocatéquico), 330 nm (derivados del ácido cafeico) o 360 nm (derivados de flavona y flavonol), utilizando el método del patrón externo. El ácido cumárico, la quercetina 3-O-glucósido quercetina y la luteolina 7-O-glucósido fueron cuantificadas utilizando una curva de calibración de sus propios patrones comerciales. Los contenidos de derivados del ácido cafeico, glucósido del ácido protocatéquico, derivado de apigenina y derivados de quercetina fueron expresados como equivalentes de ácido cafeico, ácido protocatéquico, apigenina 7-O-glucósido y quercetina 3-O-glucósido, respectivamente. Los resultados fueron obtenidos del valor medio de tres análisis independientes, expresados en g kg⁻¹ de peso seco de la planta.

5.9.3. Análisis de la expresión génica en muestras de lechuga por PCR cuantitativa (q-PCR).

A partir de muestras procedentes del ensayo en invernadero de lechuga realizamos el análisis de la expresión de los genes *LsPIP2*, *LsHKT1;6*, *LsNHX2*, *LsPAL* y *LsSOD* bajo las diferentes condiciones y tratamientos aplicados, mediante PCR a tiempo real (q-PCR).

5.9.3.1. Preparación de las muestras.

A los 25 DPI y en condiciones de asepsia, recogimos la parte aérea de 4 plantas por cada tratamiento y condición, depositándose en tubos tipo Falcon estériles y libres de ribonucleasas. Las muestras fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido, moliéndose con morteros de plástico (estériles y libres de ribonucleasas) manteniendo la temperatura de congelación. Posteriormente fueron almacenadas a -80 °C.

5.9.3.2. Extracción de ARN y obtención de cDNA.

Sobre cada una de las muestras extrajimos el ARN total mediante el kit “PureLink™ RNA Mini Kit” (Invitrogen™), siguiendo las instrucciones del fabricante, pero con ligeras modificaciones. Transferimos 100 mg de cada muestra a microtubos de 2 mL con bolas de vidrio de 0.5 mm (Fisherbrand™), sobre los que añadimos 0,6 mL de Lysis Buffer (suplementado con 2-mercaptoetanol al 1%) y 1 mL/g de planta de “Plant RNA Isolation Aid” (Invitrogen™). A continuación, las muestras fueron homogeneizadas en el equipo FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals, EE. UU.), aplicando 3 ciclos de agitación de 6.0 m/sec durante 40” (enfriando 2 minutos en hielo entre cada ciclo), continuando después con el protocolo descrito. El ARN obtenido fue almacenado a -80 °C.

Las muestras de ARN fueron tratadas con DNAsa, siguiendo el protocolo rutinario del kit comercial “TURBO DNA-free™” (Invitrogen™). A continuación, comprobamos la ausencia

de ADN en las muestras mediante la amplificación por PCR de los genes endógenos (*LsEIF2A* y *LsTIP41*) y electroforesis en gel de agarosa. En este sentido, la ausencia de amplificación indica ausencia de ADN viable, en comparación con la amplificación obtenida en el control positivo (ADN de lechuga). Posteriormente, medimos la concentración de ARN y ADN (como comprobación de su ausencia) en las muestras mediante los kits “Qubit™ RNA High Sensitive Assay” y “Qubit™ dsDNA High Sensitive Assay”, en el fluorómetro Qubit 3 (Invitrogen™, EE. UU.). Además, comprobamos la calidad del ARN utilizando el espectrofotómetro/fluorómetro DS-11 FX+ (Denovix®, EE. UU.), y la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %.

La obtención del ADN complementario (cDNA) a partir de ARN fue realizada por transcripción inversa, mediante el kit “First Strand cDNA Synthesis” (Thermo Scientific™), siguiendo el protocolo comercial. En cada muestra ajustamos la cantidad de ARN total, con el fin de añadir 0,2 µg de ARN molde a cada reacción.

5.9.3.3. Análisis de la expresión de genes por q-PCR.

Los cambios de expresión de los genes *LsPIP2*, *LsHKT1;6*, *LsNHX2*, *LsPAL* y *LsSOD* bajo las diferentes condiciones y tratamientos fueron estudiados por q-PCR utilizando el equipo StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems®, EE. UU.). Los juegos de oligos utilizados para amplificar cada uno de los genes están recogidos en la Tabla 26. La mezcla para cada reacción fue preparada añadiendo 1 µL de cDNA, 2 µL de cada primer (2 µM), y 5 µL de “Power™ SYBR™ Green Master Mix” (Applied Biosystems™), obteniendo un volumen final de 10 µL. Cada reacción fue realizada por triplicado, a partir de cada una de las 4 réplicas biológicas.

El programa de PCR utilizado consistió en una fase inicial de 2' a 50 °C, seguido de 2' a 95 °C, y a continuación 40 ciclos de 3" a 95 °C y 30" a 60 °C. La especificidad del procedimiento de amplificación fue comprobada mediante *Melt curve*, la cual constaba de un ciclo de 15" a 95 °C, seguido de 1' a 60 °C, y una subida progresiva de 0,3 °C hasta alcanzar 95 °C (manteniéndose finalmente 15" a 95 °C).

La expresión relativa de los transcritos fue calculada empleando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Según este método, los datos hacen referencia a cambios en los valores de expresión génica normalizados a uno o más genes de referencia (o endógenos) y a una condición control de normalización. Para la normalización de los valores de expresión, dos genes endógenos fueron analizados en todos los tratamientos, aunque finalmente la normalización fue

llevada a cabo con el gen *LsEIF2A*, debido a su expresión más estable (las secuencias de los oligos utilizados en la amplificación de estos genes también aparecen recogidas en la Tabla 26). Como condición control de normalización o calibrador utilizamos el control sin inocular no sometido a ningún tipo de estrés salino. Además, en todas las reacciones de PCR incluimos controles negativos sin cDNA.

La elección de *LsEIF2A* y *LsTIP41* como genes endógenos fue realizada en base a los resultados obtenidos por Borowski y colaboradores (2014), quienes llevaron a cabo un proceso de selección y validación de genes de referencia adecuados y confiables para análisis de RT-qPCR mediante los *softwares* geNorm y NormFinder. En este artículo demostraron que los genes endógenos con expresión más estable en hojas de lechuga sometidas a estrés salino fueron los seleccionados para este trabajo.

Tabla 26: Secuencias de los oligos utilizados en los análisis de expresión génica por q-PCR.

Gen	Oligo	Secuencia (5'-3')	Longitud del amplicón	Referencia
<i>LsEIF2A</i>	Forward	TAGGCGAGTGGAGAAGCATT	71 pb	Borowski et al. (2014)
	Reverse	GTAGAAACAGCAACAGGCAAA		
<i>LsTIP41</i>	Forward	GAGAGATTTGCTGGAGGGAACTA	101 pb	Borowski et al. (2014)
	Reverse	CCTTTGACTGATGATGTTTGGGA		
<i>LsPIP2</i>	Forward	CAAATGGTCCTTCTACAGAGC	304 pb	Porcel et al. (2006)
	Reverse	CAAACACTGTGCAATCATGTATCC		
<i>LsHKT1;6</i>	Forward	GTTTGTGAAATCCGTTGTG	109 pb	Santander et al. (2021)
	Reverse	AATGGGTGGAAATACTCAGGT		
<i>LsNHX2</i>	Forward	CTGGGTTTGTTGTTTATAGGG	81 pb	Santander et al. (2021)
	Reverse	TCAAACCATCACTCACTTCAC		
<i>LsPAL</i>	Forward	GGAGAGACGCTTACAGTTTCTCAG	201 pb	Matamoros et al. (2022)
	Reverse	TTGCTTAGTTCTCCGGTGAGAG		
<i>LsSOD</i>	Forward	CAGAGGCAGAGACGGTGTA	266 pb	Tang et al. (2023)
	Reverse	GCATTGTTGAAGGTTGGAAG		

6. Evaluación de la influencia de extractos ricos en compuestos fenólicos de plantas de lechuga en la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*.

6.1. Crecimiento de *Caenorhabditis elegans* en medios de cultivo.

Para los ensayos con el nemátodo *Caenorhabditis elegans* utilizamos el medio de cultivo NGM (*Nematode Growth Medium*) (Tabla 27). La mezcla fue esterilizada en autoclave, atemperada en baño de agua a 60 °C durante 40 min y, a continuación, enriquecida con: 400 µL CaCl₂ 1 M, 400 µL de colesterol (5 mg/mL etanol), 400 µL MgSO₄ 1 M, 10 mL buffer fosfato 1 M pH 6,0 (108,3 g KH₂PO₄, 35,6 g K₂HPO₄ en 1 L de H₂O), 400 µL de ampicilina sódica (50 µg/mL) y 700 µL de nistatina 1 % (1 g/100 mL en etanol: acetato de amonio 1:1), todo ello previamente esterilizado en por filtración. El medio NGM fue repartido en placas Petri en cantidad constante, para poder mantener el mismo enfoque en el microscopio al cambiar de una placa a otra.

Tabla 27: Medio NGM.

Medio NGM	
Peptona	1,0 g
NaCl	1,2 g
Agar	6,8 g
H ₂ O destilada	390 mL

Para los ensayos de cultivo de *Caenorhabditis elegans* en presencia de los extractos ricos en compuestos fenólicos, obtenidos de las plantas de lechuga, añadimos dichos extractos (previamente liofilizados) al medio de cultivo, antes a ser dispensado en placas. Para ello, los extractos liofilizados (preparados de acuerdo con la metodología descrita en el 5.9.2. de Materiales y Métodos) fueron disueltos en DMSO, y añadidos al medio a una concentración de 10 µg/mL. Además, incluimos en los ensayos placas control que contenían únicamente DMSO (es decir, libres de extractos). Todas las placas contenían una concentración final en el medio de cultivo de 0,1 % (v/v) del extracto disuelto en DMSO o DMSO puro.

Para la realización de los ensayos con *Caenorhabditis elegans* es esencial partir de una población sincronizada, de manera que trabajemos con una única generación de gusanos. Para prevenir la reproducción de la población sincronizada y, por tanto, evitar una mezcla de diferentes generaciones, añadimos 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FUdR) a las placas a las que serían transferidos los gusanos a partir del 1^{er} día de adulto. FUdR es un compuesto que inhibe

la síntesis de ADN y ARN, produciendo la muerte de células mitóticas y la inhibición de la síntesis de proteínas (Hosono, 1978). Dado que las células de nematodos adultos son en su mayoría células post-mitóticas, el tratamiento con FUdR antes de alcanzar la madurez sexual evita el desarrollo de la progenie con efectos mínimos en el desarrollo del adulto (Mitchell et al., 1979). Por tanto, preparamos una solución de FUdR 150 mM disuelta en agua destilada estéril que fue añadida al medio NGM, obteniendo una concentración final de FUdR en las placas de 150 μ M. A partir del primer día de adulto, los gusanos fueron pasados cada dos días a placas que contenían el extracto objeto de estudio y FUdR.

Como fuente de alimento para el nemátodo utilizamos *Escherichia coli* OP50, inoculando sobre las placas de NGM 30 μ L/mL una suspensión bacteriana de la cepa de 0,6 a DO_{600nm}. La suspensión fue obtenida a partir de un cultivo *overnight* (a 37 °C) crecido en medio LB (Tabla 18) suplementado con ampicilina (1 μ L/mL), ajustando el pH a un valor de 7,0 con NaOH 1 M.

6.2. Métodos de manejo de *Caenorhabditis elegans*.

Los ensayos con *Caenorhabditis elegans* fueron realizados con la cepa silvestre N2. Las placas de NGM con la cepa N2 fueron incubadas a 20 °C.

La **conservación a largo plazo** del nemátodo fue realizada por criopreservación a -80 °C, utilizando una solución estéril de glicerol al 30 % diluido en tampón M9 (3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, 1 mL 1 M MgSO₄, H₂O destilada hasta 1 L), repartida en criotubos de 1 mL.

El **mantenimiento periódico del nemátodo** fue realizado mediante resiembra en placas frescas, transfiriendo un trozo de agar de una placa con el nemátodo previamente crecido a la nueva placa.

Para la **transferencia individual de *Caenorhabditis elegans*** entre placas utilizamos un asa de siembra de alambre de platino de calibre 32. El alambre fue introducido en una pipeta Pasteur de vidrio, aplanado y redondeado su extremo, para evitar dañar al gusano o al agar durante su manejo. La transferencia del gusano fue realizada bajo una lupa Leica M205 FA (Leica Microsystems, Alemania), colocada al lado de un mechero de alcohol (con el fin de mantener condiciones de asepsia). Utilizamos el asa, previamente esterilizada en la llama, para coger el nemátodo cuidadosamente (al coger una pequeña cantidad de biomasa bacteriana con la punta del asa facilitamos la adherencia del nemátodo), y pasarlo a una nueva placa, sin romper el agar.

La **transferencia de nemátodos en cantidad** entre placas fue realizada utilizando una solución de tampón M9. Las placas Petri (60 mm) que contenían la población de nemátodos fueron lavadas dos veces con 3 mL del tampón, y la suspensión fue centrifugada (90", 4500 g). La mayoría de sobrenadante fue descartado, dejando una pequeña cantidad para resuspender el pellet que contenía los nematodos, que fueron transferidos e incubados en nuevas placas de NGM.

La **sincronización de *Caenorhabditis elegans*** fue llevada a cabo con el fin de obtener una población en la que todos los individuos a utilizar en el ensayo estuvieran en el mismo estadio larvario, es decir, que tuvieran la misma edad. Para ello, realizamos una siembra de la cepa N2 en placas NGM con OP50, incubándolas 3-4 días a 20 °C, hasta obtener una elevada cantidad de adultos hermafroditas con huevos en su interior. A continuación, trasladamos individualmente adultos con huevos a nuevas placas, de manera que las nuevas placas solo contuvieran este tipo de nemátodos. Los adultos permanecieron en las placas durante 2-3 horas, tiempo suficiente para que realizaran la puesta de los huevos. Transcurrido ese tiempo, los adultos presentes en las placas fueron retirados, con el objetivo de dejar únicamente los huevos. Los huevos fueron incubados 24 h a 20 °C, permitiendo su eclosión y desarrollo a estadio larvario L1.

6.3. Ensayos de estrés inducido térmicamente.

La vida de *Caenorhabditis elegans* es dependiente de la temperatura, siendo inversamente proporcional la relación entre la temperatura de cultivo y la vida del nematodo. De esta manera, los ensayos de estrés térmico nos permiten comprobar si existe una relación entre la supervivencia del nematodo y su exposición a los extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos. Los ensayos fueron realizados siguiendo la metodología previamente descrita por Saul et al. (2009), pero con ligeras modificaciones.

En primer lugar, la puesta de huevos procedente de la sincronización fue realizada en placas Petri (60 mm) con NGM, sin FUdR, pero con el extracto a ensayar (10 µg/mL) o DMSO puro al 0,1 % (placas control). Una vez retirados los adultos, los huevos fueron incubados a 20 °C durante 2 días (hasta alcanzar fase adulta). Transcurrido este tiempo, los adultos desarrollados a partir de los huevos fueron trasladados individualmente a placas Petri (35 mm) con FUdR (para evitar el desarrollo de los huevos que pudieran poner los nematodos) y con el extracto o el DMSO (en el caso del tratamiento control). La supervivencia tras el estrés térmico fue evaluada en diferentes estados de desarrollo del nematodo: a los 2 y 9 días tras alcanzar la fase

adulta. Para inducir el estrés térmico, los nematodos fueron sometidos a una temperatura de 35 °C durante 8 horas, midiendo a continuación la supervivencia. Fueron considerados como nematodos muertos aquellos que no respondían a ningún estímulo, como, por ejemplo, ligeros toques con el asa de siembra. Cada tratamiento, en cada uno de los tiempos de medida: 2 y 9 días, estaba conformado por 80 nematodos, divididos en 4 placas Petri (35 mm) con 20 nematodos en cada una. Además, los ensayos fueron realizados por triplicado.

7. Tratamiento estadístico de los datos.

Las diferencias significativas entre los tratamientos aplicados en cada uno de los ensayos realizados fueron evaluadas mediante análisis de la varianza (ANOVA) unidireccional, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$), utilizando el software estadístico StatView® (5.0) (BrainPower Inc, Fremont, CA, EE. UU.). En los casos necesarios, realizamos un ANOVA de dos vías de manera inicial, para determinar si había interacción entre las variables “inoculación” y “salinidad”, utilizando las funciones `tapply()` y `aov()`, en base R. Al no observar interacción significativa entre ambas variables en los diferentes ensayos continuamos aplicando ANOVA unidireccional.

Finalmente, para evaluar la supervivencia al estrés térmico en *Caenorhabditis elegans* realizamos tablas de contingencia y calculamos la significancia estadística entre tratamientos mediante la prueba Chi Cuadrado de significancia exacta bilateral de Fisher ($p \leq 0,05$), utilizando la función `fisher.test()`, en base R.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

Aislamiento y caracterización genotípica de cepas bacterianas procedentes de muestras de: nódulos de *Trifolium repens* L., y suelo rizosférico y raíces de *Plantago maritima* L. y *Camphorosma monspeliaca* L.

En este capítulo abordamos el aislamiento y la caracterización genotípica de bacterias procedentes de diferentes tipos de muestras: interior de nódulos de plantas de *Trifolium repens* L. crecidas en suelos procedentes de Huerta y Golpejas, suelo rizosférico e interior de raíces de *Plantago maritima* L., y suelo rizosférico e interior de raíces de *Camphorosma monspeliaca* L. Por una parte, llevamos a cabo el aislamiento y caracterización de cepas bacterianas procedentes del interior de nódulos de plantas de trébol blanco (*Trifolium repens* L.), que habían sido obtenidas a partir de semillas crecidas en suelos procedentes de dos localizaciones de la provincia de Salamanca: Huerta y Golpejas. El objetivo era la obtención de cepas pertenecientes al género *Rhizobium*, ampliamente descrito por su capacidad como promotor del crecimiento vegetal, incluso en cultivos no leguminosos y bajo condiciones de estrés abiótico (Bano & Fatima, 2009; Flores-Félix et al., 2018; Flores-Félix et al., 2021; García-Fraile et al., 2012; Jiménez-Gómez et al., 2018; Jiménez-Gómez et al., 2021). Por otra parte, abordamos el aislamiento y caracterización de cepas bacterianas procedentes de suelo rizosférico e interior de raíces de dos plantas recogidas en la localidad salmantina de San Cristóbal de la Cuesta: *Plantago maritima* L. y *Camphorosma monspeliaca* L. Esta zona de muestreo fue seleccionada debido a las condiciones de alta conductividad eléctrica del suelo, así como las plantas halófitas capaces de desarrollarse en él. La finalidad de este aislamiento fue la obtención de cepas halotolerantes y con capacidad PGP.

En primer lugar, llevamos a cabo el aislamiento de cepas bacterianas de todas las muestras, siendo a continuación analizadas mediante la técnica MALDI-TOF, con el objetivo de eliminar posibles bacterias de relevancia clínica. A partir de los aislados restantes, procedimos al análisis de la biodiversidad intraespecífica mediante la obtención de perfiles RAPD, y seleccionamos un representante de cada grupo, que fue identificado a través de secuenciación del gen ribosómico rRNA 16S. Además, comprobamos la presencia del gen *betB* (relacionado con la síntesis de betaína) en los aislados seleccionados, mediante su amplificación por PCR, como un criterio selectivo inicial dentro de la elección de candidatos de interés para su uso como bioinoculantes bajo condiciones de salinidad.

Aunque el desarrollo metodológico es común para los diferentes tipos de muestras (obtenidas de nódulos, y obtenidas de suelo rizosférico e interior de raíz), los resultados están expuestos por separado, para lograr una mayor claridad.

1. Características edáficas de los suelos utilizados para el aislamiento bacteriano.

El análisis de los suelos fue realizado en el Servicio de Análisis e Instrumentación del IRNASA-CSIC (Salamanca, España). Las características edáficas de los suelos utilizados en el presente trabajo están recogidas en la Tabla 28.

Tabla 28: Características de los suelos utilizados para el aislamiento bacteriano.

LOCALIZACIÓN		Huerta	Golpejas	San Cristóbal de la Cuesta
COORDENADAS		40°58'17.5"N 5°28'14.5"W	41°00'57.0"N 5°55'19.7"W	41°02'29.4"N 5°38'02.4"W
TEXTURA USDA	% Arcilla	14,10	4,4	24,32
	% Limo	31,96	43,71	30,74
	% Arena	53,95	51,89	44,94
	Clasificación USDA	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Franco Arenoarcilloso
ACIDEZ	pH (agua)	7,45	6,28	10,14
	% CaCO ₃	0,15	0	0,6
MATERIA ORGÁNICA	% C Org.	1,11	0,74	0,55
	% Mat. Org.	1,91	1,27	0,95
	% N	0,126	0,088	0,06
	C/N	8,8	8,4	9,1
ASIMILABLES	ppm P	49,16	14,03	15,74
	ppm Ca	1554,86	1061,18	1385,62
	ppm K	185,71	58,49	380,49
	ppm Mg	205,24	182,01	153,88
CAPACIDAD DE INTERCAMBIO IÓNICO / cmol (+)/Kg suelo	Total (NH ₄ ⁺)	6,04	4,74	10,25
CONDUCTIVIDAD (mS/cm)		0,08	0,03	6,78

Los suelos de Huerta y Golpejas exhibieron una textura franco arenosa y pH cercano a la neutralidad, con valores de materia orgánica comparables. En contraste, el suelo recogido en San Cristóbal de la Cuesta mostró una mayor proporción de arcilla (textura franco arenoarcillosa), un pH básico, y una menor cantidad de materia orgánica, además de una elevada conductividad eléctrica, lo que lo clasifica como suelo salino.

La medición de la conductividad eléctrica del suelo de San Cristóbal de la Cuesta fue llevada a cabo directamente en campo utilizando un conductímetro HI993310 de medida directa en suelo (HANNA Instruments, EE. UU.). Esta decisión fue tomada por las características edafológicas particulares de dicha zona de muestreo. Según Ladero y colaboradores (1997), estas áreas están

formadas por arenas y arcillas del Cuaternario o del Holoceno, que retienen agua procedente de arroyos estacionales, resultando en la formación periódica de eflorescencias salinas. En años de lluvia normales, estas zonas se inundan durante el invierno, y al secarse, las sales acumuladas en los sedimentos son transportadas hacia horizontes superficiales, generando las eflorescencias salinas y aumentando la conductividad eléctrica del suelo (Figura 13). Con las lluvias de otoño, las sales son transportadas hacia horizontes más profundos. En términos de flora, estas áreas son consideradas pastizales vivaces halosubnitrófilos, donde predominan plantas halófilas anuales y perennes (como *Plantago maritima* L. y *Camphorosma monspeliaca* L.) (Gallardo & González-Hernández, 1997; Ladero et al., 1997).



Figura 13: Eflorescencias salinas y comunidades vegetales presentes en el suelo de San Cristóbal de la Cuesta.

2. Aislamiento de cepas bacterianas procedentes del interior de nódulos de *Trifolium repens* L., y de suelo rizosférico e interior de raíces de *Plantago maritima* L. y *Camphorosma monspeliaca* L.

El aislamiento de cepas bacterianas fue realizado siguiendo la metodología indicada en el apartado 1.2 de Materiales y Métodos. En la Tabla 29 están recogidas las 51 cepas aisladas del interior de nódulos de trébol blanco crecido en suelos de dos localizaciones de la provincia de Salamanca: Huerta y Golpejas. Tanto el tipo de muestra como el medio seleccionado para su aislamiento tenían como objetivo el aislamiento de cepas del género *Rhizobium*.

Tabla 29: Listado de las cepas aisladas del interior de nódulos de *Trifolium repens* L.

Localización	Tipo de muestra	Cepas
Huerta	Interior nódulos <i>Trifolium repens</i> L.	HUTR01, HUTR02, HUTR03, HUTR04, HUTR05, HUTR06, HUTR07, HUTR08, HUTR09, HUTR10, HUTR11, HUTR12, HUTR13, HUTR14, HUTR15, HUTR16, HUTR17
Golpejas	Interior nódulos <i>Trifolium repens</i> L.	GPTR01, GPTR02, GPTR03, GPTR04, GPTR05, GPTR06, GPTR07, GPTR08, GPTR09, GPTR10, GPTR11, GPTR12, GPTR13, GPTR14, GPTR15, GPTR16, GPTR17, GPTR18, GPTR19, GPTR20, GPTR21, GPTR22, GPTR23, GPTR24, GPTR25, GPTR26, GPTR27, GPTR28, GPTR29, GPTR30, GPTR31, GPTR32, GPTR33, GPTR34

En la Tabla 30 aparecen recogidas las 138 cepas aisladas de las muestras obtenidas en San Cristóbal de la Cuesta. Los aislados están nombrados en base al nicho de muestreo (suelo rizosférico o endófitos) y a la planta asociada (*Plantago maritima* L. o *Camphorosma monspeliaca* L.). Utilizamos medios de cultivo generalistas, YMA y TSA, con el fin de obtener la mayor diversidad bacteriana posible. Además, estos medios de cultivo fueron suplementados con NaCl, para dirigir el aislamiento hacia cepas halotolerantes.

Tabla 30: Listado de las cepas aisladas de suelo rizosférico y del interior de raíces de *Plantago maritima* L. y *Camphorosma monspeliaca* L.

Localización	Tipo de muestra	Cepas
San Cristóbal de la Cuesta	Suelo rizosférico <i>Plantago maritima</i> L.	SCPM01, SCPM02, SCPM03, SCPM04, SCPM06, SCPM07, SCPM08, SCPM09, SCPM11, SCPM12, SCPM13, SCPM14, SCPM16, SCPM17, SCPM18, SCPM20, SCPM21, SCPM22, SCPM23, SCPM24, SCPM26, SCPM27, SCPM28, SCPM29, SCPM30, SCPM31, SCPM32, SCPM33, SCPM35, SCPM36, SCPM37, SCPM38, SCPM39, SCPM41, SCPM42, SCPM43, SCPM44, SCPM45, SCPM46, SCPM47, SCPM49, SCPM50, SCPM52, SCPM53, SCPM54, SCPM55, SCPM56, SCPM57, SCPM58, SCPM59, SCPM61, SCPM63, SCPM64, SCPM65, SCPM66, SCPM67, SCPM69, SCPM70, SCPM71, SCPM73, SCPM74, SCPM75, SCPM76, SCPM77, SCPM79, SCPM80, SCPM81
San Cristóbal de la Cuesta	Endófitos <i>Plantago maritima</i> L.	SCPME02, SCPME03, SCPME04, SCPME06, SCPME07, SCPME09, SCPME11, SCPME12, SCPME13, SCPME14, SCPME15
San Cristóbal de la Cuesta	Suelo rizosférico <i>Camphorosma monspeliaca</i> L.	SCCM01, SCCM02, SCCM03, SCCM05, SCCM06, SCCM07, SCCM08, SCCM09, SCCM10, SCCM11, SCCM12, SCCM13, SCCM14, SCCM15, SCCM16, SCCM17, SCCM18, SCCM21, SCCM22, SCCM23, SCCM28, SCCM30, SCCM33, SCCM36, SCCM38, SCCM41, SCCM42, SCCM43, SCCM44, SCCM45, SCCM46, SCCM49, SCCM50, SCCM52, SCCM53, SCCM54, SCCM55, SCCM57, SCCM59, SCCM62, SCCM63, SCCM65, SCCM67, SCCM70
San Cristóbal de la Cuesta	Endófitos <i>Camphorosma monspeliaca</i> L.	SCCME01, SCCME02, SCCME03, SCCME04, SCCME05, SCCME09, SCCME10, SCCME11, SCCME13, SCCME14, SCCME15

3. Identificación de aislados patógenos por MALDI-TOF

La espectrometría de masas por ionización de desorción láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) es un método utilizado en identificación bacteriana, basado en los perfiles proteicos característicos de cada organismo (Ferreira et al., 2011). La rapidez y eficiencia de esta técnica ha dado lugar a su aplicación mayoritaria en identificación de aislados clínicos, de contaminaciones alimentarias, o bioterrorismo, por lo que las bases de datos disponibles suelen tener un enfoque relacionado con estas áreas (Ferreira et al., 2011; Sandrin et al., 2013). Por esta razón, decidimos utilizar esta metodología para identificar posibles patógenos humanos entre los aislados obtenidos. Además, los perfiles proteicos de los aislados procedentes del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. también fueron comparados frente a una base de datos local que había sido realizada por el Grupo Interacciones Microbianas, y que incluye numerosas cepas del género *Rhizobium*.

Ninguna de cepas aisladas a partir del interior de los nódulos del trébol blanco fue identificada como un microorganismo con relevancia clínica. Por otra parte, dentro de los aislados obtenidos a partir de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta fueron identificadas 25 bacterias con relevancia clínica, clasificadas dentro de los grupos 1+ o 2, según la DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares). De acuerdo con la Directiva 2000/54/CE, un agente biológico del grupo 1 es aquel que “resulte poco probable que cause enfermedad en el hombre”, pero, según las Normas Técnicas para Agentes Biológicos (TRBA) del Comité de Agentes Biológicos (ABAS), la etiqueta identificativa “+” establece que “en casos individuales son identificados como patógenos o sospechosos de serlo, principalmente en personas con una inmunidad considerablemente reducida” (ABAS, 2010). Asimismo, la Directiva 2000/54/CE clasifica a los agentes biológicos del grupo 2 como aquel que “pueda causar una enfermedad en el hombre y pueda suponer un peligro para los trabajadores; es poco probable que se propague a la colectividad; existen generalmente una profilaxis o un tratamiento eficaces”. Por esta razón, los aislados recogidos en la Tabla 31 fueron descartados para su uso en el presente trabajo.

Tabla 31: Patógenos identificados por MALDI-TOF entre los aislados obtenidos en las muestras de San Cristóbal de la Cuesta.

Cepa	Identificación (MALDI-TOF)	Score (MALDI-TOF)	Grupo de Riesgo
SCPM60	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	2,004	1+
SCPM62	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	1,930	1+
SCPM68	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	1,922	1+
SCPM72	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	1,887	1+
SCPME03	<i>Bacillus cereus</i>	2,098	2
SCPME11	<i>Bacillus cereus</i>	2,301	2
SCPME14	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,214	2
SCPME15	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,215	2
SCCM13	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	1,801	1+
SCCM14	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	2,030	1+
SCCM15	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	1,975	1+
SCCM21	<i>Bacillus cereus</i>	1,987	2
SCCM23	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	1,902	1+
SCCM38	<i>Bacillus cereus</i>	1,859	2
SCCM41	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	1,853	1+
SCCM42	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	2,005	1+
SCCM49	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	1,717	1+
SCCM50	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	1,875	1+
SCCM52	<i>Bacillus cereus</i>	1,755	2
SCCM57	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	1,773	1+
SCCM59	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	2,016	1+
SCCM65	<i>Bacillus cereus</i>	1,929	2
SCCM70	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	1,950	1+
SCCME02	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	1,726	1+
SCCME03	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	1,760	1+

4. Análisis de la diversidad bacteriana mediante perfiles RAPD

El análisis de los perfiles RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) es una técnica basada en la PCR y utilizada para la identificación de variaciones genéticas, como, por ejemplo, el estudio de la diversidad bacteriana intraespecífica. Esta metodología implica el uso de un único cebador con secuencia arbitraria (de entre 10 y 20 pb), que permite la amplificación aleatoria de fragmentos de ADN de diverso tamaño. De esta manera pueden ser detectados polimorfismos en un gran número de *loci*, al obtenerse un perfil de bandas característico de cada individuo, sin necesidad de conocimiento previo de este material genético (Kumari & Thakur, 2014).

Esta técnica permite procesar un gran número de muestras, como ocurre en el aislamiento de microorganismos. Y, al determinar la diversidad intraespecífica, posibilita la reducción del número de aislados de trabajo. En este trabajo utilizamos el *primer* M13, de tamaño pequeño y alto contenido en G+C, el cual permite amplificar distintas regiones de ADN en condiciones poco restrictivas, y cuya eficacia en el análisis de la biodiversidad de cepas bacterianas ambientales ya ha sido comprobada con éxito (Araújo et al., 2017; Flores-Félix et al., 2020; Kimes et al., 2015; Valverde et al., 2006). A pesar de ello, esta técnica también presenta limitaciones que deben tenerse en cuenta, como los relacionados con su reproducibilidad, derivados de la mala calidad del ADN o los cambios de los productos y/o condiciones de PCR (Kumari & Thakur, 2014).

Tras el análisis matemático de los perfiles RAPD de los 51 aislados procedentes del interior de nódulos de trébol blanco, observamos la presencia de 9 grupos, mediante la aplicación de un porcentaje de similitud del 75 % (Figura 14 y Tabla 32).

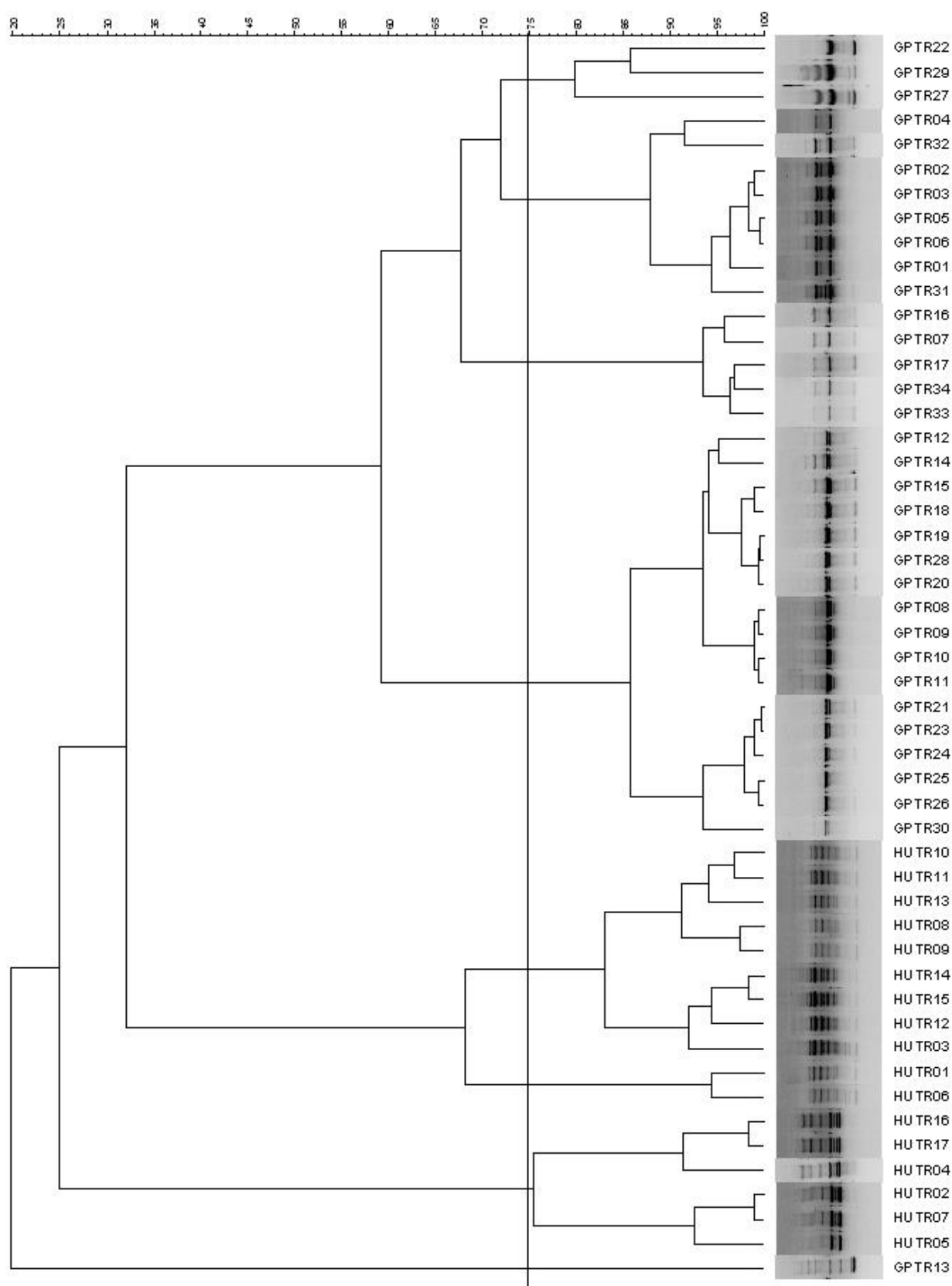


Figura 14: Dendrograma de los aislados procedentes del interior de nódulos de *Trifolium repens* L., analizados por M13-RAPD, aplicando el método de agrupación UPGMA y el coeficiente de Pearson.

Tabla 32: Listado de los aislados obtenidos del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. agrupados en base a los resultados del RAPD. Identificación y rango de score obtenido mediante MALDI-TOF. Similitud entre la secuencia del gen ribosómico rRNA16S del representante (en negrita) de cada grupo RAPD y la cepa tipo más próxima. Amplificación del gen *betB*.

Cepas	MALDI-TOF		Grupo RAPD	rRNA 16S		<i>betB</i>
	Identificación	Score		Cepa tipo más próxima	Similitud (%)	
GPTR22, GPTR27, GPTR29	<i>Rhizobium</i> sp.	1,65-1,93	1	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275eT	99,8	+
GPTR01, GPTR02 , GPTR03, GPTR04, GPTR05, GPTR06, GPTR31, GPTR32	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	1,71-1,98	2	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275eT	99,2	-
GPTR07 , GPTR16, GPTR17, GPTR33, GPTR34	<i>Rhizobium trifolii</i>	1,66-1,99	3	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275eT	99,8	+
GPTR08 , GPTR09, GPTR10, GPTR11, GPTR12, GPTR14, GPTR15, GPTR18, GPTR19, GPTR20, GPTR28	<i>Rhizobium sophorae</i>	1,69-1,98	4	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275eT	99,8	-
GPTR21, GPTR23, GPTR24, GPTR25 , GPTR26, GPTR30	<i>Rhizobium trifolii</i>	1,74-2,04	5	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275eT	99,6	+
HUTR03 , HUTR08, HUTR09, HUTR10, HUTR11, HUTR12, HUTR13, HUTR14, HUTR15	<i>Rhizobium</i> sp.	1,94-2,35	6	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275eT	100,0	+
HUTR01, HUTR06	<i>Rhizobium laguerreae</i>	2,33-2,35	7	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275eT	99,8	-
HUTR02, HUTR04, HUTR05 , HUTR07, HUTR16, HUTR17	<i>Rhizobium laguerreae</i>	2,31-2,48	8	<i>Rhizobium brockwellii</i> CC275eT	99,9	+
GPTR13	Identificación poco fiable	1,28	9	<i>Paenibacillus rhizosphaerae</i> CECAP06 ^T	99,7	-

Los resultados obtenidos muestran una clara diferenciación entre los aislados procedentes de nódulos de trébol crecido en suelo de Huerta y de Golpejas. Los aislados procedentes de Golpejas estaban divididos en 6 grupos, mientras que los de Huerta en 3. Como refleja el apartado 1. del Capítulo I, el tipo y características del suelo varían de una localización a otra. En este sentido, la diversidad bacteriana del suelo está influenciada por diferentes factores ambientales y edáficos, como la precipitación, temperatura, pH, contenido en carbono o fósforo, etc. (Krishnaraj & Pasha, 2017; Yan et al., 2021). Estos resultados coinciden con otros estudios que comprobaron que cepas de *Rhizobia* aisladas de la misma planta leguminosa, pero en diferentes condiciones edáficas, presentaban diferentes perfiles RAPD (Díaz-Alcántara et al., 2014).

Los 138 aislados procedentes de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta fueron divididos en 49 grupos tras el análisis de los perfiles RAPD, y aplicando un porcentaje de similitud del 80 % (Figura 15 y Tabla 33).

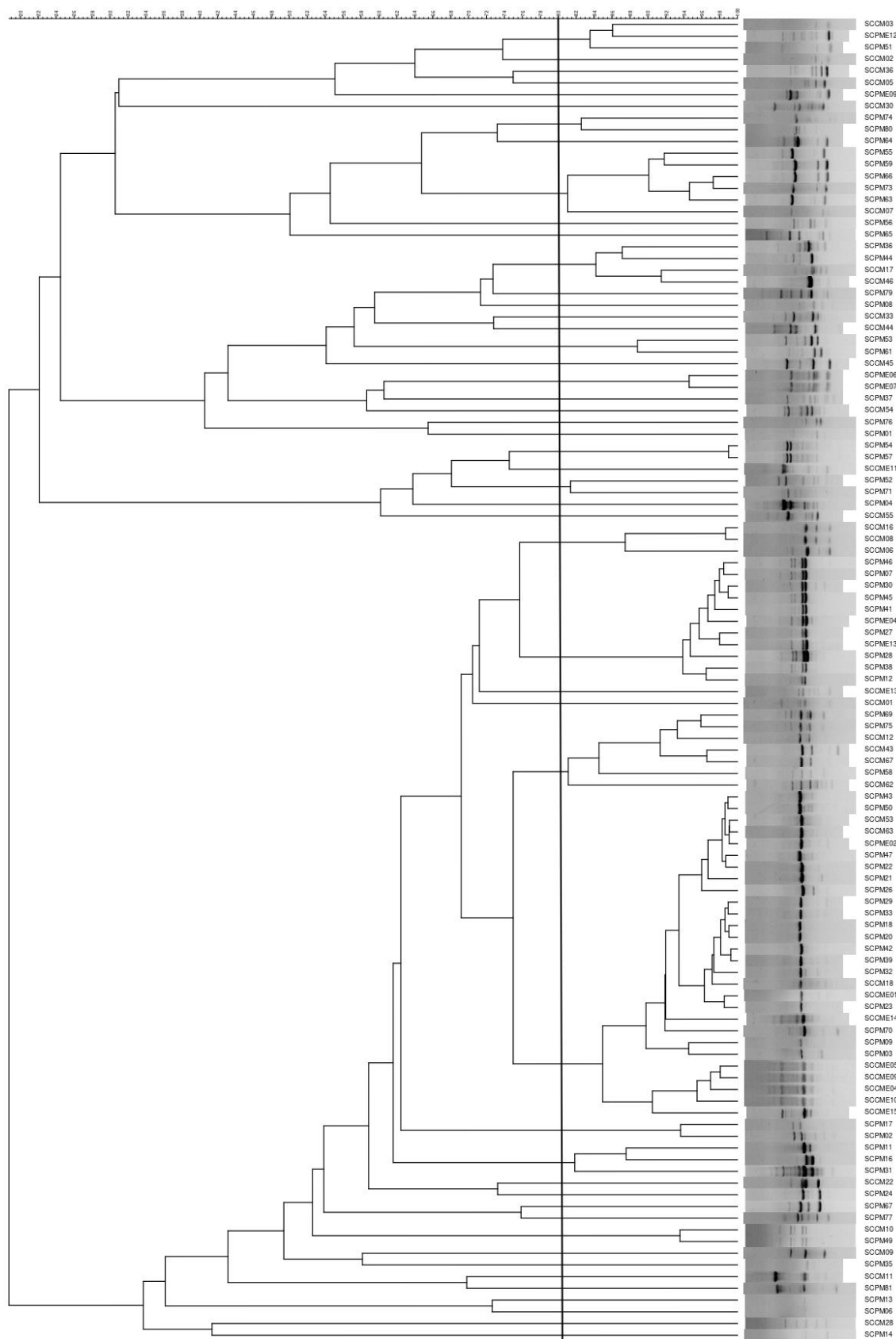


Figura 15: Dendrograma de los aislados procedentes de las muestras obtenidas en San Cristóbal de la Cuesta, analizados por M13-RAPD, aplicando el método de agrupación UPGMA y el coeficiente de Pearson.

Tabla 33: Listado de los aislados procedentes de las muestras obtenidas en San Cristóbal de la Cuesta agrupados en base a los resultados del RAPD. Identificación y rango de score obtenido mediante MALDI-TOF. Similitud de la secuencia del gen ribosómico rRNA16S del representante (en negrita) de cada grupo RAPD y la cepa tipo más próxima. Amplificación del gen *betB*.

Cepas	MALDI-TOF		Grupo RAPD	rRNA 16S		<i>betB</i>
	Identificación	Score		Cepa tipo más próxima	Similitud (%)	
SCPM51, SCPME12 , SCCM03	Identificación poco fiable	1,00	1	<i>Mesobacillus persicus</i> B 48 ^T	98,3	-
SCCM02	Identificación poco fiable	1,41	2	<i>Streptomyces rubrogriseus</i> NBRC 15455 ^T	99,7	-
SCCM36	<i>Cytobacillus firmus</i>	1,83	3	<i>Cytobacillus oceanisediminis</i> H2 ^T	99,7	+
SCCM05	<i>Arthrobacter globiformis</i>	2,16	4	<i>Arthrobacter globiformis</i> DSM 20124 ^T	99,4	+
SCPME09	Identificación poco fiable	1,52	5	<i>Paenibacillus lautus</i> JCM 9073 ^T	98,6	+
SCCM30	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i>	2,32	6	<i>Rhodococcus jostii</i> DSM 44719 ^T	99,9	+
SCPM74, SCPM80	<i>Cytobacillus firmus</i>	1,38-1,99	7	<i>Cytobacillus firmus</i> NBRC 15306 ^T	99,2	-
SCPM64	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	2,27	8	<i>Paenibacillus lautus</i> NBRC 15380 ^T	99,5	-
SCPM55, SCPM59 , SCPM63, SCPM66, SCPM73, SCCM07	<i>Paenibacillus lautus</i>	1,43-2,12	9	<i>Paenibacillus lautus</i> NBRC 15380 ^T	99,4	-
SCPM56	Identificación poco fiable	1,42	10	<i>Isoptericola halalbus</i> CFH 91151 ^T	99,3	-
SCPM65	Identificación poco fiable	1,27	11	<i>Alteribacillus alkaliphilus</i> JC229 ^T	99,2	+
SCPM36 , SCPM44, SCCM17, SCCM46	<i>Pseudarthrobacter chlorophenolicus</i>	1,3-2,03	12	<i>Arthrobacter rhizosphaerae</i> CCNWLXL 1-35 ^T	99,4	-
SCPM79	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	2,18	13	<i>Paenibacillus lautus</i> JCM 9073 ^T	99,2	+
SCPM08	Identificación poco fiable	1,44	14	<i>Streptomyces iakyrus</i> NBRC 13401 ^T	99,5	-
SCCM33	<i>Streptomyces badius</i>	1,98	15	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> CSSP436 ^T	99,6	-
SCCM44	Identificación poco fiable	1,40	16	<i>Mesobacillus maritimus</i> KS16-9 ^T	99,0	+
SCPM53 , SCPM61	Identificación poco fiable	1,3-1,5	17	<i>Halalkalibacter kiskunsagensis</i> B16-24 ^T	99,6	-
SCCM45	Identificación poco fiable	1,38	18	<i>Bacillus infantis</i> SMC 4352-1 ^T	99,7	+
SCPME06 , SCPME07	Identificación poco fiable	1,40-1,53	19	<i>Paenibacillus tritici</i> RTAE36 ^T	99,0	-
SCPM37	<i>Pseudarthrobacter chlorophenolicus</i>	1,94	20	<i>Arthrobacter pascens</i> DSM 20545 ^T	98,9	-
SCCM54	<i>Paenarthrobacter aureus</i>	2,04	21	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> G2-1 ^T	99,9	-

SCPM76	Identificación poco fiable	1,66	22	<i>Streptomyces ureilyticus</i> YC419 ^T	99,3	+
SCPM01	Identificación poco fiable	1,34	23	<i>Streptomyces afghaniensis</i> NBRC 12831 ^T	99,6	+
SCPM54, SCPM57	Identificación poco fiable	1,38-1,60	24	<i>Streptomyces sparsus</i> YIM 90018 ^T	99,8	+
SCCME11	Identificación poco fiable	1,62	25	<i>Arthrobacter humicola</i> KV-653 ^T	99,9	+
SCPM52 , SCPM71	Identificación poco fiable	1,36-1,46	26	<i>Isoptericola halalbus</i> CFH 91151 ^T	99,2	-
SCPM04	<i>Arthrobacter humicola</i>	1,93	27	<i>Arthrobacter humicola</i> KV-653 ^T	99,7	+
SCCM55	Identificación poco fiable	1,50	28	<i>Mesobacillus thioparans</i> BMP-1 ^T	99,5	+
SCPM07, SCPM12, SCPM27, SCPM28, SCPM30, SCPM38, SCPM41, SCPM45, SCPME04, SCPME13, SCCM06, SCCM08 , SCCM16	Identificación poco fiable	1,30-2,35	29	<i>Streptomyces rubrogriseus</i> NBRC 15455 ^T	99,9	-
SCPM46	<i>Priestia megaterium</i>	1,86	30	<i>Priestia megaterium</i> ATCC 14581 ^T	99,9	+
SCCME13	Identificación poco fiable	1,53	31	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> G2-1 ^T	100,0	-
SCCM01	Identificación poco fiable	1,34	32	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T	99,7	-
SCPM58, SCPM69 , SCPM75, SCCM12, SCCM43, SCCM62, SCCM67	Identificación poco fiable	1,59-2,06	33	<i>Pseudarthrobacter polychromogenes</i> JCM 2523 ^T	98,9	-
SCPM03, SCPM09, SCPM18, SCPM20, SCPM21, SCPM22, SCPM23, SCPM26, SCPM29, SCPM32, SCPM33, SCPM39, SCPM42, SCPM43, SCPM47, SCPM50, SCPM70, SCPME02, SCCM18, SCCM53, SCCM63, SCCME01, SCCME04, SCCME05, SCCME09, SCCME10 , SCCME14, SCCME15	Identificación poco fiable	1,34-2,24	34	<i>Pseudomonas alvandae</i> SWRI17 ^T	99,9	+
SCPM02 , SCPM17	Identificación poco fiable	1,33-1,47	35	<i>Streptomyces iakyrus</i> NBRC 13401 ^T	99,7	-
SCPM16, SCPM11, SCPM31	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1,29-2,15	36	<i>Pseudomonas alvandae</i> SWRI17 ^T	99,9	+
SCCM22	Identificación poco fiable	1,41	37	<i>Priestia megaterium</i> ATCC 14581 ^T	99,9	+

SCPM24	Identificación poco fiable	1,40	38	<i>Peribacillus frigoritolerans</i> DSM 8801 ^T	99,8	-
SCPM67	<i>Neobacillus niacini</i>	2,25	39	<i>Neobacillus niacini</i> IFO15566 ^T	97,9	+
SCPM77	Identificación poco fiable	1,58	40	<i>Isoptricola halalbus</i> CFH 91151 ^T	99,1	-
SCPM49, SCCM10	<i>Priestia megaterium</i>	1,63-2,17	41	<i>Priestia megaterium</i> ATCC 14581 ^T	99,7	-
SCCM09	<i>Arthrobacter globiformis</i>	2,26	42	<i>Arthrobacter globiformis</i> DSM 20124 ^T	99,6	+
SCPM35	Identificación poco fiable	1,43	43	<i>Streptomyces iakyrus</i> NBRC 13401 ^T	99,6	-
SCCM11	Identificación poco fiable	1,59	44	<i>Psychrobacillus lasiicapitis</i> NEAU-3TGS17 ^T	98,8	-
SCPM81	Identificación poco fiable	1,69	45	<i>Priestia megaterium</i> DSM 32 ^T	100,0	+
SCPM13	<i>Priestia megaterium</i>	2,35	46	<i>Priestia aryabhatai</i> B8 W22 ^T	99,9	-
SCPM06	<i>Priestia megaterium</i>	1,98	47	<i>Priestia megaterium</i> ATCC 14581 ^T	99,9	-
SCCM28	Identificación poco fiable	1,63	48	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> DSM 13468 ^T	99,1	-
SCPM14	<i>Priestia megaterium</i>	2,14	49	<i>Priestia aryabhatai</i> B8 W22 ^T	99,9	-

Estos resultados ponen de manifiesto la gran diversidad presente en las muestras obtenidas de San Cristóbal de la Cuesta. Así, la presencia de grupos conformados por una única cepa (o por un bajo número de ellas) es más elevada que en el caso de los aislados de *Trifolium repens* L., lo que demuestra esta mayor diversidad. Es importante tener en cuenta que el 85 % de las cepas fueron aisladas a partir de muestras de suelo rizosférico, tanto de *Plantago maritima* L. como de *Camphorosma monspeliaca* L., un nicho ecológico con una diversidad bacteriana más elevada que el interior de las raíces o los nódulos de plantas, de manera general (Krishnaraj & Pasha, 2017). Sin embargo, las condiciones salinas del suelo también pueden influenciar la diversidad microbiana de este, provocando una reducción con respecto a suelos no salinos (Hindersah et al., 2023).

5. Identificación de las cepas mediante secuenciación del gen ribosómico rRNA 16S

La secuencia del gen ribosómico 16S (o 16S rRNA) es un marcador genético ampliamente utilizado en filogenia y taxonomía de bacterias, debido a las ventajas que presenta: está presente en todos los organismos procariotas, su tamaño es adecuado para la secuenciación (~ 1500 pb), la secuencia está altamente conservada pero contiene regiones con alta variabilidad (que permiten la diferenciación entre taxones), y existen bases de datos públicas que recogen la secuencia del gen ribosómico rRNA 16S de todas las bacterias descritas (como GenBank de NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Church et al., 2020; Sirichoat et al., 2021; Straub et al., 2020; Winand et al., 2019).

A partir de los grupos RAPD obtenidos, un representante de cada grupo fue seleccionado e identificado mediante secuenciación del gen ribosómico rRNA 16S. Un total de 9 representantes fueron seleccionados en el caso de los aislados procedentes de nódulos de *Trifolium repens* L. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en GenBank (NCBI), logrando los resultados mostrados en la Tabla 32.

En las muestras aisladas del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. observamos un claro dominio de bacterias del género *Rhizobium*, apareciendo un único representante del filo *Bacillota*. Así, 8 de las 9 cepas identificadas presentaron similitudes de entre el 100,0 % y el 99,2 % con las secuencias de diversas cepas tipo clasificadas dentro del complejo de *Rhizobium leguminosarum* (*Rhizobium brockwelli*, *Rhizobium sophorae*, *Rhizobium johnstonii*, *Rhizobium beringeri*, *Rhizobium rizarguesonis*, *Rhizobium laguerreae*, o *Rhizobium leguminosarum*) y otras especies de clados muy cercanos a este (*Rhizobium redzepovicii*, *Rhizobium indigoferae*, o *Rhizobium anhuiense*) (Young et al., 2021; Young et al., 2023). Sin embargo, es importante

señalar que, dentro del género *Rhizobium*, la secuencia del 16S rRNA es útil para confirmar la identificación únicamente a nivel del género, ya que múltiples especies pueden compartir secuencias idénticas de este gen o presentar pequeñas variaciones que no permiten la distinción a nivel específico (Hsouna et al., 2023; Young et al., 2021; Young et al., 2023). Por otra parte, aislamos una cepa externa a este género del filo *Bacillota*, GPTR13, la cual presentó un 99,7 % de similitud con respecto a la especie *Paenibacillus rhizosphaerae*.

La presencia de cepas del género *Paenibacillus*, así como su coexistencia con cepas del género *Rhizobium* en nódulos de leguminosas ya ha sido descrito previamente (Latif et al., 2013; Wang et al., 2021a). Aislamientos del interior de nódulos de trébol rojo realizados siguiendo una metodología similar a la propuesta para estas muestras lograron obtener principalmente aislados de *Rhizobia* (*Rhizobium* o *Ensifer*), pero también cepas pertenecientes al género *Paenibacillus* (Latif et al., 2013).

Las Figuras 16 y 17 representan los resultados de los análisis filogenéticos realizados con las secuencias del 16S rRNA. Dos árboles filogenéticos fueron realizados, uno con las cepas del género *Rhizobium* (Orden *Hyphomicrobiales*), y otro con la cepa identificada como *Paenibacillus rhizosphaerae* (Orden *Caryophanales*).

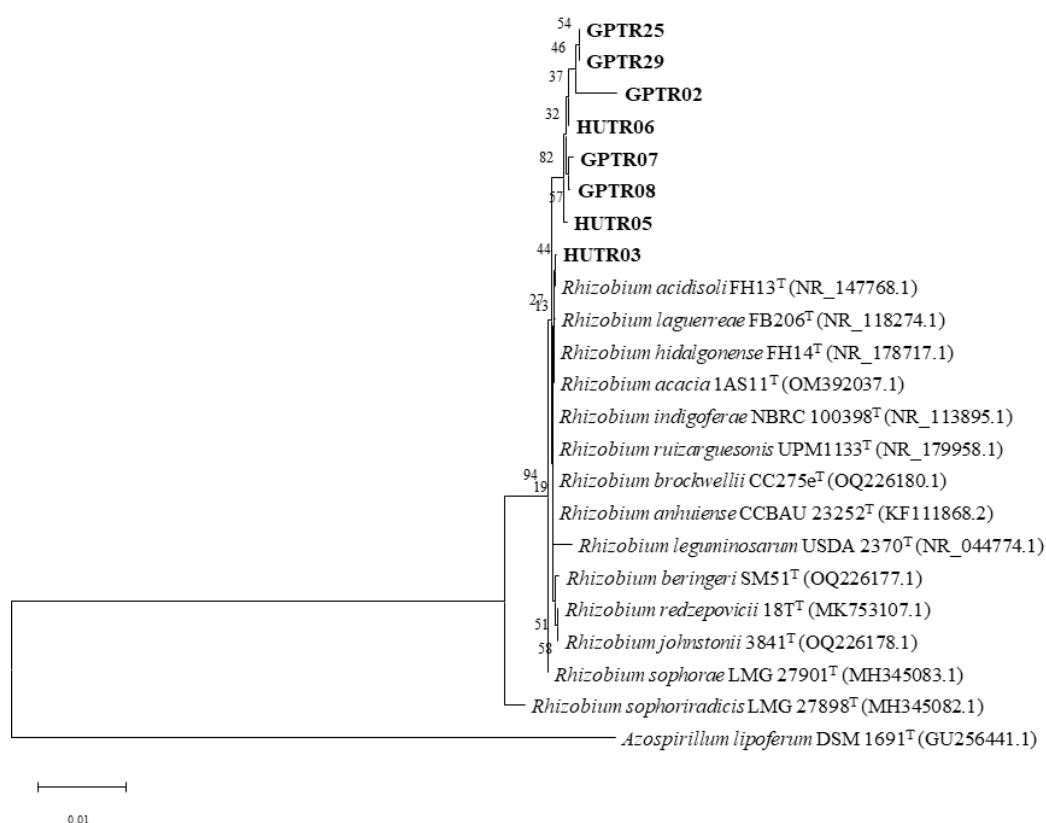


Figura 16: Análisis filogenético del gen ribosómico rRNA 16S de las cepas del orden *Hyphomicrobiales* aisladas del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. Árbol realizado con el método Neighbour-Joining, coeficiente de Kimura 2 *parameters*, y seleccionando un *bootstrap* de 1000.

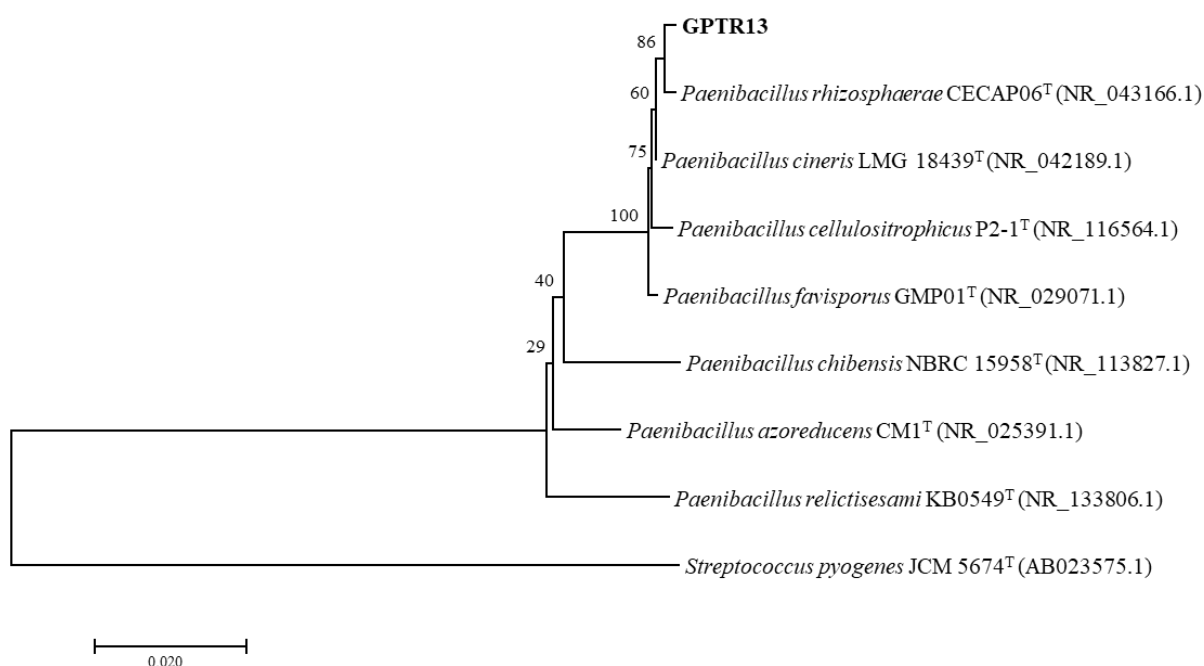


Figura 17: Análisis filogenético del gen ribosómico rRNA 16S de las cepas del orden *Caryophanales* aisladas del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. Árbol realizado con el método Neighbour-Joining, coeficiente de Kimura 2 *parameters*, y seleccionando un *bootstrap* de 1000.

La Figura 16 muestra las relaciones filogenéticas de los aislados identificados como *Rhizobium* procedentes del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. Todos ellos estaban agrupados en un clado muy cercano a las cepas tipo con las que presentaban alta similitud en la secuencia, aunque la cepa GPTR02 exhibió una mayor distancia filogenética con respecto al resto. A pesar de la elevada similitud entre las secuencias del gen ribosómico rRNA 16S dentro del género *Rhizobium*, este marcador molecular es una herramienta muy utilizada para confirmar la clasificación dentro de este género de los aislados de trabajo (Young et al., 2021; Young et al., 2023). Por otra parte, en la Figura 17 aparecía agrupado de manera muy cercana el aislado GPTR13 con respecto a *Paenibacillus rhizosphaerae* CECAP06^T, además, teniendo en cuenta que el nivel de similitud con respecto a esta cepa tipo es del 99,7%, pudimos identificar a GPTR13 como *Paenibacillus rhizosphaerae* (Beye et al., 2018; Rosselló-Móra & Amann, 2015).

En cuanto a los aislados procedentes de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta, 49 representantes fueron identificados, uno por cada grupo de RAPD obtenido. La Tabla 33 muestra la similitud obtenida entre las secuencias del 16S rRNA de dichas cepas y la secuencia de la cepa tipo más próxima.

La diversidad de aislados obtenidos en estas muestras fue claramente mayor que las procedentes del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. En este caso, pudimos aislar e identificar bacterias de 3 filos distintos: *Actinomycetota* (49,0 %), *Bacillota* (46,9 %) y *Pseudomonadota* (4,1 %). Distribuidos, a su vez, en 5 órdenes diferentes: *Caryophanales* (46,9 %), *Micrococcales* (26,5 %), *Kitasatosporales* (20,4 %), *Pseudomonadales* (4,1 %), y *Mycobacteriales* (2,1 %). De los 18 géneros bacterianos identificados, los más abundantes fueron: *Streptomyces* (20,4 %), *Priestia* (14,3 %), y *Arthrobacter* (12,2 %). Al analizar la bibliografía podemos observar que mediante técnicas independientes de cultivo (*metabarcoding* basado en 16S rRNA o regiones hipervariables de este), el taxón más común en diferentes suelos rizosféricos afectados por salinidad es el filo *Proteobacteria*, aunque la representación de los filos *Actinomycetota* y *Bacillota* también es destacable (Dragojević et al., 2023; Ma & Gong, 2013; Qiu et al., 2022). Sin embargo, teniendo en cuenta análisis realizados mediante aproximaciones dependientes de cultivo, los resultados presentan una mayor similitud con los obtenidos en este trabajo, al obtenerse una mayor proporción de aislados caracterizados como Gram positivos (Chandra et al., 2020), o pertenecientes al filo *Bacillota* (Bachran et al., 2019; Delgado-García et al., 2018). Estas diferencias entre técnicas dependientes e independientes de cultivo pueden deberse a

sesgos cometidos en el proceso de aislamiento, o bien la posible limitación que pueden tener ciertos microorganismos para ser cultivados (Lee et al., 2021).

La Figura 18 muestra los resultados del análisis filogenético de las secuencias del gen ribosómico rRNA 16S de los aislados procedentes de San Cristóbal de la Cuesta identificados dentro del orden *Caryophanales*. Dentro de este orden encontramos los aislados agrupados dentro de 10 géneros diferentes: *Mesobacillus*, *Cytobacillus*, *Bacillus*, *Neobacillus*, *Peribacillus*, *Priestia*, *Psychrobacillus*, *Halalkalibacter*, *Alteribacillus*, y *Paenibacillus*. Los aislados SCPME12, SCCM44 y SCCM55 se encuentran agrupados dentro del género *Mesobacillus*, aunque de acuerdo con los porcentajes de similitud de la Tabla 33, SCPME12 podría tratarse de una nueva especie (< 98,7 %) (Beye et al., 2018; Rosselló-Móra & Amann, 2015). Asimismo, las cepas SCPM80 y SCCM36 presentaron porcentajes de similitud mayores del 99,0 % con respecto a la secuencia de las cepas tipo *Cytobacillus firmus* JCM 2512^T y *Cytobacillus oceanisediminis* H2^T, con las que, además, aparecían agrupan de manera cercana en el árbol filogenético (Figura 18). De igual manera, la cepa SCCM45 fue identificada dentro del taxón *Bacillus infantis*, con una similitud del 99,7 %. SCPM67 fue agrupada dentro del género *Neobacillus* en el árbol filogenético, pero los porcentajes de similitud con respecto a las cepas tipo más cercanas sugieren que podría clasificarse como una nueva especie (Tabla 33). Por otra parte, el aislado SCPM24 presentó un porcentaje de similitud del 99,8 % con respecto a la cepa tipo *Peribacillus frigoritolerans* DSM 8801^T. Las cepas SCPM06, SCPM13, SCPM14, SCPM46, SCPM81, SCCM10 y SCCM22 fueron agrupadas en el clado perteneciente al género *Priestia*, todos ellos con porcentajes de similitud muy cercanos al 100 % con respecto de las cepas tipo *Priestia megaterium* ATCC14581^T o *Priestia aryabhattai* B8 W22^T. Además, SCPM53, SCPM65 y SCCM11 fueron clasificadas dentro de los géneros *Halalkalibacter*, *Alteribacillus* y *Psychrobacillus*, respectivamente, aunque este último aislado presentó un porcentaje de similitud muy cercano al límite para ser considerado una especie nueva (Beye et al., 2018; Rosselló-Móra & Amann, 2015). Por último, las cepas SCPM59, SCPM64, SCPM79, SCPME06 y SCPME09 fueron clasificadas dentro del taxón *Paenibacillus*, más concretamente como *Paenibacillus lautus* (SCPM59, SCPM64 y SCPM79), *Paenibacillus tritici* (SCPME06), y una posible nueva especie cercana a *Paenibacillus lautus* (SCPME09).

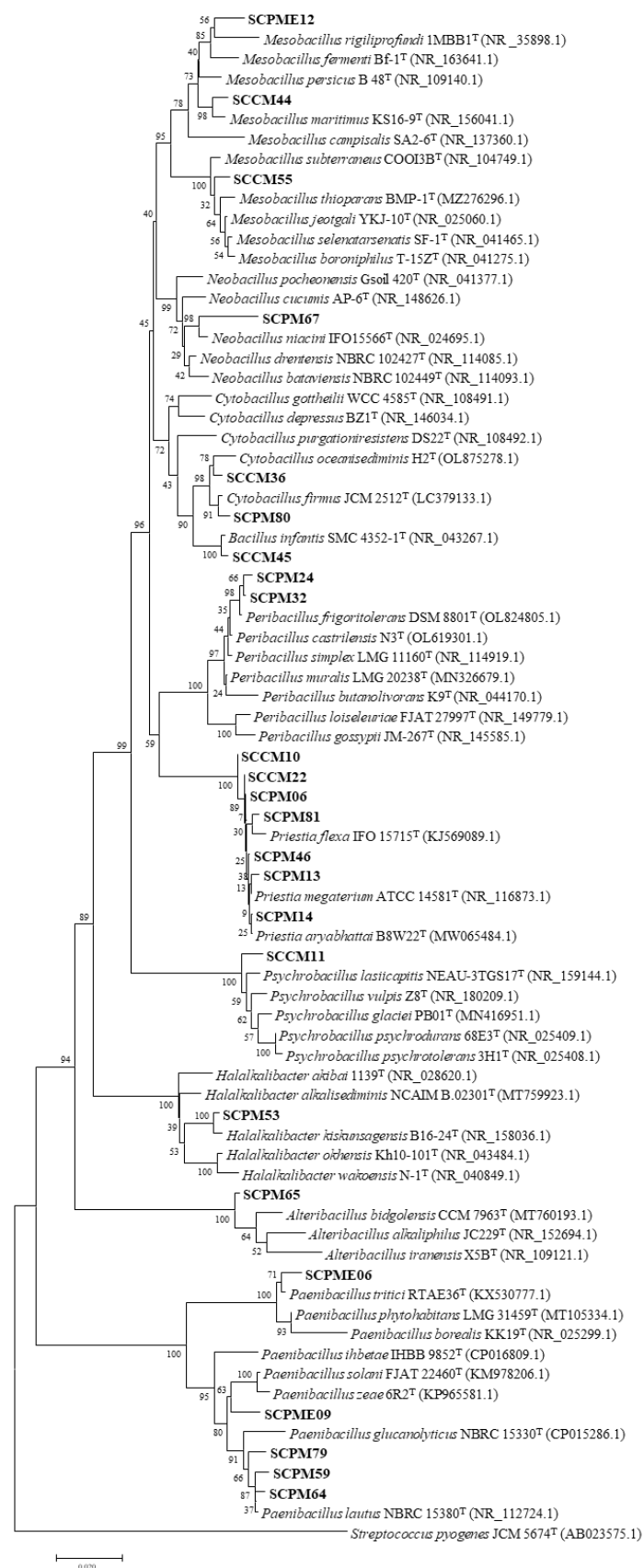


Figura 18: Análisis filogenético del gen ribosómico rRNA 16S de las cepas del orden *Caryophanales* aisladas de las muestras procedentes de San Cristóbal de la Cuesta. Árbol realizado con el método Neighbour-Joining, coeficiente de Kimura 2 *parameters*, y seleccionando un *bootstrap* de 1000.

Las relaciones filogenéticas entre los aislados pertenecientes al orden *Micrococcales* y procedentes de las muestras obtenidas en San Cristóbal de la Cuesta aparecen recogidas en la Figura 19. Dentro de dicho taxón fueron identificadas 13 cepas, pertenecientes a 5 géneros bacterianos distintos: *Arthrobacter*, *Pseudarthrobacter*, *Paenarthrobacter*, *Microbacterium*, e *Isoptericola*. Los aislados SCPM04, SCPM36, SCPM37, SCCM05, SCCM09, y SCCME11 fueron agrupados dentro de diferentes especies del género *Arthrobacter*: *Arthrobacter humicola* (SCPM04 y SCCME11), *Arthrobacter rhizosphaerae* (SCPM36), *Arthrobacter globiformis* (SCCM05 y SCCM09), y *Arthrobacter pascens* (SCPM37), aunque este último aislado presentó un porcentaje de similitud muy cercano al límite para ser considerado una posible especie (98,9 %). De igual manera ocurrió con la cepa SCPM69, que presentaba el mismo porcentaje de similitud con respecto a la cepa tipo de *Pseudarthrobacter polychromogenes* JCM 2523^T. En cambio, los aislados SCCM54 y SCCME13, mostraron un porcentaje de similitud mayor 99,9 % con respecto a la especie *Paenarthrobacter nitroguajacolicus*. El único representante identificado del género *Microbacterium* fue SCCM28, agrupado de manera cercana con respecto a la cepa tipo de la especie *Microbacterium phyllophaerae*. Por último, las cepas SCPM52, SCPM56, y SCPM77 fueron agrupadas de manera conjunta junto al taxón *Isoptericola halalbus*, formando un clado independiente del resto de las especies de este género.

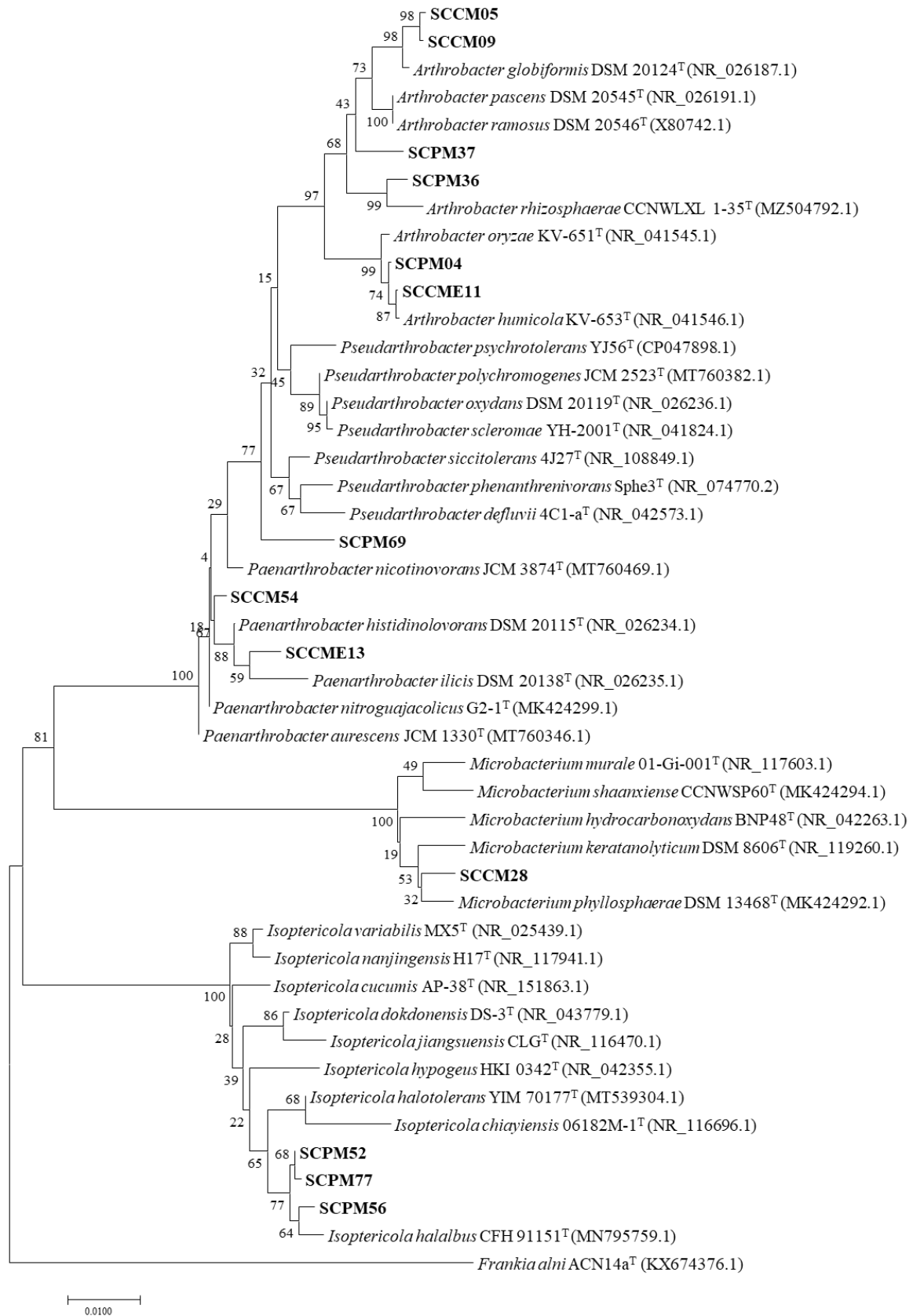


Figura 19: Análisis filogenético del gen ribosómico rRNA 16S de las cepas del orden *Micrococcales* aisladas de las muestras procedentes de San Cristóbal de la Cuesta. Árbol realizado con el método Neighbour-Joining, coeficiente de Kimura 2 *parameters*, y seleccionando un *bootstrap* de 1000.

Con respecto a los aislados identificados dentro del orden *Kitasatosporales*, las relaciones filogenéticas están recogidas en la Figura 20. La secuenciación del gen ribosómico rRNA 16S fue realizada sobre 10 representantes de este taxón: SCPM01, SCPM02, SCPM08, SCPM35, SCPM57, SCPM76, SCCM01, SCCM02, SCCM08, SCCM33. La comparación de las secuencias de estos aislados con respecto a las depositadas en GenBank nos permitió agruparlos en 7 especies distintas (Tabla 33), con porcentajes de similitud mayores del 99,3 %: *Streptomyces afghaniensis* (SCPM01), *Streptomyces iakyrus* (SCPM02, SCPM08, y SCPM35), *Streptomyces sparsus* (SCPM57), *Streptomyces ureilyticus* (SCPM76), *Streptomyces ambofaciens* (SCCM01), *Streptomyces rubrogriseus* (SCCM02 y SCCM08), y *Streptomyces cyaneofuscatus* (SCCM33). Además, la agrupación de las cepas en el árbol filogenético coincide con la comparación de la base de datos, aunque cabe destacar el clado que formaban los aislados SCCM02 y SCCM08 con respecto a diversas especies del género muy similares entre ellas, entre las que estaba incluida *Streptomyces rubrogriseus*; o el clado en el que aparecía SCCM33, en el que *Streptomyces cyaneofuscatus* también estaba incluido.

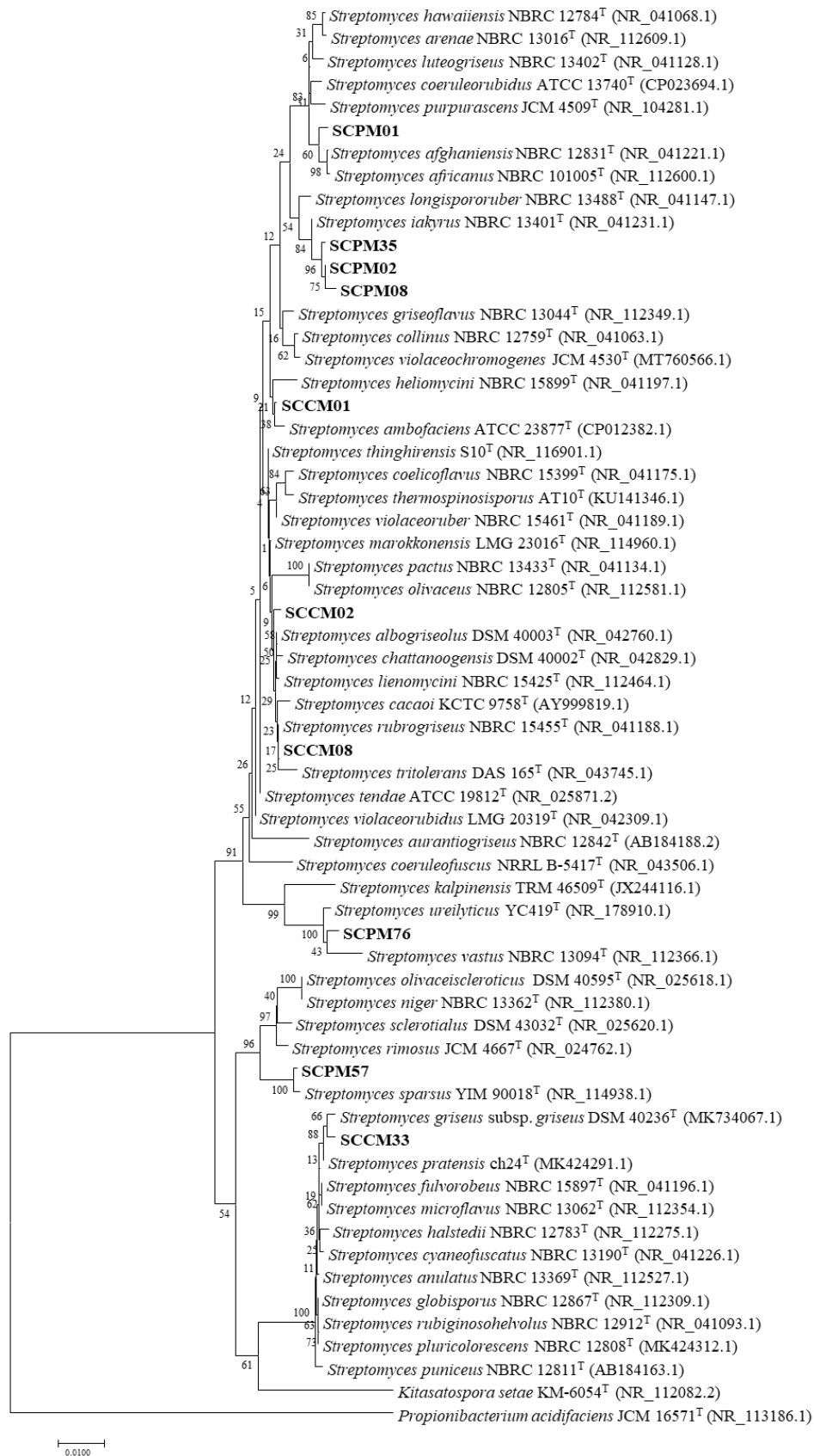


Figura 20: Análisis filogenético del gen ribosómico rRNA 16S de las cepas del orden *Kitasatosporales* aisladas de las muestras procedentes de San Cristóbal de la Cuesta. Árbol realizado con el método Neighbour-Joining, coeficiente de Kimura 2 *parameters*, y seleccionando un *bootstrap* de 1000.

Las cepas SCPM31 y SCCME10 fueron clasificadas dentro de la especie *Pseudomonas alvandrae*, de acuerdo con la comparación de las secuencias del 16S rRNA con respecto a las de las cepas tipo depositadas en las bases de datos públicas. Aunque al observar el árbol filogenético (Figura 21), pudimos determinar las pequeñas distancias evolutivas con respecto a otras especies de ese mismo género, como *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas canavaninivorans* o *Pseudomonas bijieensis*. En este sentido, el uso de la secuencia del gen ribosómico rRNA 16S en identificación puede presentar un poder discriminatorio bajo a nivel de especie, especialmente en ciertos clados bacterianos, como es el caso del género *Pseudomonas*, donde es especialmente relevante el uso de aproximaciones genómicas para su correcta taxonomía (Saati-Santamaría et al., 2021; Winand et al, 2019). Por otra parte, estas dos cepas clasificadas dentro del género *Pseudomonas* pertenecen a los grupos de RAPD 34 y 36, y teniendo en cuenta que otros 29 aislados más habían sido clasificados en estos mismos grupos, podemos inferir que la presencia absoluta de aislados pertenecientes al filo *Pseudomonadota* era más elevada de lo esperado anteriormente (asemejándose más a los resultados obtenidos mediante técnicas independientes de cultivo) (Dragojević et al., 2023; Ma & Gong, 2013; Qiu et al., 2022). Sin embargo, cabe mencionar la baja diversidad interespecífica encontrada para este grupo taxonómico.

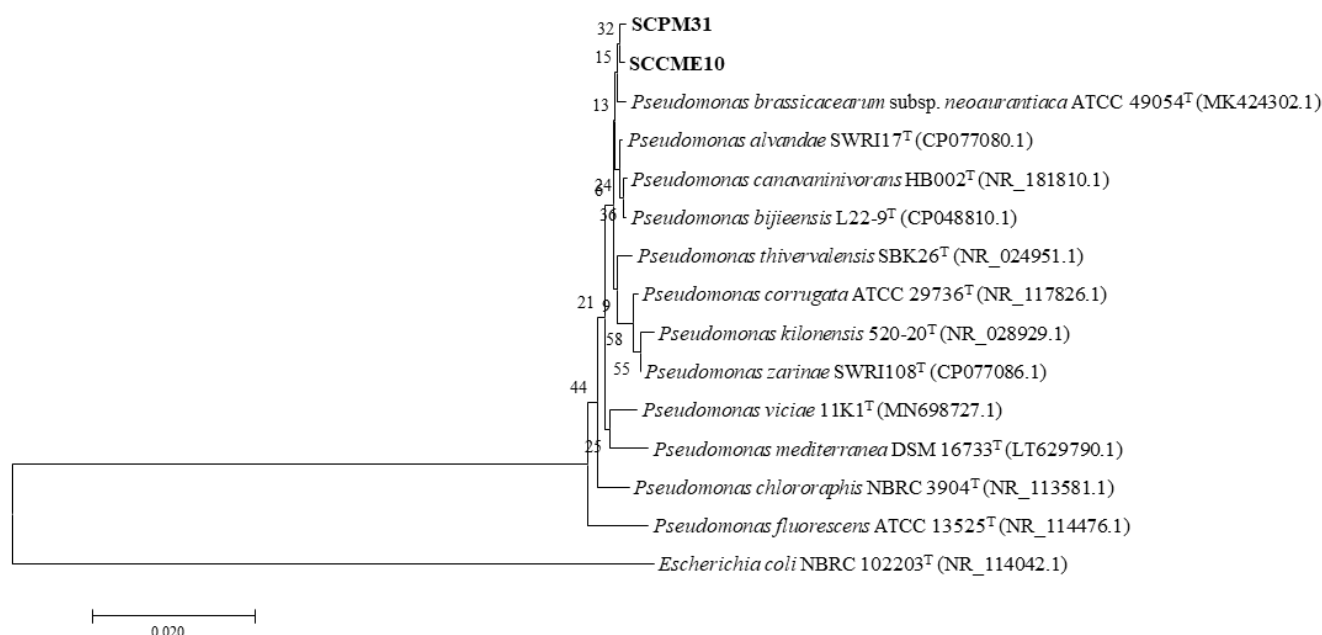


Figura 21: Análisis filogenético del gen ribosómico rRNA 16S de las cepas del orden *Pseudomonadales* aisladas de las muestras procedentes de San Cristóbal de la Cuesta. Árbol realizado con el método Neighbour-Joining, coeficiente de Kimura 2 *parameters*, y seleccionando un *bootstrap* de 1000.

Por último, el aislado SCCM30 fue el único representante del orden *Mycobacteriales*, cuya secuencia del gen ribosómico rRNA 16S mostró un 99,9 % de similitud con respecto a *Rhodococcus jostii* DSM 44719^T. En el árbol filogenético recogido en la Figura 22 observamos que el aislado SCCM30 estaba agrupado de manera cercana a las cepas tipo de las especies *Rhodococcus jostii* y *Rhodococcus opacus*, presentando mayores distancias evolutivas con respecto al resto de cepas presentes en el árbol.

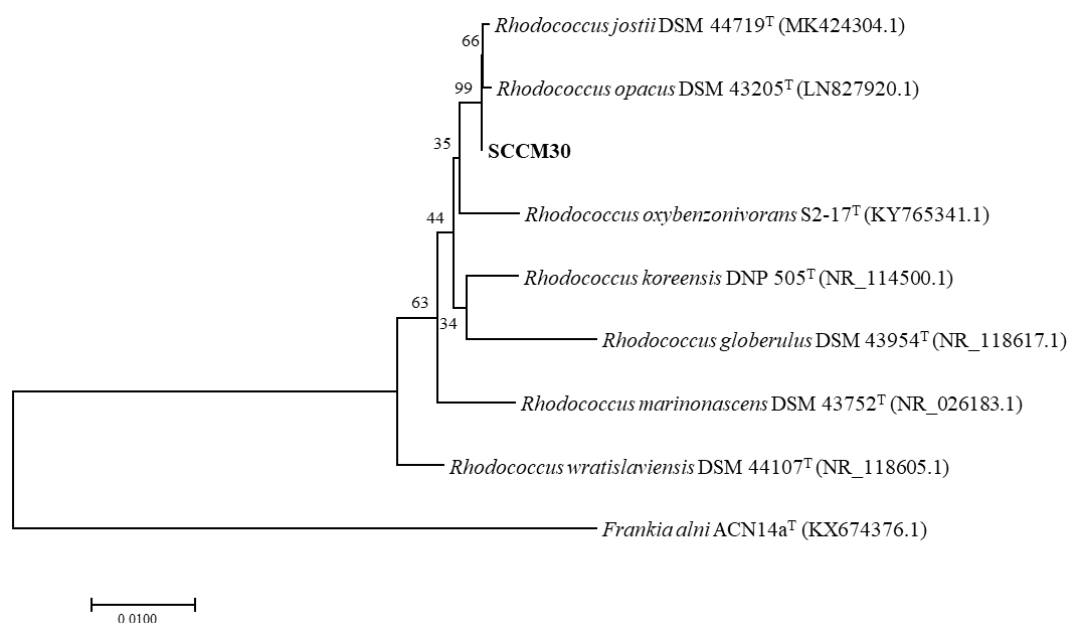


Figura 22: Análisis filogenético del gen ribosómico rRNA 16S de las cepas del orden *Mycobacteriales* aisladas de las muestras procedentes de San Cristóbal de la Cuesta. Árbol realizado con el método Neighbour-Joining, coeficiente de Kimura 2 *parameters*, y seleccionando un *bootstrap* de 1000.

Con estos resultados hemos podido describir, por primera vez, el culturoma de dos especies vegetales comúnmente encontradas en ambientes salinos: *Plantago maritima* L. y *Camphorosma monspeliaca* L. Esta comunidad microbiana cultivable está formada por bacterias de 18 géneros diferentes, entre los que destaca la presencia de taxones pertenecientes a los filos *Actinomycetota* y *Bacillota* y, en menor medida, al filo *Pseudomonadota*. Otros estudios realizados previamente estaban centrados en especies cercanas dentro del género, u otras plantas con capacidad de crecimiento en condiciones similares, aunque, en su mayoría, no fueron realizados mediante técnicas dependientes de cultivo (Dragojević et al., 2023; Furtado et al., 2019; Qiu et al., 2022). Además, hemos podido comprobar que las comunidades microbianas presentes varían entre estudios, dado que las condiciones de muestreo (propiedades y características del suelo, tipo de planta, etc.) o las técnicas aplicadas no son iguales, siendo factores que pueden influir en la diversidad microbiana y los resultados obtenidos, respectivamente (Krishnaraj & Pasha, 2017; Lee et al., 2021; Winand et al, 2019).

6. Amplificación del gen *betB*

La betaína es un compuesto derivado del ácido N,N-dimetilaminoacético que es producida por animales, plantas y microorganismos. Entre sus funciones destaca su papel como osmolito u osmoprotector, al ayudar a mantener la presión osmótica intracelular (Arumugam et al., 2021). La biosíntesis de la betaína está mediada por los genes *betA* y *betB*, y comienza con la oxidación de la colina a betaína aldehído a través de la enzima BetA (colina deshidrogenasa), la cual es transformada a betaína a través de la enzima BetB (betaína aldehído deshidrogenasa) (Balabanova et al., 2022).

La amplificación del gen *betB* fue realizada en todos los aislados seleccionados de los grupos RAPD e identificados por 16S rRNA, con el objetivo de conocer el potencial de dichos aislados para resistir condiciones de estrés osmótico, como el generado por la salinidad (Figura 23). En el caso de las muestras procedentes del interior de nódulos de *Trifolium repens* L., 5 de los aislados presentaron amplificación del gen *betB*. Por otra parte, 21 de las cepas procedentes de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta también presentaron amplificación del gen *betB*. Entre los aislados con resultados positivos en esta prueba encontramos una gran diversidad de géneros bacterianos, como: *Streptomyces*, *Priestia*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, o *Rhizobium*, entre otros (Tablas 32 y 33).

La acumulación de solutos orgánicos, como la betaína, es una de las estrategias de osmoprotección utilizada por microorganismos para adaptarse a las condiciones de salinidad elevada (Boysen et al., 2022; Yang et al., 2022). La betaína puede ser absorbida de manera exógena del medio extracelular, o ser sintetizada endógenamente mediante la oxidación de la colina (Balabanova et al., 2022). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que aproximadamente la mitad de los aislados seleccionados presentaron amplificación del gen que codifica la enzima BetB, implicada en el último paso de la síntesis de este osmolito. Aunque las cepas obtenidas de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta fueron aisladas de un entorno salino, los mecanismos de tolerancia frente a este estrés pueden ser diversos. Sin embargo, para conseguir una respuesta eficiente al estrés osmótico, tanto de manera inicial como mantenida en el tiempo, la acumulación de solutos osmoprotectores supone un evento clave de dicho proceso (Bremer & Krämer, 2019; Paul, 2013). Por tanto, la presencia de bacterias con la maquinaria genética para sintetizar este tipo de compuestos, claves en el proceso de osmorregulación, puede suponer una ventaja adaptativa en la tolerancia a la salinidad, objeto

de estudio de este trabajo (Bremer & Krämer, 2019; Navarro-Torre et al., 2017). Por ello seleccionamos este análisis como uno de los criterios de selección de posibles candidatos.



Figura 23: Gel de electroforesis donde se observa la banda amplificada de aproximadamente 700 pb en los carriles 4 y 5, correspondientes a las cepas SCPM31 y SCPM46. El carril 1 representa el marcador de peso molecular (GenRulerTM 1 kb DNA Ladder), donde la flecha indica la banda correspondiente a 750 pb.

CAPÍTULO II

Caracterización fenotípica y análisis del potencial PGP *in vitro* e *in silico* de los asilados.

El suelo alberga una gran diversidad de microorganismos que pueden establecer diferentes tipos de relaciones con las plantas: positivas, negativas o neutras (Jacoby et al., 2017). Algunos de estos microbios pueden presentar potencial para promover positivamente el crecimiento de las plantas, siendo candidatos de interés para su uso como bioinoculantes. En este sentido, el análisis *in vitro* de diferentes características de promoción del crecimiento vegetal supone una metodología de gran utilidad en los primeros pasos del diseño de este tipo de productos (Ilangumaran & Smith, 2017). Además, el aumento de zonas afectadas por altos niveles de salinidad hace que el aislamiento de microorganismos tolerantes a la sal y con propiedades PGP pueda suponer una solución para mejorar la productividad de los agrosistemas sometidos a condiciones de estrés abiótico, como la salinidad (Egamberdieva et al., 2019).

Todos estos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal y de adaptación a las condiciones ambientales adversas están mediados por una compleja maquinaria genética (Paterson et al., 2017). El estudio funcional de los genomas de estos microorganismos nos permite analizar este potencial, lo que supone una ayuda en el proceso de selección de candidatos de interés (Flores-Félix et al., 2021). Sin embargo, conocer estos mecanismos genéticos no es suficiente para asegurar un resultado efectivo, por lo que los estudios *in silico* deben ir acompañados de ensayos *in vitro*.

Por lo tanto, en este segundo capítulo describimos la caracterización fenotípica y el análisis del potencial PGP (*in vitro* e *in silico*) de las bacterias aisladas e identificadas en el Capítulo I. Por una parte, detallamos el análisis de los rangos de crecimiento en pH, salinidad (NaCl y Na₂SO₄) y temperatura de los aislados. Y, por otra parte, describimos el análisis *in vitro* de diversos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal. Con estos resultados procedimos a la selección de candidatos de interés para posteriores análisis. Por último, también exponemos los resultados obtenidos del estudio *in silico* de los genomas de las cepas seleccionadas, en el cual profundizamos en su potencial PGP y de resistencia al estrés abiótico, así como de los análisis filogenómicos.

1. Caracterización fenotípica de los aislados seleccionados.

1.1. Determinación del rango decrecimiento bajo condiciones de salinidad.

Para determinar el rango de crecimiento en salinidad de los aislados seleccionados, estos fueron inoculados en sus respectivos medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de NaCl y Na₂SO₄. Por una parte, el 100 % de los representantes aislados del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. lograron crecer al someterlos al 1,0 % de NaCl, pero únicamente el 44,4 % del total mostraron crecimiento a NaCl 2,5 % (Tabla 34). Además, todos estos aislados lograron crecer en una concentración de 2,5 % de Na₂SO₄, pero solamente GPTR13 fue capaz de desarrollarse hasta concentraciones del 7,0 % de Na₂SO₄ (Tabla 34). Por otra parte, el 100 % de los aislados seleccionados de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta mostraron crecimiento en concentraciones del 2,5 % de NaCl, el 91,8 % de estos aislados toleraron concentraciones del 5,0 % de NaCl, y el 69,4 % lograron desarrollarse a una concentración de NaCl del 7,0 % (Tabla 35). Asimismo, todas las cepas crecieron bajo una concentración de Na₂SO₄ del 5,0 %, pero el 6,1 % de estos aislados no lograron crecer al 7,0 % de Na₂SO₄ (Tabla 35).

Tabla 34: Capacidad de crecimiento bajo diferentes condiciones de salinidad (NaCl y Na₂SO₄), pH, y temperatura de los aislados procedentes del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. + = positivo; - = negativo; D = débil.

Cepa	% NaCl				% Na ₂ SO ₄				pH					Temperatura (°C)					
	1,0	2,5	5,0	7,0	1,0	2,5	5,0	7,0	4,5	5,5	6,5	8,0	9,0	4,0	10,0	15,0	28,0	37,0	42,0
Interior nódulos <i>Trifolium repens</i> L.																			
HUTR03	+	-	-	-	+	D	-	-	-	+	+	+	D	-	+	+	+	D	-
HUTR05	+	D	-	-	+	D	-	-	-	+	+	+	D	-	+	+	+	+	-
HUTR06	+	D	-	-	+	D	-	-	-	+	+	+	D	-	+	+	+	+	-
GPTR02	+	-	-	-	+	D	-	-	-	+	+	+	D	-	+	+	+	+	-
GPTR07	+	-	-	-	+	D	-	-	-	+	+	+	D	-	+	+	+	+	-
GPTR08	+	-	-	-	+	D	-	-	-	+	+	+	D	-	+	+	+	+	-
GPTR13	+	+	D	-	+	+	+	+	-	+	+	+	D	-	D	+	+	+	+
GPTR25	D	-	-	-	+	D	-	-	-	+	+	+	D	-	+	+	+	+	-
GPTR29	+	D	-	-	+	D	-	-	-	+	+	+	D	-	+	+	+	+	-

Tabla 35: Capacidad de crecimiento bajo diferentes condiciones de salinidad (NaCl y Na₂SO₄), pH, y temperatura de los aislados procedentes de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta. + = positivo; - = negativo; D = débil.

Cepa	% NaCl				% Na ₂ SO ₄				pH					Temperatura (°C)					
	1,0	2,5	5,0	7,0	1,0	2,5	5,0	7,0	4,5	5,5	6,5	8,0	9,0	4,0	10,0	15,0	28,0	37,0	42,0
San Cristóbal de la Cuesta																			
SCPM1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	-	-	-	D	+	+	+
SCPM2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	-	-	-	D	+	+	+
SCPM4	+	+	+	D	+	+	+	+	D	+	+	+	D	+	+	+	+	+	-
SCPM6	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
SCPM8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	-	-	-	D	+	+	+
SCPM13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
SCPM14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+

SCPM24	+	+	+	D	+	+	+	+	-	-	+	+	+	D	+	+	+	+	+
SCPM31	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SCPM35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	D	+	+	+	+
SCPM36	+	+	+	D	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	D
SCPM37	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	D	-	+	+	+	+	+	D
SCPM46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
SCPM52	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	D	+	+	+	+
SCPM53	+	+	D	-	+	+	+	-	D	D	D	+	+	-	D	+	+	-	-
SCPM56	+	+	+	+	+	+	+	+	-	D	+	+	+	-	-	D	+	+	+
SCPM57	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	D	+	+	+	+
SCPM59	+	+	-	-	+	+	+	+	-	D	+	+	D	-	-	+	+	+	+
SCPM64	+	+	D	-	+	+	+	+	-	+	+	+	D	-	D	+	+	+	+
SCPM65	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	D	-	-	-	+	+	+	+
SCPM67	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
SCPM69	+	+	+	D	+	+	+	+	-	-	+	+	D	+	+	+	+	+	D
SCPM76	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	D	-	-	-	D	+	+	-
SCPM77	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
SCPM79	+	+	-	-	+	+	+	+	-	D	+	+	D	-	-	-	+	+	+
SCPM80	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	D	+	+	+
SCPM81	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
SCCM1	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	D	-	-	-	+	+	+	+
SCCM2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
SCCM5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
SCCM8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	-	-	-	D	+	+	+
SCCM9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
SCCM10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
SCCM11	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	D	+	-	-	-	D	+	+	-
SCCM22	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
SCCM28	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

SCCM30	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	D	+	+	+	+	-
SCCM33	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
SCCM36	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	D	+	+	+	+
SCCM44	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	D	+	-	-	-	-	+	+	+
SCCM45	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	D	+	+	+	+
SCCM54	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SCCM55	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
SCPME6	+	+	-	-	+	+	+	-	-	D	+	+	-	-	D	+	+	-	-
SCPME9	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	D	D	+	+	+
SCPME12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
SCCME10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
SCCME11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
SCCME13	+	+	+	D	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Estos resultados ponen de manifiesto la mayor tolerancia a diferentes tipos de salinidad de los aislados obtenidos en las muestras de San Cristóbal de la Cuesta, siendo resultados lógicos, al estar aislados de un nicho con una conductividad eléctrica elevada. Por otra parte, los efectos dañinos del NaCl parecen ser mayores que los del Na₂SO₄, ya que, a la misma concentración de ambas sales, la capacidad de crecimiento de los aislados en NaCl fue menor. En este sentido, ha sido comprobado que no solo el nivel de salinidad afecta a la inhibición bacteriana, sino que el tipo de iones causantes también tienen un efecto sobre el crecimiento (Lin et al., 2021). Algo que también ocurre en el desarrollo de especies vegetales, donde está demostrado que los efectos de la salinidad por NaCl son más perjudiciales que en el caso del Na₂SO₄ a bajas concentraciones, no obstante, el Na₂SO₄ puede ser más dañino que el NaCl con salinidades más altas (Reginato et al., 2021). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la sensibilidad a diferentes tipos de sales varía entre especies, ya sean vegetales o microbianas (Gennari et al., 2007; Reginato et al., 2021).

1.2. Determinación del rango de crecimiento en diferentes condiciones de pH.

Para determinar el rango de crecimiento bajo diferentes condiciones de pH los aislados seleccionados fueron inoculados en sus respectivos medios de cultivo ajustados a pH 4,5, 5,5, 6,5, 8,0 y 9,0. Todos los aislados obtenidos de nódulos de *Trifolium repens* L. presentaron el mismo rango de crecimiento, desde pH 5,5 hasta pH 9, observándose crecimiento débil en este último (Tabla 34). En cambio, las cepas seleccionadas de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta exhibieron una mayor variabilidad en los rangos de crecimiento (Tabla 35). El 85,7 % de los aislados no mostraron crecimiento a pH 4,5, sin embargo, el 73,5 % y el 97,9 % lograron crecer bajo condiciones de pH 5,5 y 6,5, respectivamente. La mayoría de los representantes identificados (91,8 %) crecieron en pH 8, pero el número de cepas capaces de tolerar condiciones más básicas (pH 9) se redujo drásticamente hasta el 34,7 %.

La acidificación del suelo (pH < 5,5), es un factor que afecta negativamente a las comunidades bacterianas rizosféricas, ya que este tipo de estrés provoca una reducción de su capacidad de supervivencia (Wan et al., 2020). Además, ha sido comprobado que ciertos grupos bacterianos, como los *rhizobia*, suelen presentar sensibilidad a pH ácidos, con crecimiento bajo o nulo por debajo de 6,0 (Zhang et al., 2020). Esta dinámica pudo ser observada en los datos recogidos en las Tablas 34 y 35, tanto para los aislados identificados dentro del género *Rhizobium*, como en los aislados obtenidos a partir de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta, aunque al presentar estos últimos más diversidad, pudimos encontrar algunos con capacidad de crecimiento a pH

4,5. Por otra parte, el estrés alcalino también puede tener efectos negativos en el crecimiento bacteriano. En este sentido, un pH elevado puede generar cambios sobre el microbioma del suelo, ya que, ante este tipo de condiciones, solamente los microorganismos más competitivos logran desarrollarse gracias a procesos de neutralización el pH del medio, entre otros (Lopes et al., 2021; Msimbira & Smith, 2020). Además, un pH neutro (o cercano a la neutralidad) suele ser considerado como óptimo para el crecimiento bacteriano, tal y como observamos en las Tablas 34 y 35.

1.3. Determinación del rango de crecimiento bajo diferentes temperaturas.

Para determinar el rango de temperaturas de crecimiento de los aislados seleccionados, estos fueron inoculados en sus respectivos medios de cultivo e incubados a diferentes temperaturas: 4,0 °C, 10,0 °C, 15,0 °C, 28,0 °C, 37,0 °C y 42,0 °C. Todos los aislados obtenidos del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. crecieron entre 10,0 °C y 37,0 °C, excepto la cepa GPTR13, identificada como *Paenibacillus rhizosphaerae*, que logró crecer también a 42 °C. Además, consideramos la temperatura óptima de crecimiento en 28,0 °C (Tabla 34). Del mismo modo, la temperatura de crecimiento óptima para las cepas seleccionadas de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta también fue 28,0 °C, aunque más del 95 % crecieron entre 15,0 °C y 37,0 °C. Fuera de estos rangos de temperatura, los porcentajes de crecimiento disminuyeron al 71,4 %, 49,0 % y 22,4 % para 42,0 °C, 10,0 °C y 4,0 °C, respectivamente (Tabla 35).

De acuerdo con los resultados indicados en las Tablas 34 y 35, los aislados seleccionados pueden ser considerados mesófilos, lo que concuerda con la zona de aislamiento de las que proceden (latitudes templadas). Asimismo, las temperaturas óptimas de crecimiento suelen estar más cerca de la máxima que de la mínima, aunque los rangos de crecimiento tienden a reflejar la temperatura media de sus hábitats (Madigan et al., 2003; Zhang et al., 2020).

2. Análisis *in vitro* de los mecanismos PGP.

La selección de bacterias para su uso como bioinoculantes requiere la realización de un *screening* inicial que permita determinar sus características de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*, previa a la realización de ensayos de inoculación en plantas, sobre todo cuando se trabaja con un elevado número de cepas (Ilangumaran & Smith, 2017). Por esta razón, en el presente apartado describimos el análisis de varios mecanismos PGP *in vitro* de las cepas seleccionadas, como son la solubilización de fosfato, la producción de sideróforos, la producción de auxinas, y el crecimiento en medios libres de nitrógeno (este último no fue realizado para las muestras procedentes del interior de nódulos de *Trifolium repens* L., excepto

en el caso del aislado GPTR13). Las Tabla 36 y 37 recogen los resultados de estos mecanismos PGP analizados.

Tras el análisis de estos mecanismos, procedimos a la selección de los 6 aislados que habían obtenido los resultados *in vitro* más prometedores, procurando, además, seleccionar cepas filogenéticamente diversas. Y, a continuación, llevamos a cabo el análisis *in vitro*, cuantitativo y cualitativo, de la capacidad de producción de *biofilms* de los candidatos seleccionados.

Tabla 36: Mecanismos PGP *in vitro* analizados en los aislados procedentes del interior de nódulos de *Trifolium repens* L.: solubilización de fosfato bicálcico (PKVII), tricálcico (PKVIII) e hidroxiapatita (NBRIP), producción de sideróforos, y producción de auxinas.

Cepa	PKVII	PKVIII	NBRIP	Sideróforos	[auxinas] mg/l
Interior nódulos <i>Trifolium repens</i> L.					
HUTR03	+	+	-	+	131,0
HUTR05	+	+	+	+	70,5
HUTR06	+	+	+	-	82,5
GPTR02	+	-	-	+	64,4
GPTR07	+	+	-	+	51,4
GPTR08	+	+	-	+	50,8
GPTR13	+	+	-	+	27,5
GPTR25	+	+	-	+	50,8
GPTR29	+	-	+	+	74,3

Tabla 37: Mecanismos PGP *in vitro* analizados en los aislados procedentes de San Cristóbal de la Cuesta: solubilización de fosfato bicálcico (PKVII), tricálcico (PKVIII) e hidroxiapatita (NBRIP), producción de sideróforos, producción de auxinas, y crecimiento en medios libres de nitrógeno (N₂).

Cepa	PKVII	PKVIII	NBRIP	Sideróforos	[auxinas] mg/l	N ₂
San Cristóbal de la Cuesta						
SCPM01	+	+	-	+	14,4	+
SCPM02	+	+	+	+	19,6	+
SCPM04	+	-	-	+	11,3	+
SCPM06	+	-	-	+	64,3	+
SCPM08	+	+	-	+	15,8	+
SCPM13	+	+	-	+	53,6	-
SCPM14	+	+	-	+	69,1	-
SCPM24	-	-	-	+	13,7	-
SCPM31	+	+	+	+	11,2	-
SCPM35	+	+	-	+	8,9	-
SCPM36	+	-	-	+	0,0	+
SCPM37	+	-	-	+	31,5	+

SCPM46	+	+	-	+	48,9	-
SCPM52	-	-	-	+	10,3	+
SCPM53	-	-	-	+	9,5	-
SCPM56	-	-	-	+	46,8	-
SCPM57	-	-	-	+	36,7	+
SCPM59	-	-	-	+	19,1	-
SCPM64	-	-	-	+	21,6	-
SCPM65	-	+	-	+	10,5	-
SCPM67	-	+	-	+	64,7	-
SCPM69	-	-	-	+	18,1	-
SCPM76	+	+	-	+	7,8	+
SCPM77	-	-	-	+	13,4	+
SCPM79	-	-	-	+	15,4	-
SCPM80	-	-	-	+	8,6	-
SCPM81	+	+	-	+	139,5	+
SCCM01	+	+	-	+	28,0	+
SCCM02	+	-	-	+	20,6	+
SCCM05	+	-	-	+	21,3	-
SCCM08	+	+	-	+	22,8	+
SCCM09	+	-	-	+	16,4	+
SCCM10	+	-	-	+	7,3	-
SCCM11	+	-	-	+	3,0	-
SCCM22	+	+	-	+	24,2	-
SCCM28	-	-	-	+	36,2	-
SCCM30	+	-	-	+	199,4	-
SCCM33	+	+	-	+	2,8	+
SCCM36	-	-	-	+	16,0	+
SCCM44	-	-	-	+	27,6	-
SCCM45	-	-	-	+	9,3	-
SCCM54	+	+	-	+	10,6	-
SCCM55	-	-	-	+	22,3	-
SCPME06	-	+	-	+	3,8	-
SCPME09	-	-	-	+	36,2	-
SCPME12	-	-	-	+	63,6	-
SCCME10	+	+	-	+	15,3	-
SCCME11	-	-	-	+	8,5	+
SCCME13	+	+	-	+	18,5	-

2.1. Solubilización de fosfato.

El fósforo es un nutriente esencial para las plantas, pero su baja disponibilidad en el suelo supone un factor limitante para la producción agrícola (Glick, 2012; Hakim et al., 2021). Además, la rápida conversión del P procedente de fertilizantes inorgánicos a formas insolubles

en el suelo hace que el rendimiento de este tipo de productos sea insuficiente (Hakim et al., 2021; Menéndez & García- Fraile, 2017). Por ese motivo, la utilización de bacterias solubilizadoras de fosfato (PSB) es un factor clave para el diseño de bioinoculantes bacterianos efectivos (Bashan et al., 2013).

En este trabajo describimos la capacidad *in vitro* de las cepas aisladas de solubilizar tres fuentes distintas de fosfato, utilizando para ello dos medios de cultivo distintos: Pikovskaya Agar (Pikovskaya, 1948) con fuente de fosfato bicálcico (Ca_2PO_3) y tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_3)_2$), y medio NBRIP (Nautiyal, 1999) con hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) como fuente de fosfato (Tablas 36 y 37). En este sentido, la búsqueda de bacterias capaces de solubilizar diferentes complejos de P ha sido establecido como el enfoque adecuado para la selección de PSB (Bashan et al., 2013).

Todos los aislados obtenidos del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. mostraron halos de solubilización en el medio Pikovskaya Agar con fuente de fosfato bicálcico, mientras que la capacidad de solubilización de fosfato tricálcico solo fue observada en el 77,8 % de las cepas (Tabla 36). En cambio, únicamente un 33,3 % de los aislados mostraron capacidad de solubilización de hidroxiapatita. De los 9 aislados, las cepas HUTR05 y HUTR06 exhibieron los resultados más prometedores, al ser capaces de solubilizar las tres fuentes de fosfato. Asimismo, GPTR29 también destacó, al formar halos de solubilización en los medios con Ca_2PO_3 y $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, siendo este último uno de los minerales menos solubles entre los fosfatos (Bashan et al., 2013). Ya ha sido descrita previamente la capacidad de diversas cepas del género *Rhizobium* por solubilizar algunas formas de P, aunque estos trabajos están centrados en formas más fácilmente solubilizables, como el fosfato bicálcico o tricálcico (Flores-Félix et al., 2013; Jiménez-Gómez et al., 2018; Sridevi & Mallaiah, 2009).

Por otra parte, de los 49 aislados procedentes de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta, un 55,0 % del total presentó solubilización positiva de fosfato bicálcico, porcentaje que disminuyó al 41,0 % en el medio suplementado con fosfato tricálcico. En el caso del medio NBRIP, solamente los aislados SCPM02 y SCPM31 mostraron resultados positivos (Tabla 37 y Figura 24). Ambas cepas, identificadas como *Streptomyces iakyrus* y *Pseudomonas alvandae*, respectivamente, fueron las únicas capaces de solubilizar los tres tipos de minerales. Sin embargo, otros aislados pertenecientes a los géneros *Sterptomyces* (SCPM01, SCPM08, SCPM35, SCPM76, SCCM01, SCCM08, y SCCM33), *Pseudomonas* (SCCME10), *Priestia* (SCPM13, SCPM14, SCPM46, SCPM81, y SCCM22), o *Paenarthrobacter* (SCCM54 y

SCCME13), también mostraron resultados positivos en los medios suplementados con Ca_2PO_3 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_3)_2$, enmarcándose como posibles candidatos de interés. De acuerdo con la revisión de Chouyia y colaboradores (2022), han sido aisladas numerosas cepas del género *Streptomyces* con capacidad para solubilizar P, en formas inorgánicas (fosfato de aluminio o calcio) u orgánicas. De igual manera, numerosos aislados clasificados dentro de la familia *Bacillaceae*, han sido descritos como solubilizadores de fosfato: *Priestia aryabhattai*, *Priestia megaterium*, *Bacillus cereus*, o *Bacillus subtilis* (Ramesh et al., 2014; Saeid et al., 2018). Asimismo, diversas cepas de las familias *Micrococcaceae* y *Pseudomonadaceae*, han mostrado un gran potencial para aumentar la disponibilidad de P en suelos deficientes de este nutriente, dando lugar a una promoción del crecimiento vegetal de cultivos de interés agronómico, como el maíz o el guisante (Arruda et al., 2013; Oteino et al., 2015; Pereira & Castro, 2014). En este sentido, cabe destacar que la producción de ácidos orgánicos ha sido descrita como el principal mecanismo de solubilización de fosfato en bacterias del género *Pseudomonas* (Miller et al., 2010).

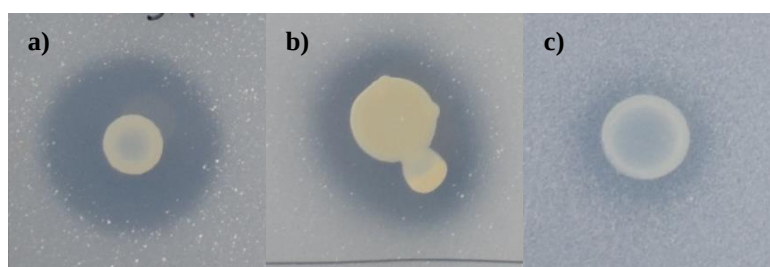


Figura 24: Solubilización de fosfato a) bicálcico, b) tricálcico, y c) hidroxiapatita, por parte del aislado SCPM31.

2.2. Producción de sideróforos.

El hierro es un micronutriente esencial para cualquier organismo, ya que juega un papel fundamental en la regulación de procesos celulares (cofactor de enzimas, regulación de la respiración o fotosíntesis, protección del ADN, etc.) (Ferreira et al., 2019; Hakim et al., 2021). A pesar de ser un elemento muy abundante en el suelo, su disponibilidad para plantas o microorganismos es baja, ya que suele encontrarse en formas férricas oxidadas (Fe^{3+}) muy insolubles (Glick et al., 2012; Hakim et al., 2021). Dada la competencia existente en la rizosfera por este nutriente, la producción de sideróforos destaca como una estrategia evolutiva de gran importancia entre los organismos que habitan en ella (Glick et al., 2012). Y, aunque las plantas poseen sus propios mecanismos de captación de este elemento, está descrito que pueden aprovechar los sideróforos secretados por los microorganismos como una estrategia alternativa o complementaria a la absorción de Fe (Ferreira et al., 2019). Por esta razón, la producción de

sideróforos por bacterias de la rizosfera es considerado actualmente un mecanismo promotor del crecimiento vegetal.

La capacidad de producción de sideróforos *in vitro* por parte de las cepas seleccionadas por RAPD e identificadas por rRNA16S fue analizada en el presente trabajo, obteniendo los resultados indicados en las Tablas 36 y 37. Ocho de las nueve cepas aisladas del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. mostraron halos anaranjados alrededor de las colonias, lo que supone cerca del 90 % del total (Tabla 36). Únicamente la cepa HUTR06 no presentó capacidad para producir sideróforos en este ensayo *in vitro*. En cambio, el 100 % de los aislados seleccionados de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta exhibieron un resultado positivo para la producción de sideróforos (Tabla 37 y Figura 25).

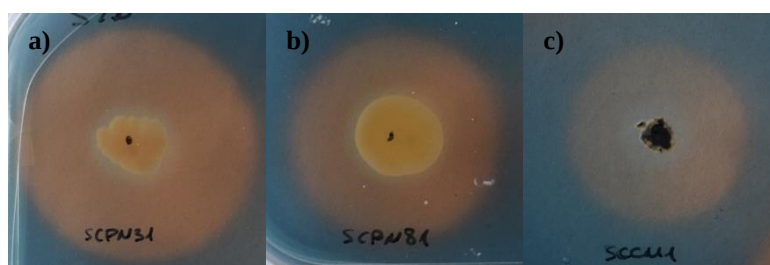


Figura 25: Producción de sideróforos de los aislados a) SCPM31, b) SCPM81, y c) SCCM01 en el medio M9-CAS-AGAR.

Estudios recientes relacionan la salinidad con una disminución de la disponibilidad de hierro para las plantas y microorganismos, aunque los mecanismos y elementos implicados en esta interacción no están del todo claros (Abbas et al., 2015; Ferreira et al., 2019). Por tanto, seleccionar cepas capaces de producir sideróforos no solo supone un criterio de selección para el desarrollo de biofertilizantes, sino que también puede representar una alternativa prometedora para abordar los efectos negativos del estrés salino en plantas y sus limitaciones derivadas de la deficiencia de Fe disponible en el suelo (Ferreira et al., 2019). Son numerosos los trabajos en los que analizan cepas de diversos taxones bacterianos capaces de producir sideróforos y promover el crecimiento vegetal, como *Pseudomonas* (Trapet et al., 2016), *Streptomyces* (Rungin et al., 2012), *Rhizobium* (Flores-Félix et al., 2013; García-Fraile et al., 2012; Jiménez-Gómez et al., 2018) o *Bacillus* (Jiménez-Gómez et al., 2021), incluso en condiciones de salinidad.

2.3. Producción de auxinas y ácido indol acético.

Las auxinas son un grupo de fitohormonas que regulan una gran variedad de aspectos relacionados con el desarrollo vegetal (Li & Chen, 2023). Entre ellas, el ácido indol acético es

la auxina mejor estudiada en las plantas, ya que, juega un papel muy importante en procesos como la diferenciación celular, dominancia apical, germinación y, sobre todo, en el desarrollo radicular (Glick, 2012; Hakim et al., 2021). El IAA es producido por las propias especies vegetales, pero algunos microorganismos también tienen capacidad para sintetizar esta fitohormona, principalmente a través de rutas biosintéticas que tienen como principal precursor el triptófano (Hakim et al., 2021). La producción de ácido indol acético puede estar implicada en procesos de virulencia de microorganismos fitopatógenos, pero es importante destacar que también es un rasgo apreciado y deseable entre los PGPBs, ya que la diferencia entre la actividad biológica ejercida depende de la concentración de la fitohormona producida y el balance hormonal de la planta (Pantoja-Guerra et al., 2023).

Por esta razón, en el presente apartado detallamos el análisis *in vitro* de producción de auxinas y ácido indol acético por parte de las cepas seleccionadas. En primer lugar, realizamos un *screening* inicial de producción de auxinas, a través de un método colorimétrico semicuantitativo, utilizando un medio base suplementado con triptófano (Flores-Félix, 2018; Khalid et al., 2004). Y, a continuación, realizamos un análisis de la producción de ácido indol acético mediante HPLC con los aislados seleccionados por su potencial PGP *in vitro*, utilizando las mismas condiciones de crecimiento. En este sentido, el método colorimétrico permite conocer la concentración de auxinas en el medio, pero no permite diferenciar entre los distintos tipos, sin embargo, la cromatografía líquida de alta eficiencia permite conocer de manera específica la concentración de IAA producida por las bacterias (Wöhler, 1997). Por lo tanto, ambos métodos pueden ser complementados perfectamente, usando el primero como una aproximación general (para volúmenes más grandes de muestras) y el segundo como un análisis más concreto y preciso.

En cuanto al análisis de producción de auxinas mediante el método colorimétrico, todos los aislados obtenidos del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. mostraron capacidad de producción de auxinas, con concentraciones de entre 27,5 y 131,0 mg/L (Tabla 36). La cepa GPTR13 obtuvo el valor más bajo de concentración de auxinas, coincidiendo con el único representante no identificado dentro del género *Rhizobium*. Mientras que el valor más alto de producción fue obtenido por el aislado HUTR03. La producción de auxinas por parte de cepas identificadas dentro del género *Rhizobium* ha sido ampliamente estudiada, obteniendo valores similares a encontrados en el presente trabajo (Flores-Félix et al., 2013; García-Fraile et al., 2012; Ghosh et al., 2011; Jiménez-Gómez et al., 2018). Además, algunas de estas cepas mostraron promoción del crecimiento vegetal de diferentes cultivos hortícolas. Asimismo, otros

estudios han comprobado la relación directa entre la mejora de la masa radicular y la producción de IAA por bacterias PGP, para concentraciones similares a las mostradas en este trabajo (Gumiere et al., 2014).

La producción de estas fitohormonas entre las cepas aisladas de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta osciló entre producción nula, como en el caso de SCPM36, y valores cercanos a 200,0 mg/L en la cepa SCCM30 (Tabla 37 y Figura 26). Estos resultados presentan una mayor variabilidad que los obtenidos en los aislados de nódulos de trébol blanco, pudiendo estar relacionado con la mayor diversidad taxonómica observada, como también ocurre en otros trabajos (Ahmad et al., 2005; Gumiere et al., 2014; Khianngam et al., 2023). Además, ya ha sido caracterizada la capacidad de microorganismos halófilos para producir IAA, incluso al ser sometidos a elevadas concentraciones de NaCl, mejorar el crecimiento vegetal, y la tolerancia de cultivos frente a condiciones de estrés salino (Kapadia et al., 2022; Saleem et al., 2021). Desde una perspectiva evolutiva, el IAA podría inducir una mayor adaptabilidad bacteriana a las condiciones de estrés, al mejorar la tolerancia frente a los desafíos oxidativos. Así, Lin et al. (2018) comprobaron que la aplicación exógena de esta fitohormona provocaba cambios a nivel transcriptómico, así como un aumento de la supervivencia de mutantes y cepas silvestres de *Acinetobacter baumannii*. Además, el IAA puede ejercer un efecto positivo en la respuesta vegetal a condiciones de estrés salino, debido a la alteración del balance hormonal por parte de bacterias productoras de esta fitohormona (Ayuso-Calles et al., 2021; Hakim et al., 2021; Ilangumaran & Smith, 2017).

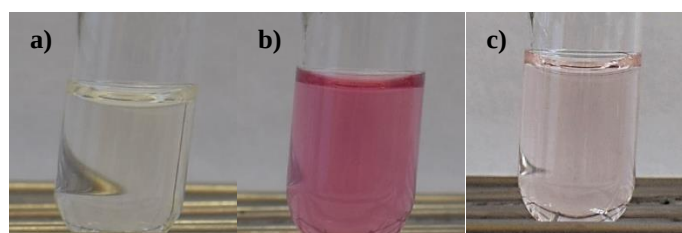


Figura 26: Producción de auxinas de las muestras a) Control -, b) SCPM81, y c) SCCME10, en el medio JMM-DF sales.

Por otra parte, llevamos a cabo el análisis de la producción de IAA mediante HPLC por parte de los aislados seleccionados por su potencial PGP (Tabla 38). Las concentraciones obtenidas por esta técnica son claramente inferiores a las alcanzadas en el análisis colorimétrico, ya que este último determina la concentración de auxinas y compuestos derivados del indol, mientras que el análisis por HPLC analiza el ácido indol acético de manera específica (Goswami et al.,

2015; Wöhler, 1997). Esta disminución ya ha sido previamente descrita (Goswami et al., 2015; Jiménez-Gómez et al., 2018).

Tabla 38: Resultados del análisis mediante HPLC de la producción de ácido indol acético por parte de los aislados seleccionados.

Cepa	IAA (mg/L)
SCPM31	0,30
SCPM81	1,16
SCCM01	0,18
SCCME10	0,36
HUTR05	1,34
GPTR29	0,77

2.4. Crecimiento en medios libres de nitrógeno.

La FBN es un proceso que permite transformar el nitrógeno atmosférico en formas asimilables para las plantas (Hakim et al., 2021). Dada la baja disponibilidad de este nutriente para las plantas, la importancia de las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico es muy elevada, no solo en el caso de aquellas capaces de establecer relaciones simbióticas con su hospedador vegetal, sino también en el caso de las fijadoras en vida libre (García-Fraile et al., 2015; Menéndez & García-Fraile, 2017). Por esta razón, en el presente trabajo decidimos analizar la capacidad de los aislados para crecer en medios libres de nitrógeno, una prueba presuntiva que permite hacer un *screening* inicial de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno. En este ensayo no analizamos los aislados procedentes del interior de nódulos de *Trifolium repens* L. e identificados dentro del género *Rhizobium*, ya que está ampliamente descrito que este taxón bacteriano lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno en simbiosis con leguminosas, después de su transformación a bacteroides (Peix et al., 2015). Sin embargo, sí fue analizada en el aislado GPTR13, identificado como *Paenibacillus rizosphaerae*, el cual no exhibió capacidad para crecer en medios libres de nitrógeno. En este sentido, estudios previos han informado de la presencia de cepas del género *Paenibacillus* en nódulos de leguminosas (Annapurna et al., 2013; Latif et al., 2013; Wang et al., 2021a), así como de otras especies bacterianas que no mostraron capacidad para crecer en medios libres de nitrógeno (Li et al., 2008).

De los 49 aislados procedentes de las muestras de San Cristóbal de la Cuesta, únicamente 19 mostraron crecimiento tras el tercer pase en el medio de cultivo libre de nitrógeno (Tabla 37 y Figura 27). Estas cepas habían sido clasificadas previamente dentro de los géneros bacterianos *Streptomyces* (SCPM01, SCPM02, SCPM08, SCPM57, SCPM76, SCCM01, SCCM02,

SCCM08, y SCCM33), *Arthrobacter* (SCPM04, SCPM36, SCPM37, SCCM09, y SCCME11), *Priestia* (SCPM06, y SCPM81), *Isoptericola* (SCPM52, y SCPM77), y *Cytobacillus* (SCCM36).

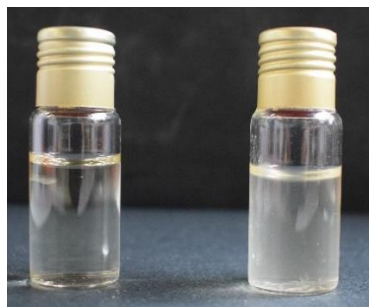


Figura 27: Crecimiento en el medio JMM-DF sales libre de nitrógeno por parte del control negativo (izquierda) y del aislado SCPM52 (derecha).

Ya ha sido descrita la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico por parte de diversos aislados pertenecientes a la mayoría de los géneros bacterianos indicados en el párrafo anterior. Por ejemplo, cepas pertenecientes al género *Arthrobacter* (Chhetri et al., 2022; Jiang et al., 2022), *Streptomyces* (Dahal et al., 2017), o a varios géneros de la familia *Bacillaceae* (Jain et al., 2021; Singh et al., 2020). Respecto al género *Isoptericola*, Radwan y colaboradores (2010) han constatado la capacidad de cepas pertenecientes a este taxón bacteriano de crecer en medios libres de nitrógeno, así como reducir el gas acetileno a etileno, una prueba comúnmente utilizada para medir la actividad de la enzima nitrogenasa en la FBN (Soper et al., 2021).

No obstante, el crecimiento en medios libre de nitrógeno debe ser considerada presuntiva y una aproximación para la realización del *screening* de microorganismos útiles. Cabe destacar que varias revisiones bibliográficas señalan la necesidad de ahondar en el estudio de las vías y los mecanismos completos implicados en la fijación del nitrógeno atmosférico por parte de estos aislados. Así, muchos estudios se centran en ensayos moleculares (presencia de genes *nif*) o en el crecimiento en medios libres de N (pruebas presuntivas), siendo pocos los trabajos que estudian el proceso más a fondo (por ejemplo, realizando ensayos con isótopos como el $^{15}\text{N}_2$) (Amaresan et al., 2018; Jain et al., 2021).

2.5. Estudio de la capacidad de producción de *biofilms in vitro*.

Los *biofilms* o biopelículas son comunidades celulares formadas por una o varias especies microbianas y rodeadas de una matriz polimérica extracelular autoproducida (*Extracellular Polymeric Substance* o EPS), que incluye principalmente exopolisacáridos, proteínas, y ácidos nucleicos (Gupta et al., 2017; Kassinger & van Hoek, 2020; Seneviratne et al., 2011). Las

principales funciones de las biopelículas microbianas son la adhesión de las células a diferentes sustratos, y la protección frente a estreses bióticos y abióticos (Ansari & Ahmad, 2018). Dentro de la interacción planta-microorganismo, la adhesión o colonización de las PGPBs a la superficie radicular de las plantas supone un beneficio para ambas partes. Por un lado, las bacterias pueden utilizar los exudados radiculares como fuente de nutrientes y energía (Molina et al., 2003; Seneviratne et al., 2011). Por otra parte, las plantas también son beneficiadas gracias al incremento de la disponibilidad y movilización de nutrientes, la inducción de la respuesta sistémica, el desplazamiento de comunidades microbianas competitivas, o la disminución de los efectos negativos causados por diversos estreses abióticos (Gupta et al., 2017; Molina et al., 2003; Seneviratne et al., 2011).

El proceso de formación de biopelículas en superficies abióticas muestra similitudes con la colonización de las superficies vegetales (Molina et al., 2003; Seneviratne et al., 2011). Por esa razón, realizamos el análisis de la capacidad de formación de *biofilms in vitro* por parte de las cepas seleccionadas. Para ello utilizamos dos metodologías: una primera que permite analizar de manera cuantitativa la formación *biofilms* en superficies abióticas, y una metodología cualitativa que permite analizar microscópicamente la estructura de la biopelícula formada.

2.5.1. Determinación cuantitativa de la producción de *biofilms in vitro*.

Los seis aislados seleccionados mostraron capacidad para producir *biofilms* en placas multipocillo, aunque la dinámica de formación de la biopelícula, así como la cantidad producida, variaron entre ellos (Figura 28).

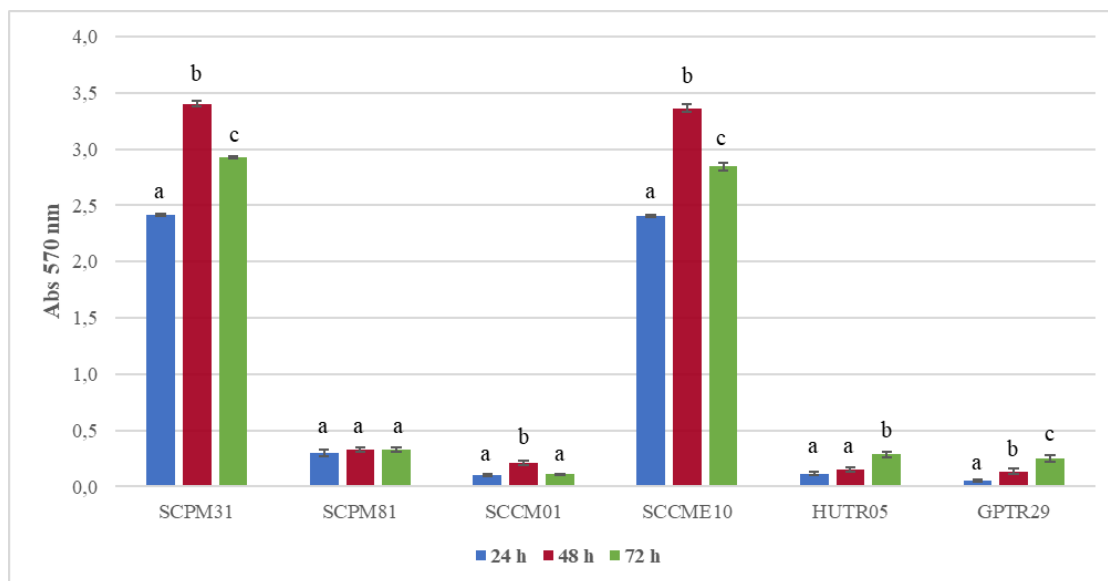


Figura 28: Producción de *biofilms in vitro* por parte de los aislados seleccionados, expresado en valores de absorbancia (570 nm) obtenidos a las 24, 48 y 72 horas de crecimiento en placas multipocillo. Las barras de error indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos, en base a la prueba Fisher's protected LSD ($p \leq 0,05$).

Los aislados SCPM31 y SCCME10, identificados dentro del género *Pseudomonas*, obtuvieron las medidas más altas de absorbancia, llegando a valores cercanos a 3,5. Además, la dinámica seguida en el desarrollo temporal del *biofilm* fue similar para ambos, alcanzando el valor más alto a las 48 h, y disminuyendo ligeramente a las 72 h (Figura 28). En este sentido, la bibliografía establece que la estructura del *biofilm* y su fisiología varían con el tiempo y están determinadas por diversos factores que influyen en la posible deformación o rotura de este, como las propiedades de la superficie, la distribución inicial de las células, la elasticidad apical de la estructura, o su flotabilidad, entre otros (Kassinger & van Hoek, 2020; Schuster & Markx, 2014).

Por otra parte, el resto de aislados (SCPM81, SCCM01, HUTR05 y GPTR29) presentaron unos valores de absorbancia inferiores a 0,5, siendo considerablemente más bajos que los obtenidos por ambas *Pseudomonas* (Figura 28). Está comprobado que la formación y estructura del *biofilm* varía entre diferentes taxones bacterianos (Andrews et al., 2010), al haber una relación importante entre la arquitectura de la biopelícula y factores como la forma de las células, la producción de EPS, o la presencia de adhesinas que ayuden a la adhesión y agregación celular (Kassinger & van Hoek, 2020; Molina et al., 2003). Además, cabe destacar que muchos miembros dentro del género *Pseudomonas* presentan gran facilidad para formar *biofilms*, lo que

puede suponer una gran ventaja para su uso en procesos biotecnológicos, pero constituye un grave problema en el caso de las cepas con relevancia clínica (Masák et al., 2014).

La dinámica seguida por la cepa SCCM01 (identificada dentro del género *Streptomyces*) fue similar a la de las cepas del género *Pseudomonas*, con un valor máximo de absorbancia a las 48 h. En cambio, los valores obtenidos por la cepa *Priestia megaterium* SCPM81 fueron continuos en el tiempo, al no aparecer diferencias significativas entre las medidas. Por último, los aislados pertenecientes al género *Rhizobium*, mostraron una dinámica similar, al alcanzar la absorbancia máxima en el último tiempo de medida.

2.5.2. Determinación cualitativa de la producción de *biofilms in vitro*.

La tinción con naranja de acridina ha sido utilizada comúnmente para la visualización microscópica de *biofilms* bacterianos (Altaf & Ahmad, 2017; Palestrant et al., 2004), ya que se une a los ácidos nucleicos y moléculas polianiónicas, emitiendo fluorescencia cuando es excitada con luz ultravioleta (Netuschil et al., 2014). El análisis microscópico del crecimiento bacteriano sobre portaobjetos permite conocer en detalle el tipo de biopelícula formada, razón por la cual llevamos a cabo este ensayo en el presente trabajo.

La morfología de los *biofilms* desarrollados por los aislados pertenecientes al género *Pseudomonas*, SCPM31 y SCCME10, fue similar. Las zonas de adhesión a la superficie mostraban una matriz extracelular con una estructura compleja y un gran desarrollo tridimensional (Figura 29a y 29d). La parte más externa del *biofilm* presentaba una zona con menos densidad celular, en la que se observaban microcolonias irregulares, que sufría una transición hacia una zona con mayor crecimiento bacteriano en la que comenzaba la matriz extracelular más madura y compleja (Figura 29a y 29d). Así, las dinámicas de desarrollo de *biofilms* en especies de *Pseudomonas* están bien caracterizadas, y muestran similitudes con lo observado en este trabajo (Tolker-Nielsen et al., 2000).

Tras el análisis cuantitativo, comprobamos que la capacidad de desarrollo de *biofilms in vitro* por parte del aislado *Priestia megaterium* SCPM81 era considerablemente menor que el de ambas cepas del género *Pseudomonas*, dinámica que también fue corroborada mediante análisis de microscopía. Este aislado presentó crecimiento sobre de la superficie del portaobjetos de manera más puntual, donde podían apreciarse agregados heterogéneos y de forma irregular, como el que aparece en la Figura 29b. De manera general, la bibliografía establece que la arquitectura de los *biofilms* de diferentes especies de la familia *Bacillaceae* suele estar

caracterizada por estructuras heterogéneas en forma de aglomerados, que pueden llegar a desarrollarse verticalmente (Bridier et al., 2011; Romero et al., 2018).

La cepa SCCM01, clasificada dentro del género *Streptomyces*, mostró una arquitectura de la biopelícula diferente al resto de los aislados seleccionados, tal y como se observa en la Figura 29c. El *biofilm* formado por SCCM01 consistía en una capa fina de micelio extendida por gran parte de la superficie del portaobjetos. A este respecto, la matriz extracelular desarrollada por las bacterias del género *Streptomyces* es morfológicamente diferente a la de otros géneros bacterianos, ya que está formada por un micelio filamentoso complejo, constituido, a su vez, por hifas aéreas en cuyos extremos aparecen las esporas (El Othmany et al., 2021). Por tanto, la morfología y el tipo de extensión de las hifas observado coincide con lo descrito previamente en la bibliografía (Jyothikumar et al., 2008).

Por último, los aislados HUTR05 y GPTR29, también mostraron un *biofilm* menos extenso que en el caso de las cepas del género *Pseudomonas*. La estructura fue similar a la observada en SCPM81, agregados heterogéneos e irregulares sobre la superficie, aunque pudimos observar un cierto desarrollo tridimensional en la matriz formada (Figura 29e y 29f). De acuerdo con lo descrito en la bibliografía, el inicio de la formación de biopelículas en *Rhizobium* comienza con el desarrollo de microcolonias, que acaban conformando una estructura más compleja y con un cierto escalado vertical (Fujishige et al., 2006; Robledo et al., 2012). Además, ha sido ampliamente descrito el papel clave que juegan las microfibrillas de celulosa en la adhesión y la arquitectura del *biofilm* de *Rhizobium* (Robledo et al., 2012).

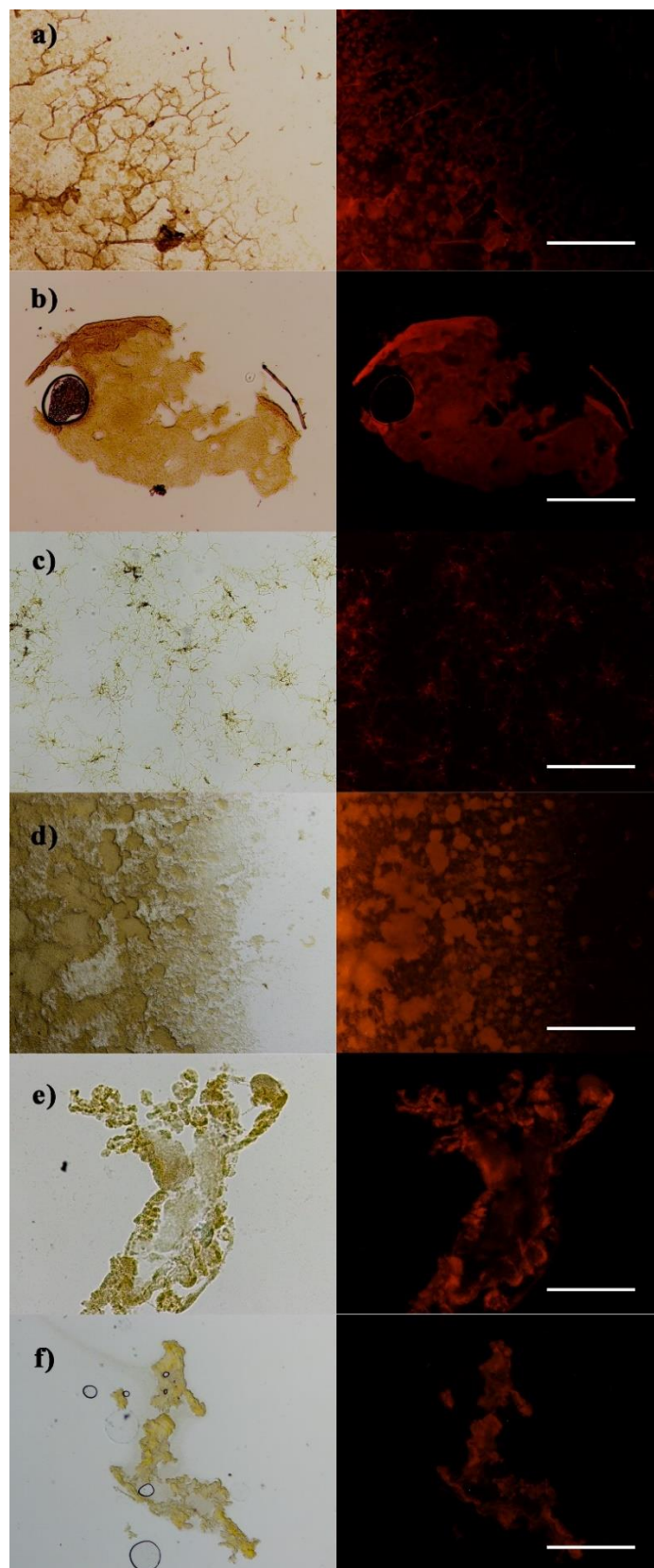


Figura 29: Imágenes representativas de microscopía óptica de campo claro (izquierda) y microscopía óptica de fluorescencia (derecha) de los *biofilms* formados por los aislados a) SCPM31, b) SCPM81, c) SCCM01, d) SCCME10, e) HUTR05, y f) GPTR29, sobre portaobjetos de vidrio y teñidos con naranja de acridina. El tamaño de las barras es de 20 μm .

3. Análisis *in silico* de los genomas de los aislados seleccionados.

Desde la secuenciación de los primeros genomas bacterianos en 1995, la genómica bacteriana ha evolucionado rápidamente, permitiendo trabajar de manera más económica y rápida con nuevas estrategias y métodos de investigación que han influido positivamente en el progreso científico (Land et al., 2015). Un factor clave en esta evolución lo constituye el minado de los genomas o la minería de datos genómicos, que hace referencia a la recopilación, análisis e interpretación sistemáticos de gran cantidad de datos (*big data*) con el objetivo de descubrir rasgos, relaciones, patrones o tendencias significativos (Paterson et al., 2017). Toda esta información genómica y su análisis bioinformático también han revolucionado el campo de las PGPBs, desde la obtención de nuevas herramientas para el análisis de las relaciones filogenéticas, hasta el estudio de los mecanismos genéticos implicados en las relaciones de los microorganismos con plantas o con el entorno (Flores-Félix et al., 2021; Land et al., 2015; Paterson et al., 2017).

En el presente apartado describimos el análisis de la información genómica de los seis aislados seleccionados por su potencial PGP *in vitro*: SCPM31, SCPM81, SCCM01, SCCME10, HUTR05 y GPTR29. Con el objetivo de conocer más a fondo sus relaciones taxonómicas, así como la maquinaria genética implicada en la promoción del crecimiento vegetal y su adaptación a condiciones ambientales desfavorables.

3.1. Análisis filogenómico de los aislados seleccionados.

Durante las últimas décadas la clasificación sistemática en bacterias ha estado basada en la comparación de la secuencia del gen ribosómico rRNA 16S, a menudo complementado por la construcción de árboles filogenéticos a partir de la secuencia de genes *housekeeping* (Land et al., 2015; Saati-Santamaría et al., 2021). Sin embargo, el uso de herramientas genómicas es cada vez más frecuente y ha permitido implementar los análisis taxonómicos (Lalucat et al., 2020; Saati-Santamaría et al., 2021). De esta manera, la filogenómica (comparaciones digitales de genomas completos) proporciona métodos precisos para la delimitación de clados bacterianos, especialmente en ciertos géneros donde la secuencia del gen ribosómico rRNA 16S puede presentar un poder discriminatorio bajo para diferenciar a nivel específico (Lalucat et al., 2020; Land et al., 2015; Saati-Santamaría et al., 2021; Young et al., 2021). Entre dichas herramientas genómicas, los índices ANIb y el dDDH destacan como los estándares en la organización y clasificación taxonómica (Lalucat et al., 2020; Saati-Santamaría et al., 2021; Young et al., 2021). Valores de ANIb y dDDH superiores al 95-96 % y 70%, respectivamente,

indican la pertenencia a la misma especie por parte de una pareja de cepas bacterianas (Chun et al., 2018; Saati-Santamaría et al., 2021; Young et al., 2021). Asimismo, algunos autores fijan el umbral del ANIb para la delimitación de géneros bacterianos en valores superiores al 75-76 % (Kimes et al., 2015; Menéndez et al., 2020; Saati-Santamaría et al., 2021).

Tras la secuenciación y el ensamblaje de los genomas de los aislados seleccionados, procedimos a la realización de análisis filogenómicos utilizando los algoritmos computacionales ANIb y dDDH. Las cepas identificadas dentro de la misma especie fueron englobadas dentro de un único análisis filogenómico, para facilitar la interpretación de los resultados.

3.1.1. SCPM31 y SCCME10.

En primer lugar, describimos el análisis filogenómico de las cepas SCPM31 y SCCME10. Los valores de ANIb compartidos entre las secuencias del genoma de ambas cepas con las de las especies tipo más cercanas de la familia *Pseudomonadaceae* fueron calculados a través del servidor informático JSpeciesWS (Tabla 39). El valor de ANIb obtenido entre las cepas SCPM31 y SCCME10 fue 99,9 %. Además, el rango de similitud entre ambos aislados con las cepas tipo de *Pseudomonas* más cercanas estuvo entre el 79,9 % y el 92 %. Las especies más cercanas fueron *Pseudomonas thivervalensis* (92,0 % y 91,9 %, respectivamente) y *Pseudomonas zarinae* (92,0 % y 92,0 %, respectivamente).

El cálculo de la hibridación digital ADN-ADN fue realizado mediante la plataforma bioinformática TYGS, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 39. El valor de dDDH entre ambas cepas fue de 99,6 %, por lo que, junto al valor de ANIb obtenido, pudimos corroborar que pertenecen a la misma especie. Asimismo, los valores obtenidos en ambos índices permitieron determinar que son especies diferentes a aquellas contra las que han sido comparadas de acuerdo con los estándares aceptados para la delimitación de nuevas especies (Riesco & Trujillo, 2024)

A partir del árbol filogenómico obtenido mediante el cálculo de las distancias intergenómicas (GBDP) observamos que las cepas SCPM31 y SCCME10 formaban un clado independiente al resto de las especies (Figura 30). Además, las cepas tipo más cercanas a los dos aislados estudiados fueron *Pseudomonas thivervalensis* DSM 13194^T y *Pseudomonas zanjensis* SWRI12^T, las cuales estaban agrupadas en un mismo *cluster*.

Pseudomonas es género bacteriano compuesto por más de 300 especies validadas, divididas, a su vez, en varios linajes (Rudra & Gupta, 2024). El empleo de herramientas genómicas ha dado

lugar a reclasificaciones de especies asignadas en este género, confirmando que este tipo de análisis es de vital importancia en este tipo de estudios taxonómicos (Lalucat et al., 2020; Rudra & Gupta, 2024; Saati-Santamaría et al., 2021). Los valores de ANIb y dDDH confirmaron que las cepas SCPM31 y SCCME10 pertenecen a la misma especie, pero que podrían ser consideradas una nueva especie, al haber obtenido diferencias frente a los taxones más emparentados similares a las encontradas en otras descripciones de nuevas especies de *Pseudomonas* (Garrido-Sanz et al., 2021; Peral-Aranega et al., 2020). Asimismo, la similitud genética entre los aislados SCPM31 y SCCME10 y las especies más cercanas filogenéticamente sugieren su posible agrupación dentro del linaje de *Pseudomonas fluorescens*, donde podemos encontrar especies con capacidad de promoción del crecimiento vegetal (Lalucat et al., 2020; Rudra & Gupta, 2024; Saati-Santamaría et al., 2021).

Tabla 39: Comparación por pares de los valores de ANIb (arriba a la derecha) y dDDH (abajo a la izquierda) entre el genoma de las cepas SCPM31 y SCCME10 y los de las cepas tipo de las especies más próximas de la familia *Pseudomonadaceae*. Cepas: 1. SCCME10; 2. SCPM31; 3. *Pseudomonas alvandae* SWRI17^T (GCA_019141525.1); 4. *Pseudomonas bijieensis* L22-9^T (GCA_013347965.1); 5. *Pseudomonas brassicacearum* JCM 11938^T (GCA_012034345.1); 6. *Pseudomonas canavaninivorans* HB002^T (GCA_016405165.1); 7. *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446^T (GCA_028747405.1); 8. *Pseudomonas corrugata* DSM 7228^T (GCA_001269905.1); 9. *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525^T (GCA_900215245.1); 10. *Pseudomonas kilonensis* DSM 13647^T (GCA_001269885.1); 11. *Pseudomonas lini* DSM 16768^T (GCA_001042905.1); 12. *Pseudomonas mediterranea* DSM 16733^T (GCA_900106005.1); 13. *Pseudomonas migulae* CFML 95-321^T (GCA_024169545.1); 14. *Pseudomonas ogarae* F113^T (GCA_000237065.1); 15. *Pseudomonas tehranensis* SWRI196^T (GCA_014268615.1); 16. *Pseudomonas thivervalensis* DSM 13194^T (GCA_001269655.1); 17. *Pseudomonas uvaldensis* 20TX0172^T (GCA_021271205.1); 18. *Pseudomonas viciae* 11K1^T (GCA_004786035.1); 19. *Pseudomonas zanjanensis* SWRI12^T (GCA_014268745.2); 20. *Pseudomonas zarinae* SWRI108^T (GCA_014268695.2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	*	99,9	87,3	90,7	91,8	87,1	87,9	86,0	79,9	91,8	82,2	86,4	82,0	91,9	87,3	92,0	85,9	88,7	91,7	92,0
2	99,6	*	87,2	90,6	91,8	87,0	81,9	86,0	80,0	91,8	82,2	86,4	82,0	91,8	87,2	91,9	85,7	88,6	91,8	92,0
3	35,3	35,3	*	86,6	87,0	98,1	81,2	84,7	79,3	87,0	81,3	85,1	81,3	87,0	85,5	87,3	84,5	86,5	87,1	87,1
4	44,5	44,5	33,7	*	91,3	86,1	81,2	85,7	79,4	90,7	81,7	86,1	81,5	90,8	87,0	90,4	85,4	89,3	89,6	91,0
5	48,1	48	34,6	46,6	*	86,6	81,4	85,9	79,5	93,8	81,9	86,2	81,6	94,2	87,2	91,1	85,5	88,8	90,5	94,3
6	35,3	35,2	88,1	33,4	34,5	*	81,2	84,7	79,2	87,1	81,3	85,2	81,4	87,1	85,5	87,4	84,5	86,5	87,1	87,1
7	27,5	27,4	26,9	27,1	26,9	26,6	*	80,9	80,4	81,7	82,0	81,3	82,1	81,5	81,3	81,5	80,8	81,5	81,5	81,6
8	33	33	30,6	32,6	33	30,5	26,6	*	78,8	85,9	81,0	92,3	80,8	86,0	85,5	85,9	85,7	86,2	85,8	86,1
9	25,4	25,3	24,8	24,7	24,6	24,3	25,6	24,2	*	79,8	79,9	79,2	80,2	79,7	79,4	79,7	78,8	79,6	79,5	79,8
10	49,4	49,4	34,7	46,3	59	34,5	27,3	33,1	25	*	82,2	86,4	81,9	95,0	87,3	91,6	85,9	89,2	91,1	95,4
11	27,6	27,6	26,5	27	27,1	26,4	27,1	25,9	24,9	27,4	*	81,4	86,4	81,9	81,6	81,9	80,7	81,9	81,7	82,3
12	33,8	33,8	31,5	33,3	33,4	31,4	27,2	49,2	24,7	34	26,5	*	81,2	86,1	85,5	86,1	86,1	86,4	86,0	86,2
13	27,4	27,4	26,6	27	27	26,4	27,4	26,1	25,2	27,2	34,1	26,6	*	81,8	81,4	81,7	80,9	81,7	81,5	81,8
14	48,6	48,5	34,7	46	60,5	34,4	27,2	32,9	25,1	64,5	27,2	33,6	27,1	*	87,2	91,2	85,6	88,8	90,6	96,3
15	34,9	34,9	32	34,9	35,1	31,9	26,7	31,9	24,4	35,3	26,8	32,3	26,7	35,1	*	87,1	85,3	88,0	86,9	87,6
16	48,9	48,9	35	43,3	46,3	34,8	27,1	32,6	24,7	47,4	27,1	33,2	27,1	46,7	34,4	*	85,4	88,2	92,3	91,3
17	32,5	32,4	30,3	31,9	32,3	30,3	25,9	31,7	23,7	32,6	25,7	32,7	25,8	32,3	31,2	32	*	85,9	85,3	85,8
18	38,6	38,6	33,4	40,5	39,4	33,1	26,9	32,7	24,6	39,8	27,1	33,4	27	39,4	36,2	37,6	31,9	*	87,7	88,9
19	48,4	48,3	35	41,9	44,6	34,6	27,2	31,9	25,1	46	27,1	32,7	27	45	34,1	50,8	31,7	36,9	*	90,9
20	49	49,1	34,7	46,2	60,5	34,4	27,2	33	25	66,4	27,6	33,7	27,2	73,7	35,2	46,8	32,3	39,5	45,5	*

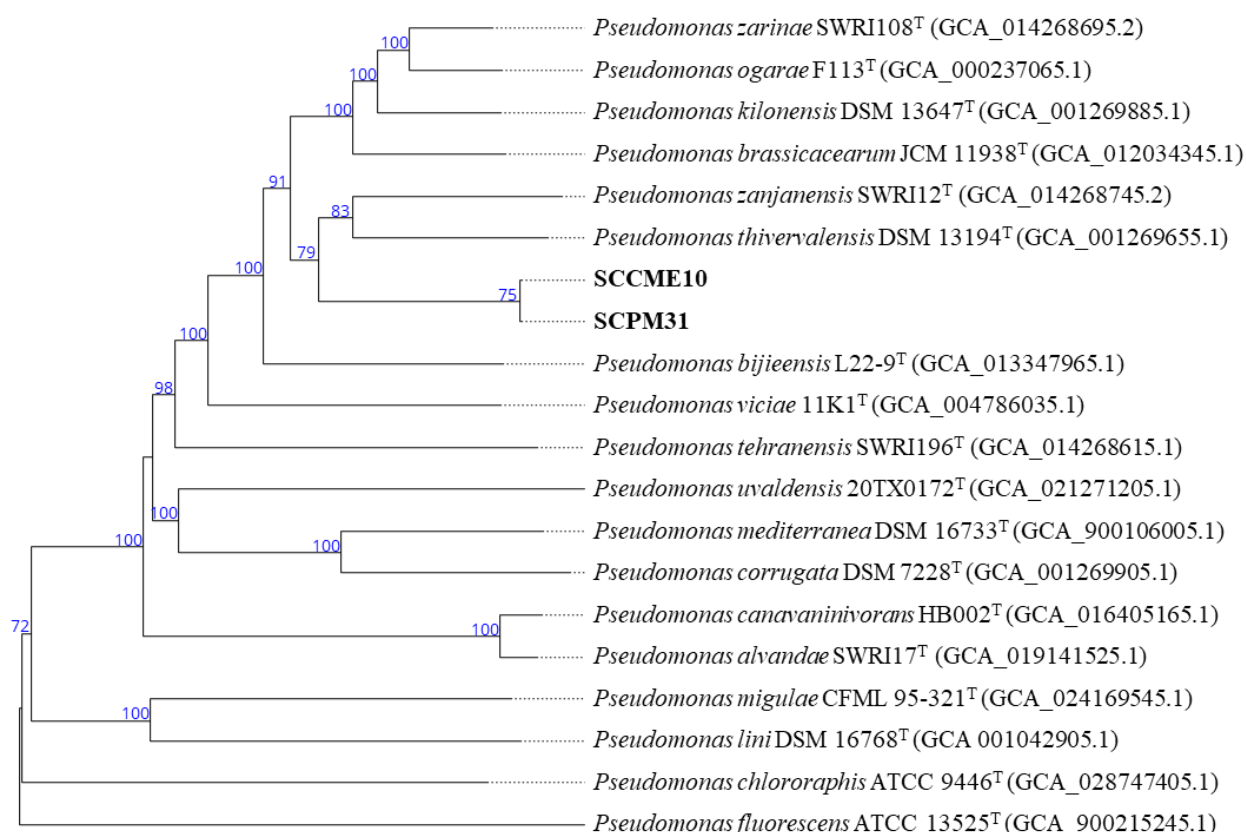


Figura 30: Análisis filogenético obtenido a partir del cálculo de las distancias intergenómicas entre los aislados SCPM31 y SCCME10 y las cepas tipo de especies de la familia *Pseudomonadaceae* más cercanas. Árbol realizado mediante la herramienta bioinformática TYGS utilizando el enfoque GBDP, y aplicando 100 réplicas pseudo-bootstrap por cada rama.

3.1.2. SCPM81.

Para realizar el análisis filogenómico del aislado SCPM81, su secuencia genómica fue comparada frente a las secuencias de las cepas tipo de las especies más cercanas de la familia *Bacillaceae*, seleccionadas a partir de la similitud de la secuencia del gen ribosómico 16S. Los resultados obtenidos tras el cálculo de los valores de ANIb mostraron que SCPM81 presentaba una elevada similitud frente a las cepas tipo de *Priestia megaterium* (95,5 %) y *Priestia aryabhattai* (94,7 %), mientras que la similitud con respecto al resto de especies era menor del 75,0 % (Tabla 40). De igual manera, los valores de dDDH entre la cepa SCPM81 y las más estrechamente relacionadas, *Priestia megaterium* ATCC 14581^T y *Priestia aryabhattai* B8W22^T, fueron 71,4 % y 64,7 % (Tabla 40). El árbol filogenómico obtenido en el servidor TYGS indicaba que el aislado estudiado y las cepas tipo de *Priestia megaterium* y *Priestia aryabhattai* estaban agrupados en una rama muy distante filogenéticamente al resto de especies incluidas, formando un clado independiente (Figura 31).

Recientemente, el género *Bacillus* ha sido reclasificado en base a análisis filogenómicos y genómicos comparativos en más de 20 géneros diferentes, como *Peribacillus*, *Cytobacillus*, *Mesobacillus*, *Neobacillus*, *Metabacillus*, *Alkalihalobacillus*, *Priestia*, *Ectobacillus*, *Bacillus*, entre otros (Gupta et al., 2020; Patel & Gupta, 2020). La organización taxonómica basada en el gen rRNA 16S genera agrupaciones o *clusters* entre especies de diferentes géneros de la familia *Bacillaceae* e, incluso, similitudes muy bajas entre especies del mismo género, como en el caso de *Peribacillus* (Jian et al., 2021; Rodríguez et al., 2022). Por lo tanto, las aproximaciones filogenómicas cobran una importancia vital. Los valores de los índices ANIb y dDDH para el aislado SCPM81 indicaron su elevada similitud con respecto a dos especies del género *Priestia*, principalmente *Priestia megaterium*. Los resultados obtenidos en ambos índices están ligeramente por encima del umbral aceptado para la delimitación de especies bacterianas, 95-96 % (ANIb) y 70 % (dDDH) (Chun et al., 2018; Saati-Santamaría et al., 2021; Young et al., 2021). Así, teniendo en cuenta otros trabajos de descripción de nuevas especies en la familia *Bacillaceae*, podemos observar que las similitudes entre las nuevas especies aceptadas y los taxones más emparentados son más bajas a las obtenidas por el aislado SCPM81 (Jian et al., 2021; Rodríguez et al., 2022). Sin embargo, al observar las diferencias entre los valores de *Priestia megaterium* y *Priestia aryabhatai*, vemos que son muy similares a los obtenidos entre SCPM81 y la cepa tipo de *Priestia megaterium* (Tabla 40). Por lo tanto, basándonos únicamente en estos datos, no podemos establecer si el aislado SCPM81 pertenece a la especie *Priestia megaterium*, o si se trata de una nueva especie, siendo necesarios otro tipo de análisis complementarios para determinarlo, como, por ejemplo, su caracterización fenotípica y quimiotaxonómica.

Tabla 40: Comparación por pares de los valores de ANIb (arriba a la derecha) y dDDH (abajo a la izquierda) entre el genoma de la cepa SCPM81 y los de las cepas tipo de las especies más próximas de la familia *Bacillaceae*. Cepas: 1. SCPM81; 2. *Peribacillus acanthi* L28^T (GCA_003073175.1); 3. *Peribacillus simplex* DSM 1321^T (GCA_002243645.1); 4. *Priestia aryabhatai* B8W22^T (GCA_000956595.1); 5. *Priestia flexa* NBRC 15715^T (GCA_001591565.1); 6. *Priestia megaterium* ATCC 14581^T (GCA_017086525.1).

	1	2	3	4	5	6
1	*	68,6	68,1	94,7	73,5	95,5
2	21,7	*	68,9	68,3	68,5	68,4
3	28,1	25,3	*	68,0	67,7	68,2
4	64,7	20,7	28,8	*	73,1	95,4
5	19,8	24,1	26,6	19,7	*	73,8
6	71,4	26,3	33,5	65,5	20,7	*

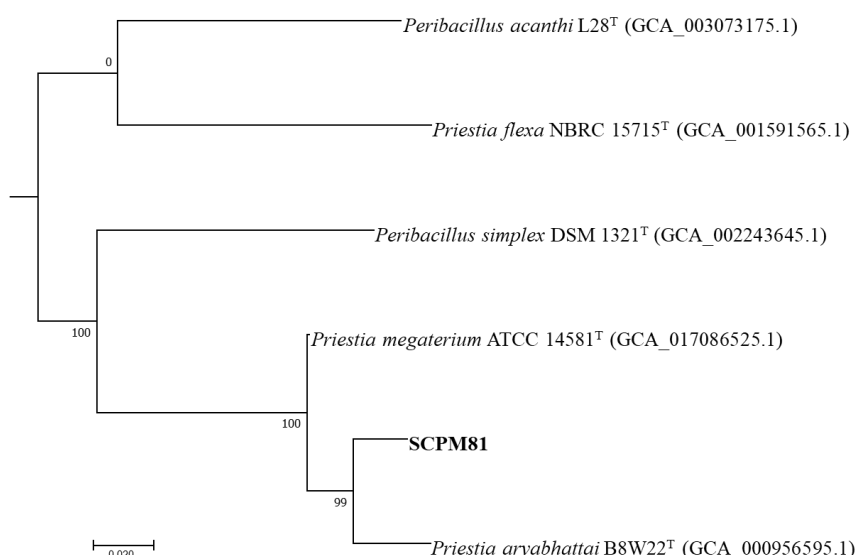


Figura 31: Análisis filogenético obtenido a partir del cálculo de las distancias intergenómicas entre el aislado SCPM81 y las cepas tipo de especies de la familia *Bacillaceae* más cercanas. Árbol realizado mediante la herramienta bioinformática TYGS utilizando el enfoque GBDP, y aplicando 100 réplicas pseudo-*bootstrap* por cada rama.

3.1.3. SCCM01.

Los valores de similitud obtenidos en el índice ANIb entre el aislado SCCM01 y las cepas tipo del género *Streptomyces* más próximas fueron inferiores al 92,1 %, siendo *Streptomyces tendae* la especie más cercana filogenéticamente (Tabla 41). De manera similar, los valores obtenidos en el índice dDDH mostraron que las cepas tipo más próximas a SCCM01 eran *Streptomyces violaceorubidus* NRRL B-16381^T (51,4 %) y *Streptomyces tendae* JCM 4610^T (51,1 %) (Tabla 41). Además, el árbol filogenómico GBDP confirmó que la cepa aislada en el presente trabajo formaba un clado con la especie *Streptomyces violaceorubidus*, pero que la distancia evolutiva con respecto al clado formado por *Streptomyces tendae* y *Streptomyces hyderabadensis* era muy baja (Figura 32).

Los resultados obtenidos sugieren que SCCM01 podría ser considerada una posible nueva especie dentro del género *Streptomyces*. Así, los valores de ANIb y dDDH mostrados entre SCCM01 y las especies más cercanas filogenéticamente estaban en un rango de valores similares a los obtenidos en publicaciones de nuevas especies dentro de este género bacteriano (Besaury et al., 2021; Saygin et al., 2020). Dada la gran diversidad del filo *Actinobacteria* y, más concretamente del género *Streptomyces*, las aproximaciones filogenómicas proporcionan un marco de trabajo indispensable para detectar y evitar las incongruencias en la clasificación de este taxón, en el que se engloban organismos de importancia agrícola, biotecnológica, clínica y ecológica (Nouioui et al., 2018).

Tabla 41: Comparación por pares de los valores de ANib (arriba a la derecha) y dDDH (abajo a la izquierda) entre el genoma de la cepa SCCM01 y los de las cepas tipo de las especies más próximas de la familia *Streptomycetaceae*. Cepas: 1. SCCM01; 2. *Streptomyces albogriseolus* JCM 4616^T (GCA_014650475.1); 3. *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877^T (GCA_001267885.1); 4. *Streptomyces aurantiogriseus* JCM 4346^T (GCA_014649375.1); 5. *Streptomyces chattanoogensis* NRRL ISP-5002^T (GCA_001294335.1); 6. *Streptomyces collinus* DSM 40129^T (GCA_014204745.1); 7. *Streptomyces hyderabadensis* JCM 17657^T (GCA_020404845.1); 8. *Streptomyces lienomycini* DSM 41475^T (GCA_027947595.1); 9. *Streptomyces rubrogriseus* NBRC 15455^T (GCA_003112595.1); 10. *Streptomyces salinarius* SS06011^T (GCA_014280945.1); 11. *Streptomyces tendae* JCM 4610^T (GCA_014650435.1); 12. *Streptomyces violaceoruber* CGMCC 4.1801^T (GCA_033406955.1); 13. *Streptomyces violaceorubidus* NRRL B-16381^T (GCA_000717995.1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	*	81,6	87,0	81,0	76,0	82,0	91,8	89,5	91,5	90,4	92,1	91,5	91,6
2	26,3	*	82,2	81,2	76,2	82,1	82,1	82,1	82,1	82,2	81,9	82,3	81,9
3	35,5	26,5	*	81,4	76,0	82,3	86,9	86,9	86,9	86,8	86,7	86,9	86,6
4	26,3	25,7	26,8	*	75,5	82,1	80,5	80,3	80,5	80,2	80,4	80,3	80,4
5	22,1	21,7	22,1	22,1	*	76,1	76,2	76,0	76,1	76,2	76,0	76,0	76,1
6	27,1	26,8	27,5	27,6	22,0	*	81,8	81,6	81,8	81,7	81,8	81,7	81,6
7	50,7	26,5	35,3	26,5	22,1	27,2	*	89,7	91,7	90,7	92,8	91,5	91,1
8	42,2	26,2	35,2	26,4	22,3	27,0	41,9	*	90,4	90,2	90,2	90,2	89,6
9	48,8	26,2	34,9	26,4	22,0	26,9	48,2	42,3	*	90,6	92,4	96,1	90,8
10	45,2	26,6	34,7	26,4	22,2	27,0	45,4	42,0	45,5	*	90,9	90,9	90,2
11	51,1	26,2	35,0	26,4	22,1	26,9	52,9	41,8	51,5	45,6	*	91,8	90,8
12	48,8	26,6	34,9	26,3	22,2	27,0	47,6	42,1	70,3	45,2	50,1	*	90,9
13	51,4	26,2	34,8	26,4	22,1	27,0	48,4	41,5	47,3	44,0	48,1	47,2	*

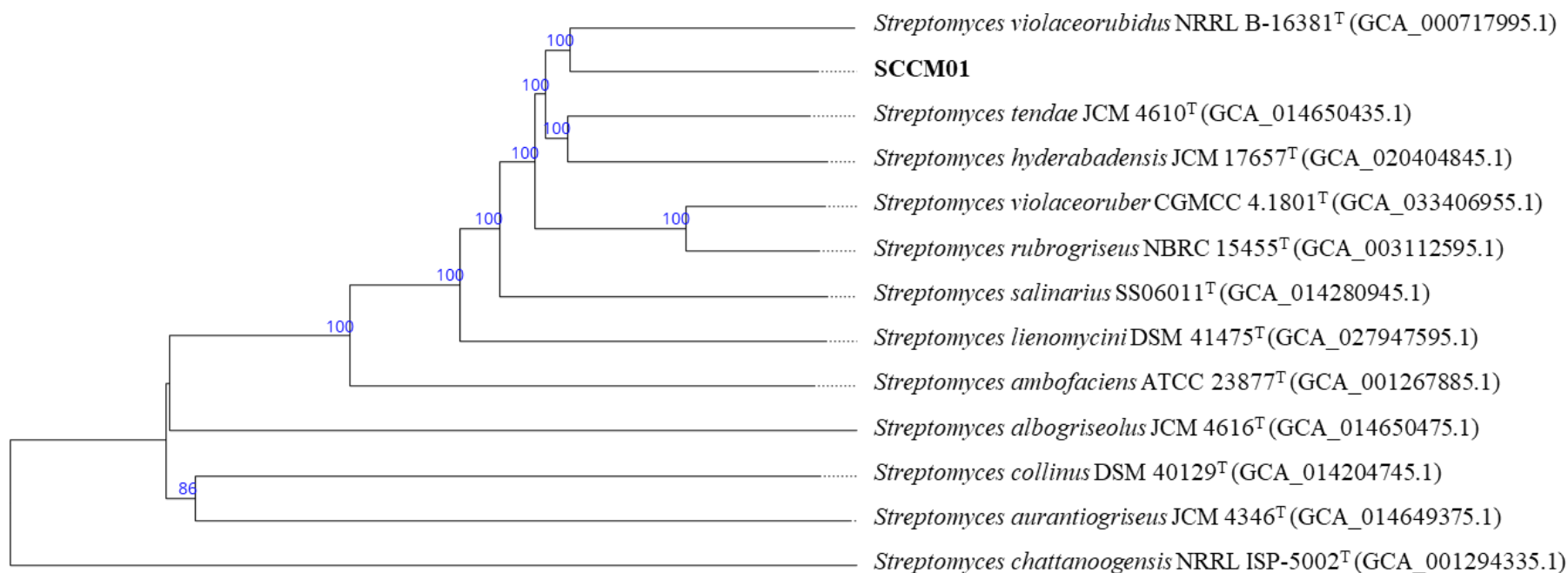


Figura 32: Análisis filogenético obtenido a partir del cálculo de las distancias intergenómicas entre el aislado SCCM01 y las cepas tipo de especies de la familia *Streptomycetaceae* más cercanas. Árbol realizado mediante la herramienta bioinformática TYGS utilizando el enfoque GBDP, y aplicando 100 réplicas pseudo-*bootstrap* por cada rama.

3.1.4. HUTR05 y GPTR29.

Por último, detallamos el análisis filogenómico de los aislados identificados dentro del género *Rhizobium*, HUTR05 Y GPTR29. Los valores de ANIb y dDDH compartidos entre HUTR05 y la especie más cercana, *Rhizobium laguerreae*, fueron 97,9 % y 85,1 %, respectivamente (Tabla 42). Teniendo en cuenta el umbral establecido para la delimitación de especies bacterianas, este aislado podría ser identificado como *Rhizobium laguerreae* HUTR05 (Young et al., 2021). Sin embargo, la cepa GPTR29 mostró valores de similitud inferiores al 93,2 % (ANIb) y 54,3 % (dDDH) con respecto a las cepas tipo más cercanas del género *Rhizobium*, siendo *Rhizobium ruizarguesonis* UPM 1133^T la más próxima filogenéticamente (Tabla 42). Por lo tanto, el aislado GPTR29 podría ser considerado como una nueva especie dentro del género *Rhizobium*. Además, la probabilidad de que HUTR05 y GPTR29 pertenecieran a la misma especie fue del 91,6 % (ANIb) y 48,3 % (dDDH), valores por debajo del umbral establecido para dicha delimitación taxonómica (Young et al., 2021). El árbol filogenómico inferido mediante la herramienta TYGS corroboró lo anteriormente expuesto (Figura 33). HUTR05 aparecía agrupado con *Rhizobium laguerreae* FB206^T, formando un clado independiente al resto de cepas tipo. Sin embargo, GPTR29 estaba situada en una rama muy distante de cualquier otra especie incluida en el análisis, siendo la más próxima *Rhizobium ruizarguesonis*.

En los últimos años el concepto “complejo *Rhizobium leguminosarum*” o Rlc ha adquirido una gran importancia en la taxonomía del género *Rhizobium* (Young et al., 2021; Young et al., 2023). Comprende un grupo de especies altamente relacionadas entre sí, que presentan diferencias para ser consideradas especies distintas pero que, a su vez, están claramente diferenciadas de otras especies del género *Rhizobium* (Young et al., 2021). Inicialmente este grupo fue dividido en 18 clados, considerados distintas genoespecies, además de 7 cepas individuales fuera de estos clados (Young et al., 2021). Sin embargo, posteriormente han sido descritas nuevas especies asignadas dentro de este complejo (Hsouna et al., 2023). Dentro de este contexto taxonómico, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos del análisis filogenómico de HUTR05 y GPTR29, también podemos asignar estas dos cepas dentro del citado Rlc. El aislado HUTR05 podría ser considerado dentro de la genoespecie *Rhizobium laguerreae* (gsR), al presentar valores de ANIb y dDDH por encima del 96 % y 70 %, respectivamente, marcados como puntos de corte en las nuevas descripciones de especies en este género (Hsouna et al., 2023; Young et al., 2023). Mientras que, aunque GPTR29 estaría altamente relacionada con la genoespecie *Rhizobium ruizarguesonis* (gsC), los valores

obtenidos en los análisis filogenómico sugieren su asignación a una nueva genoespecie dentro de este complejo.

Tabla 42: Comparación por pares de los valores de ANIb (arriba a la derecha) y dDDH (abajo a la izquierda) entre el genoma de las cepas HUTR05 y GPTR29 y los de las cepas tipo de las especies más próximas de la familia *Rhizobiaceae*. Cepas: 1. GPTR29; 2. HUTR05; 3. *Rhizobium acaciae* 1AS11^T (GCA_025941625.1); 4. *Rhizobium anhuiense* CGMCC 1.12621^T (GCA_014638185.1); 5. *Rhizobium brockwellii* CC275e^T (GCA_000769405.2); 6. *Rhizobium changzhiense* WYCCWR 11279^T (GCA_013087625.1); 7. *Rhizobium indigoferae* CIP 108029^T (GCA_034554815.1); 8. *Rhizobium johnstonii* 3841^T (GCA_000009265.1); 9. *Rhizobium laguerreae* FB206^T (GCA_002008165.1); 10. *Rhizobium leguminosarum* ATCC 10004^T (GCA_033842645.1); 11. *Rhizobium redzepovicii* 18T^T (GCA_019793435.1); 12. *Rhizobium ruizarguesonis* UPM 1133^T (GCA_012349115.1); 13. *Rhizobium sophorae* CCBAU 03386^T (GCA_013087515.1); 14. *Rhizobium sophoriradicis* CCBAU 03470^T (GCA_003939025.1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	*	91,6	91,7	89,5	91,7	90,7	91,5	91,9	91,6	91,4	87,4	93,2	91,2	85,8
2	48,3	*	93,4	89,5	92,2	92,5	91,2	93,5	97,9	91,2	87,3	91,9	92,7	85,8
3	49,3	56,2	*	89,4	92,3	92,3	91,2	94,9	92,9	91,3	87,0	92,2	92,3	85,4
4	41,7	41,6	42,5	*	90,0	89,8	90,6	90,1	89,5	90,6	87,6	90,3	89,9	86,0
5	48,7	50,7	53,7	42,7	*	91,8	92,5	93,1	92,0	92,5	87,6	92,9	91,9	85,7
6	46,4	52,8	53,8	43,1	50,3	*	91,7	93,0	92,8	91,6	87,7	92,0	94,9	86,1
7	48	47,3	48,9	43,9	51,7	48,2	*	91,6	90,8	97,1	87,3	92,3	91,2	85,8
8	49,5	56,4	66	42,9	54,2	53,7	49,4	*	93,3	91,8	87,3	92,5	92,6	85,8
9	48,2	85,1	56,1	41,7	50,4	52,7	47,4	57,1	*	91,3	87,0	91,7	92,4	85,7
10	47,8	47,6	49,1	43,9	51,9	48,3	81,2	50,2	47,4	*	87,5	92,4	91,1	85,6
11	35,8	36	36,5	36,5	36,6	36,6	36,8	36,6	35,9	37,1	*	87,7	87,5	87,6
12	54,3	49,6	52,7	43,3	53,2	48,8	51,7	53,1	49,5	52	36,6	*	91,4	85,6
13	46,8	52,5	53,2	42,4	49,5	63	47,8	53,5	52,4	47,9	36,2	48,3	*	85,6
14	33,2	33,4	33,8	33,8	33,5	33,9	33,5	33,8	33,4	33,5	36,8	33,7	33,7	*

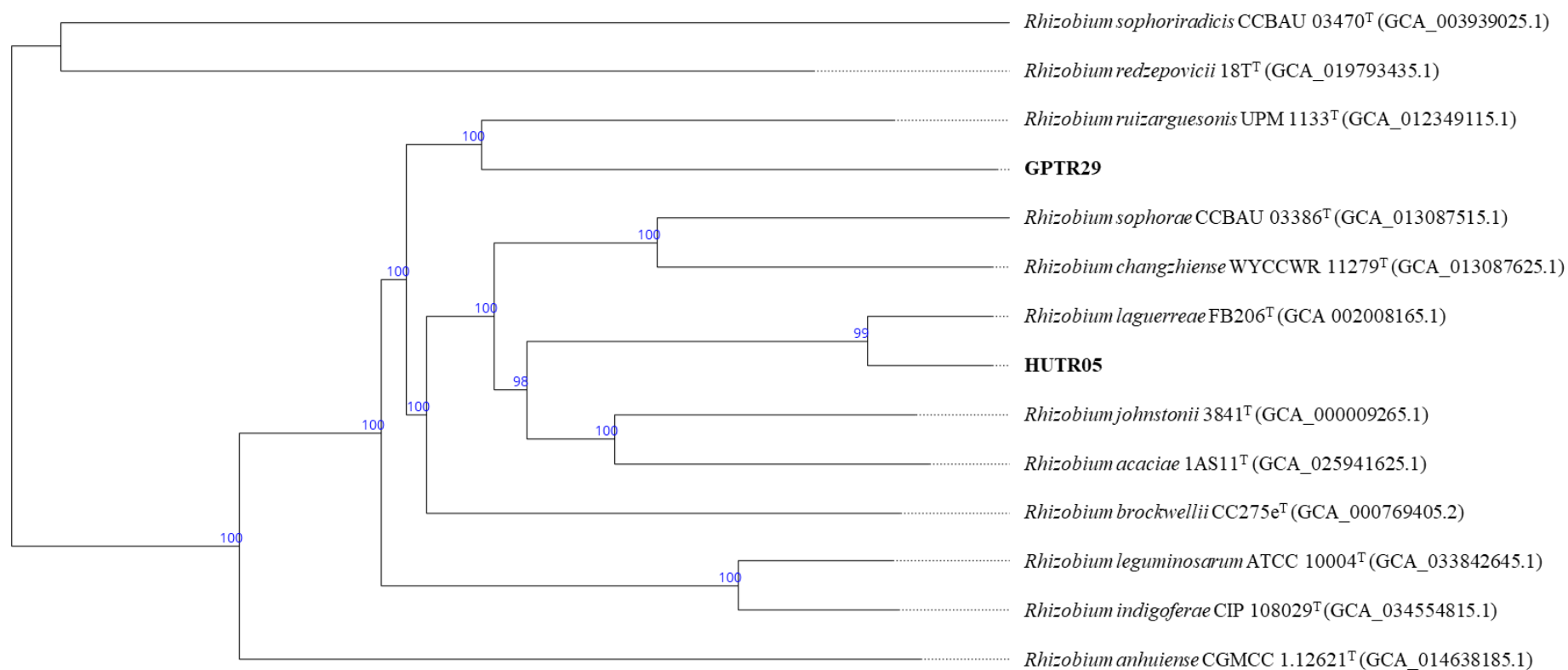


Figura 33: Análisis filogenético obtenido a partir del cálculo de las distancias intergenómicas entre los aislados HUTR05 y GPTR29 y las cepas tipo de especies de la familia *Rhizobiaceae* más cercanas. Árbol realizado mediante la herramienta bioinformática TYGS utilizando el enfoque GBDP, y aplicando 100 réplicas pseudo-*bootstrap* por cada rama.

3.2. Análisis *in silico* de los genomas de las cepas seleccionadas.

Los análisis PGP *in vitro* nos permitieron realizar una selección de aislados prometedores para el desarrollo del presente trabajo. Todos estos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal están mediados por una compleja maquinaria genética, cuya comprensión aporta una visión holística del tema. En este sentido, y teniendo en cuenta la imposibilidad del análisis *in vitro* de toda la batería de mecanismos PGP existentes en bacterias, algunas funciones pueden ser pasadas por alto. Por lo que el análisis genómico ofrece una ventaja sobre los métodos experimentales clásicos, al brindar la oportunidad de examinar el potencial PGP de una cepa de manera más sencilla (Paterson et al., 2017). Además, permite comprender los mecanismos adaptativos de los aislados a las condiciones ambientales, así como a las interacciones con otros organismos del entorno, como las plantas (Flores-Félix et al., 2021; Saati-Santamaría et al., 2022). Por tanto, en el presente apartado describimos el análisis de las características genómicas de las cepas seleccionadas, ya que supone una ventaja en el proceso de selección de candidatos de interés para su uso como bioinoculantes (Flores-Félix et al., 2021; Paterson et al., 2017).

3.2.1. Descripción general de los genomas.

Las cepas *Pseudomonas* sp. SCPM31 y SCCME10 presentaban un genoma con un tamaño de 6.498.598 y 6.472.408 pares de bases, respectivamente, con un contenido en G+C del 61,0 % y 60,9 %. El número de *contigs* fue de 80 y 120, y la anotación mediante RAST mostró la presencia de 5.916 y 5.877 regiones codificante (CDSs), respectivamente (Tabla 43).

El número de pares de bases secuenciadas en el genoma de *Priestia megaterium* SCPM81 fue de 6.075.013, con un contenido en G+C del 37,5 %. El número de *contigs* obtenidos fue 57, y el número de CDSs fue de 6.512.

El aislado *Streptomyces* sp. SCCM01 tenía un tamaño de genoma de 8.662.314 pb, y el contenido en G+C era del 72,0 %. El número de *contigs* obtenidos fue 92, y el número de regiones codificantes 8.094.

Los aislados *Rhizobium laguerreae* HUTR05 y *Rhizobium* sp. GPTR29 presentaron una secuencia genómica de 7.145.517 y 6.934.675 pb, con un contenido en G+C del 60,9 % y 60,7 %, respectivamente. Los *contigs* obtenidos en cada caso fueron 51 y 70, con 7.398 y 7.202 CDSs cada uno de ellos, respectivamente.

Cabe destacar que tras la anotación funcional mediante RAST, aproximadamente el 25 % de los genes anotados fueron clasificados automáticamente por la plataforma bioinformática en diferentes subsistemas, tal y como se observa en la Figura 34.

Finalmente, mediante el *software* BUSCO (Versión 5.5.0), estimamos la exhaustividad o completitud de los datos genómicos obtenidos de la secuenciación (Manni et al., 2021). Así, observamos que la secuenciación había alcanzado valores superiores al 99,1 % en todos los genomas analizados, lo que indica que los borradores obtenidos tienen una buena integridad.

Tabla 43: Características generales de los genomas de los aislados seleccionados.

	SCPM31	SCPM81	SCCM01	SCCME10	HUTR05	GPTR29
Tamaño (pb)	6.498.598	6.075.013	8.662.314	6.472.408	7.145.517	6.934.675
Contenido en G+C (%)	61,0	37,5	72,0	60,9	60,9	60,7
Nº de contigs	80	57	92	120	51	70
N50	263.028	1.231.427	297.813	239.261	509.481	252.396
L50	8	2	10	8	6	9
Genes anotados (%)	27	24	18	28	24	24
Nº de CDSs	5916	6512	8094	5877	7398	7202
Nº de RNAs	67	145	78	71	51	50
Completitud (%)	99,9	99,8	99,1	99,9	99,4	99,7

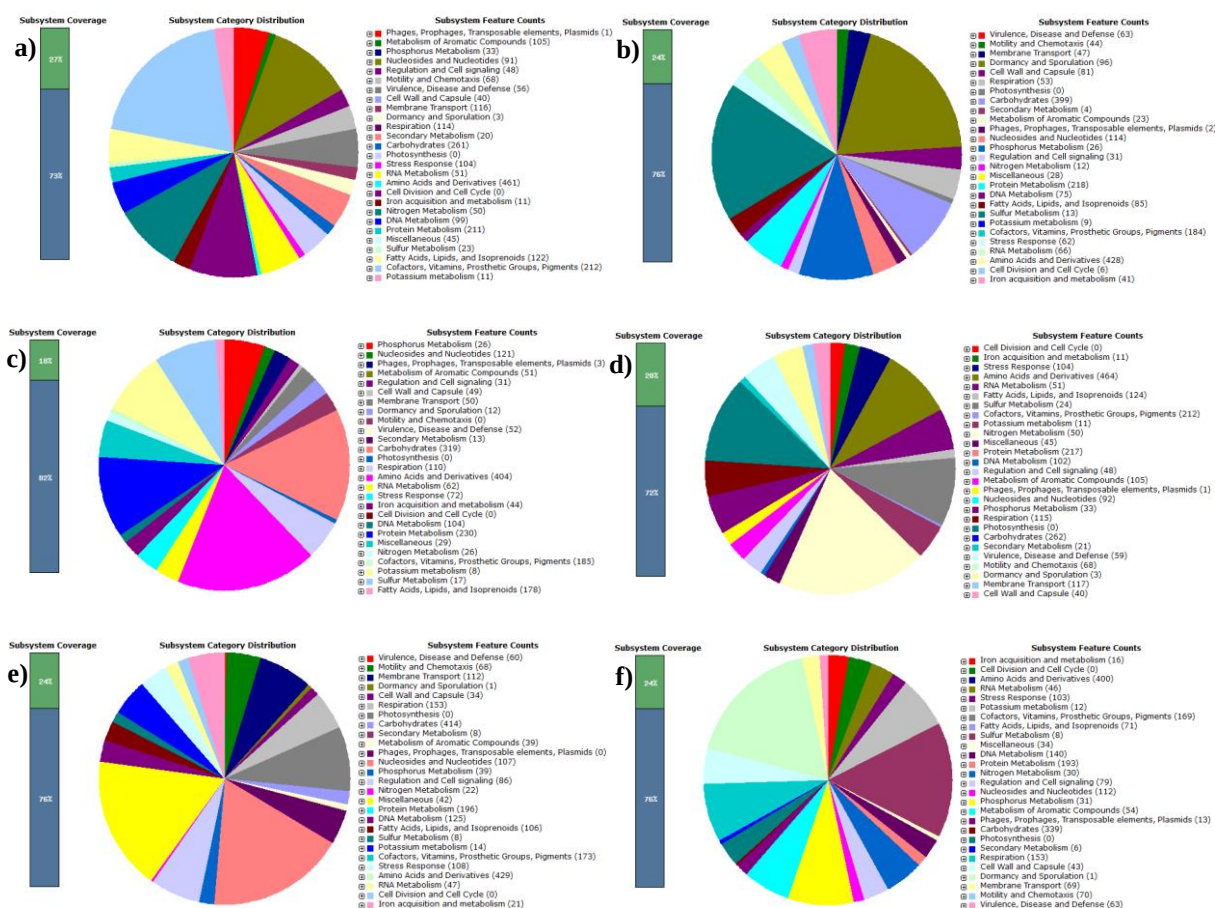


Figura 34: Representación de la anotación automática y la categorización en subsistemas mediante la plataforma RAST de los aislados analizados: a) SCPM31, b) SCPM81, c) SCCM01, d) SCCME10, e) HUTR05, y f) GPTR29.

3.2.2. Análisis de genes implicados en la promoción del crecimiento vegetal.

3.2.2.1. Genes relacionados con la solubilización de fosfato.

La solubilización de fosfato es un mecanismo de gran relevancia en la promoción del crecimiento vegetal mediada por microorganismos. Las bacterias presentan dos vías principales para la solubilización de formas insolubles de P: la producción de ácidos orgánicos, y la síntesis de enzimas fosfatasa (Glick, 2012; Hakim et al., 2021). Por esta razón dirigimos la búsqueda hacia genes relacionados con ambos mecanismos de solubilización.

En este sentido, todas las cepas presentaron anotado el gen que codifica la enzima citrato sintasa (EC 2.3.3.1), clave para la síntesis de ácido cítrico y el aumento de la disponibilidad de P en la interacción planta-bacteria (Rodríguez et al., 2006). Sin embargo, únicamente los aislados pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Rhizobium* (SCPM31, SCCME10, HUTR05 y GPTR29) presentaban genes involucrados en la síntesis del ácido glucónico, uno de los

principales ácidos orgánicos implicados en la solubilización de P, cuya síntesis está mediada por la enzima glucosa deshidrogenasa (GDH) y el cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ), anotadas mediante la plataforma RAST (Pradhan et al., 2017).

Por otra parte, todos los aislados mostraron anotados genes que codifican enzimas fosfatasas, como EC 3.6.1.1 (pirofosfatasa inorgánica) o EC 3.6.1.11 (exopolifosfatasa). Sin embargo, únicamente las cepas SCPM81, SCCM01, HUTR05 y GPTR29 presentaban genes de síntesis de fosfatasas alcalinas (EC 3.1.3.1). La acción de este tipo de enzimas es clave para la obtención de fósforo a partir de compuestos orgánicos del suelo y, por tanto, crucial para una adecuada nutrición en las interacciones planta-bacteria de la rizosfera (Rodríguez et al., 2006). Además, la producción de fosfatasas suele estar mediada por complejos mecanismos reguladores, como es el caso del regulón Pho, del que encontramos anotados genes en los aislados seleccionados, como *phoU*, *phoR*, *phoB* (en todos ellos) o *pstS* (en el caso de HUTR05) (Pradhan et al., 2017; Santos-Beneit, 2015).

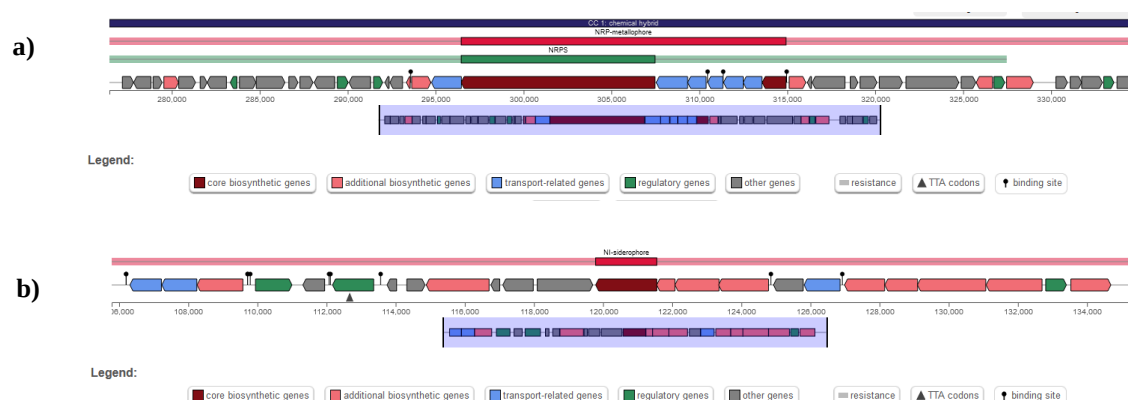
3.2.2.2. Genes relacionados con la producción de sideróforos.

Los sideróforos son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por diversos organismos, que forman complejos solubles con el Fe presente en el ambiente, permitiendo su absorción a través de transportadores específicos (Glick, 2012). En bacterias, la síntesis de sideróforos suele estar medida por NRPSs (*non-ribosomal peptide synthetase*), aunque una pequeña parte son sintetizados de manera independiente de NRPSs (Kramer et al., 2020). Los sistemas de absorción y transporte de sideróforos varían entre bacterias Gram + y Gram - debido a la diferencia de la pared celular existente, por lo que la maquinaria genética involucrada en estos procesos puede ser distinta entre diferentes tipos de bacterias (Kramer et al., 2020).

El genoma de los aislados SCPM31 y SCCME10 tenían anotados los genes que codifican las enzimas EC 5.4.4.2 (*Isochorismate synthase*) y EC 3.3.2.1 (*Isochorismatase*), necesarias para la obtención de 2,3-dihidroxibenzoato, precursor de la síntesis de algunos sideróforos catecólicos (May et al., 2001). Así como los genes *pitACD*, también presentes en el genoma de HUTR05, que forman un sistema de absorción y transporte de Fe³⁺ (Brown et al., 2022). El genoma de SCPM81 y SCCM01 presentaba anotados los genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de 1,3-diaminopropano, precursor de la síntesis de sideróforos (Burrell et al., 2012; Lynch et al., 2001). La herramienta RAST también anotó todos los genes del *cluster* de síntesis del sideróforo tipo hidroxamato deferrioxamina E en el genoma de la cepa SCCM01 (*desABCD*), ampliamente estudiado dentro del género *Streptomyces* (Gáll et al.,

2016), así como los genes *irp2* e *irp3*, involucrados en la síntesis de yersinibactina, un sideróforo descrito por sus implicaciones como factor de virulencia en diversos aislados de relevancia clínica (El Fertas-Aissani et al., 2013). En cambio, en la secuencia de los genomas de HUTR05 y GPTR29 observamos la presencia de los genes *iucB* e *iucD*, relacionados con la síntesis del sideróforo tipo hidroxamato aerobactina, así como el sistema *fhuCDB* (también anotado en el genoma de SCCM01), descrito como un sistema transportador de este grupo de moléculas (Adolf et al., 2023).

Asimismo, el análisis mediante el programa antiSMASH mostró que los aislados SCPM31 y SCCME10 presentaba anotados dos *clusters* de NRPS en el que aproximadamente el 30 % de los genes mostraban similitud con los del *cluster* de biosíntesis de pioverdina y pioquelina, así como un *cluster* con una similitud del 92 % con respecto al de síntesis del sideróforo histicorrugatina (Matthijs et al., 2016). A partir de estos resultados pudimos corroborar que RAST también había anotado (pero no había clasificado en subsistemas) diferentes genes del sistema *pvd*, relacionado con la síntesis y el transporte de pioverdinas, un grupo de sideróforos ampliamente caracterizados en el género *Pseudomonas* (Moon et al., 2008). De igual manera, el genoma de SCPM81 presentó una similitud del 62 % con el *cluster* de genes relacionados con la síntesis de *schizokinen*, un sideróforo del tipo hidroxamato (Chuljerm et al., 2020). Los aislados identificados dentro del género *Rhizobium* tenían anotado el *cluster* de biosíntesis de vicibactina, con una similitud en el 88 % de los genes que lo conforman, un sideróforo tipo trihidroxamato identificado en otras cepas de este género bacteriano (Carter et al., 2002). Finalmente, la cepa *Streptomyces* sp. SCCM01, a parte del *cluster* de biosíntesis de deferrioxamina E, también mostraba un *cluster* NRPS con una similitud del 100 % con respecto al de síntesis de coeliquelina, sideróforo tipo hidroxamato identificado inicialmente en *S. coelicolor* (Williams et al., 2019) (Figura 35).



3.2.2.3. Genes implicados en la síntesis de ácido indol acético.

El ácido indol acético es una de las fitohormonas más estudiadas en la interacción entre PGPBs y plantas, debido a los efectos positivos que tiene sobre el desarrollo vegetal (Glick, 2012). Existen diversas vías de biosíntesis de IAA en bacterias, muchas dependientes del triptófano como precursor, siendo las principales la ruta del ácido indol-3-pirúvico, indol-3-acetaldehído, indol-3-acetonitrilo, e indol-3-acetamida (Duca & Glick, 2020; Hakim et al., 2021). Todas estas vías de síntesis están mediadas por diferentes enzimas y cofactores, y, además, interconectadas entre sí (Duca & Glick, 2020; Patten et al., 2013).

El análisis de las anotaciones obtenidas por RAST permitió observar la presencia de similitudes y diferencias entre los aislados (Figura 36). En el caso de las cepas SCPM31 y SCCME10, encontramos anotados los genes que codificaban las enzimas EC 1.4.3.4 (amina oxidasa) y EC 1.2.1.3 (aldehído deshidrogenasa), involucradas en la obtención de IAA a partir de índole-3-acetaldehído, así como las secuencias codificantes de las enzimas EC 3.5.5.1 (nitrilasa) y EC 3.5.1.4 (amidasa alifática, codificada por *amiE*), que catalizan la conversión de indol-3-acetonitrilo e indol-3-acetamida en IAA, respectivamente. En el caso de HUTR05 y GPTR29, a parte de las secuencias de EC 1.2.1.3 y EC 3.5.1.4, también fue anotado el gen que codifica la enzima EC 4.2.1.84 (nitrilo hidratasa), relacionada con la obtención de indol-3-acetamida a partir de indol-3-acetonitrilo. Por último, los aislados Gram +, SCPM81 y SCCM01, únicamente presentaban anotados los genes codificantes de las enzimas EC 1.2.3.1 y EC 3.5.1.4.

Los ensayos *in vitro* confirmaron que todos los aislados seleccionados tenían capacidad para producir IAA, pero estos resultados ponen de manifiesto la posible maquinaria genética implicada en su biosíntesis a través de diversas vías, principalmente indol-3-acetaldehído e indol-3-acetamida, y en el caso de los aislados de los géneros *Pseudomonas* y *Rhizobium*, también la derivada del indol-3-acetonitrilo. Como hemos comprobado, en un mismo microorganismo pueden existir múltiples rutas de síntesis de ácido indol acético, a menudo interconectadas entre sí, lo que denota el papel fundamental que juega esta fitohormona en diversos aspectos bacterianos, como la propia regulación fisiológica o sus interacciones con otros organismos o con el ambiente (Duca & Glick, 2020; Patten et al., 2013).

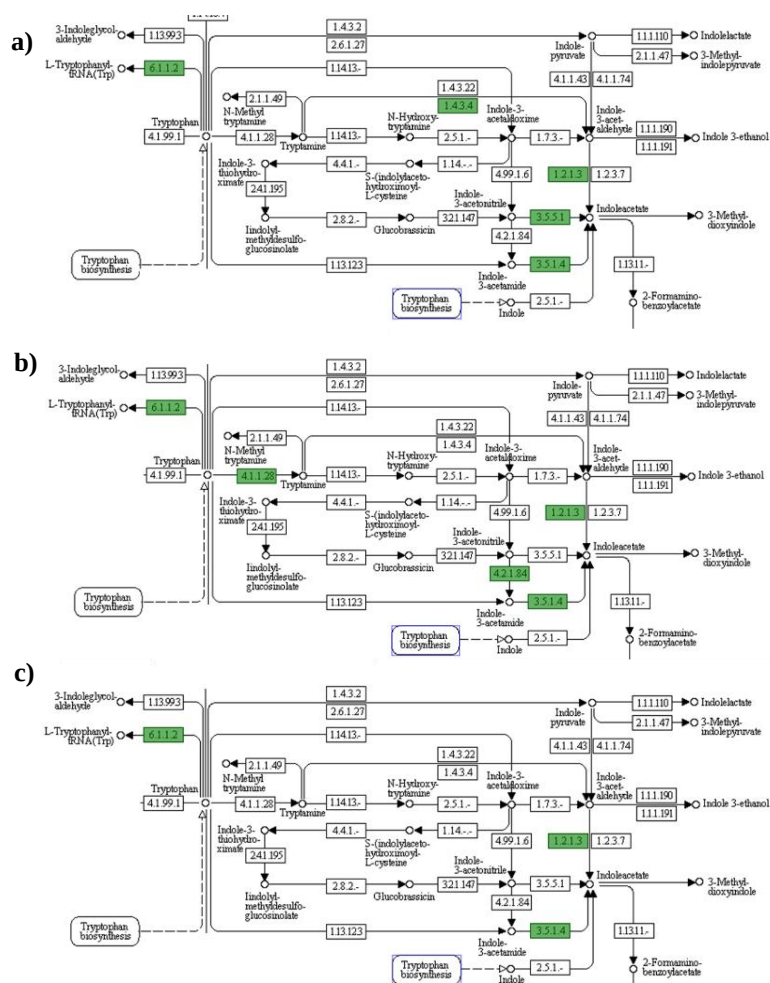


Figura 36: Esquema de la ruta de síntesis de ácido indol acético de los aislados a) SCPM31, b) GPTR29, y c) SCPM81. Obtenido mediante la herramienta KEGG map, asociada a la plataforma RAST. En verde aparecen las enzimas presentes en el genoma de las cepas.

3.2.2.4. Genes relacionados con la producción de *biofilms* y la colonización.

Las sustancias poliméricas extracelulares o EPSs son biopolímeros secretados por los microorganismos para la matriz extracelular, y están implicadas en la formación de biopelículas (Gupta et al., 2017; Kassinger & van Hoek, 2020; Seneviratne et al., 201). La estructura de los EPSs es heterogénea, y está formada por exopolisacáridos, proteínas, fosfolípidos e, incluso, ADN extracelular (Flemming et al., 2007). Además, la composición del EPS varía entre taxones bacterianos, en este sentido, la estructura de la pared celular tiene un papel fundamental en la formación y desarrollo de las biopelículas (Bucher et al., 2015). Por ejemplo, la presencia de polipéptidos en la matriz del EPS no es una característica muy común en bacterias Gram + (Czarczyk & Myszka, 2007), sin embargo, ciertos polisacáridos específicos, como los ácidos teicóicos, son indispensables para la formación y maduración del *biofilm* en *Bacillus subtilis*

(Bucher et al., 2015). Por tanto, analizar los mecanismos genéticos detrás de la formación de biopelículas puede ayudar a comprender mejor este mecanismo PGP.

El análisis del genoma de las cepas identificadas dentro del género *Pseudomonas*, SCPM31 y SCCME10, permitió ver una gran similitud en la maquinaria genética implicada en la producción del EPS. Mediante la herramienta bioinformática RAST, fueron anotados diferentes genes de un sistema de transporte de lipopolisacáridos (LPS) en ambos genomas, *lptABCDEFG* (Villa et al., 2013). Tanto SCPM31 como SCCME10 presentaban los genes del sistema de síntesis de ramnosa y derivados, *rfaABCD* y *wbbL* (EC 2.7.7.24, EC 5.1.3.13, EC 4.2.1.46, EC 1.1.1.133, y EC 2.4.1.289, respectivamente), un monosacárido ampliamente distribuido en bacterias que forma parte del LPS (Balsanelli et al., 2010; Li et al., 2022). De igual manera, ambas cepas mostraron anotado el *cluster pgaABCD*, asociado a la síntesis de una matriz extracelular compuesta de poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (o PGA), una adhesina relacionada con la formación de *biofilms* “rugosos” (Wang et al., 2004). Por último, también fue detectada la secuencia del gen que codifica la enzima endoglucanasa EC 3.2.1.4, implicada en el proceso de biosíntesis de celulosa, así como en la adhesión y colonización radicular (Robledo et al., 2012).

En base a los resultados de RAST, el aislado SCPM81 exhibió diferencias en el tipo de anotaciones relacionadas con la síntesis de EPS, con respecto a las cepas previamente descritas. Los genes *epsB*, *epsC*, *epsD* y *epsE*, pertenecientes al *cluster eps*, fueron anotados. Este sistema está involucrado en la síntesis, modificación y exportación de polisacáridos, y ha sido ampliamente estudiado en *Bacillus subtilis* (Marvasi et al., 2010; Pandit et al., 2020). Además, varios genes asociados al transporte extracelular y la síntesis de ácidos teicóicos (TA) y lipoteicóicos (LTA) también fueron encontrados: *tagA*, *tagG*, *tagH*, *lptS-Ia*, y *lptS-Ib*. Esta clase de polímeros ricos en fosfato aparecen unidos covalentemente al peptidoglicano de la pared celular (TA), o anclados a la membrana plasmática (LTA), y ha sido descrito su papel fundamental en la formación y maduración de biopelículas en bacterias Gram +, como ocurre en el género *Bacillus* (Bucher et al., 2015; Formstone et al., 2008). De igual manera que en las cepas SCPM31 y SCCME10, SCPM81 tenía anotados los genes de síntesis de ramnosa y derivados (*rfaABCD* y *wbbL*) (Balsanelli et al., 2010; Li et al., 2022).

El crecimiento de las bacterias del género *Streptomyces* es característico por el desarrollo de un micelio filamentoso, que puede estar rodeado de fibrillas amiloides, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos (El Othmany et al., 2021). El análisis del genoma de *Streptomyces* sp.

SCCM01 mostró la presencia de la secuencia codificante de varias enzimas (EC 5.4.2.10, EC 2.3.1.157, EC 2.7.7.23, y EC 2.5.1.7), involucradas en la síntesis UPD-N-acetilmuramato, un compuesto clave para la formación de la pared celular y el *biofilm* en bacterias (Rahman et al., 2022). La herramienta RAST también anotó el sistema de síntesis de ramnosa *rfbABCF*. Sin embargo, es importante mencionar la presencia de los genes *hasA* y *hasC*, que codifican proteínas involucradas en la síntesis de la cápsula de ácido hialurónico, ampliamente caracterizado en *Streptococcus pyogenes* por ser un factor de virulencia relacionado con la evasión del sistema inmunitario (Falaleeva et al., 2014).

Por último, los aislados pertenecientes al género *Rhizobium* presentaron anotados diversos genes y sistemas de interés en la producción y transporte de EPS. En el genoma de ambos aislados detectamos la presencia de los genes *exoF*, *exoQ*, y *exoZ*, pertenecientes al *cluster exo*, responsable de la síntesis, ensamblaje, modificación, polimerización y exportación de succinoglicano (Halder et al., 2017). El succinoglicano es un heteropolisacárido compuesto por galactosa y glucosa, de gran importancia en la estructura del EPS en la familia *Rhizobiaceae* (Halder et al., 2017). Asimismo, encontramos anotado el gen *wadC*, que codifica una enzima con actividad glicosiltransferasa y manosiltransferasa, involucrado en el ensamblaje del LPS (Gil-Ramírez et al., 2014). De igual manera que en las cepas del género *Pseudomonas*, HUTR05 y GPTR29 tenían anotados genes de los sistemas *rfbABCD* (síntesis de ramnosa) y *lptABCD*FG (transporte de LPS) (Figura 37). La secuencia codificante de la enzima endoglucanasa EC 3.2.1.4 también fue anotada en el genoma de ambas cepas. Este grupo de enzimas han sido ampliamente caracterizadas por su papel clave en el proceso de síntesis de celulosa, un componente esencial en la arquitectura de la matriz polisacáridica del *biofilm* de *Rhizobium*, ya que están asociadas a la modulación de la longitud de las fibrillas de este polisacárido (Robledo et al., 2012).

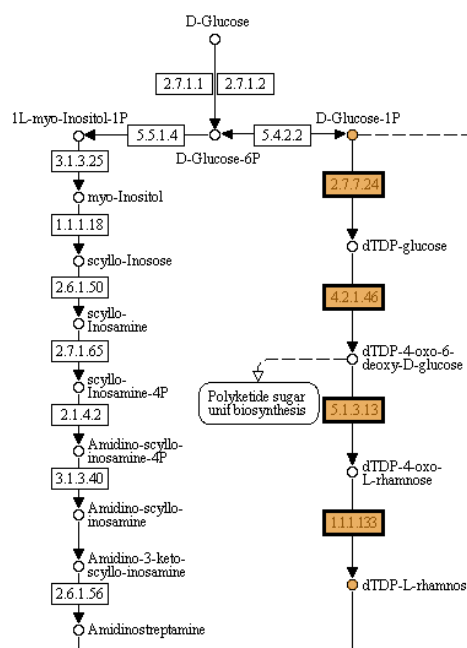


Figura 37: Esquema de la ruta de síntesis de ramnosa del aislado GPTR29. Obtenido mediante la herramienta KEGG mapper, asociada a la plataforma RAST. En naranja aparecen las enzimas presentes en el genoma de las cepas.

3.2.2.5. Genes relacionados con la fijación del nitrógeno.

A nivel genético, la FBN está determinada por la presencia de genes que codifican el complejo nitrogenasa, así como proteínas reguladoras de la fijación del nitrógeno (genes *nif* y *fix*) (Li & Chen, 2020; Lindström & Mousavi, 2020). Tanto en el genoma de HUTR05 como de GPTR29 encontramos anotados los genes *nifA* (regulador transcripcional), *nifBEN* (biosíntesis del cofactor Fe-Mo de la nitrogenasa), y *nifH* (síntesis de parte de las subunidades estructurales de la nitrogenasa), además del sistema *fixABCX* (codifica una cadena de transporte de electrones para la nitrogenasa) (Li & Chen, 2020; Lindström & Mousavi, 2020). Por otra parte, la FBN en los *rhizobia* tiene lugar en simbiosis con leguminosas, donde el proceso de nodulación es el paso inicial (Sharma et al., 2020). En el genoma de ambos aislados del género *Rhizobium* estaban anotados los genes *nodABC*, relacionados con la síntesis de los factores Nod, esenciales en el inicio de la formación de los nódulos (Lindström & Mousavi, 2020).

En el resto de aislados analizados no encontramos anotado ningún gen directamente involucrado en la FBN. No obstante, en la prueba de crecimiento en medios libres de nitrógeno, las cepas SCPM81 y SCCM01 mostraron resultados positivos. Como ha sido comentado previamente, esta es una prueba presuntiva y, por tanto, una aproximación inicial que debe ser apoyada con análisis adicionales. Otros trabajos previos ya han informado de comportamientos

similares en microorganismos oligótrofos aislados de entornos extremos. Por ejemplo, MacKellar y colaboradores (2016) demostraron que *Streptomyces thermautotrophicus* UBT1 era capaz de crecer en medios libres de nitrógeno, aunque pruebas realizadas con N₂ marcado isotópicamente revelaron su incapacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Por otra parte, es importante tener en cuenta que los genomas obtenidos en el presente trabajo son borradores, lo que podría implicar pérdida de cierta información genética, un problema de la secuenciación parcial de genomas ya descrito en la bibliografía (Chen et al., 2020). Sin embargo, el análisis realizado con el *software* BUSCO reveló que los borradores presentaban valores de completitud superiores al 99,1 %, por lo que es poco probable que haya habido pérdida de información genética relevante durante el proceso.

3.2.2.6. Genes implicados en la síntesis de VOCs.

Las bacterias producen una gran diversidad de metabolitos secundarios, entre ellos compuestos de bajo peso molecular (< 300 Da) que pueden evaporarse fácilmente, denominados compuestos orgánicos volátiles o VOCs (Almeida et al., 2023). Los volátiles bacterianos actúan como moléculas de señalización y están involucrados en interacciones inter e intraespecíficas, ya que pueden influir en procesos como el propio crecimiento, diferenciación celular, resistencia al estrés, o la interacción con otros organismos, como plantas, hongos, insectos, etc. (Almeida et al., 2023; Audrain et al., 2015). Los VOCs son sintetizados, de manera general, por vías metabólicas o catabólicas, como la glucólisis, proteólisis o lipólisis, y, en función de su clase química, pueden ser clasificados en: hidrocarburos, cetonas, alcoholes, compuestos que contienen azufre, o terpenos, entre otros (Almeida et al., 2023; Audrain et al., 2015; Cappellari & Banchio, 2020; Jacob & Sudini, 2016).

Aunque la plataforma RAST no mostraba ninguna subcategorización de genes relacionados con la síntesis de este tipo de compuestos, realizamos una búsqueda dirigida en los genomas de los aislados seleccionados. Tras este análisis, pudimos comprobar que todas las cepas presentaban anotados genes de las etapas finales de diversas vías biosintéticas de los VOCs. Por ejemplo, encontramos las secuencias de las enzimas EC 1.1.1.1, EC 4.2.1.33, EC 1.1.1.85, EC 2.3.3.13, implicadas en la síntesis de 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol (Vogt et al., 2016). De igual manera, en todos los aislados había sido anotado el gen que codifica la enzima 2-acetolactato sintasa (EC 2.2.1.6), implicada en el paso previo a la síntesis de acetoína, aunque únicamente el aislado SCPM81 presentaba el gen codificante de la enzima 2-acetolactato decarboxilasa (EC 4.1.1.5), necesaria en la etapa final de la obtención de esta cetona (Xiao & Lu, 2014). Además,

el genoma de SCPM31, SCPM81 y SCCME10 también exhibía la secuencia de la enzima 2,3-butanodiol dehidrogenasa (EC 1.1.1.4), que cataliza la transformación de acetoína en 2,3-butanodiol (Xiao & Lu, 2014). Finalmente, encontramos las anotaciones de genes presentes en la ruta de síntesis de pirofosfato de geranilo a partir de piruvato, el precursor de la síntesis de monoterpenos, como el α -pineno (EC 2.2.1.7, EC 1.1.1.267, EC 2.7.7.60, EC 2.7.1.148 y EC 4.6.1.12) (Soares-Castro et al., 2020; Zebec et al., 2016).

Las anotaciones con la plataforma antiSMASH permitieron observar la presencia de *clusters* involucrados en vías sintéticas de compuestos volátiles. Por ejemplo, el genoma del aislado SCPM81 mostró un *cluster* de terpenos sin homología en la base de datos de antiSMASH, pero según la comparación con BLASTp, el gen central mostraba similitud del 100 % con una proteína ciclasa de terpenos. Según Dickschat (2016), la mayoría de las ciclasas de terpenos caracterizadas son sesquiterpeno sintasas, involucrados en la síntesis de una gran variedad estructural de esqueletos sesquiterpénicos (poli)cíclicos. La cepa SCCM01 también tenía anotados varios *clusters* de síntesis de terpenos, entre ellos uno con un 100 % de similitud con respecto al de la geosmina (Figura 38), un sesquiterpenoide ampliamente producido por miembros de la clase *Actinomycetes* que confiere un característico olor a tierra húmeda (Becher et al., 2020). Además, el programa antiSMASH predijo un BGC (*Biosynthetic Gene Cluster*) de terpenos en el genoma de HUTR05 y GPTR29, en el que el gen central mostraba un 99,7 % de similitud con respecto un gen que codifica una sintasa de fitoeno y escualeno, involucradas en la producción de terpenoides e isoprenos (Song et al., 2020).

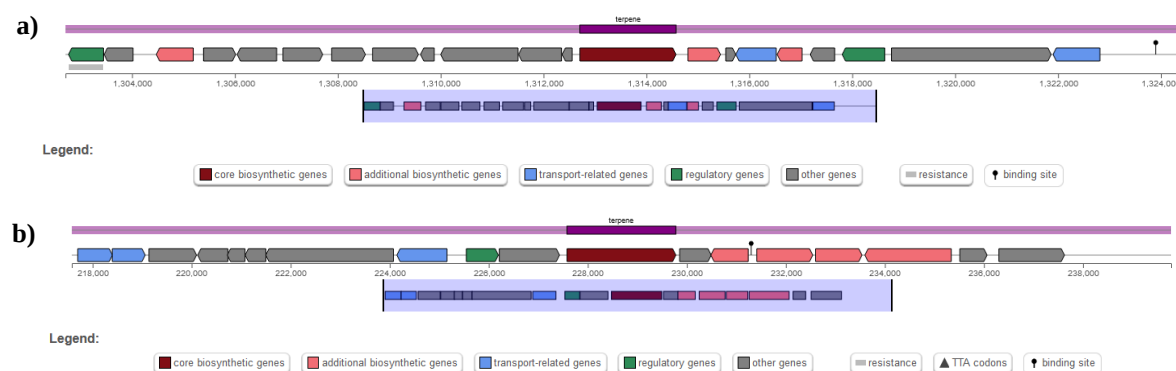


Figura 38: Representación de los *clusters* de síntesis de terpenos en el genoma de las cepas a) SCPM81 y b) SCCM01, en los que el gen central presenta un 100 % de similitud con respecto al gen de síntesis de una ciclasa de terpenos y de geosmina, identificados mediante la plataforma antiSMASH y BLASTp.

Hasta la fecha han sido identificados más de 2.000 volátiles bacterianos implicados en una gran diversidad de funciones (Almeida et al., 2023; Audrain et al., 2015). De entre todos ellos, algunos de los previamente mencionados están involucrados en procesos de interacción

beneficiosa entre bacterias y plantas, como el 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol (Farag et al., 2006), o la acetoína (Cappellari & Banchio, 2020). Por tanto, el análisis *in silico* de los genomas permitió determinar la presencia de otros posibles mecanismos PGP no estudiados de manera *in vitro*, como es el caso de la producción de VOCs, abriendo nuevas vías de trabajo para la caracterización molecular y funcional de los aislados seleccionados como bioinoculantes.

3.2.3. Análisis de genes implicados en la resistencia/tolerancia a la salinidad.

3.2.3.1. Genes relacionados con la respuesta al estrés osmótico e iónico.

Una de las principales estrategias que utilizan las bacterias para reducir los efectos negativos provocados por un aumento de la salinidad es la acumulación de solutos compatibles en el citoplasma, es decir, osmolitos orgánicos altamente solubles en agua y de bajo peso molecular que ayudan a mantener el equilibrio osmótico entre el interior y el exterior celular (Bremer & Krämer, 2019). Estos compuestos osmoprotectores pueden ser sintetizados *de novo* por las bacterias o importados por sistemas de captación específicos, y entre ellos encontramos: glicerol, prolina, glicina, betaína, trehalosa, ectoína, etc. Además, las bacterias tienen otros mecanismos de adaptación frente a los cambios de osmolaridad del ambiente, como es la regulación del flujo de agua transmembrana a través de acuaporinas (Bremer & Krämer, 2019; Ilangumaran & Smith, 2017).

El análisis del genoma de los aislados SCPM31 y SCCME10 mostró la presencia de una maquinaria genética similar en la respuesta frente al estrés osmótico. Por una parte, encontramos genes implicados en la producción de trehalosa, como el gen *treS* (síntesis a partir de maltosa) o el sistema *treXYZ* (a partir de glucógeno o glucanos) (Chandra et al., 2011). Ambas cepas también exhibieron anotaciones de sistemas involucrados en la síntesis y el transporte específico de betaína, como el gen *opuD*, esencial para la absorción de betaína, el sistema *betACB*, encargado de la síntesis de betaína a partir de colina, o el gen *betT*, un transportador de alta afinidad de colina (Kappes et al., 1996; Lidbury et al., 2015). También cabe destacar la presencia del *cluster proBA*, asociado a la síntesis de prolina a partir de glutamato (Brill et al., 2011). Por último, diversos genes relacionados con la síntesis de proteínas de membrana de interés en la tolerancia al estrés salino también fueron anotados en el genoma de SCPM31 y SCCME10, como acuaporinas y proteínas facilitadoras de la difusión o absorción de glicerol (Bremer & Krämer, 2019; Ilangumaran & Smith, 2017).

Al llevar a cabo la anotación del genoma de la cepa SCPM81, encontramos genes relacionados con el transporte específico de betaína, como *opuD* o el sistema OpuA (compuesto por *opuAA*, *opuAB* y *opuAC*), además del gen *gbsB*, que codifica una colina deshidrogenasa que oxida la colina en betaína aldehído, y el gen *betB*, cuya expresión permite catalizar el producto de *gbsB* para la obtención de betaína (Boch et al., 1997; Kappes et al., 1996; Lidbury et al., 2015). En cuanto a la síntesis de prolina, el genoma de SCPM81 tenía anotado el *cluster proBA*, así como los genes *proC*, también relacionado con la síntesis de prolina, y *proP*, involucrado en el transporte de prolina y betaína (Wang et al., 2021b). Finalmente, encontramos anotados genes relacionados con la síntesis de acuaporinas y proteínas relacionadas con la absorción de glicerol, genes de síntesis de chaperonas, así como genes del denominado complejo *stressosome* (*RsbRSTXUVW*-SigB), que se activa bajo condiciones ambientales estresantes induciendo la expresión de genes de estrés (Bremer & Krämer, 2019; Brígido et al., 2012; Ilangumaran & Smith, 2017; Pané-Farré et al., 2005).

Al igual que el resto de los aislados, el genoma de SCCM01 tenía anotados genes relacionados con el transporte y la síntesis de trehalosa y betaína: *treS*, *treYZ* *opuAABC*, *opuD*, y *betB*. Así como el gen *ompA*, que codifica una proteína de membrana externa de importancia en la integridad estructural de esta y la difusión de solutos al interior celular en *E. coli* (Wang, 2002).

Con respecto al análisis del genoma de HUTR05 y GPTR29, encontramos anotaciones de genes relacionados con la síntesis de trehalosa: *tres* y *treXYZ*, previamente descritos, así como *otsA* y *otsB*, que codifican enzimas involucradas en la síntesis de trehalosa a partir de UPD glucosa o glucosa-6-fosfato (Liu et al., 2016). Además, también observamos la presencia de sistemas de síntesis y transporte de betaína y prolina: *betABC*, *proBA* (no anotado en el genoma de GPTR29) y *proVWX* (reconocido como uno de los principales sistemas de transporte de betaína, prolina y ectoína en *E. coli*) (Wang et al., 2021b). La anotación llevada a cabo por la plataforma RAST también permitió determinar la presencia de los genes *ndvAB* y *opgC*, relacionados con la síntesis de OPGs (glucanos periplasmáticos osmorregulados), oligosacáridos formados únicamente por D-glucosa (de 5 a 24 unidades) unidas por enlaces β -glucosídicos en su estructura principal (Bontemps-Gallo & Lacroix, 2015). Para finalizar, también observamos genes involucrados en la síntesis de acuaporinas y de proteínas transmembrana, como *ompA*.

El programa antiSMASH predijo un BCG de ectoína en el genoma de SCCM01, HUTR05 y GPTR29 (Figura 39). En el caso del aislado SCCM01, el 100 % de los genes del *cluster* presentaban similitud con el propio BCG. Sin embargo, que en el caso del genoma de HUTR05

y GPTR29, tras la comparación con BLASTp, el gen central presentó una similitud del 100 % y 98,4 % con el de síntesis de la ectoína sintasa, respectivamente.

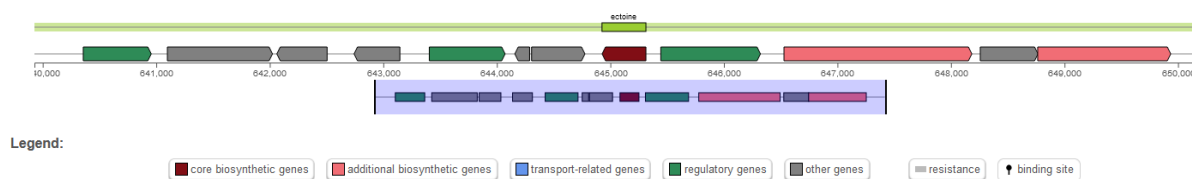


Figura 39: Representación de los *clusters* de síntesis de ectoína en el genoma de HUTR05, en los que el gen central presenta un 100 % de similitud con respecto al gen que codifica una ectoína sintasa, identificados mediante la plataforma antiSMASH y BLASTp.

Estos resultados ponen de manifiesto la amplia variedad de mecanismos genéticos que disponen los aislados seleccionados para hacer frente al estrés osmótico. Además, confirman los resultados positivos obtenidos en el ensayo de amplificación del gen *betB*.

3.2.3.2. Genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo.

El estrés oxidativo tiene lugar cuando el equilibrio celular existente entre la generación y la degradación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es alterado. La posibilidad de supervivencia ante este desafío depende del estado fisiológico, la intensidad y la naturaleza del estrés (Lushchak, 2011). Por ello, la mayoría de los organismos presentan mecanismos para aumentar la tolerancia frente a este tipo de estrés: el aumento de la permeabilidad de la membrana a las ROS, y la producción de enzimas y otros compuestos no enzimáticos con poder antioxidante (Ezraty et al., 2017; Lushchak, 2011).

La anotación mediante RAST de los genomas de SCPM31 y SCCME10 mostró la presencia de sistemas de respuesta frente al estrés oxidativo, por ejemplo, la producción del glutatión, un tripéptido con capacidad redox (Lu, 2013). El ciclo biosintético de este compuesto depende de la acción de enzimas como EC 6.3.2.2 (glutamato-cisteína ligasa) o EC 6.3.2.3 (glutatión sintetasa), codificadas por los genes *gshA* y *gshB*, presentes en las anotaciones de ambos genomas. Además, también fue anotada la secuencia codificante de enzimas involucradas en la reutilización del glutatión: EC 2.3.2.2, EC 2.5.1.18, EC 4.4.1.5, y EC 3.1.2.6, así como de enzimas glutaredoxinas (genes *grx*), que evitan la oxidación irreversible del glutatión y de residuos de cisteína en proteínas (Lu, 2013). Por otra parte, ambos genomas mostraron la presencia del gen *rdx*, así como la secuencia codificante de una rubredoxina-NAD(+) reductasa (EC 1.18.1.1), involucrados en la síntesis de rubredoxinas, pequeñas proteínas hierro-azufre con propiedades redox-activas (Hagelueken et al., 2007). Asimismo, encontramos anotados los

genes *sodA* y *sodB*, involucrados en la síntesis de superóxido dismutasas, enzimas ampliamente descritas por sus propiedades antioxidantes (Doukyu & Taguchi, 2021; Jha & Subramanian, 2014).

El genoma de SCPM81 presentaba anotados genes codificantes de enzimas relacionadas con la reutilización del glutatión (EC 2.3.2.2 y EC 4.4.1.5), así como genes de sistemas enzimáticos con actividad redox, como superóxido dismutasas (*sodABC*), o catalasas (EC 1.11.1.6) (Doukyu & Taguchi, 2021). De igual manera, el aislado SCCM01 también tenía anotados genes relacionados con la síntesis y utilización del glutatión, como el *gshA* o la enzima EC 2.3.2.2.

HUTR05 y GPTR29 presentaron una maquinaria genética similar a los aislados del género *Pseudomonas*, con genes y enzimas asociados a la producción y reutilización del glutatión: *gshA*, *gshB*, *grx1*, *grx2*, *grx3*, EC 2.3.2.2, EC 2.5.1.18, EC 4.4.1.5, y EC 3.1.2.6. Así como las secuencias codificantes de superóxido dismutasas, *sodABC*.

En resumen, este capítulo pone de manifiesto tanto las características de crecimiento como el potencial PGP de los aislados obtenidos en el presente trabajo. Por una parte, las pruebas *in vitro* permitieron comprobar la capacidad de estas cepas para crecer bajo diversas condiciones de salinidad, pH y temperatura, para producir sideróforos y ácido indol acético, para solubilizar fosfato, o para crecer en medios libres de nitrógeno. El estudio de todas estas características nos facilitó la selección de seis candidatos de interés para su uso como potenciales bioinoculantes, sobre los que, además, determinamos su capacidad de producción de biopelículas *in vitro*. Por otra parte, mediante la secuenciación de genomas de los seis aislados seleccionados, pudimos llevar a cabo estudios filogenómicos y análisis *in silico* de la maquinaria genética que podría estar implicada en los mecanismos PGP analizados y en la resistencia a condiciones ambientales adversas, como la salinidad. A partir de estos seis aislados seleccionados (SCPM31, SCPM81, SCCM01, SCCME10, HUTR05, y GPTR29), decidimos realizar una segunda selección, para continuar trabajando con los cuatro candidatos más interesantes en las siguientes etapas del trabajo. Dada la similitud filogenética entre los aislados SCPM31 y SCCME10, y teniendo en cuenta que la cepa SCPM31 contaba con resultados levemente mejores en los mecanismos PGP analizados, decidimos descartar el aislado SCCME10 en las siguientes etapas del trabajo. Asimismo, el aislado SCCM01 también fue descartado, al mostrar algunas anotaciones relacionadas con factores de virulencia en el análisis *in silico* del genoma.

CAPÍTULO III

Evaluación de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal en plántulas de lechuga, apio y canónigo.

En las últimas décadas, el uso de bioinoculantes bacterianos capaces de maximizar los rendimientos de los cultivos y reducir el impacto ambiental ha emergido como una alternativa atractiva para la agricultura sostenible (Flores-Félix et al., 2021; García-Fraile et al., 2015). En el contexto de la interacción entre plantas y PGPBs, la colonización del sistema radicular supone un factor fundamental para el diseño de bioinoculantes efectivos, capaces de generar un efecto positivo sobre la producción de los cultivos (Lugtenberg et al., 2001; Santoyo et al., 2021b). De igual manera, otro factor clave para un adecuado establecimiento y rendimiento de los cultivos es una correcta germinación y desarrollo durante los primeros estadios de crecimiento, sobre todo cuando tiene lugar bajo condiciones ambientales adversas (Cardarelli et al., 2022; Zapata et al., 2003). Sin embargo, la tendencia actual en investigación sobre las relaciones planta-bacteria está adoptando un enfoque multidisciplinar, en la que no solo son consideradas las interacciones directas, como las previamente comentadas, sino también los mecanismos microbianos de acción indirecta. En este sentido, la señalización microbiana mediada por la emisión de compuestos volátiles ha emergido como un mecanismo de interés en la promoción del crecimiento vegetal y la protección frente a estreses bióticos y abióticos (Santoro et al., 2015).

En este capítulo detallamos el estudio de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal de los cuatro aislados con mayor potencial PGP sobre plántulas de tres cultivos de interés hortícola: lechuga, apio y canónigo. Inicialmente, estudiamos el proceso de colonización de los candidatos sobre el sistema radicular de las tres especies vegetales mediante microscopía óptica de fluorescencia. A continuación, analizamos la capacidad de promoción del crecimiento vegetal de las cepas al inocularlas sobre plántulas de los tres cultivos crecidas en condiciones de cámara iluminada. Asimismo, quisimos comprobar si la inoculación provocaba una reducción de los efectos negativos provocados por estrés salino (inducido por NaCl y Na₂SO₄) en plántulas de dichas especies vegetales. Por último, realizamos ensayos para determinar los efectos de los VOCs bacterianos en la promoción del crecimiento vegetal y la tolerancia al estrés salino de las plantas, caracterizando, además, el perfil de volátiles producido por cada una de las cepas.

1. Estudio de la capacidad de colonización mediante microscopía óptica de fluorescencia.

El sistema radicular de las plantas y su entorno asociado (rizosfera) son los lugares de preferencia para la colonización de las bacterias del suelo, ya que suponen un nicho muy favorable para su desarrollo gracias a los exudados vegetales liberados (Knights et al., 2021; Molina et al., 2003). El proceso de colonización de las raíces vegetales supone un factor clave para una efectiva interacción PGPB-planta (Seneviratne et al., 2010). En este sentido, las biopelículas formadas por bacterias beneficiosas pueden contribuir a la mejora de la productividad y el rendimiento de los cultivos, al establecer una relación directa y contribuir al ciclo de los nutrientes, sobre el biocontrol directo de fitopatógenos, en la inducción de la respuesta sistémica en plantas, o en la adaptación a condiciones ambientales adversas (Gupta et al., 2017; Seneviratne et al., 2010). De manera habitual, el proceso de colonización de las PGPBs en el sistema radicular de plantas es dividido en varias etapas. En primer lugar, ocurre la adhesión inicial y reversible de una bacteria a la superficie epidérmica, mediada por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre las células bacterianas y la raíz, así como por otros mecanismos microbianos, como la producción de adhesinas. Esta unión inicial conduce a una adhesión más fuerte e irreversible, derivada de la síntesis de fibrillas de celulosa, proteínas y otros polisacáridos extracelulares. Tras esta fijación irreversible, tiene lugar el proceso de formación de microcolonias, que da lugar al inicio del desarrollo de la arquitectura del *biofilm*. Finalmente tiene lugar la maduración de la biopelícula y la dispersión de células a partir de esta (Gupta et al., 2017; Knights et al., 2021; Molina et al., 2003).

En este apartado describimos el análisis realizado mediante microscopía óptica de fluorescencia de la capacidad de las cuatro cepas seleccionadas de colonizar el sistema radicular de plántulas de lechuga, apio y canónigo, a los 7 y 14 días de la inoculación. Los aislados identificados dentro de los géneros *Pseudomonas* y *Priestia* (SCPM31 y SCPM81) fueron inmunolocalizados mediante anticuerpos específicos acoplados a un fluoróforo verde fluorescente. Mientras que los aislados identificados dentro del género *Rhizobium* (HUTR05 y GPTR29) fueron marcados con GFP, mediante un proceso de conjugación biparental. Las raíces fueron teñidas con blanco de calcoflúor o yoduro de propidio.

1.1. Análisis de la colonización en raíces de lechuga.

De manera general, la colonización del sistema radicular de las plántulas de lechuga fue eficaz en el caso de los aislados SCPM31, HUTR05 y GPTR29. La cepa SCPM81 también fue capaz

de formar *biofilms* sobre las raíces de este cultivo, aunque la superficie radicular colonizada fue menor a la observada en el resto de los candidatos (Figura 40).

A nivel individual, el aislado *Pseudomonas* sp. SCPM31 mostró una clara evolución en el proceso de colonización entre 7 y 14 DPI. En el primer tiempo analizado pudimos observar un patrón de colonización más puntual, con microcolonias establecidas en la base y superficie de los pelos radiculares y raíces secundarias, que indicaban el inicio de la formación y maduración del *biofilm* (Figura 40a). Así, está descrito que estas áreas presentan una mayor liberación de exudados radiculares, por lo que tienden a concentrar una mayor densidad bacteriana (Holz et al., 2018; Molina et al. 2003; Liu et al., 2024b). Tras 14 días de crecimiento, observamos una colonización más extendida a lo largo de la raíz (Figura 40b), con microcolonias desarrolladas sobre la superficie radicular, y ciertas zonas en las que aparecían cúmulos bacterianos más desarrollados. Estas biopelículas mostraban una arquitectura tridimensional, estando dispuestas sobre la epidermis y envolviendo los pelos radiculares. La secuencia temporal de SCPM31 es un claro ejemplo de las diferentes etapas en el proceso de colonización bacteriana, desde estructuras más puntuales y poco desarrolladas en los primeros estadios, hasta la aparición de una biopelícula madura y extendida a lo largo de la raíz (Gupta et al., 2017; Knights et al., 2021).

En el caso de SCPM81, la colonización del sistema radicular de la lechuga fue menor. A los 7 DPI apreciábamos pequeños cúmulos bacterianos dispuestos alrededor de los pelos radiculares (Figura 40c), que fueron evolucionando para formar estructuras un poco más complejas a los 14 DPI. Sin embargo, las microcolonias observadas en el segundo tiempo de medida no estaban extendidas a lo largo de toda la raíz, sino que estaban acumulaban en zonas más localizadas, generalmente asociadas a zonas con más densidad de pelos radiculares, tanto en base como en superficie (Figura 40d). Estos resultados corroboran los obtenidos en el estudio de formación de *biofilms* sobre superficies abióticas, en el que SCPM81 lograba desarrollar menos cantidad de biopelícula en la placa y en el portaobjetos, en comparación con SCPM31.

Los aislados HUTR05 y GPTR29 mostraron similitudes en el proceso de colonización de las raíces de lechuga. Las plántulas inoculadas con ambas cepas presentaban una gran colonización a los 7 días, con cúmulos dispuestos en los espacios intercelulares de la epidermis y en la base de los pelos radiculares (Figura 40e y 40g). Cabe destacar que uno de los puntos donde más densidad bacteriana encontramos fue en los inicios de formación de raíces secundarias (aunque solo se muestra la imagen en el caso de HUTR05), ya que son zonas donde son liberados más

exudados y que, además, actúan como puntos de entrada al interior de la raíz (Compant et al., 2021; Kandel et al., 2017; Molina et al., 2003). A los 14 días, la colonización estaba distribuida sobre toda la superficie radicular, formando *biofilms* maduros, también dispuestos sobre la epidermis y desarrollando una estructura tridimensional entre los pelos radiculares, al igual que el aislado SCPM31 (Figura 40f y 40h).

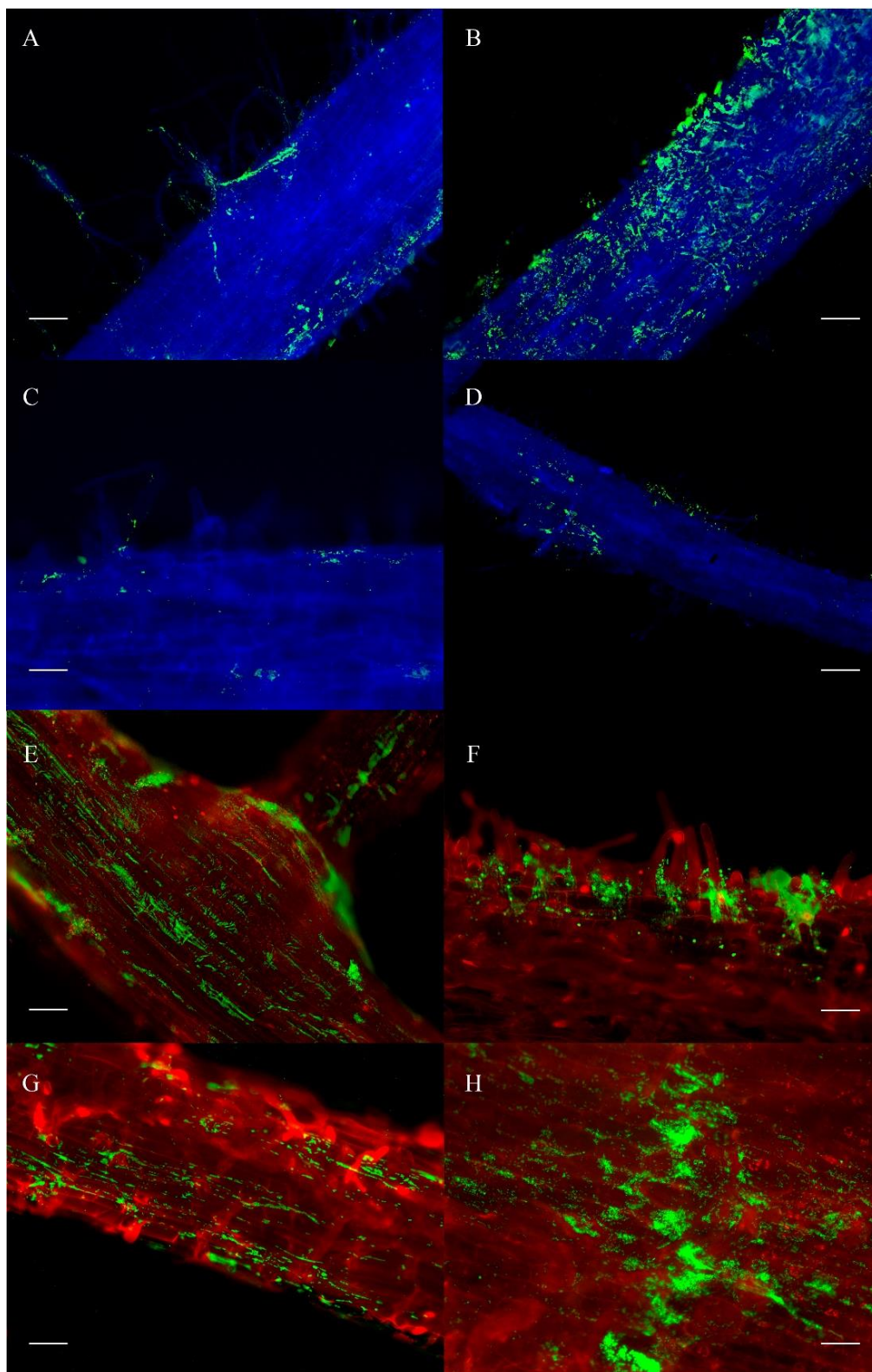


Figura 40: Microscopía óptica de fluorescencia en raíces de lechuga inoculadas con las cepas seleccionadas y marcadas con GFP: SCPM31 (A y B), SCPM81 (C y D), HUTR05 (E y F), y GPTR29 (G y H). 7 DPI (A, C, E, y G) y 14 DPI (B, D, F, y H). En azul las raíces teñidas con blanco de calcofluor, y en rojo las teñidas con yoduro de propidio. Las barras corresponden a un tamaño de 400 μm (D), 100 μm (A, B, E, y G) y 50 μm (C, F, y H).

1.2. Análisis de la colonización en raíces de apio.

La colonización del sistema radicular del apio por parte de los cuatro aislados fue menor que la observada en las plántulas de lechuga, ya que no detectamos la presencia de biopelículas extendidas a lo largo de toda la raíz, sino en zonas más localizadas, y con un menor desarrollo estructural (Figura 41).

Las plántulas inoculadas con SCPM31 presentaron una dinámica similar a la obtenida en la lechuga a los 7 DPI, con células adheridas a la superficie de pelos radiculares, así como pequeñas microcolonias dispuestas en su base (Figura 41a). Pero tras 14 días de crecimiento, la colonización no fue tan efectiva, al no estar adheridas a gran parte de la superficie epidérmica. Los *biofilms* desarrollados estaban dispuestos en áreas más puntuales, asociados a la base de pelos radiculares, con pequeñas microcolonias dispuestas en los espacios intercelulares de la raíz (Figura 41b).

Priestia megaterium SCPM81 logró colonizar el sistema radicular del apio, pero tampoco de una manera extensa. Como refleja la Figura 41c, las primeras áreas de adhesión de las células estaban concentradas en posibles puntos de entrada al interior de la raíz, como fisuras o zonas de desarrollo de nuevas raíces. La muerte de células epidérmicas en estas zonas da lugar a la liberación de su contenido, rico en C y N, al medio externo, lo que provoca un aumento de las poblaciones microbianas asociadas, como podría estar ocurriendo en este caso (Jones et al., 2009; Kandel et al., 2017; Sasse et al., 2018). A los 14 días, las biopelículas formadas no presentaban un alto grado de desarrollo, y estaban centradas en la base y superficie de pelos radiculares. Además, observamos microcolonias distribuidas por la superficie epidérmica radicular.

Finalmente, los aislados identificados dentro del género *Rhizobium* mostraron un mayor grado de colonización radicular, aunque no tan marcado como en las plántulas de lechuga. A los 7 DPI, HUTR05 fue capaz de formar pequeños cúmulos bacterianos sobre una mayor parte de la raíz. Tras 14 días de crecimiento, observamos la presencia de *biofilms* con un mayor grado de desarrollo, aunque no tan extendidos como en las raíces de lechuga. En cambio, GPTR29 siguió una dinámica más parecida a SCPM31. La adhesión de las células estuvo más centrada en la base de los pelos radiculares en el primer tiempo analizado, donde observamos el inicio de formación de biopelículas. Estas formaciones iniciales fueron dando lugar a una estructura más madura, con un cierto desarrollo tridimensional, pero no tan marcado como en las plántulas de lechuga, tras 14 días de crecimiento.

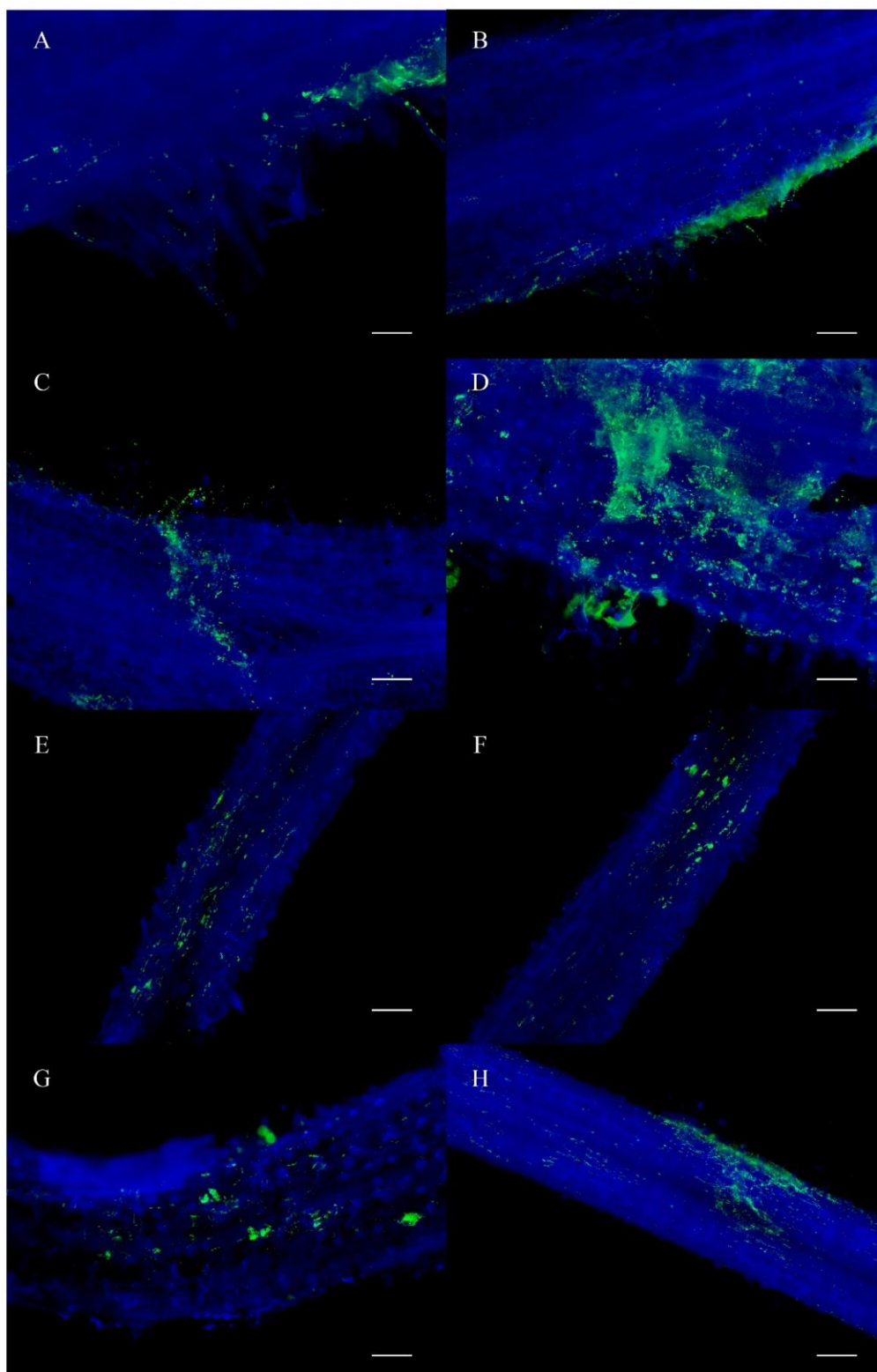


Figura 41: Microscopía óptica de fluorescencia en raíces de apio inoculadas con las cepas seleccionadas y marcadas con GFP: SCPM31 (A y B), SCPM81 (C y D), HUTR05 (E y F), y GPTR29 (G y H). 7 DPI (A, C, E, y G) y 14 DPI (B, D, F, y H). En azul las raíces teñidas con blanco de calcofluor. Las barras corresponden a un tamaño de 400 μm (A y D), 100 μm (B, C, E, F, G, y H).

1.3. Análisis de la colonización en raíces de canónigo.

Los cuatro aislados seleccionados lograron colonizar el sistema radicular de las plántulas de canónigos, especialmente SCPM31. Además, a los 14 días post inoculación pudimos observar una mayor colonización que en el primer tiempo de medida (Figura 42). Aunque de manera general, la colonización no fue tan efectiva como en las raíces de lechuga.

La cepa *Pseudomonas* sp. SCPM31 logró una mayor eficiencia de colonización que el resto de aislados. A los 7 DPI ya había logrado adherirse e iniciar el proceso de desarrollo de *biofilms* sobre la superficie epidérmica y en la base de los pelos radiculares (Figura 42a), y a los 14 días de crecimiento ya había desarrollado zonas con biopelículas más desarrolladas, así como microcolonias extendidas a lo largo de la raíz (Figura 42b).

El aislado SCPM81 exhibió una dinámica de adhesión similar a la obtenida en el apio y la lechuga. Tras 7 días de crecimiento, había comenzado a formar pequeñas microcolonias en la base y superficie de los pelos radiculares (Figura 42c), que habían logrado extenderse sobre más parte de la superficie radicular en la segunda medida, pero sin alcanzar un grado de desarrollo tan marcado como SCPM31 (Figura 42d).

Finalmente, HUTR05 y GPTR29 consiguieron colonizar las plántulas de canónigo, pero no con tanto éxito como en el caso de la lechuga. En el primer tiempo de medida observamos la presencia de pequeños cúmulos bacterianos en la superficie epidérmica, así como asociados al inicio de formación de raíces secundarias (Figura 42e y 42g). Estas microcolonias no alcanzaron un grado de desarrollo elevado, aunque aparecieron extendidas en una mayor extensión de las raíces primarias (Figura 42f y 42h). Cabe destacar que el aislado HUTR05 mostró un mayor grado de colonización que GPTR29.

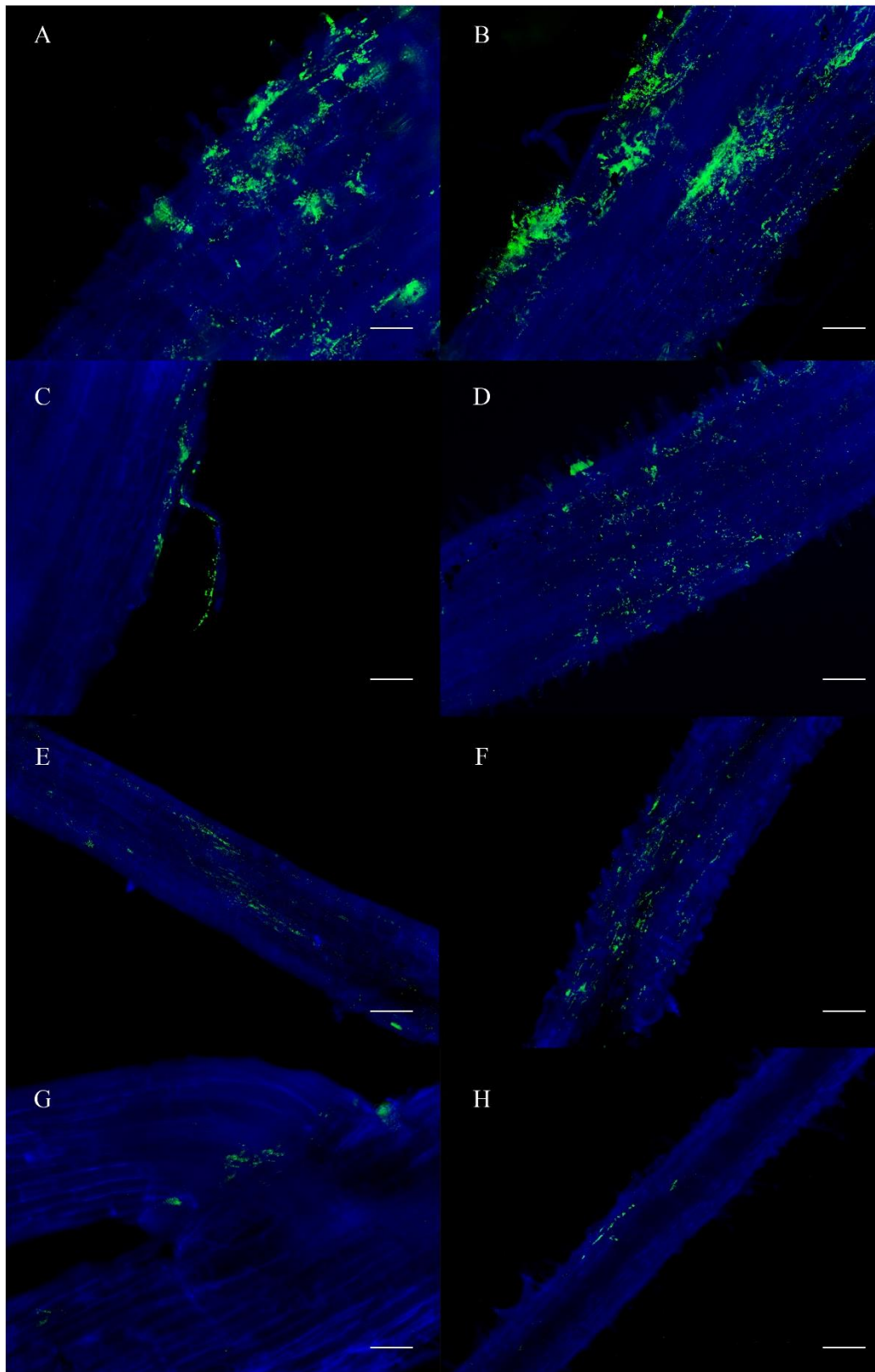


Figura 42: Microscopía óptica de fluorescencia en raíces de canónigo inoculadas con las cepas seleccionadas y marcadas con GFP: SCPM31 (A y B), SCPM81 (C y D), HUTR05 (E y F), y GPTR29 (G y H). 7 DPI (A, C, E, y G) y 14 DPI (B, D, F, y H). En azul las raíces teñidas con blanco de calcofluor. Las barras corresponden a un tamaño de 400 μm (A, C, y G), 100 μm (B, D, E, F, y H).

Según lo comentado anteriormente, la quimiotaxis bacteriana determina el lugar de colonización, algo que puede variar entre especies, entre cepas filogenéticamente cercanas e, incluso, entre diferentes hospedadores vegetales en la misma cepa (Knights et al., 2021; Liu et al., 2024b; Tovi et al., 2019). Es de esperar que en los lugares con mayores tasas de liberación de exudados radicales tienda a concentrarse una mayor densidad bacteriana y, por tanto, faciliten la colonización en zonas cercanas (Holz et al., 2018; Molina et al. 2003). Sin embargo, las áreas de colonización bacteriana pueden ir variando temporalmente a lo largo de la raíz, durante las diferentes etapas del proceso (Chu et al., 2018; Liu et al., 2024b). Los resultados obtenidos en este trabajo permiten corroborar todo esto, ya que hemos podido observar zonas de preferencia de adhesión en cada una de las cepas y en las distintas plantas, como pelos radiculares o inicios de formación de raíces secundarias. Además, la evolución temporal de la colonización también ha podido ser observada, con un ejemplo claro con el aislado SCPM31 sobre raíces de lechuga, que mostró una adhesión inicial centrada en la superficie de pelos radiculares y raíces secundarias poco desarrolladas, que evolucionó en una colonización extendida por toda la superficie radicular y con elevado grado de desarrollo de las biopelículas. Finalmente, estos resultados concuerdan con la literatura científica que ha estudiado y comprobado la capacidad de cepas pertenecientes a géneros bacterianos como *Rhizobium* (García-Fraile et al., 2012; Flores-Félix et al., 2013; Jiménez-Gómez et al., 2018), *Pseudomonas* (Pieterse et al., 2021; Tovi et al., 2019), o *Bacillus* y géneros emparentados (Chu et al., 2018; Jiménez-Gómez et al., 2020), de colonizar el sistema radicular de especies vegetales de interés agrícola, actuando en algunos casos como promotores del crecimiento vegetal de estas.

2. Ensayos de inoculación en plántulas de lechuga, apio y canónigo.

2.1. Ensayos de inoculación en plántulas crecidas en condiciones no salinas.

Una correcta germinación y establecimiento durante las primeras fases de desarrollo vegetal son pasos críticos que pueden determinar el éxito o fracaso de la futura cosecha, así como para la productividad de los cultivos (Finch-Savage & Bassel, 2016). Estos factores contribuyen a un crecimiento y madurez uniformes, una mejor competencia frente a malas hierbas o estreses bióticos/abióticos (Cardarelli et al., 2022; Damalas et al., 2019). En este contexto, el uso de PGPBs puede tener una influencia positiva en factores como el estado hormonal de las plantas o su calidad nutricional, que induzcan un mayor vigor en el desarrollo de las plántulas y, por tanto, en el establecimiento del cultivo (Cardarelli et al., 2022; Zhao, 2010). Por esta razón

decidimos analizar el efecto de la inoculación con los cuatro aislados que presentaron un mayor potencial PGP *in vitro* e *in silico*, sobre plántulas de lechuga, apio y canónigos. Para ello, tomamos medidas de la longitud de la parte aérea y radicular, así como del número de raíces secundarias y hojas de las plantas, 7 y 14 días después de la inoculación (Figura 43).

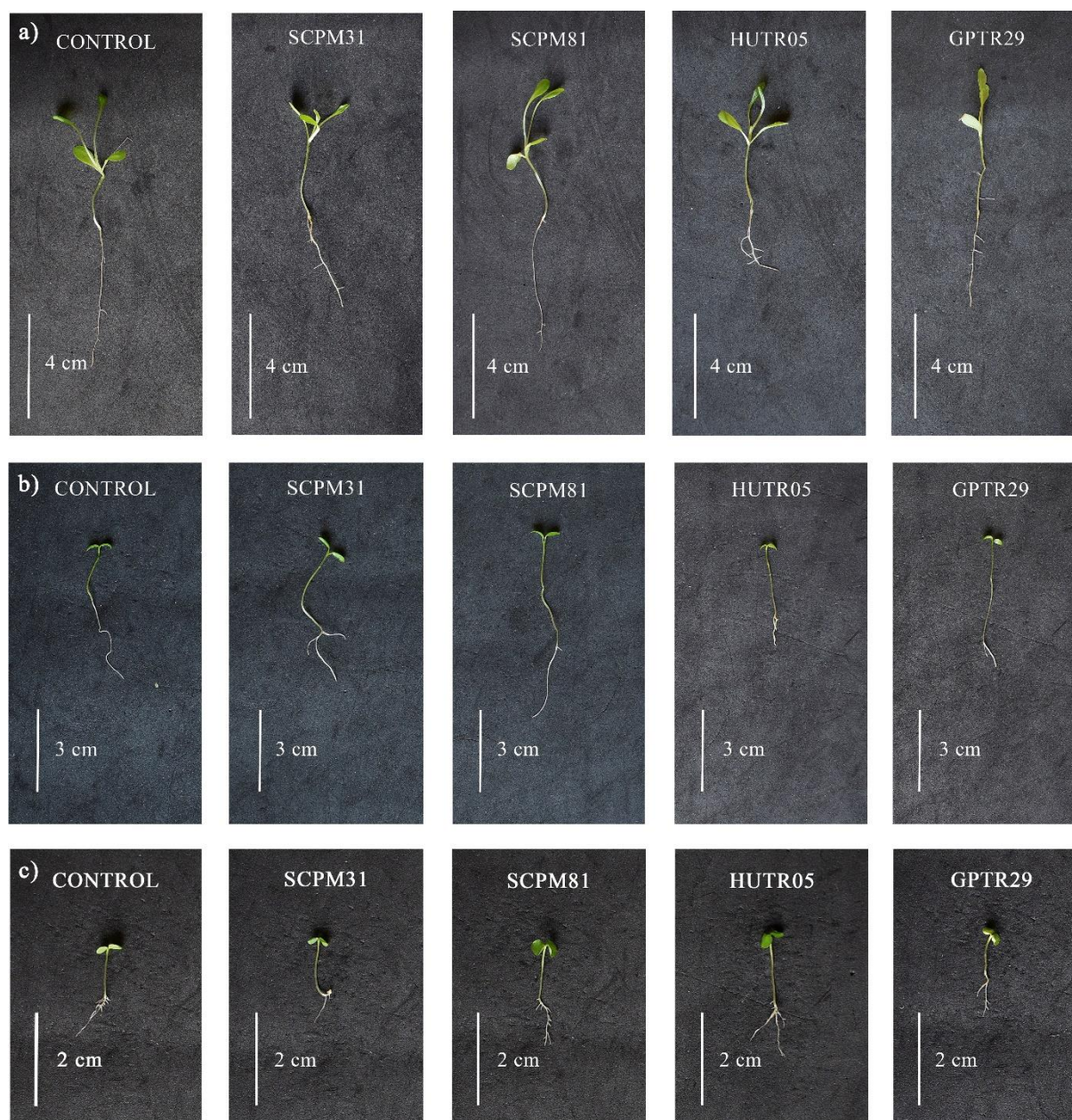


Figura 43: Fotografías representativas de las plántulas de a) lechuga, b) apio, y c) canónigos con sus respectivos tratamientos a 14 DPI, evaluadas en el ensayo de promoción del crecimiento vegetal durante los primeros estadios de crecimiento.

En el caso de la lechuga, pudimos observar incrementos estadísticamente significativos en la longitud de la parte aérea y radicular a los 7 días de la inoculación, así como mejoras en el número de raíces secundarias y hojas en el segundo tiempo de medida (Figura 44). Los aislados

SCPM81 y GPTR29 exhibieron los resultados más destacables, al lograr mejoras cercanas al 30 % y 25 % con respecto al control sin inocular en las variables de longitud de la parte aérea y radicular a los 7 DPI, respectivamente. Además, el número de raíces secundarias también fue incrementado significativamente a los 14 DPI gracias a la inoculación con estos aislados, con un incremento del 43 % en ambos casos. El tratamiento con SCPM31 provocó un incremento en la longitud de la parte aérea del 24,2 %, 7 días post inoculación. Finalmente, las plántulas inoculadas con la cepa HUTR05 presentaron un 12,8 % más de hojas a los 14 DPI con respecto al tratamiento control, un resultado estadísticamente significativo.

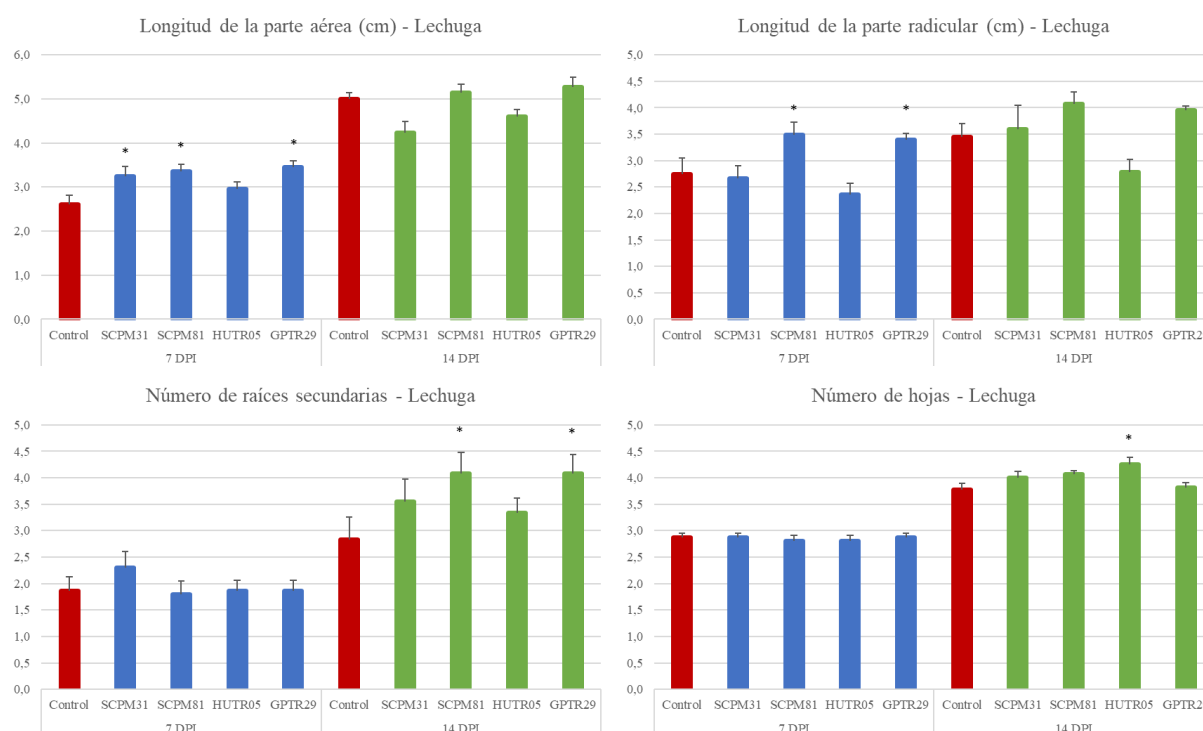


Figura 44: Efecto de la inoculación con los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 sobre los primeros estadios de crecimiento de plántulas de lechuga. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control sin inocular, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Tras el análisis de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal en plántulas de apio, pudimos observar incrementos estadísticamente significativos en la longitud de la parte aérea y el número de raíces secundarias a 7 y 14 DPI, así como en el número de hojas en el segundo tiempo de medida (Figura 45). De manera similar a la lechuga, las plantas tratadas con el aislado SCPM81 exhibieron mejoras significativas en la longitud de la parte aérea con respecto al control negativo a los 7 (25,3 %) y 14 DPI (39,8 %). La inoculación con GPTR29 únicamente provocó un incremento significativo del 43,9 % en el número de raíces secundarias a los 7 días,

mientras que el tratamiento con HUTR05 lo hizo sobre la longitud de la parte aérea (42,6 %) en el mismo tiempo de medida y también con respecto al control sin inocular. Por último, las plántulas tratadas con SCPM31 tenían un mayor número de raíces secundarias a los 7 (42,8 %) y 14 DPI (39,7 %) y de hojas en el segundo tiempo de medida (10,7 %), que las plantas no inoculadas.

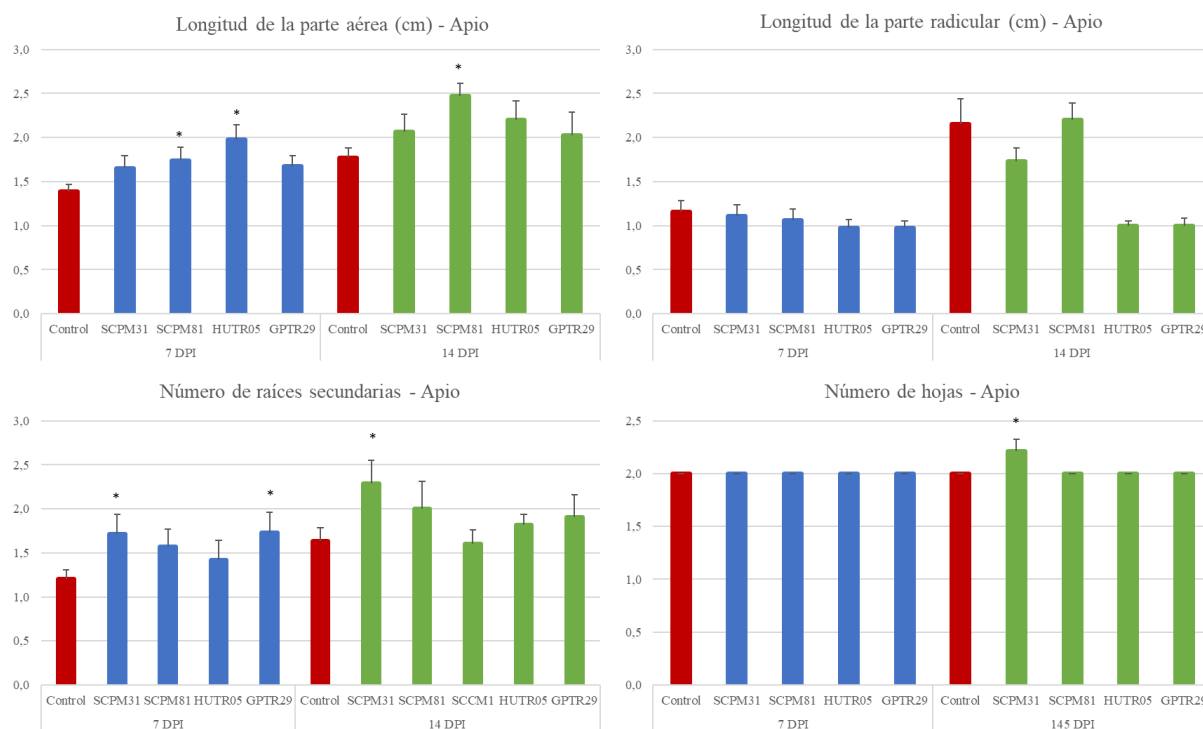


Figura 45: Efecto de la inoculación con los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 sobre los primeros estadios de crecimiento de plántulas de apio. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control sin inocular, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Por último, analizamos la capacidad de promoción del crecimiento vegetal de los cuatro aislados seleccionados sobre plántulas de canónigo (Figura 46), aunque los resultados obtenidos no fueron tan destacables como en los casos anteriores. Únicamente las plántulas tratadas con SCPM81 y con GPTR29 mostraron diferencias significativas con respecto a las plántulas control en la longitud de la parte aérea a los 7 DPI, con incrementos del 27,8 % y 25,7 %. También observamos incrementos en las medidas del resto de variables, aunque no estadísticamente significativos, como en la longitud de la parte radicular en las plántulas inoculadas con SCPM81 y HUTR05 tras 14 días (aproximadamente del 15 %), o de la longitud de la parte radicular en las plantas tratadas con SCPM31 y SCPM81 (34,7 % y 22,1 %).

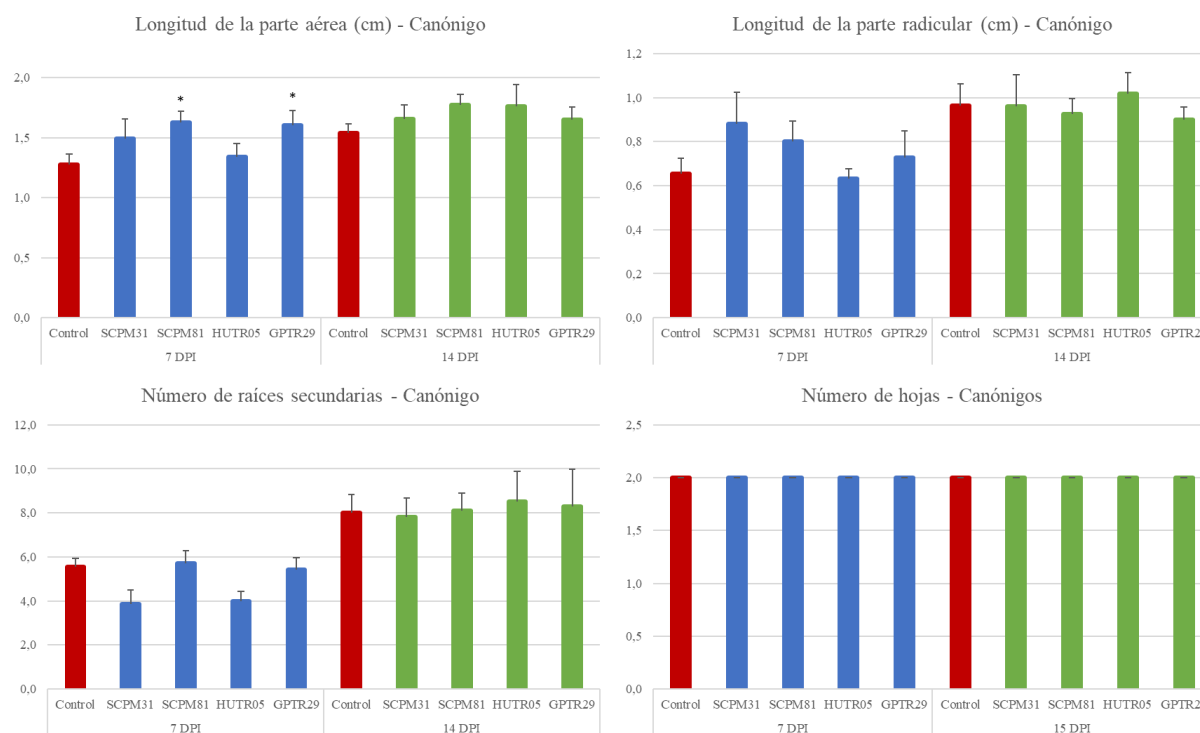


Figura 46: Efecto de la inoculación con los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 sobre los primeros estadios de crecimiento de plántulas de canónigo. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control sin inocular, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

De manera global, los resultados derivados de la inoculación con SCPM81 y GPTR29 fueron especialmente destacables, al inducir mejoras estadísticamente significativas tanto en la parte radicular como aérea de las plántulas. Aunque pudimos observar incrementos a los 14 DPI, las principales diferencias frente al control fueron las obtenidas en el primer tiempo de medida. Según lo comentado previamente, una adecuada germinación y desarrollo en los primeros días de crecimiento son claves para el correcto establecimiento del cultivo, por lo que los resultados obtenidos en estos ensayos indican el potencial de estos aislados para promover el crecimiento en etapas críticas de desarrollo (Cardarelli et al., 2022; Damalas et al., 2019; Finch-Savage & Bassel, 2016). La importancia económica de estos cultivos hortícolas reside en la parte aérea, la parte comercializable y comestible de los mismos, por lo que la obtención de resultados de interés en estas variables es de gran importancia, como en el caso del tratamiento de HUTR05 sobre el número de hojas de las plántulas de lechuga. Sin embargo, el sistema radicular proporciona a las plantas soporte físico, y la capacidad para obtener agua y nutrientes, por lo que su desarrollo y morfogénesis es crucial para un correcto establecimiento de estas (López-Bucio et al., 2007). Las hormonas vegetales juegan un papel crucial en el desarrollo y arquitectura de las raíces de las plantas, por lo que la alteración del estado hormonal mediado

por PGPBs supone un factor de importancia en la interacción planta-bacteria, sobre todo en estas primeras etapas de desarrollo (López-Bucio et al., 2007; Zao, 2010). En este sentido, la cepa SCPM81 mostró los mejores resultados de producción de auxinas y IAA, junto con los aislados identificados dentro del género *Rhizobium*, lo que podría estar dando lugar a estas diferencias en las variables relacionadas sistema radicular.

2.2. Ensayos de inoculación en plántulas crecidas en salinidad por NaCl.

La salinidad del suelo es una de las principales causas de estrés abiótico en plantas, así como un problema creciente a nivel mundial que afecta especialmente a regiones áridas y semiáridas (Abrol et al., 1988; Hayat et al., 2020; Zaman et al., 2018). Según lo anteriormente mencionado, la germinación y el crecimiento de las plántulas son etapas críticas para el desarrollo de las especies vegetales, por lo que son consideradas las fases más sensibles a la salinidad u otro tipo de estrés (Ibrahim, 2016). En las semillas, la salinidad retrasa y/o disminuye la germinación, reduce la disponibilidad de agua, puede afectar a la movilización de las reservas almacenadas, o afectar a diversos componentes celulares (Finch-Savage & Bassel, 2016; Ibrahim, 2016; Rajabi Dehnavi et al., 2020). Por tanto, el estrés salino supone un desafío importante para el establecimiento y correcto desarrollo inicial de los cultivos. Ante esta problemática, han surgido diversas estrategias que intentan mejorar el rendimiento de las plantas durante sus primeras fases de crecimiento, como es el *priming* de las semillas (Adhikari et al., 2024; Ibrahim, 2016; Mahmoudi et al., 2012), o la inoculación con microorganismos capaces de aliviar los efectos negativos derivados de este tipo de estrés (Bacilio et al., 2004; Fu et al., 2010; Gao et al., 2016; Jiménez-Gómez et al., 2020; Li & Jiang, 2017; Tiwari et al., 2017).

En este apartado describimos el efecto de la inoculación con los cuatro aislados seleccionados sobre el crecimiento de plántulas de lechuga, apio y canónigo sometidas a estrés salino por NaCl, con el objetivo de comprobar si el tratamiento con estas cepas provocaba un alivio de los efectos negativos causados por este tipo de estrés. Para ello, tomamos medidas de la longitud de la parte aérea y radicular, así como del número de raíces secundarias y hojas de las plántulas, 7 y 14 días después de la inoculación (Figura 47). La lechuga y el apio fueron sometidos a una concentración de 100 mM NaCl, mientras que las plántulas de canónigo a 50 mM NaCl. La elección de las concentraciones salinas aplicadas fue realizada en base a una revisión bibliográfica inicial, y a pruebas de crecimiento bajo diferentes concentraciones de NaCl llevadas a cabo en el laboratorio, con el objetivo de encontrar una concentración que provocara una reducción significativa del rendimiento, pero sin tener un efecto drástico o radical

(ALKahtani et al., 2021; De Pascale et al., 2003; González et al., 2023; Grewal & Maheshwari, 2013; Mahmoudi et al., 2010; Pardossi et al., 1999b; Voutsinos-Frantzis et al., 2023).

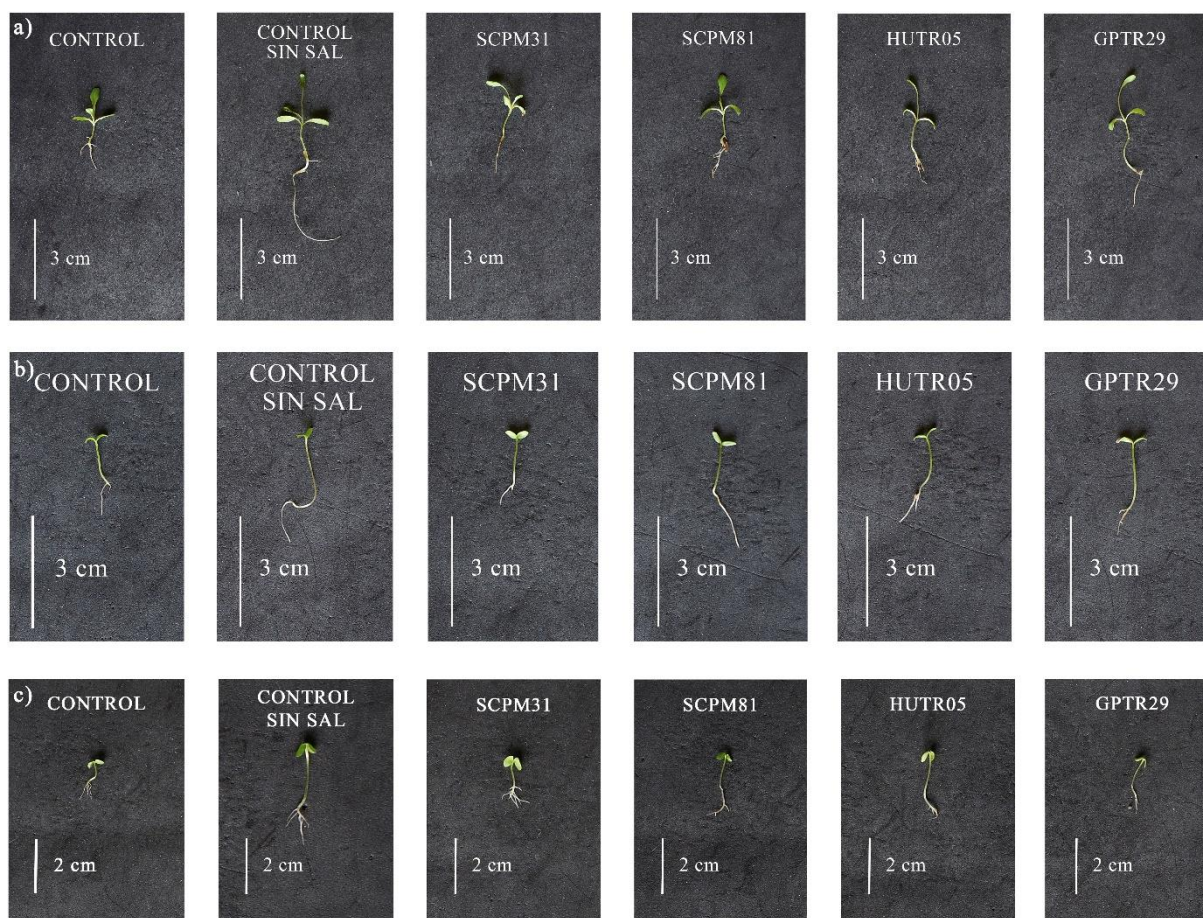


Figura 47: Fotografías representativas de las plántulas de a) lechuga, b) apio, y c) canónigos con sus respectivos tratamientos a 14 DPI, evaluadas en el ensayo de promoción del crecimiento vegetal durante los primeros estadios de crecimiento bajo estrés por NaCl (100 mM en lechuga y apio, 50 mM en canónigo).

Los resultados obtenidos en las plántulas de lechuga fueron muy interesantes (Figura 48). Al comparar el tratamiento control crecido en condiciones normales frente al control sin inocular crecido en NaCl 100 mM, pudimos comprobar que la salinidad inducía un efecto negativo estadísticamente significativo en las plántulas. Sin embargo, en la variable número de raíces secundarias el control salino mostró un valor más elevado que el control en condiciones normales. En este sentido, algunos trabajos en *Arabidopsis* han demostrado que sus raíces secundarias presentan una mayor resistencia al estrés salino que la raíz principal, y que el número de estas raíces puede mantenerse o incluso aumentar (Ambastha et al., 2020; Duan et al., 2013).

Por otro lado, la inoculación con las cepas generó mejoras significativas en diferentes parámetros de interés, con respecto al control salino (Figura 48). En la variable longitud de la

parte aérea observamos incrementos estadísticamente significativos a los 7 DPI en las plántulas tratadas con cada una de las cepas, de entre el 25 % y 41 %. A los 14 días de crecimiento, los tratamientos SCPM81, HUTR05 y GPTR29 fueron los que obtuvieron mejoras significativas, superiores al 25 %, con respecto al control salino. Además, la inoculación con el aislado GPTR29 también provocó diferencias significativas en la longitud de la parte radicular a 7 (98,3 %) y 14 DPI (52,6 %), así como como en el número de hojas a los 14 DPI (10,1 %). Finalmente, las plántulas tratadas con SCPM81 presentaron un 33,9 % más de raíces secundarias que el control crecido en condiciones de estrés.

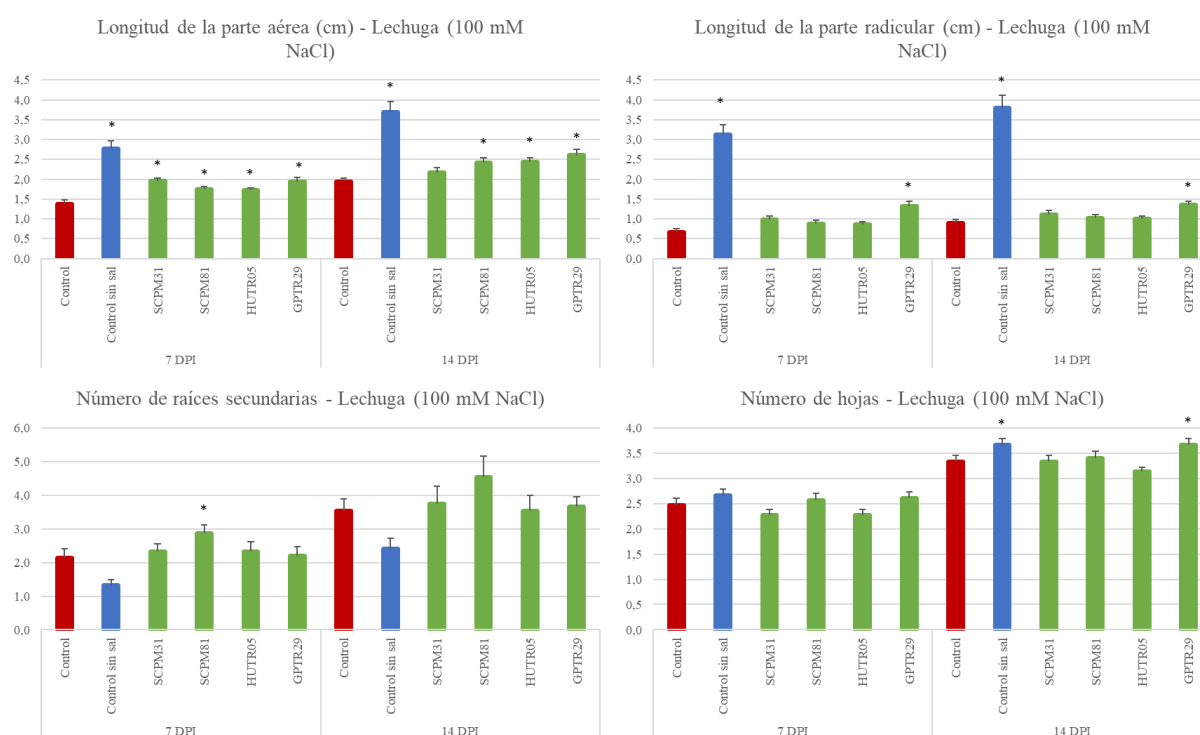


Figura 48: Efecto de la inoculación con los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 sobre los primeros estadios de crecimiento de plántulas de lechuga crecidas en condiciones de salinidad (100 mM NaCl).

Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control salino sin inocular, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

El análisis de la capacidad de crecimiento en las plántulas de apio sometidas a 100 mM NaCl reveló los efectos negativos provocados por el estrés, así como la capacidad de alivio de estas condiciones adversas gracias a la inoculación de los aislados (Figura 49). Los resultados obtenidos en el tratamiento sin inocular en condiciones normales fueron estadísticamente superiores al control salino en la mayoría de las variables analizadas, excepto en el número de hojas (7 y 14 DPI) y de raíces secundarias (14 DPI). También pudimos observar los efectos positivos derivados de la inoculación bacteriana. Respecto a la variable longitud de la parte

aérea, los tratamientos de inoculación con SCPM81 y HUTR05 generaron diferencias significativas respecto al control salino, con incrementos cercanos al 30% y 20 % a los 7 y 14 DPI, respectivamente. La longitud radicular también presentó mejoras significativas en los tratamientos con estas dos cepas y SCPM31 a los 7 DPI, con incrementos iguales o superiores al 50 % con respecto al control crecido bajo estrés por NaCl, siendo estos valores similares o superiores a los obtenidos en las plántulas sin inocular y no estresadas. En el número de raíces secundarias, las plántulas inoculadas con GPTR29 exhibieron incrementos significativos con respecto al control salino a 7 (33,3 %) y 14 DPI (53,9 %), además de igualar los valores con el control no salino a los 7 DPI y mejorarlos un 20,0 % a los 14 días. Por último, la variable número de hojas mantuvo constates los resultados en ambos tiempos de medida y bajo los diferentes tratamientos.

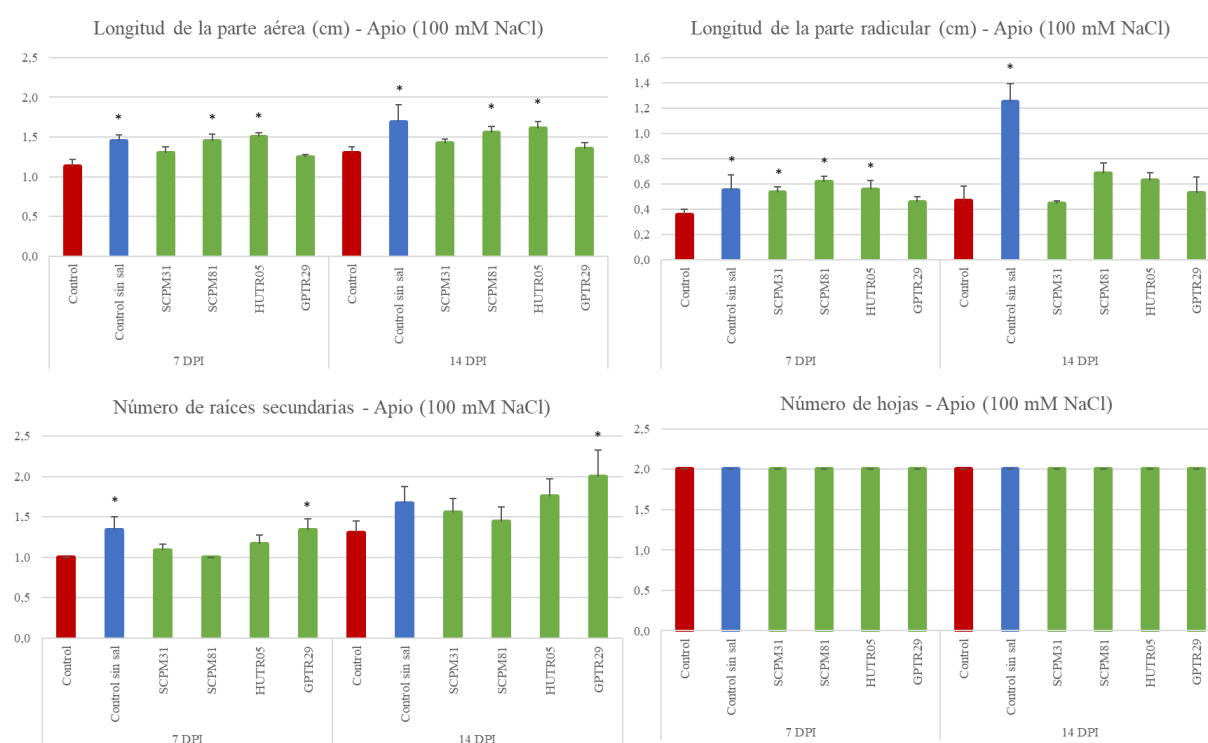


Figura 49: Efecto de la inoculación con los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 sobre los primeros estadios de crecimiento de plántulas de apio crecidas en condiciones de salinidad (100 mM NaCl). Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control salino sin inocular, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Los resultados obtenidos en las plántulas de canónigo sometidas a 50 mM NaCl siguieron una dinámica similar a las de apio (Figura 50). La salinidad indujo efectos negativos sobre los primeros estadios de crecimiento de este cultivo, al presentar una reducción estadísticamente significativa de la longitud de la parte aérea y radicular, así como del número de raíces

secundarias en las plantas no inoculadas y sometidas al estrés frente a las plantas no inoculadas y crecidas en condiciones normales. Sin embargo, la inoculación bacteriana generó mejoras significativas con respecto al control salino en la longitud de la parte aérea y radicular. Las plántulas tratadas con los aislados SCPM81 y HUTR05 mostraron incrementos de aproximadamente un 25 % y 20 % en la longitud de los tallos a 7 y 14 DPI, respectivamente. En cambio, la longitud del sistema radicular fue incrementada tras la inoculación con cada una de las cepas a 7 y 14 DPI, en comparación con el control salino sin inocular, entre el 36,8 % y 55,2 % en el primer tiempo de medida, y el 38,2 % 57,1 % en el segundo tiempo de medida.

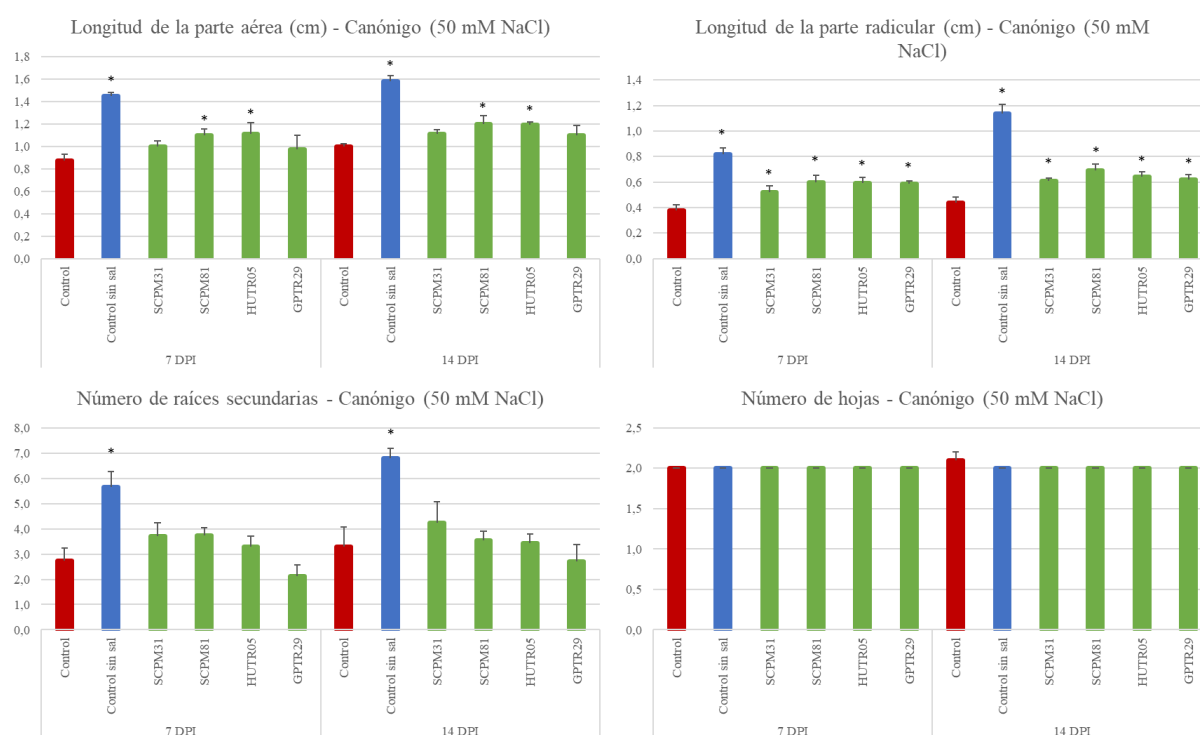


Figura 50: Efecto de la inoculación con los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 sobre los primeros estadios de crecimiento de plántulas de canónigo crecidas en condiciones de salinidad (100 mM NaCl).

Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control salino sin inocular, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Los porcentajes de reducción de la longitud de la parte aérea y radicular de las plántulas sin inocular crecidas en condiciones salinas frente a las no inoculadas y no estresadas, fueron de aproximadamente el 50 % y 76 % en la lechuga, 22% y 35 % en el apio, y 35 % y 50 % en el canónigo, respectivamente. Estos valores son similares a los encontrados en otros artículos que analizan los efectos de la salinidad sobre los cultivos hortícolas seleccionados para este trabajo: lechuga (González et al., 2023; Mahmoudi et al., 2010), apio (Grewal & Maheshwari, 2013; Pardossi et al., 1999b), y canónigo (Voutsinos-Frantzis et al., 2023). Por tanto, estos resultados

remarcan los efectos de la salinidad en la inhibición el crecimiento vegetal, sobre todo en etapas de crecimiento vegetal críticas, como es la germinación o el establecimiento inicial de las plántulas (Finch-Savage & Bassel, 2016; Ibrahim, 2016; Rajabi Dehnavi et al., 2020).

También pudimos comprobar que la inoculación con los aislados, principalmente SCPM81 y HUTR05, reducía los efectos negativos causados por la salinidad. De manera general, las plántulas inoculadas con estas cepas no alcanzaban los rendimientos obtenidos en el tratamiento control sin estresar, pero mostraban incrementos significativos con respecto al control salino. En este sentido, ha sido descrito que la inoculación bacteriana bajo condiciones de salinidad induce una mejora de los parámetros productivos analizados frente a las condiciones de no inoculación y estrés, pero no llegando a obtener los rendimientos bajo condiciones normales (Bacilio et al., 2004; Li & Jiang, 2017; Ramadoss et al., 2013). Por tanto, hemos logrado evidenciar la capacidad de estos aislados de mitigar el estrés salino durante las primeras etapas de crecimiento de varios cultivos hortícolas.

2.3. Ensayos de inoculación en plántulas crecidas en salinidad por Na₂SO₄.

Gran parte de los trabajos realizados sobre los efectos negativos de la salinidad en plantas están centrados en el estrés provocado por NaCl, siendo mucha menor la atención prestada a otros tipos de salinidad, como puede ser la ocasionada por Na₂SO₄. Las respuestas de la susceptibilidad/tolerancia de las especies vegetales frente al estrés causado por diferentes tipos de iones son distintas (Reginato et al., 2021). Por ejemplo, algunos estudios han comprobado que ciertos cultivos de interés agronómico, entre ellos lechuga, cebada, o *Brassica rapa* L., presentan mayores efectos negativos bajo estrés por Na₂SO₄ que bajo concentraciones similares de NaCl (Huang & Redmann, 1995; Mahmoudi et al., 2010; Reich et al., 2017). Sin embargo, trabajos realizados en otras especies vegetales, como en el arroz, han comprobado que el NaCl era más tóxico que el Na₂SO₄ (Irakoze et al., 2020; Irakoze et al., 2021). Asimismo, las propiedades edafológicas de cada región determinan los principales iones causantes del estrés, por lo que conocer la respuesta de la interacción planta-bacteria en diferentes condiciones salinas supone una ventaja para el posible uso del mismo bioinoculante en diferentes contextos agrícolas (Hayat et al., 2020; Reginato et al., 2021; Safdar et al., 2019).

En este apartado describimos el efecto de la inoculación con los cuatro aislados seleccionados sobre el crecimiento de plántulas de lechuga, apio y canónigo sometidas a estrés salino por Na₂SO₄ (50 mM para todas ellas), con el objetivo de comprobar si el tratamiento con estas cepas provocaba un alivio de los efectos negativos causados por este tipo de estrés. Para ello, tomamos

medidas de la longitud de la parte aérea y radicular, así como del número de raíces secundarias y hojas de las plántulas, 7 y 14 días después de la inoculación (Figura 51). La elección de las concentraciones salinas aplicadas en estos ensayos fue realizada en base a una revisión bibliográfica inicial, y a pruebas de crecimiento bajo diferentes concentraciones de Na_2SO_4 llevadas a cabo en el laboratorio (Mahmoudi et al., 2010; Reginato et al., 2021). Finalmente, aplicamos una concentración menor de Na_2SO_4 que de NaCl , de acuerdo con lo también descrito en la bibliografía, excepto en el caso del canónigo, que aplicamos la misma concentración que para el ensayo en NaCl , ya que observamos una respuesta similar ante ambos tipos de salinidad.



Figura 51: Fotografías representativas de las plántulas de a) lechuga, b) apio, y c) canónigos con sus respectivos tratamientos a 14 DPI, evaluadas en el ensayo de promoción del crecimiento vegetal durante los primeros estadios de crecimiento bajo estrés por 50 mM Na_2SO_4 .

Las plántulas de lechuga no inoculadas y crecidas bajo estrés por Na_2SO_4 presentaron valores inferiores y estadísticamente significativos en las variables longitud de la parte aérea y radicular (7 y 14 DPI), y en el número de hojas (14 DPI), al compararlas frente al tratamiento no inoculado y no estresado, con diferencias porcentuales que variaban entre un 15 % en el número de hojas a un 80 % en la longitud radicular (Figura 52). La inoculación con los aislados provocó mejoras significativas en algunas de las variables analizadas frente al control estresado, pero no

tan marcado como en el estrés por NaCl. El tratamiento con el aislado HUTR05 dio lugar a un incremento de la longitud aérea con respecto al control salino, tanto a los 7 DPI (23,5 %) como a los 14 DPI (30,6 %). Asimismo, la inoculación con GPTR29 mejoró significativamente esta variable a los 7 DPI en un 35,6 %. Las plántulas inoculadas con los aislados SCPM31 y SCPM81 mostraron aumentos significativos del 57,9 % y 16,9 % en el número de raíces secundarias y número de hojas, respectivamente. Finalmente, el tratamiento bacteriano sobre las plántulas de lechuga no provocó diferencias significativas en la variable longitud de la parte radicular, a pesar de obtener incrementos con respecto al control salino de hasta el 49 %, probablemente debido a las grandes diferencias presentes entre cualquiera de los tratamientos frente al control no estresado (superiores al 68 %).

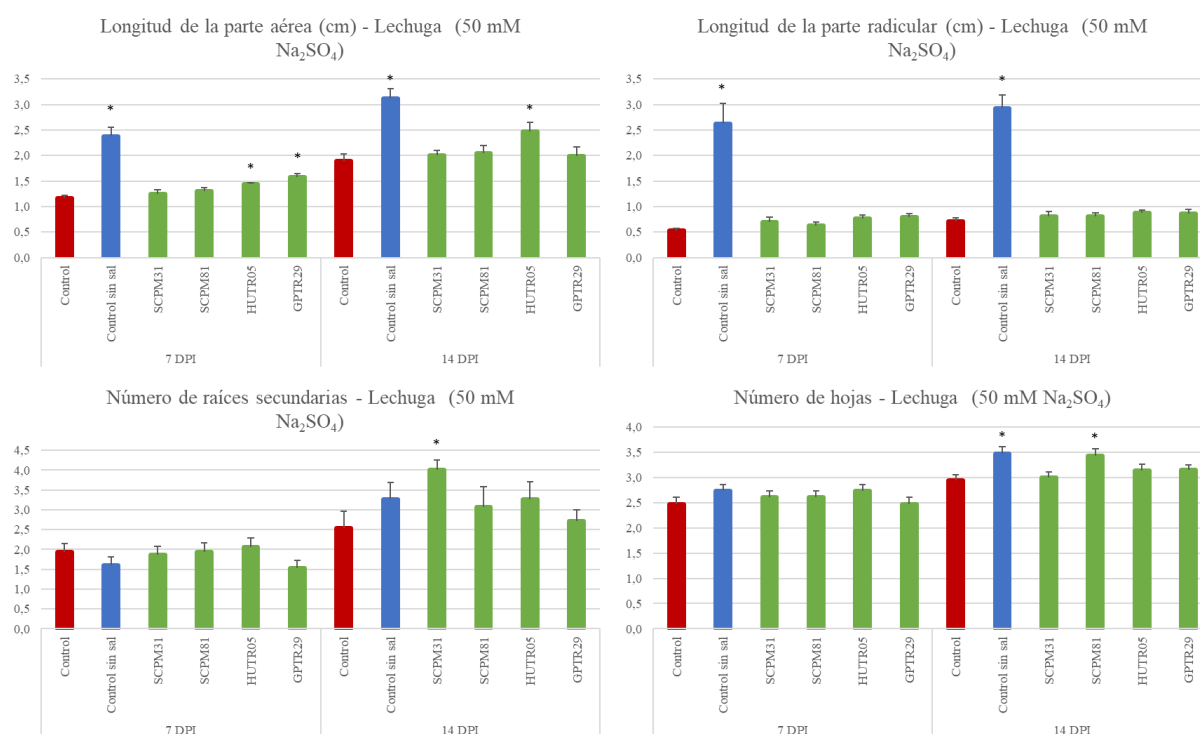


Figura 52: Efecto de la inoculación con los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 sobre los primeros estadios de crecimiento de plántulas de lechuga crecidas en condiciones de salinidad (50 mM Na₂SO₄).

Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control salino sin inocular, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

El efecto negativo del Na₂SO₄ sobre el crecimiento de las plántulas de apio fue algo superior al ejercido por el estrés por NaCl. Tanto en la parte aérea como radicular encontramos una disminución significativa de la longitud en las plántulas control crecidas bajo 50 mM Na₂SO₄ con respecto al control no estresado, con diferencias porcentuales de aproximadamente el 40 % y 60 % para cada una de las variables, respectivamente (Figura 53). Además, el alivio del estrés

derivado de la inoculación bacteriana no fue tan marcado como en el caso de la salinidad por NaCl. En este ensayo, únicamente las plántulas tratadas con GPTR29 presentaron incrementos significativos de la longitud aérea y radicular a los 14 días de crecimiento, con aumentos del 24,5 % y 34,3 %, respectivamente.

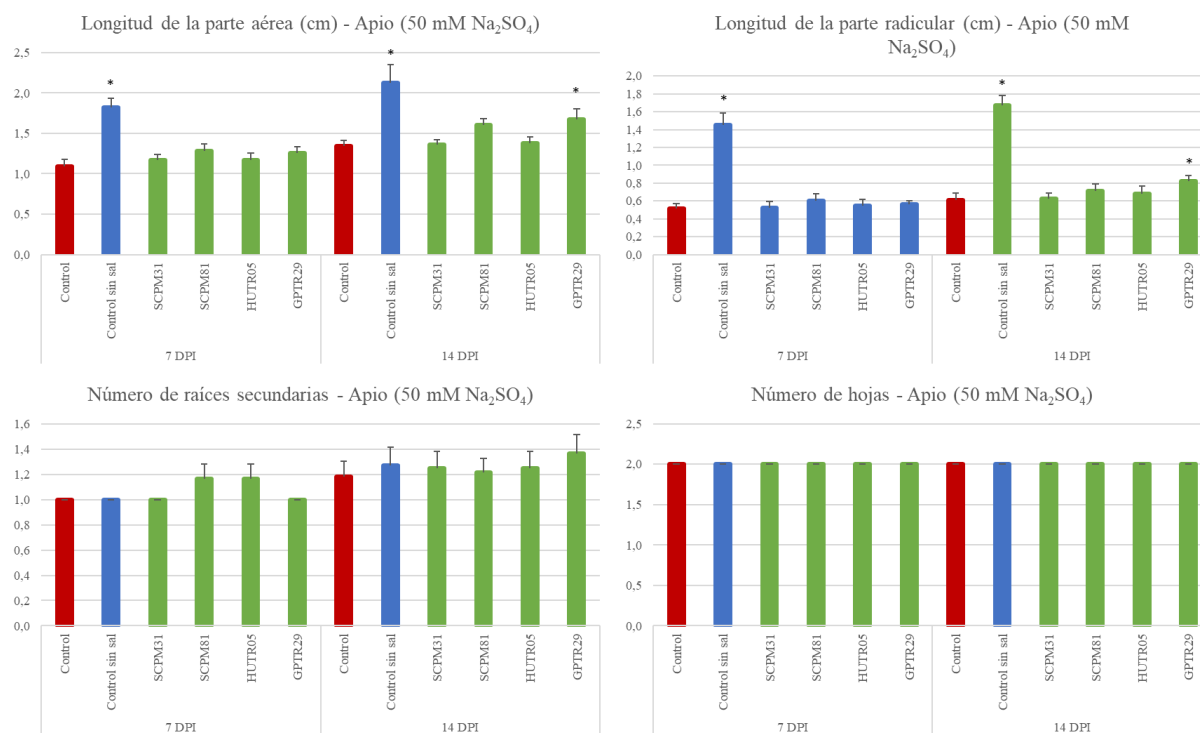


Figura 53: Efecto de la inoculación con los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 sobre los primeros estadios de crecimiento de plántulas de apio crecidas en condiciones de salinidad (50 mM Na₂SO₄).

Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control salino sin inocular, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

La comparación de los ensayos con plántulas de canónigo sometidas a estrés por NaCl y Na₂SO₄ permitió observar una dinámica similar en los efectos negativos causados por ambos tipos de salinidad. Bajo los dos tipos de estrés hubo una reducción estadísticamente significativa en la longitud de la parte aérea y radicular, y en el número de raíces secundarias, al comparar las plántulas control estresadas y no estresadas. Además, los porcentajes de reducción observados en estas variables también fueron similares, entre el 30 % y 60 % en todas ellas para ambos ensayos. Además, la inoculación con los aislados seleccionados también ejerció un efecto positivo sobre la longitud de la parte aérea y radicular, al igual que bajo condiciones de 50 mM NaCl. Así, la aplicación de cada uno de los aislados provocó incrementos significativos de entre el 20 % y 30 % en la longitud de la parte aérea de las plantas de 7 y 14 días de crecimiento (Figura 54). De igual manera, todos los tratamientos bacterianos indujeron mejoras

significativas, del 35 % o superiores, en la variable longitud de la parte radicular en ambos tiempos de medida.

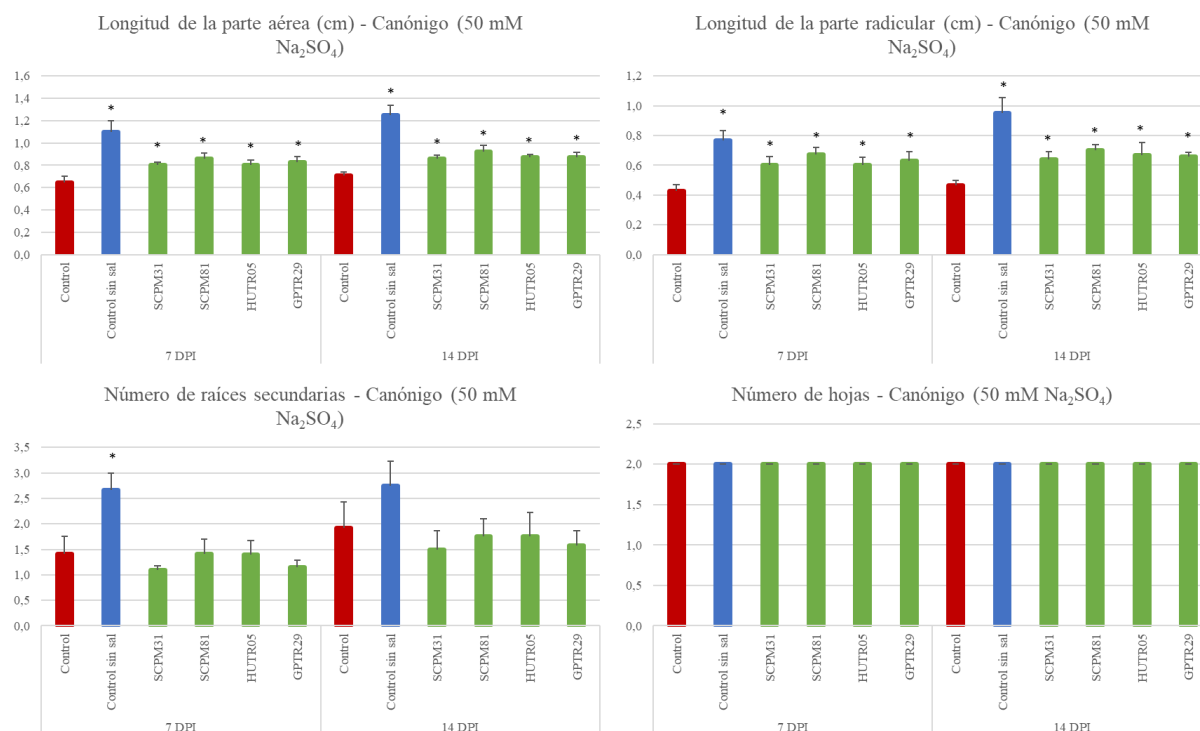


Figura 54: Efecto de la inoculación con los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 sobre los primeros estadios de crecimiento de plántulas de canónigo crecidas en condiciones de salinidad (50 mM Na₂SO₄). Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control salino sin inocular, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

De manera global, los resultados de estos ensayos corroboraron que el estrés por Na₂SO₄ también provocaba efectos negativos sobre el crecimiento de las plántulas de lechuga, apio y canónigos. Además, al comparar la disminución de la longitud aérea y radicular entre las plantas control estresadas y no estresadas en los ensayos con salinidad por Na₂SO₄ y NaCl, pudimos observar que las diferencias en la lechuga y el canónigo fueron similares entre ambos tipos de estrés. Sin embargo, las plántulas de apio presentaron ciertos incrementos en la inhibición del crecimiento bajo el estrés inducido por Na₂SO₄. Por tanto, la relación entre la concentración de NaCl y Na₂SO₄ y el efecto negativo sobre el crecimiento vegetal varía entre cada especie vegetal. La lechuga presentó efectos inhibitorios similares bajo 100 mM NaCl que bajo la mitad de concentración de Na₂SO₄, lo que corrobora que este último tipo de salinidad es más tóxico en esta especie hortícola (Mahmoudi et al., 2010). De manera similar, el efecto negativo del Na₂SO₄ también fue mayor al del NaCl en las plántulas de apio. Sin embargo, las plántulas de

canónigo mostraron una inhibición similar bajo estrés por NaCl y Na₂SO₄, en la misma concentración.

Además, la inoculación con los aislados seleccionados, especialmente HUTR05 y GPTR29, dio lugar a incrementos estadísticamente significativos de la longitud aérea y radicular en las plántulas de lechuga y canónigo (de manera más discreta en las de apio, por parte de GPTR29) con respecto al control desarrollado en las mismas condiciones, aunque sin alcanzar los rendimientos obtenidos por el control no estresado. Esto permite comprobar que el inóculo podría influir diferencialmente sobre la mejora del crecimiento vegetal en primeros estadios, en función del tipo de estrés aplicado o la presencia/ausencia de estrés. Por ejemplo, SCPM81 mostró buenos resultados bajo condiciones normales y de estrés salino, pero el efecto en la reducción del estrés por Na₂SO₄ no fue tan marcado. En cambio, la inoculación con HUTR05, que no provocó resultados notables en condiciones no estresadas, destacó al reducir significativamente el estrés por NaCl y Na₂SO₄. Por tanto, estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de analizar el efecto de cada uno de los aislados bajo diferentes condiciones, con el objetivo de lograr obtener bioinoculantes efectivos bajo diversos contextos ambientales y agrícolas.

3. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles en plántulas de lechuga, apio y canónigo.

La producción de compuestos orgánicos volátiles es un mecanismo bacteriano involucrado en las interacciones con otros microorganismos, pero también con organismos superiores, como plantas o nemátodos (Audrain et al., 2015). En el contexto de la interacción planta-bacteria, los VOCs bacterianos actúan como moléculas de señalización capaces de modular los procesos fisiológicos en plantas, pudiendo dar lugar a una mejora de crecimiento vegetal, o mitigar los efectos negativos causados por estreses bióticos y abióticos (Fincheira & Quiroz, 2018; Kanchiswamy et al., 2015). Estos compuestos pueden beneficiar a las plantas al regular su balance hormonal, modular su metabolismo, aumentar la absorción de nutrientes, regular ciertas actividades enzimáticas, alterar la expresión génica, o inducir la respuesta sistémica (Almeida et al., 2023; Cappellari & Banchio, 2019; Fincheira & Quiroz, 2018; Liu et al., 2020b).

En los últimos años el estudio de promoción del crecimiento vegetal o el alivio del estrés mediado por volátiles bacterianos ha adquirido un gran interés. Los trabajos son realizados, principalmente, bajo condiciones controladas de laboratorio, utilizando placas Petri compartimentadas o sistemas similares para evitar el contacto entre bacteria y planta, y

sellándolas con Parafilm para conseguir un ambiente cerrado (Fincheira & Quiroz, 2018). Es importante tener en cuenta que el tipo de inóculo aplicado, las condiciones de crecimiento o la planta objetivo son factores que influyen en los resultados derivados de dicha interacción (Almeida et al., 2023; Fincheira & Quiroz, 2018). Por ello es importante el análisis de cada interacción de manera individual.

En este apartado describimos el efecto de los volátiles producidos por los cuatro aislados seleccionados sobre el crecimiento de plántulas de lechuga, apio y canónigo, así como la capacidad de estos compuestos emitidos por aliviar los efectos del estrés salino (inducido por NaCl y Na₂SO₄) sobre estos cultivos. Para ello, hemos seguido la metodología experimental aplicada de manera habitual en trabajos previos con volátiles bacterianos sobre plantas. Las plántulas fueron expuestas a los volátiles bacterianos, pero sin contacto directo entre planta y bacteria, tomando medidas de las variables longitud de la parte aérea y radicular, y número de raíces secundarias y hojas, a los 5 y 10 DPI.

3.1. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles bajo condiciones no salinas.

Los resultados de la exposición de las plántulas de lechuga a los volátiles emitidos por los cuatro aislados seleccionados aparecen representados en la Figura 55. Los volátiles producidos por el aislado GPTR29 provocaron mejoras estadísticamente significativas con respecto al tratamiento control en las variables longitud de la parte aérea y radicular (5 y 10 DPI), número de raíces secundarias (5 y 10 DPI) y número de hojas (5 DPI), con incrementos de entre un 13,6 % en el número de hojas, a un 73,8 % en el número de raíces secundarias. Los VOCs producidos por HUTR05 no dieron lugar a diferencias significativas en el primer tiempo de medida, pero a los 10 días de crecimiento, las plántulas expuestas a la mezcla de volátiles de esta cepa presentaron una mayor longitud aérea (23,3 %), radicular (26,7 %), y un mayor número de raíces secundarias (53,3 %) que las plántulas del control negativo. Sin embargo, los compuestos volátiles sintetizados por los aislados SCPM31 y SCPM81 no indujeron mejoras con respecto al tratamiento control.

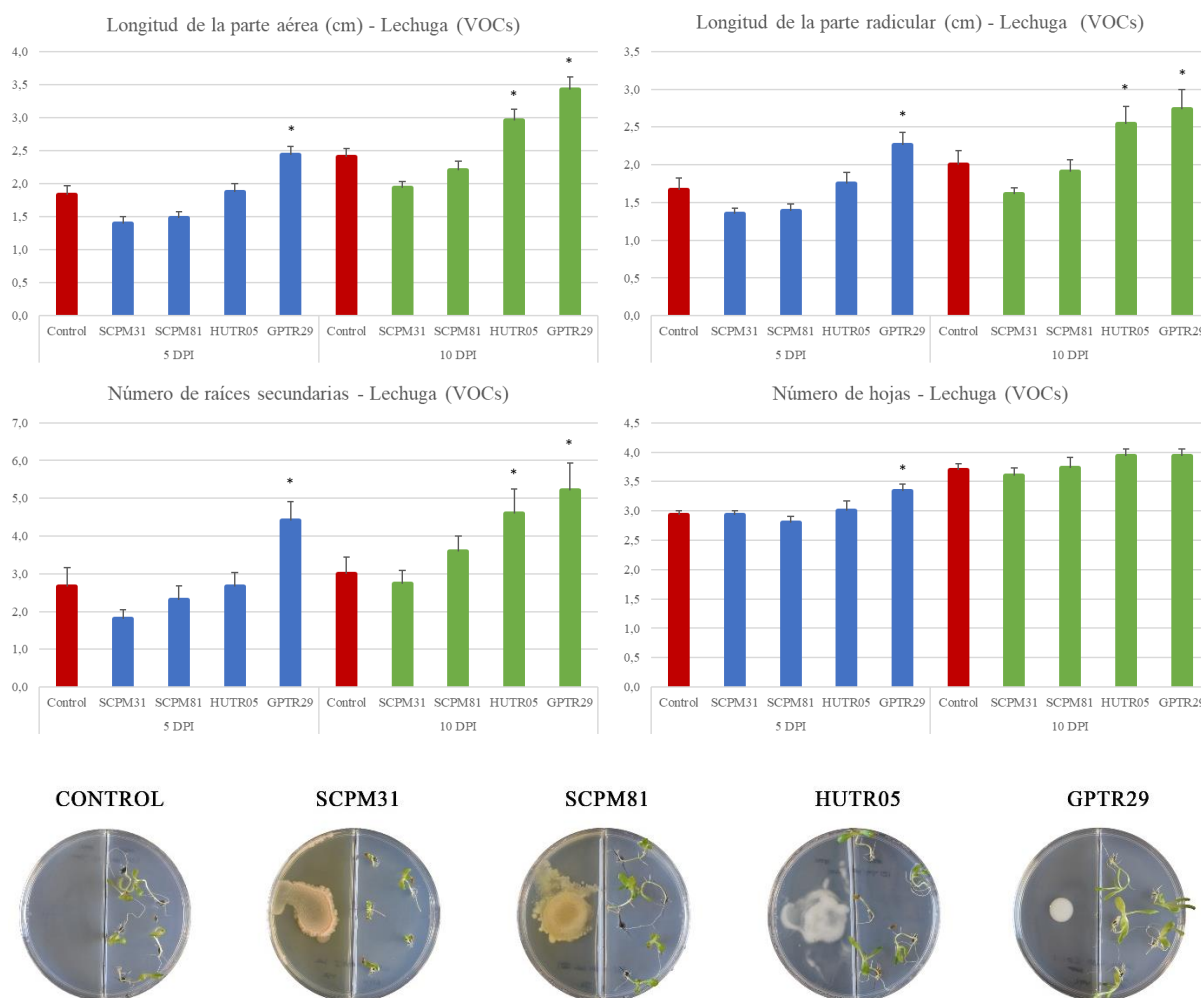


Figura 55: Efectos de la exposición de las plántulas de lechuga a los volátiles emitidos por los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29, e imágenes de los resultados obtenidos a los 10 DPI. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Las plántulas de apio expuestas a los volátiles producidos por los aislados seleccionados exhibieron una respuesta similar a las plántulas de lechuga (Figura 56). Así, los tratamientos expuestos a los compuestos volátiles de HUTR05 y GPTR29 presentaron diferencias significativas con respecto al control negativo en las diferentes variables analizadas. Las longitudes de la parte aérea y radicular mostraron incrementos cercanos al 40 % y 70 %, respectivamente y en ambos tiempos de medida, el número de raíces secundarias aumentó en torno a un 50 % a los 5 DPI, y el número de hojas lo hizo en torno a un 25 % a los 10 DPI. Además, los VOCs producidos por el aislado SCPM81 provocaron un incremento significativo del 55,2 % en el número de raíces secundarias a los 10 DPI, en comparación al control sin exposición a VOCs bacterianos.

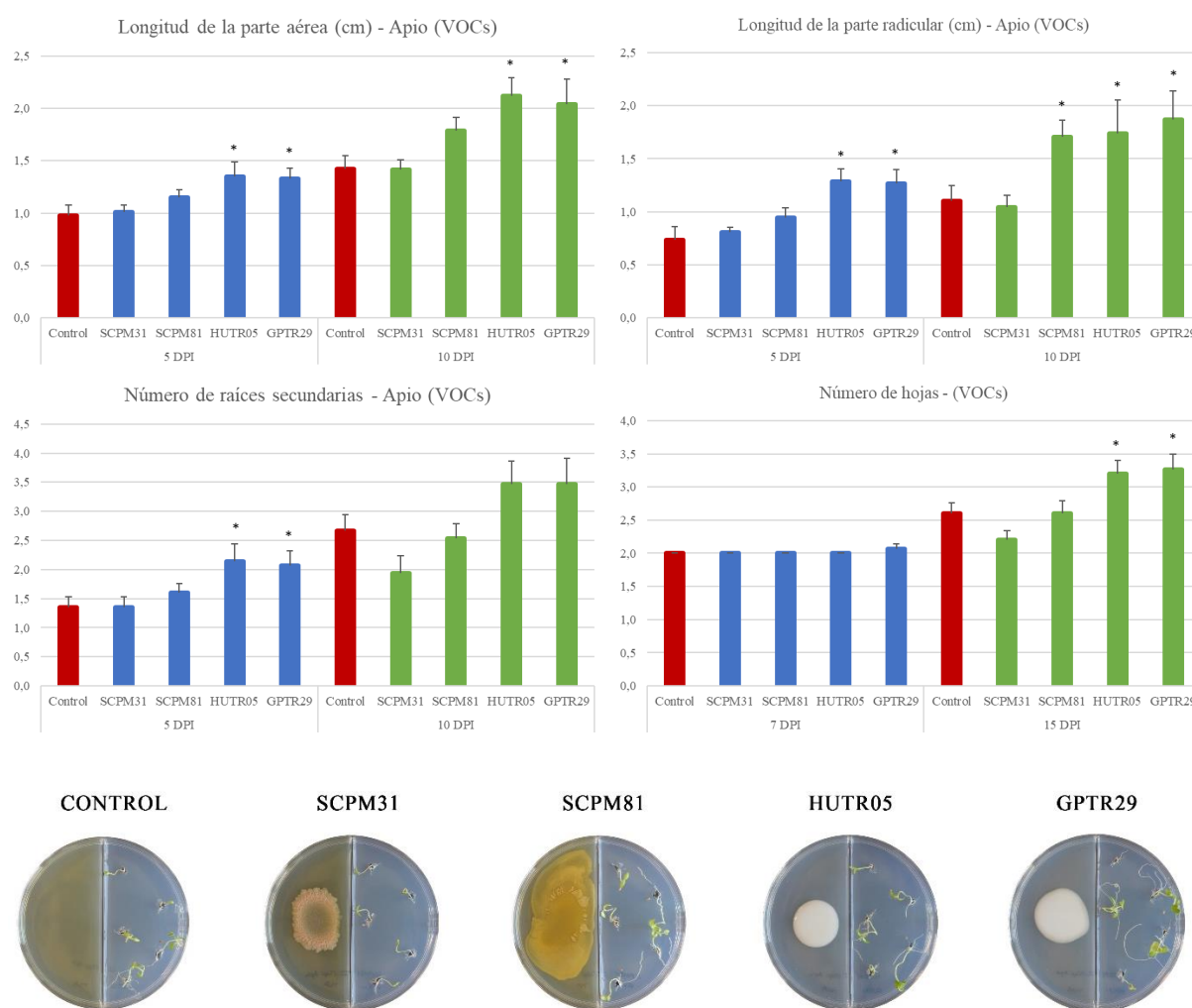


Figura 56: Efectos de la exposición de las plántulas de apio a los volátiles emitidos por los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29, e imágenes de los resultados obtenidos a los 10 DPI. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Los resultados obtenidos en las plántulas de canónigo expuestas a los volátiles bacterianos fueron más prometedores que en el caso de la lechuga y el apio (Figura 57). Las variables longitud de la parte aérea y radicular fueron mejoradas significativamente en ambos tiempos de medida debido a la emisión de VOCs por parte de las cuatro cepas, con incrementos del alrededor del 35 % para la longitud aérea, y de entre el 50 % y 80 % en el caso de la parte radicular. Además, los volátiles emitidos por HUTR05 y GPTR29 también dieron lugar a aumentos significativos en el número de raíces secundarias a 5 (60,0 % y 37,9 %, respectivamente) y 10 DPI (112,1 % y 69,7 %, respectivamente), así como en el número de hojas a 10 DPI (32,7 % y 31,6 %, respectivamente).

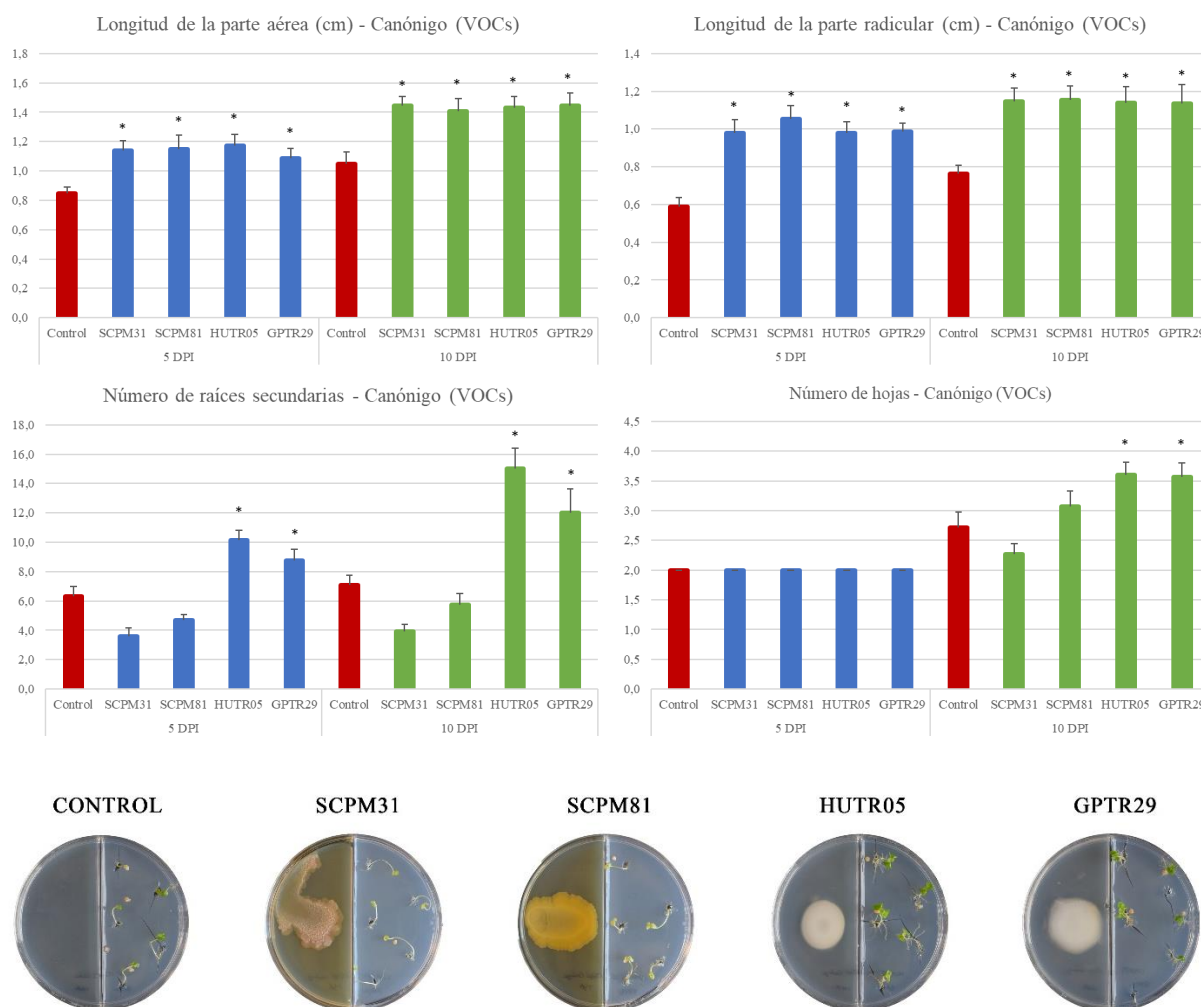


Figura 57: Efectos de la exposición de las plántulas de canónigo a los volátiles emitidos por los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29, e imágenes de los resultados obtenidos a los 10 DPI. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

De manera general, pudimos comprobar la capacidad de los volátiles emitidos por las cepas HUTR05 y GPTR29 por inducir la mejora del crecimiento vegetal de plantas de lechuga, apio y canónigos. Aunque el efecto antagonista sobre fitopatógenos de los volátiles producidos por cepas de *Rhizobium* ya había sido descrito en trabajos previos (Arfaoui et al., 2006; Hemissi et al., 2011; Volpiano et al., 2018), esta tesis doctoral describe por primera vez la capacidad de promoción del crecimiento vegetal de los volátiles emitidos por cepas del género *Rhizobium*. Además, también pudimos observar que la exposición de plántulas de canónigo a los volátiles emitidos por SCPM31 y SCPM81 indujo mejoras en el desarrollo de la parte aérea y radicular. En este sentido, ya ha sido ampliamente demostrado el efecto positivo de los volátiles producidos por bacterias de estos géneros sobre el crecimiento de diversas especies vegetales (Banchio et al., 2009; Cappellari & Banchio, 2019; Henández-León et al., 2015; Park et al.,

2015; Plyuta et al., 2021; Ryu et al., 2003; Xie et al., 2009; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2009).

Trabajos previos realizados con los volátiles sintetizados por una misma cepa bacteriana, *Bacillus amyloliquefaciens* GB03 (previamente identificada como *Bacillus subtilis*), han comprobado que la respuesta de crecimiento depende de la especie vegetal expuesta a estos, y que la respuesta en una misma planta puede variar en función del tiempo de exposición (Banchio et al., 2009; Cappellari & Banchio, 2019; Ryu et al., 2003; Xie et al., 2009; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2009). Esto también ha podido ser corroborado a través de los resultados obtenidos en el presente trabajo. Por ejemplo, los volátiles producidos por HUTR05 indujeron mejoras significativas en la longitud de la parte aérea y radicular, así como en el número de raíces secundarias, de las plántulas de apio y canónigo a los 5 y 10 DPI, sin embargo, estos incrementos solo fueron visibles a los 10 DPI en las plantas de lechuga. De igual manera, las plántulas de canónigo expuestas a los VOCs de SCPM31 y SCPM81 exhibieron mejoras significativas en la longitud aérea y radicular en ambos tiempos de medida, mientras que las plántulas de lechuga y apio no presentaron estos incrementos (excepto la longitud radicular del apio a 14 DPI).

También cabe destacar que el análisis de los resultados permitió determinar que los valores de algunas variables de las plántulas expuestas a los volátiles bacterianos en el quinto día de crecimiento fueron superiores a los obtenidos en el tratamiento control crecido durante 10 días. Lo que demuestra el potencial de estos compuestos como promotores del crecimiento vegetal sobre los primeros estadios de crecimiento de cultivos hortícolas.

3.2. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles bajo salinidad por NaCl.

Está demostrado que la producción de volátiles bacterianos puede mitigar los efectos negativos de la salinidad en plantas (Cappellari & Banchio, 2019; Vaishnav et al., 2015; Vaishnav et al., 2016a; Zhang et al., 2008). Sin embargo, también está comprobado que las condiciones de crecimiento de la bacteria pueden influir en el tipo de compuestos volátiles emitidos (Blom et al., 2011; Cappellari & Banchio, 2019; Vaishnav et al., 2016a). Por tanto, una misma bacteria puede provocar efectos distintos sobre el crecimiento vegetal en función de las condiciones de crecimiento. Por esa razón decidimos analizar la capacidad de los volátiles emitidos por los aislados seleccionados para mitigar el estrés salino por NaCl sobre las plántulas de lechuga, apio y canónigo. La concentración salina aplicada fue la misma que en los ensayos de

inoculación directa sobre las plántulas, 100 mM NaCl para la lechuga y el apio, y 50 mM NaCl para el canónigo. Además, los aislados también fueron sometidos al mismo estrés que las plantas, en sus respectivos medios de cultivo.

Las plántulas de lechuga sometidas a salinidad y expuestas a los volátiles bacterianos mostraron incrementos estadísticamente significativos con respecto al control sin inocular (Figura 58). La longitud de la parte aérea fue incrementada a los 5 DPI gracias los volátiles emitidos por los cuatro aislados, mientras que, a los 10 días de crecimiento, únicamente los compuestos sintetizados por HUTR05 y GPTR29 lograron aumentar significativamente esta variable, con porcentajes de incremento del 20,0 % en todos los casos. La variable longitud radicular presentó mejoras significativas en ambos tiempos de medida y con los cuatro tratamientos con VOCs bacterianos, variando las diferencias entre el 20,0 % y el 33,3 %. Finalmente, el número de raíces secundarias y de hojas aumentó significativamente en las plantas tratadas con los volátiles de HUTR05 y GPTR29 a los 10 DPI, entre un 16,1 % y un 65,4 %.

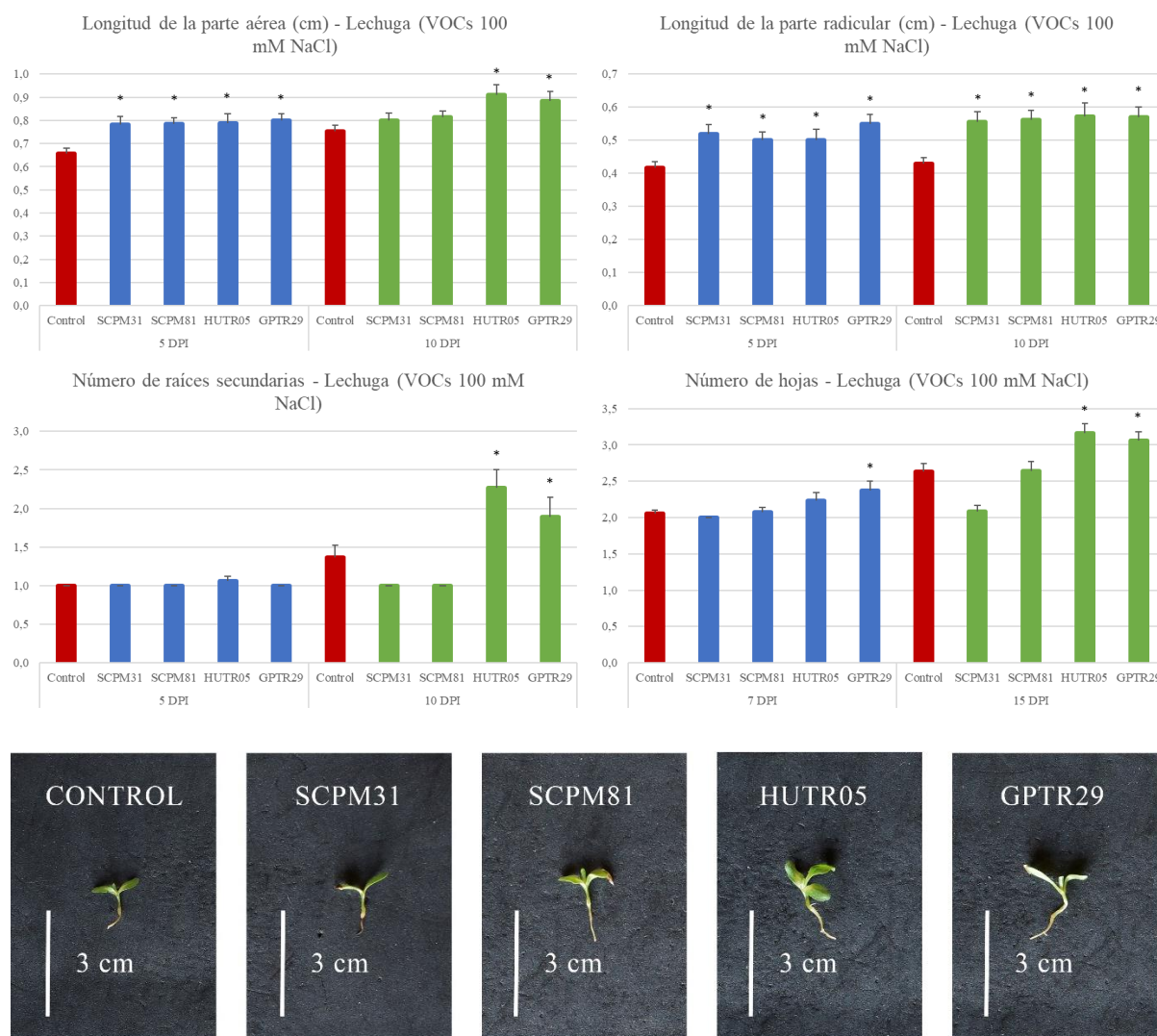


Figura 58: Efectos de la exposición de las plántulas de lechuga a los volátiles emitidos por los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 bajo 100 mM NaCl, e imágenes de los resultados obtenidos a los 10 DPI. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Los resultados obtenidos en las plántulas de apio siguen una dinámica similar a la lechuga (Figura 59). Tanto la longitud aérea como radicular de las plántulas expuestas a los VOCs de SCPM81, HUTR05 y GPTR29 presentaron diferencias significativas a los 5 y 10 días de crecimiento con respecto al control negativo. La parte aérea presentó mejoras cercanas al 20 % en ambas medidas, mientras que la longitud radicular incrementó entre un 38,0 % y 65,7 % a los 5 DPI, y un 24,5 % y 42,5 % a los 10 DPI. Además, los volátiles emitidos por GPTR29 indujeron un aumento significativo del número de raíces secundarias a los 5 (25,0 %) y 10 DPI (77,5 %).

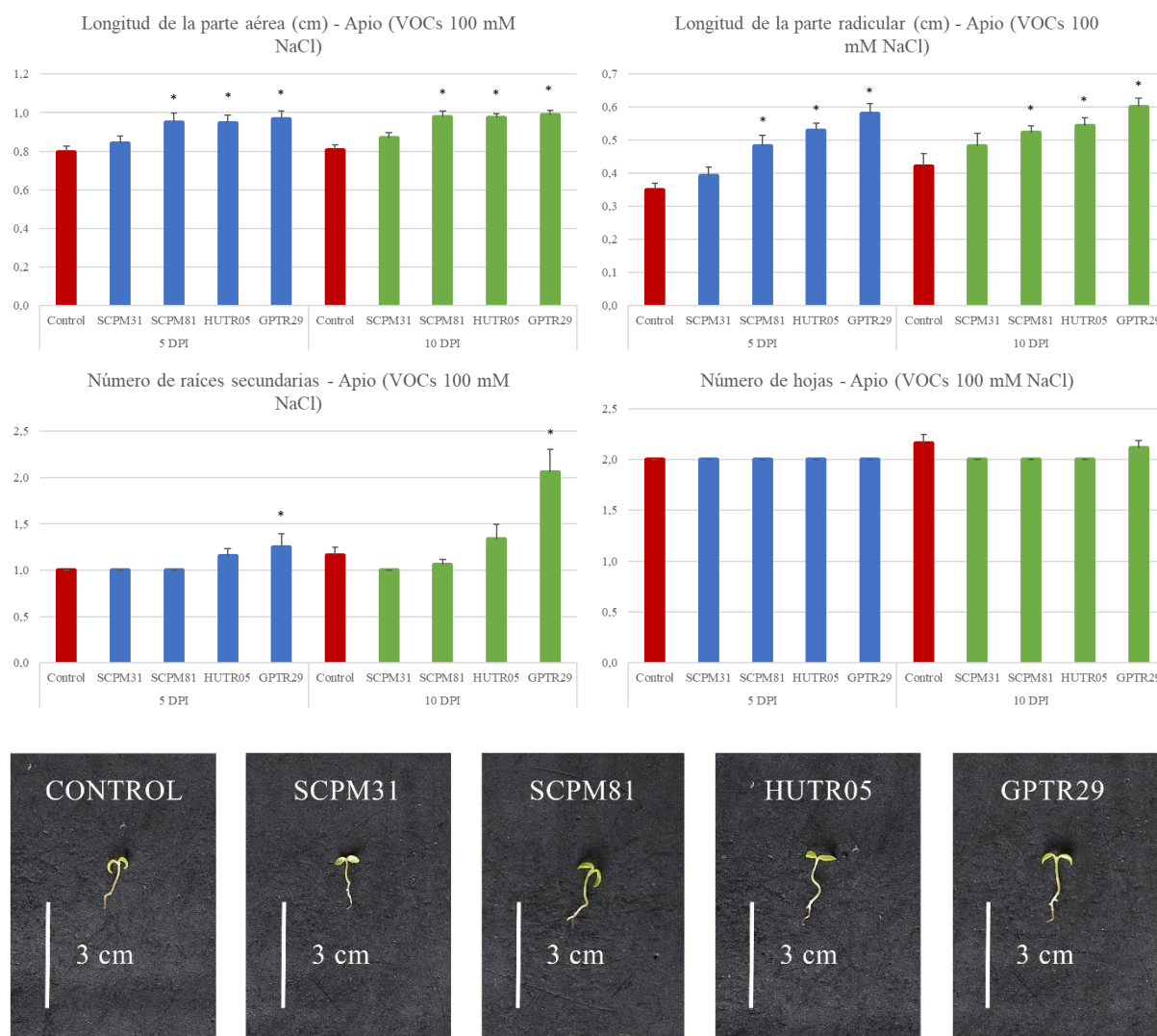


Figura 59: Efectos de la exposición de las plántulas de apio a los volátiles emitidos por los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 bajo 100 mM NaCl, e imágenes de los resultados obtenidos a los 10 DPI. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Por último, las plantas de canónigo analizadas en el presente ensayo también presentaron un comportamiento similar a las de lechuga y apio (Figura 60). La variable longitud de la parte aérea de las plantas expuestas a los VOCs presentó incrementos significativos respecto al tratamiento control, con porcentajes de mejora cercanos al 20 % en los tratamientos con los volátiles de SCPM81 y HUTR05, y al 50 % en aquellos con los de GPTR29, para ambos tiempos de medida. La parte radicular también fue mejorada significativamente por los volátiles de HUTR05 y GPTR29, tanto la longitud como el número de raíces secundarias, con incrementos que variaron entre el 35,7 % y 54,3 % para la primera variable, y entre el 58,9 % y 100,9 % para la segunda, a los 5 y 10 días de crecimiento.

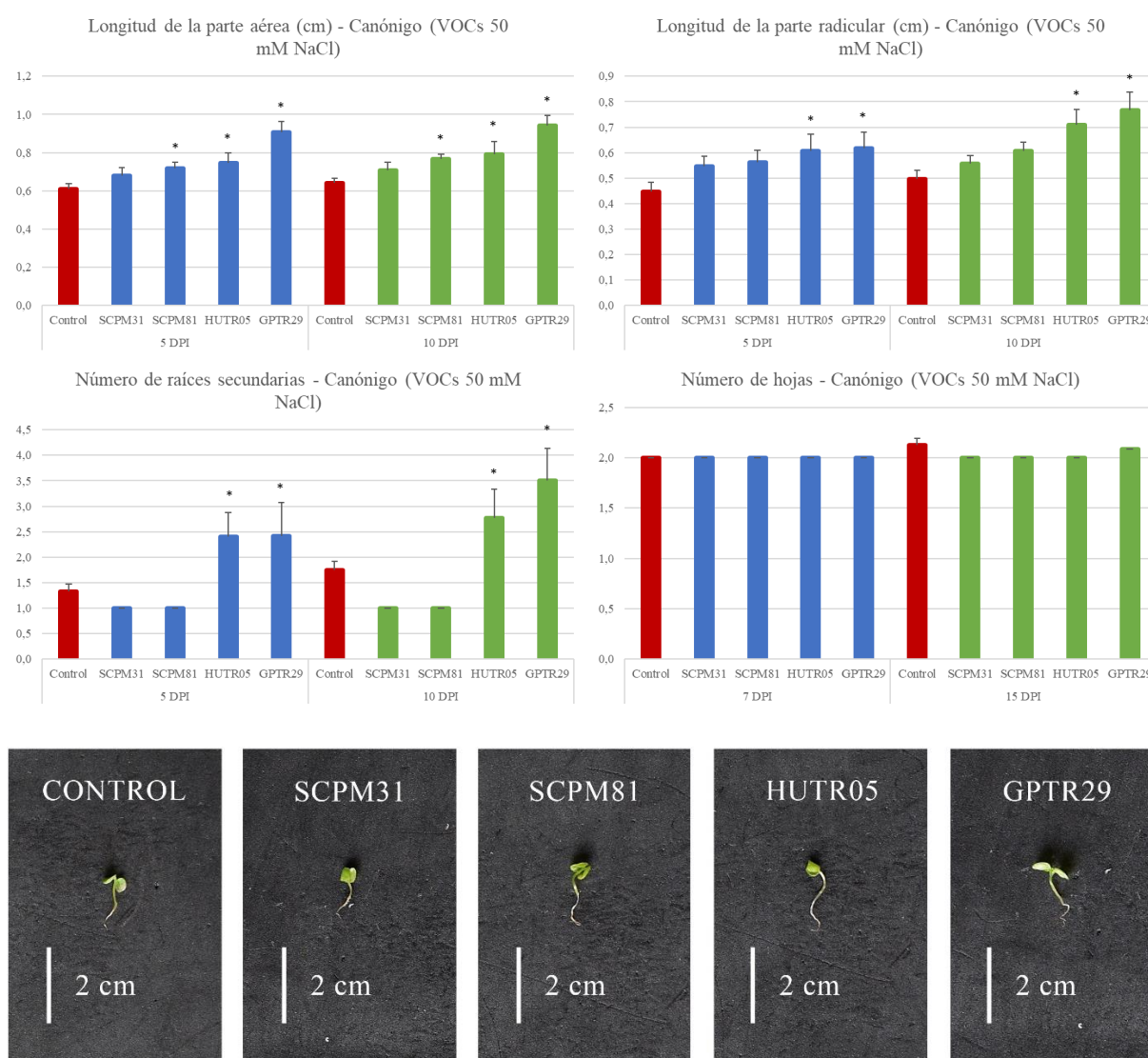


Figura 60: Efectos de la exposición de las plántulas de canónigo a los volátiles emitidos por los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 bajo 50 mM NaCl, e imágenes de los resultados obtenidos a los 10 DPI. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Si comparamos el tamaño de las plántulas obtenidas en el presente ensayo con respecto al ensayo de inoculación directa bajo las mismas condiciones de salinidad, podemos observar una reducción del tamaño de todas las plántulas. Esto es debido al menor número de días de crecimiento en el presente ensayo, ya que el espacio disponible para el desarrollo de las plantas era menor en las placas Petri compartimentadas que en las placas Petri cuadradas. Este menor espacio para el desarrollo de las plántulas, junto con los efectos inhibitorios de la salinidad, también podrían estar dando lugar a las menores diferencias entre el desarrollo a los 5 y a los 10 DPI, si lo comparamos con el ensayo en condiciones normales y, sobre todo, con los ensayos de inoculación directa.

Además, al igual que en los ensayos de VOCs bajo condiciones normales, pudimos observar que los valores de algunas variables en las plántulas expuestas a los volátiles bacterianos y crecidas durante 5 días fueron superiores a los del control negativo crecido durante 10 días. En este sentido, la exposición a compuestos volátiles identificados entre los VOCs producidos por una cepa del género *Pseudomonas* que habían sido aplicados de manera individual provocaba un aumento de la tasa de germinación de semillas de soja en tiempos de medida intermedios, en comparación con los valores obtenidos por el control en el tiempo final de medida, lo que coincide con el comportamiento observado en estos ensayos (Vaishnav et al., 2016a).

Al igual que en el apartado anterior, en este trabajo hemos podido describir por primera vez la capacidad del género *Rhizobium* para mitigar el estrés salino por NaCl en plántulas de cultivos hortícolas, a través de la producción de compuestos volátiles. Esta capacidad ya había sido descrita anteriormente en cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* (Cappellari & Banchio, 2019; Liu et al., 2020b; Vaishnav et al., 2015; Vaishnav et al., 2016a; Zhang et al., 2008).

3.3. Estudio de la promoción del crecimiento vegetal por compuestos orgánicos volátiles bajo salinidad por Na₂SO₄.

Según lo anteriormente expuesto, las condiciones de crecimiento de un microorganismo pueden influir en los compuestos volátiles producidos (Blom et al., 2011; Cappellari & Banchio, 2019; Vaishnav et al., 2016a), lo que hace necesario el estudio de los efectos provocados por los VOCs bacterianos en plantas bajo diferentes condiciones experimentales. En este caso decidimos analizar la capacidad de los volátiles emitidos por los aislados seleccionados para mitigar el estrés salino por Na₂SO₄ sobre las plántulas de lechuga, apio y canónigo. La concentración salina aplicada fue la misma que en los ensayos de inoculación directa sobre las plántulas, 50 mM Na₂SO₄. Además, los aislados también fueron sometidos al mismo estrés que las plantas, en sus respectivos medios de cultivo.

Los resultados de la exposición de las plántulas de lechuga crecidas bajo salinidad por Na₂SO₄ a los volátiles bacterianos están recogidos en la Figura 61. La variable longitud de la parte aérea fue incrementada significativamente por los VOCs emitidos por HUTR05 (10 DPI) y GPTR29 (5 y 10 DPI), entre el 20 % y el 30 %, con respecto al control negativo. Asimismo, la longitud radicular presentó mejoras significativas a los 5 días de crecimiento en todos los tratamientos expuestos a volátiles bacterianos, sin embargo, en el último tiempo de medida, únicamente la exposición a los volátiles de HUTR05 y GPTR29 generó diferencias con respecto al control

negativo, de hasta un 46 %. Las plántulas expuestas a los volátiles de HUTR05 también exhibieron un mayor número de raíces secundarias a los 10 DPI (50,0 %), y de hojas a los 5 DPI (13,1 %), siendo esta última variable también mejorada por los volátiles de GPTR29.

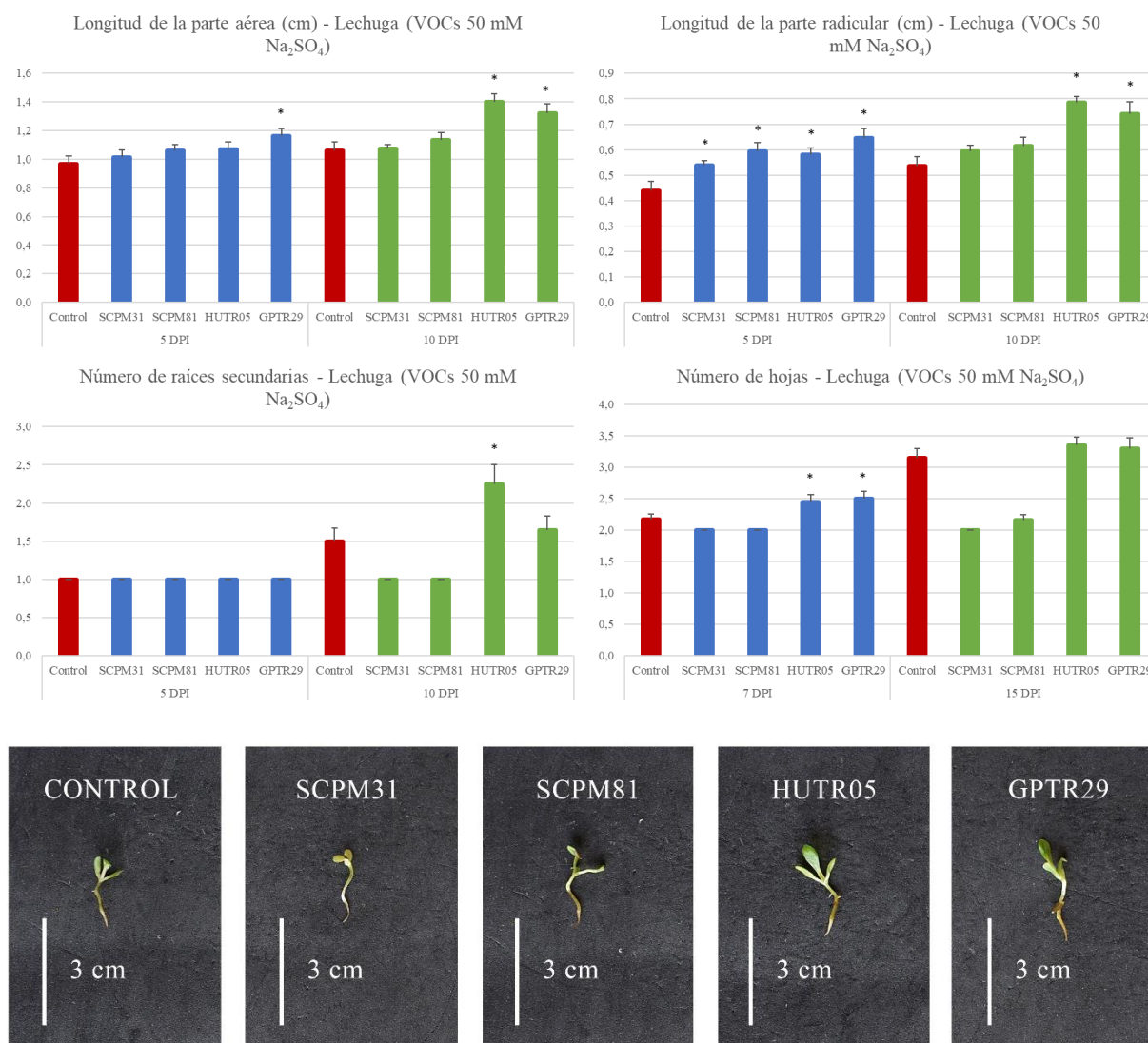


Figura 61: Efectos de la exposición de las plántulas de lechuga a los volátiles emitidos por los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 bajo 50 mM Na₂SO₄, e imágenes de los resultados obtenidos a los 10 DPI. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

De manera similar, los resultados obtenidos en las plántulas de apio demuestran que los volátiles emitidos por HUTR05 y GPTR29 fueron los que indujeron una mejor respuesta frente al estrés por Na₂SO₄ (Figura 62). Tanto la longitud de la parte aérea como de la parte radicular exhibieron incrementos significativos en las plántulas tratadas con estos compuestos frente al control, a los 5 y 10 DPI. Las diferencias porcentuales fueron de entre el 15,0 % y 20,0 % en la parte aérea, y el 21,5 % y 45,0 % en la radicular. Además, los volátiles emitidos por SCPM81

indujeron un aumento significativo del 26,1 % en la longitud radicular en el segundo tiempo de medida.

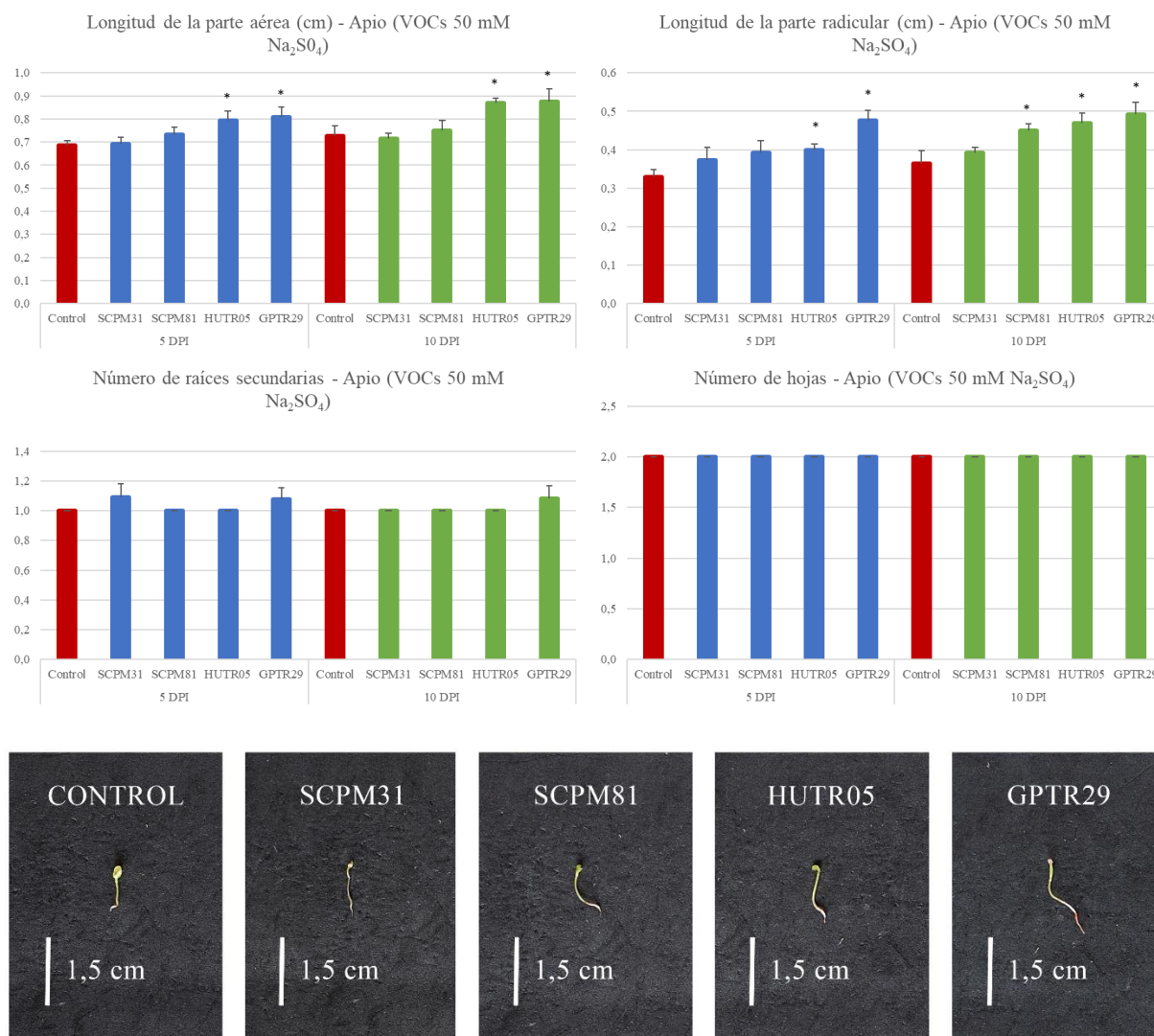


Figura 62: Efectos de la exposición de las plántulas de apio a los volátiles emitidos por los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 bajo 50 mM Na₂SO₄, e imágenes de los resultados obtenidos a los 10 DPI. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Los volátiles emitidos por los cuatro aislados seleccionados lograron ejercer un mayor alivio sobre el estrés salino por Na₂SO₄ en las plántulas de canónigo que en las de lechuga y apio (Figura 63). Las plántulas expuestas a los volátiles de cada una de las cepas exhibieron incrementos significativos de entre el 16,8 % y el 33,1 % en la longitud aérea a los 5 DPI, con respecto al control. Sin embargo, a los 10 días de crecimiento, solo aquellas en contacto con los volátiles de SCPM81, HUTR05 y GPTR29 mostraron diferencias significativas, que fueron superiores al 20 %. En la variable longitud radicular la dinámica fue inversa, a los 5 días los

volátiles de las tres cepas mencionadas previamente dieron lugar a incrementos significativos de entre el 20 % y 30 %. Mientras que, en el segundo tiempo de medida, las plántulas desarrolladas en presencia de los VOCs de los cuatro aislados fueron las que mostraron aumentos significativos cercanos al 35 %. Para finalizar, la exposición a los compuestos de GPTR29 indujo un aumento del 20 % en el número de raíces secundarias a los 5 días.

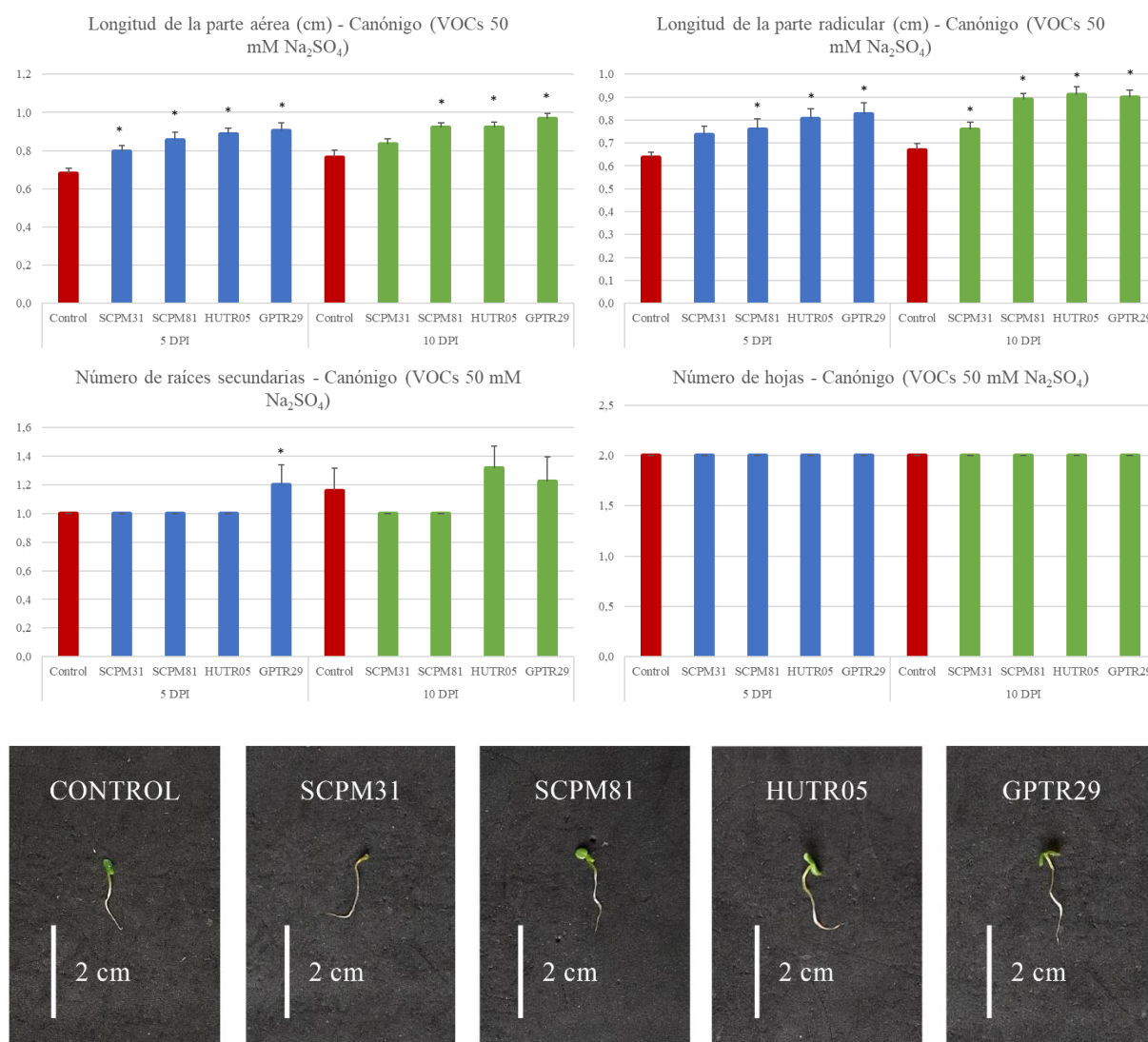


Figura 63: Efectos de la exposición de las plántulas de canónigo a los volátiles emitidos por los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 bajo 50 mM Na₂SO₄, e imágenes de los resultados obtenidos a los 10 DPI. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

En este apartado hemos descrito por primera vez los efectos de los VOCs bacterianos en el alivio del estrés salino inducido por Na₂SO₄. Hasta la fecha, todos los trabajos realizados sobre la capacidad de volátiles bacterianos por reducir los efectos negativos del estrés salino habían sido realizados con NaCl como agente de salinización (Cappellari & Banchio, 2019; Liu et al.,

2020b; Vaishnav et al., 2015; Vaishnav et al., 2016a; Zhang et al., 2008). Sin embargo, los efectos de los volátiles bacterianos en la interacción con plantas dependen de diversos factores, como el tipo de condiciones de crecimiento de la bacteria, que induce cambios en la mezcla de compuestos emitida (Blom et al., 2011; Cappellari & Banchio, 2019; Vaishnav et al., 2016a), o la especie vegetal expuesta a estos compuestos (Banchio et al., 2009; Cappellari & Banchio, 2019; Ryu et al., 2003; Xie et al., 2009; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2009). Por ello, estudiar diferentes tipos de condiciones e interacciones puede resultar en una respuesta diferencial en los efectos fisiológicos ocurridos en la planta, tal y como hemos observado con los ensayos de interacción entre volátiles bacterianos y plantas bajo tres contextos distintos.

Finalmente, estos resultados demuestran los efectos positivos que ejercen los volátiles emitidos por los aislados seleccionados, especialmente SCPM81, HUTR05 y GPTR29, en la promoción del crecimiento vegetal y el alivio del estrés salino por NaCl y Na₂SO₄, mostrando, además, una respuesta similar a la obtenida en los ensayos de inoculación directa. Por tanto, podemos corroborar que la producción de compuestos orgánicos volátiles es un mecanismo de interés en la interacción planta-bacteria, al mejorar el crecimiento de las plántulas de lechuga, apio y canónigo, así como reducir los efectos negativos derivados de la salinidad inducida por NaCl y Na₂SO₄.

4. Análisis del volatiloma de los aislados seleccionados.

El término volatiloma es definido como el conjunto de todos los metabolitos volátiles sintetizados por un organismo (Almeida et al., 2023; Kanchiswamy et al., 2015; Maffei et al., 2011; Tilocca et al., 2020). Los volatilomas bacterianos suelen estar formados por una mezcla heterogénea de compuestos volátiles producidos como parte de su metabolismo central o como resultado de procesos catabólicos (Audrain et al., 2015; Kanchiswamy et al., 2015; Tilocca et al., 2020). Entre los metabolitos emitidos aparecen compuestos pertenecientes a diversas clases moleculares, que incluyen hidrocarburos, alcoholes, ketonas, terpenoides, etc. (Almeida et al., 2023; Audrain et al., 2015; Fincheira & Quiroz, 2018; Tilocca et al., 2020). Los perfiles de los volátiles emitidos varían entre distintos organismos, y aunque pueden compartir compuestos, suelen ser muy específicos, incluso a nivel intraespecífico (Almeida et al., 2023; Heenan-Daly et al., 2021; Schmidt et al., 2015). También es importante destacar que la composición del volatiloma emitido por un mismo microorganismo es muy dinámica, ya que depende de diversos factores, como las condiciones de crecimiento, su fase desarrollo, las condiciones ambientales (temperatura, aireación, luz, humedad, etc.), o la interacción de otros organismos

(Almeida et al., 2023; Fincheira & Quiroz, 2018; Schmidt et al., 2015; Tilocca et al., 2020). Por tanto, la presencia o ausencia de compuestos volátiles con bioactividad en la interacción planta-bacteria depende, en gran medida, de las condiciones de crecimiento, lo que puede provocar que ante diferentes contextos agrícolas o ambientales un mismo microorganismo pueda o no ejercer un efecto positivo en dicha interacción (Kanchiswamy et al., 2015).

En el presente apartado detallamos el análisis del volatiloma o perfil de volátiles emitidos por los aislados seleccionados bajo diferentes condiciones de crecimiento, determinado mediante HS-SPME-GC-MS, una metodología ampliamente usada en trabajos previos (Almeida et al., 2023; Cappellari & Banchio, 2019; Liu et al., 2020b; Vaishnav et al., 2016a). Solo fueron considerados aquellos compuestos que no estaban presentes en los perfiles cromatográficos de los respectivos controles para cada tipo de condición. La determinación de los volátiles emitidos por las cepas fue realizada tanto en condiciones normales de crecimiento (0 mM NaCl) como bajo crecimiento en condiciones salinas (100 mM NaCl). Estos análisis fueron llevados a cabo en la Universidad de Oporto, en colaboración con el grupo de investigación de Paula Guedes de Pinho (UCIBIO/REQUIMTE).

El perfil de volátiles producidos por *Pseudomonas* sp. SCPM31 aparece recogido en la Tabla 44. Teniendo en cuenta ambas condiciones de crecimiento, detectamos un total de 37 compuestos volátiles, pertenecientes a 15 clases químicas diferentes: pirazoles, alcanos, cetonas, acetatos, furanos, ciclohexanos, alcoholes, aldehídos, alquenos, terpenos, valeratos, alquinos, lactonas, tiofenos, y quinolonas. El grupo de compuestos más abundante fueron los alcoholes, con ocho representantes, seguidos por los alcanos y las cetonas, con seis y cinco, respectivamente. Además, el análisis del volatiloma de SCPM31 mostró una respuesta diferencial entre las condiciones de crecimiento normales y salinas. En las muestras no estresadas identificamos 18 VOCs, de los cuales 16 también estaban presentes en las condiciones de crecimiento salinas. Únicamente los volátiles 4,5-Dihidro-4-(2-metil-3-metilenobut-4-il)-2(3H)-furanona y 3-metilquinolina fueron detectados bajo condiciones 0 mM NaCl. El tratamiento 100 mM NaCl presentó un perfil de volátiles conformado por 35 compuestos, de los cuales 19 habían sido producidos exclusivamente bajo estas condiciones de estrés.

La comparación entre los resultados obtenidos en este trabajo con estudios previos demuestra que, a pesar de haber ciertas similitudes con los volátiles producidos por otras cepas del género *Pseudomonas* (como el 1-octanol, o derivados del butano o ciclohexano), el perfil de

compuestos emitidos varía de manera notable entre cepas de diferentes especies del mismo género (Gil et al., 2023; Sheoran et al., 2015; Vaishnav et al., 2016a). Asimismo, Al-Rashdi y colaboradores (2023) también han comprobado la respuesta diferencial entre los volátiles emitidos bajo condiciones de crecimiento salinas y no salinas, al igual que ocurre en esta tesis doctoral.

Tabla 44: Perfil de volátiles producido por el aislado *Pseudomonas* sp. SCPM31 bajo condiciones de crecimiento normales (0 mM NaCl) y salinas (100 mM NaCl), y analizado mediante GC-MS. RT = tiempo de retención; n.d. = no detectado.

Compuesto	RT (min)	Identificador (m/z)	R match	Área (10 ⁷)	
				0 mM NaCl	100 mM NaCl
Pirazoles					
6,6-Dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-one	2,542	41, 42, 56, 57	869	2,4	5,3
Alcanos					
3-Methylhexane	2,638	43, 55, 56, 70	917	n.d.	3,5
Isobutane	3,364	43	831	n.d.	3,0
2,5-Dimethylheptane	8,736	41, 56, 57	825	n.d.	8,6
2,3,5-Trimethylheptane	9,4	41, 56, 57	829	n.d.	1,5
4-Ethyldecane	9,798	41, 43, 55, 57, 69, 71	850	n.d.	1,2
4-Methyldecane	10,16	41, 43, 55, 57, 70, 71	876	2,2	5,3
Cetonas					
2-pentanone	2,763	43	893	3,2	7,8
1-Mercapto-2-propanone	3,09	43	886	0,5	2,9
4-Methyl-4-penten-2-one	3,753	43	866	n.d.	5,8
4-Undecanone	17,848	41, 43, 55, 58, 73	778	n.d.	0,8
2-Undecanone	18,396	41, 43, 58, 71	946	409,8	451,9
Acetatos					
Methylthioacetate	2,913	43	867	55,0	48,0
Furanos					
2,5-Dimethylfuran	3,098	43, 45	737	n.d.	1,2
4,5-Dihydro-4-(2-methyl-3-methylenebut-4-yl)-2(3H)-furanone	13,912	55, 70	772	0,4	n.d.
3-Phenylfuran	16,431	63, 115, 144	893	0,3	0,3

Ciclohexanos					
Methylcyclohexane	3,276	41, 42, 55, 83	775	1,0	1,3
Alcoholes					
3-Methyl-1-butanol	3,435	41, 43, 55, 70	876	25,5	57,0
2-Methyl-1-butanol	3,486	41, 42, 43, 57, 70	819	n.d.	5,4
1-Octanol	12,034	41, 42, 55, 56, 69	856	n.d.	14,1
2-Nonanol	12,98	41, 45	931	260,9	873,4
5-Methyl-2-heptanol	14,851	43, 44, 45, 69	798	n.d.	0,1
2,4-Decadien-1-ol	15,992	42, 43, 55, 77, 83, 98	784	n.d.	0,2
3-Decyn-2-ol	18,086	43, 45, 67, 70	820	19,0	57,1
2-Undecanol	18,67	43, 45	943	95,3	21,4
Aldehídos					
2-Nonenal	5,361	43, 55, 69, 207	825	n.d.	1,2
Trans-Dodec-5-enal	22,975	43, 54, 81	852	67,7	75,6
Alquenos					
2-Decenal	6,475	41, 43, 55, 70	699	n.d.	0,9
1-Dodecene	12,697	41, 42, 55, 56, 57, 70, 83	914	225,2	607,7
1-Nonene	14,994	41, 42, 43, 55, 57, 70	861	7,4	4,4
Terpenos					
α -Pinene	7,969	41, 77, 92, 93	920	1,5	2,1
Valeratos					
Allyl isovalerate	8,181	41, 43, 57, 85	777	n.d.	16,3
Alquinos					
1-Dodecyne	12,511	41, 43, 53, 54, 67, 79	856	n.d.	5,1
1-Undecyne	23,475	41, 45, 54, 67, 79, 81, 95	833	n.d.	6,3
Lactonas					
5-Heptyldihydrofuran-2(3H)-one	17,309	41, 43, 61, 81, 85	582	n.d.	0,1
Tiofenos					
2-Heptylthiophene	20,391	41, 97, 98	729	n.d.	0,1
Quinolinas					
3-Methylquinoline	20,566	115, 143	880	0,4	n.d.

Tras el análisis del volatiloma de *Priestia megaterium* SCPM81, identificamos un total de 30 compuestos volátiles, pertenecientes a 17 clases químicas diferentes: acetatos, cetonas, tioles, ciclohexanos, alcoholes, sulfuros, alquenos, valeratos, butiratos, ésteres, terpenos, epóxidos, aldehídos, alcanos, lactonas, bencenodiolos, y aminas (Tabla 45). De igual manera, el grupo más abundante fue el de los alcoholes, con 8 compuestos distintos, seguido de los alcanos y valeratos, con 3 representantes cada uno. También pudimos observar una respuesta diferencial entre los volátiles emitidos por SCPM81 bajo condiciones de crecimiento normales y salinas. En las condiciones de 0 mM NaCl, únicamente detectamos 6 compuestos volátiles: metiltioacetato, isoforona, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-decyn-2-ol, y disulfuro de dimetilo. Todos ellos también estaban presentes entre los volátiles emitidos en salinidad por NaCl, excepto la isoforona y el 2-metil-1-butanol. En el caso del crecimiento en 100 mM NaCl, el aislado SCPM81 emitió 28 compuestos distintos, 24 de los cuales no fueron detectados bajo condiciones normales de crecimiento.

Otros trabajos previos ya han descrito el perfil de volátiles emitidos por cepas del género *Bacillus*, incluso en condiciones de salinidad (Capellari & Banchio, 2019; Liu et al., 2018; Liu et al., 2020b; Massawe et al., 2018). Al igual que ocurría con la cepa SCPM31, hemos podido identificar similitudes entre los volátiles emitidos por SCPM81 y otros aislados taxonómicamente cercanos: acetona, α -pineno, o derivados del ciclohexano y del ácido butanóico. Sin embargo, el perfil de volátiles emitidos era dependiente de la cepa analizada en cada trabajo (Capellari & Banchio, 2019; Liu et al., 2018; Liu et al., 2020b; Massawe et al., 2018).

Tabla 45: Perfil de volátiles producido por el aislado *Priestia megaterium* SCPM81 bajo condiciones de crecimiento normales (0 mM NaCl) y salinas (100 mM NaCl), y analizado mediante GC-MS. RT = tiempo de retención; n.d. = no detectado.

Compuesto	RT (min)	Identificador (m/z)	R match	Área (10 ⁷)	
				0 mM NaCl	100 mM NaCl
<i>Acetatos</i>					
Ethyl acetate	2,135	43	914	n.d.	4,9
Methylthioacetate	2,93	43	874	2,5	2,6
<i>Cetonas</i>					
Acetone	2,404	43	947	n.d.	2,3
Isophorone	13,475	82	1124	93,6	n.d.
<i>Tioles</i>					

2-Methyl-1-propanethiol	2,913	43, 45	738	n.d.	6,3
Ciclohexanos					
Methylcyclohexane	3,275	41, 42, 55, 56, 83	803	n.d.	1,8
Alcoholes					
3-Methyl-1-butanol	3,437	41, 43, 55, 70	878	50,6	42,0
2-Methyl-1-butanol	3,492	41, 55, 56, 70	837	5,6	n.d.
5-Methyl-3-hexanol	5,422	42, 43, 59, 60	724	n.d.	1,0
3-Pentanol	5,442	41, 43, 59	753	n.d.	3,1
(3E)-2,7-Dimethyl-3,6-octadien-2-ol	13,796	43	675	n.d.	0,5
2-Butyl-1-octanol	16,987	43, 55, 57	791	n.d.	0,9
3-Decyn-2-ol	18,08	43, 45, 67, 70	774	0,1	0,6
Sulfuros					
Dimethyl disulfide	3,567	45, 46, 79, 94	894	6,5	41,9
Alquenos					
(E)-4,4-Dimethyl-2-pentene	4,529	42, 43, 55, 60, 83	838	n.d.	0,9
4-Ethyl-1-hexene	5,404	41, 43, 55, 59	790	n.d.	1,5
Valeratos					
Valeric acid	4,697	41, 55, 60, 73	748	n.d.	1,0
Isovaleric acid	6,017	41, 42, 45, 60, 74, 87	774	n.d.	4,4
Allyl isovalerate	8,178	41, 43, 57, 85	787	n.d.	6,9
Butiratos					
2-Methylbutanoic acid	6,185	41, 45, 57, 74	865	n.d.	18,5
Ésteres					
Isoamyl acetate	6,424	43, 55, 70	824	n.d.	1,3
Terpenos					
α -Pinene	7,975	41, 77, 92, 93	920	n.d.	1,7
Epóxidos					
2-Methyl-2-propyloxirane	8,196	43, 45, 85	749	n.d.	0,4
Aldehídos					
Benzaldehyde	8,894	43, 50, 55, 57, 77, 106	852	n.d.	0,5
Alcanos					
4-Methyldecane	10,166	41, 43, 55, 57, 70, 71	847	n.d.	0,2

2,4,6-Trimethylheptane	10,52	41, 43, 56, 85	840	n.d.	4,8
2,3-Dimethyldecane	13,328	41, 55, 70	833	n.d.	0,5
Lactonas					
5-Heptyldihydro-2(3H)-furanone	10,612	41, 43, 56, 57, 73, 85	696	n.d.	0,8
Bencenodiolos					
4-Ethylresorcinol	12,542	43, 123, 138	783	n.d.	0,1
Aminas					
Butylamine	21,97	43, 44/73	744	n.d.	0,1

Mediante la metodología HS-SPME-GC–MS, detectamos un total de 14 compuestos volátiles producidos por el aislado *Rhizobium laguerreae* HUTR05, en ambas condiciones de crecimiento (Tabla 46). Los VOCs identificados estaban agrupados en 6 clases químicas diferentes: ésteres, sulfuros, alcoholes, cetonas, terpenos, y alcanos. Las cetonas y los alcoholes fueron los grupos más representados, con 4 y 3 compuestos, respectivamente. Del total de compuestos, solo 8 estaban presentes en las condiciones de crecimiento normales (0 mM NaCl), mientras que únicamente la isoforona no fue detectado entre las emisiones derivadas del estrés salino.

De igual manera, identificamos 12 compuestos volátiles en las emisiones de *Rhizobium* sp. GPTR29, pertenecientes a 8 clases químicas: amidas, pirazoles, alcanos, cetonas, alcoholes, sulfuros, terpenos, y tioéteres (Tabla 47). Al igual que en el resto de los aislados, el grupo de los alcoholes presentaba mayor abundancia, con 3 compuestos. Todos los volátiles detectados habían sido emitidos bajo crecimiento en 100 mM NaCl, mientras en condiciones normales de crecimiento solo fueron detectados 7 de los 12 compuestos.

Aunque hay diversos trabajos que han estudiado el efecto antagonista de volátiles producidos por cepas del género *Rhizobium* sobre fitopatógenos (Arfaoui et al., 2006; Hemissi et al., 2011; Volpiano et al., 2018), hasta la fecha el único estudio que ha analizado el metaboloma volátil de una cepa de este género ha sido realizado por Cardoso y colaboradores (2017). Además, otros trabajos también han identificado los volátiles producidos por otras especies filogenéticamente cercanas, así como su relación en la interacción planta-bacteria, como cepas del género *Ensifer* (Orozco-Mosqueda et al., 2013; Soto et al., 2021). Sin embargo, esta es la primera vez que ha sido descrito el perfil de volátiles producidos por bacterias de este género bajo condiciones de salinidad por NaCl. Entre los volátiles producidos por HUTR05 y GPTR29

encontramos 3-metil-1-butanol, α -pineno, 2-heptanona, o 2-nonanona, también presentes entre los emitidos por otros aislados de los géneros *Rhizobium* y *Ensifer* (Cardoso et al., 2017; Orozco-Mosqueda et al., 2013).

Tabla 46: Perfil de volátiles producido por el aislado *Rhizobium laguerreae* HUTR05 bajo condiciones de crecimiento normales (0 mM NaCl) y salinas (100 mM NaCl), y analizado mediante GC-MS. RT = tiempo de retención; n.d. = no detectado.

Compuesto	RT (min)	Identificador (m/z)	R match	Área (10 ⁷)	
				0 mM NaCl	100 mM NaCl
<i>Ésteres</i>					
S-Methyl propanethioate	4,543	45, 57	909	9,2	24,6
S-Methyl 3-methylbutanethioate	8,165	41, 43, 57, 85	966	263,2	224,0
3-Octyl acetate	15,035	41, 43, 69	759	n.d.	0,4
<i>Sulfuros</i>					
2-Methyl-3-methylsulfanylbutane	5,717	41, 43, 71	768	11,4	8,9
<i>Alcoholes</i>					
2-Methyl-1-pentanol	5,894	41, 43, 55	817	n.d.	5,9
3-Decyn-2-ol	18,089	42, 43, 45, 67	789	0,5	0,2
2-Decanol	18,665	41, 45, 69	861	n.d.	0,9
<i>Cetonas</i>					
2-Heptanone	6,751	43, 58	821	2,1	1,43
6-Methylheptan-2-one	7,909	43	747	n.d.	1,93
2-Nonanone	12,628	41, 43, 69	858	8,12	1,87
Isophorone	13,473	82	928	89,1	n.d.
<i>Terpenos</i>					
α-Pinene	7,971	43, 77, 93	870	2,49	1,17
<i>Alcanos</i>					
2,3,5,8-Tetramethyldecane	10,277	41, 43, 55, 57, 71	844	n.d.	6,75
Undecane	19,219	41, 43, 55, 57, 69, 71, 85	848	n.d.	1,71

Tabla 47: Perfil de volátiles producido por el aislado *Rhizobium* sp. GPTR29 bajo condiciones de crecimiento normales (0 mM NaCl) y salinas (100 mM NaCl), y analizado mediante GC-MS. RT = tiempo de retención; n.d. = no detectado.

Compuesto	RT (min)	Identificador (m/z)	R match	Area (10 ⁷)	
				0 mM NaCl	100 mM NaCl
Amidas					
2-Methylpropionamide	2,17	59	726	n,d	3,94
Pirazoles					
6,6-Dimethyltetrahydro-2H-pyran-2-one	2,54	56	854	n,d	4,83
Alcanos					
3-Methylhexane	2,64	55, 56	895	n,d	2,38
Cetonas					
3-Pentanone	2,88	57	871	3,17	6,62
5-Methyl-3-hexanone	5,36	57	855	1,75	5,75
Alcoholes					
3-Methyl-1-butanol	3,44	55, 70	825	3,28	6,57
2-Methyl-1-butanol	3,49	57	864	1,96	4,22
2-Ethyl-4-methylpentan-1-ol	10,83	55, 57	786	0,69	2,1
Sulfuros					
2,4-Dithiapentane	6,74	58, 61, 108	804	n,d	1,07
Benzyl methyl sulfide	14,78	65, 91	785	n,d	0,27
Terpenos					
α-Pinene	7,98	77, 93	887	0,79	2,05
Tioéteres					
2-Methyl-3-(methylthio)furan	8,35	53, 69, 99, 113	885	0,24	1,66

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que las condiciones de crecimiento influían en el volatiloma bacteriano, ya que todos los aislados presentaban diferencias en el perfil de volátiles emitido bajo condiciones de crecimiento normal (0 mM NaCl) y salino (100 mM NaCl). Además, sugirieron que la salinidad podría dar lugar a un aumento del número de metabolitos emitidos. En este sentido, está comprobado que las condiciones de crecimiento, incluida la composición del medio de cultivo, influyen en la mezcla de volátiles bacterianos

emitida (Blom et al., 2011; Heenan-Daly et al., 2021), y que la variable salinidad también afecta a la síntesis de estos compuestos (Cappellari & Banchio, 2019; Yusnawan et al., 2021).

También pudimos comprobar que el perfil de volátiles emitido era dependiente de la cepa bacteriana utilizada (Almeida et al., 2023; Heenan-Daly et al., 2021; Schmidt et al., 2015). El número de metabolitos volátiles producidos fue más alto en los aislados identificados dentro de los géneros *Pseudomonas* y *Priestia* que en el caso de los pertenecientes al género *Rhizobium*. Así, la variabilidad en la producción de metabolitos volátiles entre las cepas de diferentes géneros bacterianos podría ser atribuida a las diferencias en el metabolismo secundario característico de cada grupo taxonómico (Tyc et al., 2017). Es ampliamente reconocido en la literatura científica que los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* tienen un metabolismo secundario muy diverso y activo, lo que podría explicar los resultados obtenidos en este trabajo (Kai, 2020; Shahid et al., 2018). Sin embargo, a pesar de la mayor diversidad de volátiles producidos por SCPM31 y SCPM81, fueron los VOCs emitidos por HUTR05 y GPTR29 los que indujeron mayores efectos positivos sobre el crecimiento y el alivio del estrés salino de las plántulas de lechuga, apio, y canónigo.

Entre los compuestos detectados encontramos algunos presentes en el volatiloma de varias de las cepas analizadas. Por ejemplo, el α -pineno fue el único compuesto identificado en todos los aislados. Los alcoholes 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol estaban presentes en el volatiloma de SCPM31, SCPM81 y GPTR29, en cambio el 3-decin-2-ol, únicamente no fue detectado entre los volátiles de GPTR29. Algunos de estos compuestos han sido descritos por su bioactividad en plantas, al generar efectos positivos sobre el crecimiento o la fotosíntesis, inducir la tolerancia a estreses bióticos o abióticos, así como provocar cambios metabólicos, transcripcionales y proteómicos en las plantas (Gámez-Arcas et al., 2022). En este sentido, los monoterpenos, como el α -pineno tienen importantes funciones quimio-ecológicas en las plantas y, además, ha sido descrita su capacidad para estimular el crecimiento de las raíces, la germinación y la respiración mitocondrial en el maíz en concentraciones de 0,05 a 1,0 mM (Abraham et al., 2000). De igual manera, los alcoholes de cadena ramificada 3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol fueron encontrados entre los VOCs emitidos por diversas cepas bacterianas, y podrían estar ejerciendo una función similar al 2,3-butanodiol en la promoción del crecimiento vegetal de *Arabidopsis*, o dando lugar a una mejora de la absorción de hierro en plantas de *Medicago truncatula* (Farag et al., 2006; Orozco-Mosqueda et al., 2013). También ha sido comprobada la bioactividad de la 3-hexanona y sus derivados metilados, así como el disulfuro de dimetilo, sobre la promoción del crecimiento vegetal de *Arabidopsis* (Groenhausen

et al., 2013). Por último, volátiles como el ciclohexano o el undecano han sido identificados entre los compuestos emitidos por una cepa del género *Bacillus*, los cuales presentaban capacidad de inhibición de los efectos negativos de la salinidad sobre plantas de *Mentha piperita* L. (Cappellari & Banchio, 2019). Sin embargo, es importante tener en cuenta que los efectos de los volátiles bacterianos están asociados con la composición de la mezcla, y no siempre pueden tener el mismo efecto en la promoción del crecimiento y la tolerancia al estrés en plantas (Cappellari & Banchio, 2019; Farag et al., 2006).

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto la relación existente entre la mezcla de volátiles producidos por los aislados *Pseudomonas* sp. SCPM31, *Priestia megaterium* SCPM81, *Rhizobium laguerreae* HUTR05, y *Rhizobium* sp. GPTR29, y los efectos positivos provocados sobre la promoción del crecimiento vegetal y la tolerancia al estrés salino en plántulas de lechuga, apio y canónigo. Y, además, hemos descrito por primera vez el perfil de volátiles de dos cepas del género *Rhizobium* bajo condiciones de salinidad por NaCl, así como los efectos positivos de estos volátiles sobre el crecimiento vegetal de varios cultivos hortícolas de interés agronómico, y la mitigación del estrés salino inducido por NaCl y Na₂SO₄.

CAPÍTULO IV

Análisis funcional y molecular de la inoculación con los aislados seleccionados sobre la promoción del crecimiento vegetal, la mitigación del estrés salino, y la mejora nutracéutica de los cultivos de lechuga, apio y canónigo.

La salinidad del suelo es una de las principales causas de estrés abiótico en plantas, ya que provoca efectos negativos sobre la germinación, el desarrollo vegetativo y reproductivo (Ilangumaran & Smith, 2017). En el contexto agrícola, esta problemática es traducida en una reducción del rendimiento de los cultivos, que puede llegar a ser superior al 40 % en comparación con condiciones no salinas (Munns & Rawson, 1999; Qadir et al., 2014; Shrivastava & Kumar, 2015; Tripathi, 2009). Por tanto, la búsqueda de alternativas capaces de reducir el impacto de las condiciones ambientales adversas sobre la agricultura, maximizando a su vez el uso de los recursos de una manera sostenible, es considerado un aspecto prioritario en investigación. En este sentido, la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) ha emergido en los últimos años como una estrategia de especial interés, gracias a su potencial para aumentar la productividad y el rendimiento agrícola, aliviar o mitigar las condiciones ambientales adversas en plantas, e incluso, mejorar las propiedades nutraceuticas de los cultivos (Ayuso-Calles et al., 2021; Flores-Félix et al., 2018; García-Fraile et al., 2015; Ilangumaran & Smith, 2017; Jiménez-Gómez et al., 2021). La tendencia predominante en las investigaciones sobre PGPBs consiste en integrar el análisis de los efectos inducidos por la inoculación bacteriana sobre las plantas, con estudios ómicos destinados a profundizar en los mecanismos subyacentes de la interacción entre la planta y la bacteria, los cuales contribuyen a la respuesta fenotípica observada (Chen et al., 2022; Flores-Félix et al., 2021). Además, la creciente demanda de alimentos con propiedades nutraceuticas precisa que la aplicación de bioinoculantes no solo de lugar a aumentos en el rendimiento de los cultivos, sino que también provoque mejoras del contenido en compuestos bioactivos en las plantas, que puedan ejercer un efecto positivo en la salud del consumidor (Flores-Félix et al., 2018; Melini et al., 2023).

Por ello, en este capítulo describimos el análisis del efecto de la inoculación con los cuatro aislados seleccionados en la promoción del crecimiento vegetal y el alivio del estrés salino, por NaCl y Na₂SO₄, de plantas de lechuga, apio y canónigo crecidas en condiciones de invernadero. A continuación, detallamos la evaluación de los cambios provocados por la inoculación y la salinidad en el contenido nutricional y en compuestos bioactivos de las plantas procedentes de dichos ensayos. Además, describimos los resultados obtenidos del estudio de la variación de la expresión génica en las plantas de lechuga, con el objetivo de comprender los cambios inducidos por ambos factores sobre rutas relacionadas con la síntesis de compuestos antioxidantes y otros mecanismos de tolerancia a la salinidad. Finalmente, detallamos los hallazgos derivados del análisis con un modelo *in vivo*, con el cual quisimos comprobar si los cambios en las características nutraceuticas de las plantas de lechuga, derivadas de la inoculación bacteriana, inducían un aumento de la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* y su resistencia al estrés oxidativo.

1. Estudio de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal y el alivio del estrés salino por NaCl y Na₂SO₄ de los aislados seleccionados sobre plantas de lechuga, apio y canónigos, bajo condiciones de invernadero.

Los cultivos hortícolas tienen una gran importancia en la agricultura a nivel mundial. Por un lado, destacan como una parte fundamental de la dieta humana, al ser fuente saludable de nutrientes, fibra, y compuestos químicos de naturaleza bioactiva (Yahia et al., 2019). Por otro lado, presentan un valor económico por unidad de superficie muy elevado (Niu et al., 2019). Sin embargo, las condiciones climáticas actuales están provocando un impacto negativo sobre los sistemas agrícolas, y la notable susceptibilidad de los cultivos hortícolas a estas condiciones resulta en una mayor vulnerabilidad ante dichos efectos. En este sentido, la lechuga, el apio y el canónigo son considerados cultivos sensibles a la sal, ya que presentan umbrales de tolerancia por debajo de 2,0 dS/m (Maas, 1993; Maas & Grattan, 1999; Villalobos-Martín et al., 2017; Voutsinos-Frantzis et al., 2023).

Frente a este contexto planteado, la búsqueda de estrategias sostenibles que permitan mejorar el rendimiento y reducir los efectos causados por el estrés abiótico en los cultivos hortícolas, ha sido estudiado con anterioridad. Existen muchos de estudios que analizan la capacidad de promoción del crecimiento y/o la tolerancia al estrés salino mediada por bacterias PGP en el cultivo de la lechuga (ALKahtani et al., 2021; Azarmi-Atajan & Sayyari-Zohan, 2020; Flores-Félix et al., 2013; Flores-Félix et al., 2021; García-Fraile et al., 2012; González et al., 2023; Han & Lee, 2005; Kohler et al., 2006; Szymańska et al., 2022). Sin embargo, muy pocos trabajos con PGPBs han sido realizados sobre el cultivo del apio (Ahmed, 2017; Migahed et al., 2004; Rehman et al., 2019), y del canónigo (Collado-González et al., 2023; Kunova et al., 2016). Además, según lo previamente expuesto, la atención prestada a los efectos generados por otro tipo de salinidad distinta al NaCl ha sido mucho menor (Reginato et al., 2021).

Por estas razones, en la presente tesis doctoral decidimos analizar el efecto de la inoculación de cuatro aislados sobre la promoción del crecimiento vegetal y la mitigación del estrés salino, inducido tanto por NaCl como por Na₂SO₄, sobre plantas de lechuga, apio y canónigo, desarrolladas en condiciones de invernadero. Con el objetivo de obtener bioinoculantes multifuncionales, es decir, capaces de generar efectos positivos sobre diversos tipos de cultivos y ante diferentes condiciones ambientales o contextos agroclimáticos (Kumar & Singh, 2021).

Para ello, las plantas de lechuga y canónigos permanecieron 25 días en el invernadero y las de apio 55 días, tras su inoculación. Además, fueron sometidas a distintos tipos de condiciones de

crecimiento: condiciones normales (0 mM NaCl o Na₂SO₄), salinidad por NaCl (100 mM para la lechuga y el apio, y 50 mM para el canónigo), y salinidad por Na₂SO₄ (50 mM en todos los casos). Transcurrido ese tiempo, diferentes variables de interés fueron analizadas: contenido en clorofila de las hojas, número de hojas, y peso húmedo y seco de la parte aérea.

1.4. Ensayo de invernadero bajo condiciones normales y de estrés salino (NaCl y Na₂SO₄) en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.).

Los resultados obtenidos de las plantas de lechuga crecidas en invernadero bajo condiciones normales, 100 mM NaCl y 50 mM Na₂SO₄ están recogidos en la Tabla 48.

Tabla 48: Resultados de la inoculación con las cepas SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 sobre diferentes variables de la parte aérea de plantas de lechuga crecidas en invernadero, bajo condiciones normales y de salinidad por NaCl (100 mM) y Na₂SO₄ (50 mM). Valores expresados como: media $\pm$ error estándar. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo para cada respectiva condición de crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Clorofila (SPAD)			Número de hojas		
	Condiciones normales	100 mM NaCl	50 mM Na ₂ SO ₄	Condiciones normales	100 mM NaCl	50 mM Na ₂ SO ₄
Control	26,76 $\pm$ 0,80	25,81 $\pm$ 0,97	28,31 $\pm$ 0,71	5,75 $\pm$ 0,25	4,24 $\pm$ 0,28	5,63 $\pm$ 0,30
SCPM31	31,28 $\pm$ 0,57*	27,36 $\pm$ 0,86	29,23 $\pm$ 0,77	6,70 $\pm$ 0,24*	5,41 $\pm$ 0,17*	5,56 $\pm$ 0,26
SCPM81	28,88 $\pm$ 0,84*	28,72 $\pm$ 1,10*	30,43 $\pm$ 0,85	6,45 $\pm$ 0,17*	5,20 $\pm$ 0,14*	6,50 $\pm$ 0,28*
HUTR05	30,43 $\pm$ 0,57*	29,72 $\pm$ 0,74*	29,89 $\pm$ 0,63	6,95 $\pm$ 0,21*	5,32 $\pm$ 0,17*	6,16 $\pm$ 0,21
GPTR29	28,09 $\pm$ 0,57	28,00 $\pm$ 0,82	29,61 $\pm$ 0,65	6,55 $\pm$ 0,25*	5,21 $\pm$ 0,21*	6,55 $\pm$ 0,19*

Tratamiento	Peso húmedo de la parte aérea (g)			Peso seco de la parte aérea (g)		
	Condiciones normales	100 mM NaCl	50 mM Na ₂ SO ₄	Condiciones normales	100 mM NaCl	50 mM Na ₂ SO ₄
Control	0,96 $\pm$ 0,12	0,44 $\pm$ 0,10	0,95 $\pm$ 0,14	0,09 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01
SCPM31	1,47 $\pm$ 0,12*	0,72 $\pm$ 0,11	0,72 $\pm$ 0,13	0,13 $\pm$ 0,01*	0,09 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01*
SCPM81	1,19 $\pm$ 0,11	0,66 $\pm$ 0,09	1,25 $\pm$ 0,05*	0,12 $\pm$ 0,01*	0,09 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01*
HUTR05	1,59 $\pm$ 0,12*	0,75 $\pm$ 0,07*	1,18 $\pm$ 0,07	0,15 $\pm$ 0,02*	0,11 $\pm$ 0,01*	0,14 $\pm$ 0,01*
GPTR29	1,31 $\pm$ 0,05*	0,75 $\pm$ 0,10*	1,29 $\pm$ 0,10*	0,14 $\pm$ 0,01*	0,11 $\pm$ 0,01*	0,14 $\pm$ 0,02*

Bajo condiciones normales de crecimiento pudimos observar una mejora estadísticamente significativa generalizada gracias a la inoculación con las diferentes cepas seleccionadas. Las variables contenido en clorofila de las hojas y número de hojas presentaron incrementos significativos debido a la inoculación y con respecto al control sin inocular, de entre el 8 % y el 20 %, excepto en el tratamiento con GPTR29 en la primera variable. El peso húmedo y seco de la parte aérea también mostraron mejoras significativas debido al tratamiento con las cepas,

con incrementos porcentuales de entre el 24,1 % y 66,6 %, excepto en el caso del peso húmedo en las plantas tratadas con SCPM81.

La inoculación con los aislados, principalmente aquellos identificados dentro del género *Rhizobium*, también provocó la mitigación de los efectos negativos causados por el NaCl, al mostrar diferencias significativas con respecto a las plantas control desarrolladas bajo las mismas condiciones. Tanto el peso húmedo como seco de la parte aérea presentaron mejoras cercanas al 70 %, en las plantas tratadas con HUTR05 y GPTR29. Además, el número de hojas también fue incrementado significativamente por todos los tratamientos bacterianos aplicados, aproximadamente un 25 % con respecto al control. Asimismo, las plantas inoculadas con SCPM81 y HUTR05 exhibieron un mayor contenido en clorofila que las plantas del resto de tratamientos, siendo, además, estadísticamente significativo frente al control.

Finalmente, bajo las condiciones de salinidad por Na₂SO₄, la inoculación con SCPM81 y GPTR29 dio lugar a un mayor alivio de las condiciones de estrés. Ambos tratamientos provocaron diferencias significativas con respecto al control estresado en las variables número de hojas, peso húmedo y seco de la parte aérea, con incrementos del 15 %, 35 % y 45 %, para cada variable. Además, el peso seco de la parte aérea también fue incrementado significativamente debido a la aplicación de SCPM31 y HUTR05, en un 29,8 % y 46,8 %, respectivamente.

Ya ha sido ampliamente descrito que la inoculación con cepas de diferentes géneros bacterianos, como *Rhizobium*, *Bacillus*, o *Pseudomonas* puede provocar un efecto positivo sobre el crecimiento y el alivio del estrés salino por NaCl en plantas de lechuga (ALKahtani et al., 2021; Azarmi-Atajan & Sayyari-Zohan, 2020; Flores-Félix et al., 2013; Flores-Félix et al., 2021; García-Fraile et al., 2012; Han & Lee, 2005; Kohler et al., 2006; Szymańska et al., 2022). Sin embargo, hasta la fecha no habían sido realizados estudios de inoculación en plantas de lechuga sometidas a condiciones de estrés salino por Na₂SO₄. Por tanto, en este trabajo de tesis doctoral hemos establecido por primera vez la capacidad de mitigación del estrés salino, inducido por un tipo de salinidad diferente al NaCl, gracias a la aplicación de cepas bacterianas pertenecientes a diversos géneros, *Pseudomonas*, *Priestia* (prev. *Bacillus*) y *Rhizobium* (Figura 64).

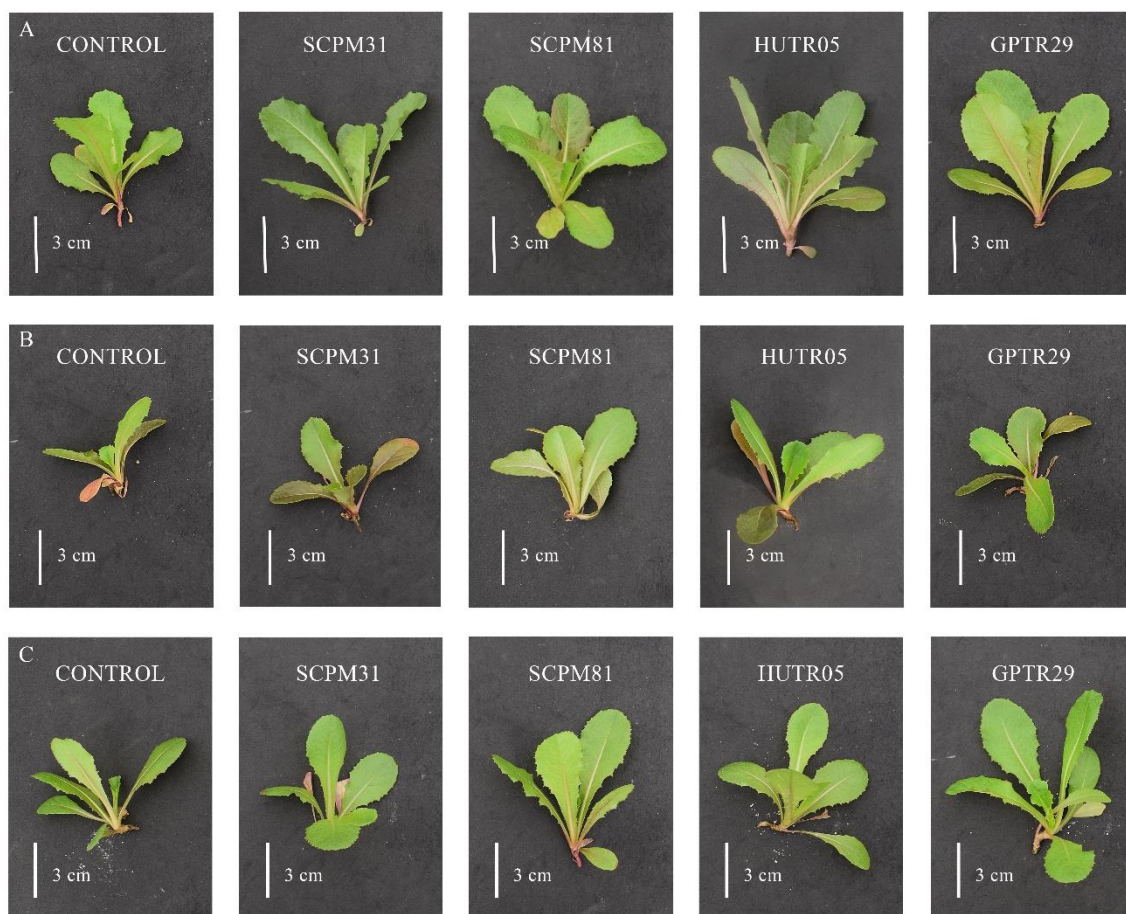


Figura 64: Fotografías representativas de las plantas de lechuga procedentes del ensayo de invernadero, y sus respectivos tratamientos. a) condiciones normales, b) 100 mM NaCl, y c) 50 mM Na₂SO₄.

Tras confrontar los resultados del peso húmedo y peso seco de las plantas de cada tratamiento en su respectiva condición de crecimiento (condiciones normales, 100 mM NaCl, y 50 mM Na₂SO₄), comprobamos que el contenido de agua de la lechuga estaba entre el 85 % y el 90 % en todos los casos, tal y como establece la bibliografía (Kim et al., 2016; Mou, 2008).

Además, también pudimos determinar que la salinidad por NaCl provocaba un mayor efecto negativo en las plantas que en el caso de la salinidad por Na₂SO₄. Por ejemplo, el peso húmedo de la parte aérea de las plantas crecidas en NaCl era, en promedio, la mitad del peso de las plantas desarrolladas en condiciones normales. Sin embargo, estas diferencias de peso húmedo promedio en el caso de la salinidad por Na₂SO₄ únicamente llegaban al 30 % en comparación con las plantas no estresadas. En este sentido, uno de los efectos de la salinidad del suelo es el estrés osmótico, que da lugar al déficit hídrico y la limitación de agua para la planta, lo que concuerda con los resultados obtenidos (Ilangumaran & Smith, 2017; Mukhopadhyay et al., 2021; Munns & Tester, 2008).

1.5. Ensayo de invernadero bajo condiciones normales y de estrés salino (NaCl y Na₂SO₄) en plantas de apio (*Apium graveolens* L.).

La Tabla 49 recoge los resultados de las variables analizadas en el ensayo de apio desarrollado en invernadero bajo condiciones normales, 100 mM NaCl, y 50 mM Na₂SO₄.

Tabla 49: Resultados de la inoculación con las cepas SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 sobre diferentes variables de la parte aérea de plantas de apio crecidas en invernadero, bajo condiciones normales y de salinidad por NaCl (100 mM) y Na₂SO₄ (50 mM). Valores expresados como: media $\pm$ error estándar. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo para cada respectiva condición de crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Clorofila (SPAD)			Número de hojas		
	Condiciones normales	100 mM NaCl	50 mM Na ₂ SO ₄	Condiciones normales	100 mM NaCl	50 mM Na ₂ SO ₄
Control	23,91 $\pm$ 0,61	23,64 $\pm$ 0,31	23,71 $\pm$ 0,44	15,95 $\pm$ 0,26	15,58 $\pm$ 0,29	15,83 $\pm$ 0,28
SCPM31	23,93 $\pm$ 0,49	23,74 $\pm$ 0,41	23,84 $\pm$ 0,42	18,47 $\pm$ 0,40*	17,30 $\pm$ 0,51*	17,39 $\pm$ 0,29*
SCPM81	24,84 $\pm$ 0,87	24,31 $\pm$ 0,33	24,46 $\pm$ 0,51	18,83 $\pm$ 0,35*	16,44 $\pm$ 0,39	17,21 $\pm$ 0,31*
HUTR05	24,36 $\pm$ 0,90	24,50 $\pm$ 0,31	24,18 $\pm$ 0,52	17,70 $\pm$ 0,36*	17,18 $\pm$ 0,34*	17,65 $\pm$ 0,43*
GPTR29	24,77 $\pm$ 0,65	24,74 $\pm$ 0,54	24,56 $\pm$ 0,38	18,15 $\pm$ 0,34*	17,00 $\pm$ 0,28*	17,35 $\pm$ 0,47*

Tratamiento	Peso húmedo de la parte aérea (g)			Peso seco de la parte aérea (g)		
	Condiciones normales	100 mM NaCl	50 mM Na ₂ SO ₄	Condiciones normales	100 mM NaCl	50 mM Na ₂ SO ₄
Control	1,62 $\pm$ 0,11	1,29 $\pm$ 0,09	1,27 $\pm$ 0,10	0,19 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01
SCPM31	1,87 $\pm$ 0,06*	1,59 $\pm$ 0,06*	1,54 $\pm$ 0,06*	0,22 $\pm$ 0,01*	0,19 $\pm$ 0,01*	0,19 $\pm$ 0,01*
SCPM81	1,95 $\pm$ 0,10*	1,48 $\pm$ 0,05	1,54 $\pm$ 0,04*	0,25 $\pm$ 0,01*	0,18 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01*
HUTR05	1,95 $\pm$ 0,10*	1,64 $\pm$ 0,13*	1,75 $\pm$ 0,08*	0,22 $\pm$ 0,01*	0,19 $\pm$ 0,02*	0,21 $\pm$ 0,01*
GPTR29	1,90 $\pm$ 0,06*	1,61 $\pm$ 0,05*	1,66 $\pm$ 0,12*	0,23 $\pm$ 0,01*	0,19 $\pm$ 0,01*	0,20 $\pm$ 0,02*

Bajo condiciones normales de crecimiento, la inoculación con las 4 cepas seleccionadas provocó una mejora significativa de todas las variables analizadas, excepto del contenido en clorofila de las hojas, con respecto al control sin inocular. Así, los incrementos obtenidos fueron de entre el 11,0 % y el 32,8 %.

El tratamiento con SCPM31, HUTR05 y GPTR29 también generó mejoras significativas en las plantas desarrolladas bajo estrés por NaCl, excepto en la variable contenido en clorofila. El número de hojas fue aproximadamente un 10 % superior en las plantas inoculadas con estos aislados que en las plantas control. De igual manera, el incremento del peso húmedo y seco de la parte aérea fue cercano al 25 % gracias a la aplicación de los tratamientos bacterianos comentados previamente.

En el caso de las plantas crecidas bajo salinidad por Na_2SO_4 , la aplicación de los cuatro aislados indujo la mejora significativa de las variables número de hojas, peso húmedo y peso seco de la parte aérea, con respecto al tratamiento sin inocular. Los resultados más destacables fueron los provocados por las cepas HUTR05 y GPTR29, con incrementos de aproximadamente el 10 %, en el número de hojas, y del 35 % en el peso húmedo y seco de la parte aérea.

No existen apenas trabajos que analicen el efecto de la inoculación bacteriana sobre la promoción del crecimiento vegetal del apio, así como el alivio de los efectos negativos inducidos por el estrés salino. Tanto Ahmed (2017) como Migahed y colaboradores (2004), estudiaron el efecto de la inoculación con cepas bacterianas de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Priestia*, solos y en combinación con NPK o fitohormonas (respectivamente), sobre el crecimiento del apio, determinando la capacidad de dichos aislados para reducir la aplicación de fertilizantes químicos y promover el crecimiento de esta especie vegetal. Además, Rehman y colaboradores (2019) comprobaron que la aplicación de bacterias rizosféricas no identificadas sobre este cultivo reducía los efectos negativos generados por la salinidad por NaCl.

En el presente trabajo obtuvimos unos resultados similares a los comentados en el párrafo previo, con mejoras de diferentes parámetros de crecimiento derivadas de la inoculación con los aislados seleccionados, bajo condiciones normales y de estrés salino por NaCl. Sin embargo, describimos por primera vez el efecto generado por la bioinoculación bacteriana en la mitigación o el alivio del estrés salino por Na_2SO_4 en plantas de apio (Figura 65).



Figura 65: Fotografías representativas de las plantas de apio procedentes del ensayo de invernadero, y sus respectivos tratamientos. a) condiciones normales, b) 100 mM NaCl, y c) 50 mM Na₂SO₄.

La comparación del peso húmedo y seco de la parte aérea de las plantas de apio en cada tratamiento y respectivas condiciones de crecimiento también nos permitió determinar su porcentaje de humedad, cercano al 90 % en todos los casos, al igual que indica la bibliografía (Singh et al., 2022). Además, pudimos observar que los efectos negativos del estrés inducido por NaCl fueron similares a los del estrés por Na₂SO₄. Así, la reducción promedio del peso húmedo y seco de las plantas estresadas por ambos tipos de salinidad era de aproximadamente un 20 % con respecto a las plantas desarrolladas en condiciones normales.

1.6. Ensayo de invernadero bajo condiciones normales y de estrés salino (NaCl y Na₂SO₄) en plantas de canónigo (*Valerianella locusta* L.).

En la Tabla 50 están recogidos los datos obtenidos del ensayo de invernadero realizado en plantas de canónigo sometidas a condiciones normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄) de crecimiento.

Tabla 50: Resultados de la inoculación con las cepas SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 sobre diferentes variables de la parte aérea de plantas de canónigo crecidas en invernadero, bajo condiciones normales y de salinidad por NaCl (50 mM) y Na₂SO₄ (50 mM). Valores expresados como: media $\pm$ error estándar. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo para cada respectiva condición de crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$).

Tratamiento	Clorofila (SPAD)			Número de hojas		
	Condiciones normales	50 mM NaCl	50 mM Na ₂ SO ₄	Condiciones normales	50 mM NaCl	50 mM Na ₂ SO ₄
Control	38,24 $\pm$ 1,04	34,24 $\pm$ 0,92	35,96 $\pm$ 0,88	12,60 $\pm$ 0,21	11,00 $\pm$ 0,27	11,50 $\pm$ 0,29
SCPM31	38,93 $\pm$ 0,67	35,40 $\pm$ 0,81	34,98 $\pm$ 0,65	12,74 $\pm$ 0,23	11,65 $\pm$ 0,31	12,32 $\pm$ 0,32*
SCPM81	38,48 $\pm$ 0,73	35,21 $\pm$ 0,58	37,20 $\pm$ 0,72	13,30 $\pm$ 0,22*	11,90 $\pm$ 0,18*	11,89 $\pm$ 0,25
HUTR05	39,73 $\pm$ 0,74	35,70 $\pm$ 0,65	37,27 $\pm$ 0,95	13,30 $\pm$ 0,22*	12,00 $\pm$ 0,15*	12,33 $\pm$ 0,29*
GPTR29	40,23 $\pm$ 1,06	37,22 $\pm$ 0,92*	36,74 $\pm$ 0,64	13,30 $\pm$ 0,26*	12,00 $\pm$ 0,15*	12,44 $\pm$ 0,26*

Tratamiento	Peso húmedo de la parte aérea (g)			Peso seco de la parte aérea (g)		
	Condiciones normales	50 mM NaCl	50 mM Na ₂ SO ₄	Condiciones normales	50 mM NaCl	50 mM Na ₂ SO ₄
Control	0,68 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01
SCPM31	0,70 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,04	0,57 $\pm$ 0,04*	0,09 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01*
SCPM81	0,83 $\pm$ 0,03*	0,55 $\pm$ 0,02*	0,50 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,01*	0,06 $\pm$ 0,01*	0,06 $\pm$ 0,01
HUTR05	0,80 $\pm$ 0,03*	0,56 $\pm$ 0,01*	0,57 $\pm$ 0,02*	0,10 $\pm$ 0,01*	0,06 $\pm$ 0,01*	0,07 $\pm$ 0,01*
GPTR29	0,80 $\pm$ 0,03*	0,56 $\pm$ 0,04*	0,62 $\pm$ 0,03*	0,10 $\pm$ 0,01*	0,06 $\pm$ 0,01*	0,08 $\pm$ 0,01*

La inoculación de los aislados SCPM81, HUTR05 y GPTR29, provocó una mejora significativa de la parte aérea de las plantas desarrolladas bajo condiciones normales de crecimiento, al compararlas frente a las plantas no inoculadas. Así, el incremento porcentual de las variables número de hojas, peso húmedo, y peso seco de la parte aérea fue de aproximadamente el 5 %, 20 %, y 15 %, respectivamente y para los tratamientos comentados.

Bajo condiciones de NaCl 50 mM, las plantas tratadas con esas mismas cepas también mostraron una reducción significativa de los efectos negativos causados por la salinidad. Las mejoras obtenidas en estos tratamientos frente al control sin inocular fueron del 9 % en el número de hojas, 19 % en el peso húmedo de la parte aérea, y del 22 % en el peso seco. Además, la aplicación de GPTR29 también dio lugar a un incremento en el contenido de clorofila de las hojas del 8,7 %, con respecto al control.

Los aislados HUTR05 y GPTR29 también generaron mejoras significativas en las plantas desarrolladas bajo salinidad por Na₂SO₄, al compararlas con las plantas control, con incrementos de hasta un 8,2 % en el número de hojas, un 33,4 % en el peso húmedo, y un 46,3 % en el peso seco de la parte aérea. En cambio, al contrario que bajo condiciones de crecimiento

normal y de salinidad por NaCl, no fue la inoculación con SCPM81 la que generó mejoras significativas de crecimiento, sino el tratamiento con *Pseudomonas* sp. SCPM31. De esta manera, las variables número de hojas, peso húmedo y seco de la parte aérea aumentaron entre un 7,1 % y un 35,2 % en las plantas tratadas con este aislado, con respecto al control no inoculado.

Al igual que en el caso del apio, hay pocos trabajos que hayan analizado el efecto de la inoculación de bacterias PGP sobre la promoción del crecimiento vegetal de plantas de canónigo (Collado-González et al., 2023; Kunova et al., 2016). En estos estudios utilizaron cepas pertenecientes a géneros bacterianos diferentes a los utilizados en el presente trabajo, *Azospirillum*, *Pantoea* y *Streptomyces*. Los resultados obtenidos indicaron que la inoculación de algunas de estas cepas daba lugar a mejoras de diferentes parámetros productivos en las plantas de canónigo, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, en esta tesis doctoral describimos por primera vez la capacidad de cepas pertenecientes a los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Priestia* y *Rhizobium*, de promover el crecimiento vegetal y aliviar los efectos del estrés salino provocado por NaCl y Na₂SO₄, sobre el cultivo del canónigo (Figura 66).



Figura 66: Fotografías representativas de las plantas de canónigo procedentes del ensayo de invernadero, y sus respectivos tratamientos. a) condiciones normales, b) 50 mM NaCl, y c) 50 mM Na₂SO₄.

El contenido en humedad de las plantas obtenidas en este ensayo también fue cercano al 90 %, de manera similar a lo recogido en la literatura científica (Muminovic et al., 2004; Ramos-Bueno et al., 2016). Además, el efecto negativo del estrés por NaCl y Na₂SO₄ fue similar en las plantas de canónigo, excepto en el caso de la variable peso seco de la parte aérea. Así, la reducción promedio del peso seco de las plantas crecidas en NaCl fue de un 61 % con respecto a las plantas no estresadas, mientras que la disminución en las plantas estresadas con Na₂SO₄ fue de menos del 40 %.

De manera general, en los ensayos realizados sobre los primeros estadios de desarrollo comprobamos que la salinidad por NaCl y Na₂SO₄ provocaba una reducción similar de las variables analizadas en el caso de la lechuga y el canónigo con respecto a las plantas no estresadas, en cambio, las plántulas de apio estaban más afectadas por el Na₂SO₄. Sin embargo, los efectos del NaCl fueron más inhibitorios que los del Na₂SO₄ en el ensayo de invernadero de la lechuga y el canónigo, mientras que en el caso del apio los efectos negativos fueron similares entre ambos tipos de sales. Así, cabe destacar que la sensibilidad a diferentes tipos de salinidad es dependiente de factores como la especie vegetal, la concentración iónica aplicada, o incluso la etapa de desarrollo de la planta (Khatkar & Kuhad, 2000; Reginato et al., 2021).

También es importante comprender que existen muchos factores ambientales que pueden afectar a la efectividad de los inoculantes bacterianos, como es el caso de las características del suelo (Chakraborty & Akhtar, 2021; Egamberdiyeva, 2007; Maçik et al., 2020). Por ejemplo, la salinidad no solo afecta a la fertilidad del suelo, sino que también puede afectar las comunidades microbianas presentes en este y, por tanto, puede influir en la capacidad de los microorganismos utilizados como bioinoculantes para ejercer su función (Rath et al., 2019; Zhang et al., 2019). Por tanto, desarrollar productos capaces de mejorar la productividad de los cultivos es agroecosistemas diversos es un enfoque de gran interés. En este sentido, pudimos comprobar que los aislados seleccionados en este trabajo, SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29, fueron capaces de mejorar diferentes variables productivas de tres cultivos hortícolas de gran importancia, y hacerlo, además, bajo tres condiciones de crecimiento distintas. Asimismo, la inoculación con estos aislados provocó mejoras en la parte aérea de las plantas utilizadas, que es la parte comercializable de dichos cultivos y, por tanto, la que mayor interés tiene a nivel económico.

2. Análisis del contenido en micro y macronutrientes de las plantas de lechuga, apio y canónigo desarrolladas en invernadero bajo condiciones normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄).

Los cultivos hortícolas desempeñan un papel fundamental en la alimentación y nutrición humana, al proporcionar una excelente fuente de vitaminas, minerales y compuestos bioactivos (Natesh et al., 2017). Es crucial garantizar una ingesta adecuada y equilibrada de minerales en la dieta para el correcto funcionamiento de los procesos fisiológicos del cuerpo humano (Vicente et al., 2014). Los minerales suelen ser clasificados en macronutrientes y micronutrientes, en función de las concentraciones relativas requeridas (Vicente et al., 2014).

Por otro lado, uno de los principales efectos de la salinidad del suelo sobre los cultivos hortícolas es el estrés iónico (Ilangumaran & Smith, 2017). Bajo estas condiciones, la presencia de elevadas concentraciones de iones como el Na⁺, Cl⁻ o SO₄²⁻, provoca que su tasa de absorción en plantas sea más rápida que la de exclusión, dando lugar a problemas de toxicidad y limitando la absorción de otros nutrientes esenciales, como el K (Munns & Tester, 2008; Mukhopadhyay et al., 2021; Safdar et al., 2019).

En este contexto, numerosos estudios han descrito mejoras en el contenido en micro y macronutrientes debido a la inoculación con PGPBs, representando una alternativa sostenible para mejorar la calidad nutricional de los cultivos (Collado-González et al., 2023; Consentino et al., 2022; Flores-Félix et al., 2013; Lai et al., 2008; Sahin et al., 2015; Santander et al., 2024; Shehata et al., 2010). Además, también se ha demostrado que las bacterias PGP pueden mitigar los efectos negativos causados por la salinidad, al favorecer la homeostasis iónica en plantas (Arora et al., 2011; Etesami & Adl, 2020; Nadeem et al., 2009; Vaishnav et al., 2016b).

Por lo tanto, en el presente apartado describimos el análisis del contenido en macro y micronutrientes en la parte aérea de las plantas de lechuga, apio y canónigo procedentes de los ensayos en invernadero, así como las variaciones derivadas de la inoculación y las condiciones de crecimiento de los cultivos (condiciones normales y salinas por NaCl y Na₂SO₄). Los análisis fueron realizados en el Servicio de Análisis e Instrumentación del IRNASA-CSIC (Salamanca, España).

2.1. Análisis del contenido en micro y macronutrientes de las plantas de lechuga.

La Tabla 51 presenta los resultados del análisis del contenido de elementos químicos en la parte aérea de las plantas de lechuga.

Al comparar los valores obtenidos bajo condiciones de crecimiento normales y salinas, observamos que el estrés por NaCl y Na₂SO₄ provocó una disminución promedio de entre el 5 % y el 50 % del contenido de la mitad de los elementos analizados: C, N, K, Mg, P, B, y Mo. Sin embargo, ambos tipos de salinidad indujeron aumentos notables en el contenido de los minerales Cu, Fe y Zn (Tabla 51). Estos hallazgos son consistentes con los obtenidos por Neocleous y colaboradores (2013), quienes observaron una dinámica similar en el contenido de macro y micronutrientes en plantas de lechuga de dos variedades expuestas a concentraciones crecientes de NaCl. Asimismo, estudios previos han demostrado que la salinidad por Na₂SO₄ conducía a una reducción del contenido de Ca y K en dos variedades de lechuga, en comparación con las plantas desarrolladas en condiciones normales, lo cual está en línea con nuestros resultados (Bie et al., 2004; Mahmoudi et al., 2010).

Es importante destacar que, bajo salinidad por NaCl y Na₂SO₄, el contenido de Na aumentó aproximadamente un 300 %, mientras que el contenido de K disminuyó entre un 30 % y 50 %, en comparación con las plantas no estresadas. Estos cambios resultaron en una disminución superior al 80 % del ratio K:Na en las plantas expuestas al estrés salino, como ya había sido observado en estudios previos (Bie et al., 2004; Breš et al., 2022; Neocleous et al, 2013). En este sentido, está descrito que el exceso de concentración de Na⁺, causado por la salinidad del suelo, afecta a la absorción de K⁺, lo que resulta en una la reducción del ratio K:Na (Ilangumaran & Smith, 2017; Shrivastava & Kumar, 2015). Además, las plantas expuestas a 50 mM Na₂SO₄ presentaron un contenido de S 800 veces superior a las plantas desarrolladas bajo condiciones de crecimiento normales y de salinidad por NaCl.

La inoculación con los aislados seleccionados también indujo cambios en el contenido químico de las hojas de lechuga (Tabla 51). Bajo condiciones normales de crecimiento, las plantas tratadas con los cuatro aislados mostraron un aumento del contenido de K superior al 22 %, en comparación con el control. Asimismo, la aplicación de SCPM31 resultó en incrementos significativos de las concentraciones de N, Mg, S, B y Mo. En presencia de 100 mM NaCl, las plantas tratadas con cada cepa exhibieron aumentos significativos del 20-30 % en el contenido de C, N (excepto SCPM31), K, y P (excepto SCPM31 y HUTR05) en comparación con las plantas no inoculadas bajo las mismas condiciones. Aunque no observamos diferencias en el contenido de Na con respecto al control salino, la inoculación bacteriana generó mejoras significativas en el ratio K:Na, aproximadamente del 30 %. Finalmente, bajo condiciones de salinidad por Na₂SO₄, la aplicación de los aislados seleccionados condujo a aumentos significativos de los valores de diferentes elementos químicos, como C (SCPM31), Mg

(SCPM31), P (GPTR29), Cu (SCPM31), Fe (SCPM31 y HUTR05), Mn (HUTR05 y GPTR29), Mo (SCPM31), y Zn (HUTR05 y GPTR29). Además, las plantas tratadas con SCPM81, HUTR05 y GPTR29, mostraron un contenido significativamente inferior de S y Na en comparación con las plantas control, lo que resultó en un ratio K:Na superior (estadísticamente significativo en el caso de la inoculación con SCPM81 y GPTR29).

Tabla 51: Contenido en elementos químicos de las plantas de lechuga (control e inoculadas con los aislados seleccionados) desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄). Valores expresados como media $\pm$ error estándar. Los asteriscos y almohadillas indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo para cada respectiva condición de crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$).

		%		Mayoritarios (g elemento/Kg planta)					Minoritarios (mg elemento/Kg planta)							K:Na
		C	N	Ca	K	Mg	P	S	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Na	Zn	
Condiciones normales	Control	43,09 $\pm$ 0,05	2,36 $\pm$ 0,14	7,67 $\pm$ 0,35	26,98 $\pm$ 1,14	3,90 $\pm$ 0,12	2,02 $\pm$ 0,20	1,90 $\pm$ 0,10	18,33 $\pm$ 0,70	2,64 $\pm$ 1,34	126,99 $\pm$ 24,04	45,31 $\pm$ 1,73	0,52 $\pm$ 0,07	7265,93 $\pm$ 204,65	10,94 $\pm$ 0,57	3,71 $\pm$ 0,09
	SCPM31	42,41 $\pm$ 0,03	2,90 $\pm$ 0,16*	7,68 $\pm$ 0,05	39,87 $\pm$ 0,15*	4,64 $\pm$ 0,20*	2,60 $\pm$ 0,23	2,31 $\pm$ 0,04*	20,79 $\pm$ 0,20*	2,07 $\pm$ 1,04	103,08 $\pm$ 4,73	43,74 $\pm$ 1,15	0,80 $\pm$ 0,04*	6455,16 $\pm$ 302,48	12,63 $\pm$ 0,42	6,2 $\pm$ 0,28*
	SCPM81	42,49 $\pm$ 0,29	2,57 $\pm$ 0,16	6,50 $\pm$ 0,30	36,33 $\pm$ 0,08*	3,92 $\pm$ 0,10	2,16 $\pm$ 0,35	2,02 $\pm$ 0,04	20,54 $\pm$ 0,87*	00 $\pm$ 0,00	110,80 $\pm$ 25,65	34,40 $\pm$ 1,37	0,47 $\pm$ 0,02	5400,63 $\pm$ 116,06	11,43 $\pm$ 1,21	6,73 $\pm$ 0,15*
	HUTR05	42,97 $\pm$ 0,20	2,49 $\pm$ 0,18	6,96 $\pm$ 0,33	37,65 $\pm$ 1,26*	3,80 $\pm$ 0,19	2,04 $\pm$ 0,18	1,93 $\pm$ 0,08	19,55 $\pm$ 0,81	00 $\pm$ 0,00	83,85 $\pm$ 10,04	38,75 $\pm$ 1,26	0,95 $\pm$ 0,02*	5538,90 $\pm$ 145,04	12,13 $\pm$ 0,33	6,81 $\pm$ 0,26*
	GPTR29	42,16 $\pm$ 0,20	2,47 $\pm$ 0,15	6,82 $\pm$ 0,24	33,08 $\pm$ 0,69*	4,12 $\pm$ 0,13	2,45 $\pm$ 0,42	2,03 $\pm$ 0,08	19,21 $\pm$ 0,63	2,28 $\pm$ 1,14	153,96 $\pm$ 32,29	44,54 $\pm$ 1,07	0,55 $\pm$ 0,04	6719,29 $\pm$ 397,91	11,34 $\pm$ 0,67	4,95 $\pm$ 0,21*
100 mM NaCl	Control	27,26 $\pm$ 1,39*	1,67 $\pm$ 0,04	11,48 $\pm$ 0,71	12,44 $\pm$ 0,79	4,35 $\pm$ 0,48	1,40 $\pm$ 0,04	2,14 $\pm$ 0,07	14,60 $\pm$ 0,63	4,22 $\pm$ 0,23	3632,90 $\pm$ 56,70	88,98 $\pm$ 2,64	0,34 $\pm$ 0,10	30531,53 $\pm$ 2013,12	28,06 $\pm$ 0,95	0,41 $\pm$ 0,01
	SCPM31	35,04 $\pm$ 0,71*	1,84 $\pm$ 0,03	9,62 $\pm$ 0,21	17,02 $\pm$ 0,36*	3,53 $\pm$ 0,11	1,40 $\pm$ 0,03	1,90 $\pm$ 0,05	12,55 $\pm$ 0,04	1,01 $\pm$ 1,01	1700,40 $\pm$ 126,48	56,11 $\pm$ 3,00	0,55 $\pm$ 0,09	32394,96 $\pm$ 400,57	16,06 $\pm$ 0,56	0,53 $\pm$ 0,02*
	SCPM81	35,06 $\pm$ 0,12*	2,04 $\pm$ 0,02*	11,14 $\pm$ 0,47	18,75 $\pm$ 0,76*	3,07 $\pm$ 0,11	1,53 $\pm$ 0,02*	1,99 $\pm$ 0,05	12,28 $\pm$ 0,77	2,31 $\pm$ 1,15	670,01 $\pm$ 74,84	41,14 $\pm$ 2,16	0,38 $\pm$ 0,07	33530,01 $\pm$ 1292,37	14,20 $\pm$ 0,66	0,56 $\pm$ 0,01*
	HUTR05	33,94 $\pm$ 0,47*	1,86 $\pm$ 0,03*	9,98 $\pm$ 0,09	17,78 $\pm$ 0,08*	3,32 $\pm$ 0,12	1,37 $\pm$ 0,02	2,01 $\pm$ 0,04	12,73 $\pm$ 0,21	3,43 $\pm$ 0,18	1375,90 $\pm$ 161,51	50,35 $\pm$ 3,06	0,35 $\pm$ 0,03	32344,43 $\pm$ 831,67	14,47 $\pm$ 0,38	0,55 $\pm$ 0,01*
	GPTR29	35,67 $\pm$ 0,59*	1,98 $\pm$ 0,10*	10,08 $\pm$ 0,36	17,78 $\pm$ 0,92*	2,93 $\pm$ 0,12	1,63 $\pm$ 0,04*	2,15 $\pm$ 0,03	12,22 $\pm$ 0,65	2,24 $\pm$ 1,12	943,71 $\pm$ 95,88	44,91 $\pm$ 3,06	0,42 $\pm$ 0,05	31798,79 $\pm$ 1228,40	13,92 $\pm$ 0,89	0,56 $\pm$ 0,03*
50 mM Na ₂ SO ₄	Control	41,37 $\pm$ 0,17	2,79 $\pm$ 0,05	2,88 $\pm$ 0,05	26,78 $\pm$ 0,53	2,13 $\pm$ 0,04	2,23 $\pm$ 0,03	19,47 $\pm$ 0,16	14,23 $\pm$ 0,48	3,40 $\pm$ 0,05	257,61 $\pm$ 11,57	30,12 $\pm$ 0,73	0,59 $\pm$ 0,04	23621,75 $\pm$ 226,10	14,21 $\pm$ 0,19	1,13 $\pm$ 0,01
	SCPM31	37,14 $\pm$ 0,22	2,52 $\pm$ 0,04	2,85 $\pm$ 0,13	19,36 $\pm$ 0,68	2,73 $\pm$ 0,07*	2,02 $\pm$ 0,01	31,67 $\pm$ 0,99*	11,00 $\pm$ 0,29	4,70 $\pm$ 0,58*	642,71 $\pm$ 93,17*	31,41 $\pm$ 0,41	0,70 $\pm$ 0,04*	33874,36 $\pm$ 601,84*	12,62 $\pm$ 0,12	0,57 $\pm$ 0,03
	SCPM81	42,09 $\pm$ 0,26*	2,25 $\pm$ 0,10	2,63 $\pm$ 0,04	26,17 $\pm$ 0,13	1,92 $\pm$ 0,03	2,15 $\pm$ 0,05	15,12 $\pm$ 0,26#	13,81 $\pm$ 0,43	00 $\pm$ 0,00	158,89 $\pm$ 7,26	28,46 $\pm$ 0,43	0,36 $\pm$ 0,01	19882,39 $\pm$ 97,69#	12,22 $\pm$ 0,23	1,32 $\pm$ 0,01*
	HUTR05	39,87 $\pm$ 0,25	2,36 $\pm$ 0,03	2,78 $\pm$ 0,03	24,02 $\pm$ 0,27	1,95 $\pm$ 0,03	1,85 $\pm$ 0,02	17,46 $\pm$ 0,21#	13,80 $\pm$ 0,23	3,27 $\pm$ 0,08	400,26 $\pm$ 9,75*	32,80 $\pm$ 0,49*	0,50 $\pm$ 0,04	22479,89 $\pm$ 208,14#	15,82 $\pm$ 0,20*	1,07 $\pm$ 0,02
	GPTR29	41,24 $\pm$ 0,05	2,49 $\pm$ 0,03	2,84 $\pm$ 0,09	26,58 $\pm$ 0,17	2,06 $\pm$ 0,03	2,32 $\pm$ 0,02*	15,61 $\pm$ 0,26#	14,96 $\pm$ 0,28	4,02 $\pm$ 0,17	369,14 $\pm$ 23,91	34,44 $\pm$ 0,96*	0,41 $\pm$ 0,02	21193,73 $\pm$ 73,98#	16,60 $\pm$ 0,71*	1,25 $\pm$ 0,01*

Son numerosos los estudios publicados que describen aumentos del contenido de macro y micronutrientes en el cultivo de la lechuga como resultado de la inoculación con cepas bacterianas de diversos géneros, como *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Priestia* o *Bacillus* (Consentino et al., 2022; Flores-Félix et al., 2013; Lai et al., 2008; Sahin et al., 2015; Santander et al., 2024). Además, la aplicación de PGPBs en plantas sometidas a estrés salino, como lechuga, pimiento, o trigo, ha demostrado reducir el contenido de Na^+ y aumentar la concentración de K^+ , lo que resulta en ratios K:Na más elevados en comparación con las plantas no inoculadas. Estos hallazgos, respaldados por investigaciones previas (Ashraf et al., 2004; Bacilio et al., 2016; Liu et al., 2024a; Nadeem et al., 2009; Telabi Atouei et al., 2019; Yue et al., 2022), subrayan la importancia de la inoculación bacteriana como estrategia prometedora para mejorar la calidad nutricional y la tolerancia al estrés de cultivos agronómicos.

2.2. Análisis del contenido en micro y macronutrientes de las plantas de apio.

Los resultados del análisis del contenido de elementos químicos en la parte aérea de las plantas de apio están recogidos en la Tabla 52. Los valores obtenidos para el molibdeno (Mo) estaban por debajo del límite de detección alcanzado en la metodología empleada. Las concentraciones de sodio (Na) en las plantas de apio sometidas a estrés por NaCl y Na_2SO_4 tampoco pudieron ser medidas, ya que estaban por encima del límite de detección del equipo utilizado.

La exposición de las plantas a la salinidad, inducida tanto por NaCl como por Na_2SO_4 , resultó en una disminución de la concentración de C, Ca, K y Mg, en comparación con los valores obtenidos en las plantas no estresadas (Tabla 52). En dos trabajos independientes, Pardossi y colaboradores (1999a, 1999b) informaron que el aumento de la salinidad por NaCl generaba una reducción en el contenido de K y Ca en las plantas de apio, en comparación con condiciones normales de crecimiento, aunque en dichos ensayos los valores de N también fueron reducidos, al contrario de lo obtenido en nuestro análisis (Pardossi et al., 1999a, Pardosi et al., 1999b). Por otro lado, el contenido de P, B, Cu, Fe y Zn fue aumentado debido a la exposición salina en las plantas de apio.

Debido al exceso de concentración de Na, no fue posible comparar el contenido de este elemento entre las condiciones de crecimiento normales y salinas, aunque evidenció que en las plantas desarrolladas bajo salinidad la concentración fue superior a las plantas no expuestas al estrés. Del mismo modo, no pudimos realizar comparaciones con los valores del ratio K:Na. Sin embargo, observamos que las plantas expuestas a 50 mM Na_2SO_4 presentaban un contenido en S un 160 % superior a las plantas desarrolladas en condiciones de crecimiento normales y

de 100 mM NaCl. Este resultado es coherente, ya que el anión SO_4^{2-} y el catión Na^+ conforman el Na_2SO_4 y, por tanto, deben estar presentes en ambientes de elevadas concentraciones de esta sal, causando efectos tóxicos sobre las plantas (Reginato et al., 2021).

La inoculación con los aislados seleccionados modificó el perfil de elementos químicos en las plantas, en comparación con los controles no inoculados (Tabla 52). En condiciones de crecimiento normales, las plantas tratadas con SCPM31, SCPM81 y GPTR29 presentaron aumentos significativos del contenido en C (GPTR29), S (SCPM81), Fe (SCPM31 y GPTR29), Mn y Zn (SCPM31 y SCPM81). Por otro lado, la inoculación con HUTR05 resultó en incrementos significativos de la concentración de más de la mitad de los nutrientes analizados, en comparación con las plantas control: N, K, Mg, P, Cu, Fe, Mn y Na.

Bajo condiciones de 100 mM NaCl, el tratamiento bacteriano también provocó incrementos significativos de diferentes elementos de interés con respecto al control de las mismas condiciones. Por ejemplo, la aplicación de SCPM31 y SCPM81 indujo aumentos en el contenido de C, B y Mn, además del contenido en N, Ca, Mg y Cu, solo en el caso de la cepa identificada como *Priestia megaterium* SCPM81. Asimismo, la inoculación con HUTR05 y GPTR29 dio lugar a mejoras significativas de la concentración de N, K P, S (HUTR05), Cu (GPTR29), Fe y Mn (GPTR29).

Por último, las plantas expuestas a 50 mM Na_2SO_4 e inoculadas con los cuatro aislados, presentaron incrementos del contenido de Fe superiores al 45 %, así como de Ca en el caso de la inoculación con SCPM31 y SCPM81. No obstante, el tratamiento con SPM81 y GPTR29 generó una menor absorción de S en las plantas desarrolladas bajo salinidad por Na_2SO_4 .

Los trabajos que analizan el efecto de la biofertilización sobre el contenido mineral del cultivo de apio son limitados. Por ejemplo, Shehata y colaboradores (2010) informaron que la aplicación de biofertilizantes bacterianos formulados con cepas de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* inducía incrementos en el contenido de P y K, en comparación con plantas control fertilizadas con N. De manera similar, Sallam (2019) analizó el efecto de la aplicación de hongos micorrícicos arbusculares, junto con fertilizante químico (NPK), observando aumentos en el contenido de N, P y K, con respecto a las plantas control y aquellas fertilizadas con la misma dosis de NPK. Sin embargo, no existen referencias que analicen las variaciones del contenido de elementos químicos en plantas de apio sometidas a condiciones salinas (NaCl y Na_2SO_4) e inoculadas con bacterias PGP, siendo este el primero trabajo que aborda esta cuestión.

Tabla 52: Contenido en elementos químicos de las plantas de apio (control e inoculadas con los aislados seleccionados) desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄). Valores expresados como media $\pm$ error estándar. Los asteriscos y almohadillas indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo para cada respectiva condición de crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). L.D.: límite de detección.

		%		Mayoritarios (g elemento/Kg planta)					Minoritarios (mg elemento/Kg planta)							K:Na
		C	N	Ca	K	Mg	P	S	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Na	Zn	
Condiciones normales	Control	39,36 $\pm$ 0,10	2,07 $\pm$ 0,01	14,16 $\pm$ 0,16	58,85 $\pm$ 1,47	4,79 $\pm$ 0,10	2,05 $\pm$ 0,04	6,31 $\pm$ 0,05	44,42 $\pm$ 1,11	3,98 $\pm$ 0,08	83,22 $\pm$ 2,81	41,07 $\pm$ 0,57	< L.D.	5612,19 $\pm$ 78,31	17,17 $\pm$ 0,49	10,48 $\pm$ 0,12
	SCPM31	39,63 $\pm$ 0,13	1,78 $\pm$ 0,02	14,06 $\pm$ 0,26	51,88 $\pm$ 0,69	4,97 $\pm$ 0,07	1,95 $\pm$ 0,02	6,55 $\pm$ 0,17	43,52 $\pm$ 0,52	3,99 $\pm$ 0,24	137,49 $\pm$ 14,66*	45,26 $\pm$ 1,00*	< L.D.	5875,52 $\pm$ 61,34	21,86 $\pm$ 0,41*	8,83 $\pm$ 0,06
	SCPM81	39,61 $\pm$ 0,12	1,83 $\pm$ 0,01	14,63 $\pm$ 0,08	53,11 $\pm$ 0,50	5,08 $\pm$ 0,03	1,95 $\pm$ 0,02	6,88 $\pm$ 0,06*	43,22 $\pm$ 0,76	4,02 $\pm$ 0,11	80,66 $\pm$ 4,14	45,67 $\pm$ 0,29*	< L.D.	5837,04 $\pm$ 24,83	20,61 $\pm$ 0,20*	9,10 $\pm$ 0,06
	HUTR05	38,96 $\pm$ 0,04	2,19 $\pm$ 0,01*	13,69 $\pm$ 0,11	63,16 $\pm$ 1,40*	5,84 $\pm$ 0,24*	2,50 $\pm$ 0,09*	6,51 $\pm$ 0,11	41,39 $\pm$ 0,73	4,54 $\pm$ 0,06*	202,81 $\pm$ 2,39*	53,92 $\pm$ 1,08*	< L.D.	6386,37 $\pm$ 26,44*	17,96 $\pm$ 0,54	9,69 $\pm$ 0,10
	GPTR29	39,74 $\pm$ 0,06*	1,74 $\pm$ 0,01	13,65 $\pm$ 0,34	52,43 $\pm$ 0,89	5,19 $\pm$ 0,11	1,98 $\pm$ 0,03	6,14 $\pm$ 0,14	44,13 $\pm$ 0,82	3,58 $\pm$ 0,01	135,45 $\pm$ 9,57*	51,87 $\pm$ 1,32*	< L.D.	5905,59 $\pm$ 217,80	17,83 $\pm$ 0,49	8,89 $\pm$ 0,17
100 mM NaCl	Control	37,49 $\pm$ 0,02	2,58 $\pm$ 0,02	13,85 $\pm$ 0,08	39,49 $\pm$ 0,71	4,30 $\pm$ 0,05	2,27 $\pm$ 0,03	6,41 $\pm$ 0,08	44,61 $\pm$ 0,57	4,12 $\pm$ 0,05	190,80 $\pm$ 10,93	49,18 $\pm$ 0,48	< L.D.	> L.D.	41,95 $\pm$ 0,62	-
	SCPM31	38,36 $\pm$ 0,07*	2,05 $\pm$ 0,03	13,66 $\pm$ 0,25	35,66 $\pm$ 0,69	4,33 $\pm$ 0,06	2,04 $\pm$ 0,02	6,60 $\pm$ 0,11	47,61 $\pm$ 0,29*	3,70 $\pm$ 0,02	178,29 $\pm$ 7,53	57,23 $\pm$ 1,18*	< L.D.	> L.D.	31,41 $\pm$ 0,47	-
	SCPM81	38,03 $\pm$ 0,09*	3,12 $\pm$ 0,03*	14,77 $\pm$ 0,14*	37,07 $\pm$ 0,45	4,70 $\pm$ 0,01*	2,21 $\pm$ 0,01	6,23 $\pm$ 0,10	48,81 $\pm$ 0,90*	4,44 $\pm$ 0,05*	193,60 $\pm$ 9,77	56,56 $\pm$ 0,57*	< L.D.	> L.D.	45,27 $\pm$ 0,15*	-
	HUTR05	37,47 $\pm$ 0,08	2,78 $\pm$ 0,03*	14,53 $\pm$ 0,30	42,66 $\pm$ 1,21*	4,39 $\pm$ 0,09	2,43 $\pm$ 0,04*	6,78 $\pm$ 0,07*	46,05 $\pm$ 1,18	4,27 $\pm$ 0,03	363,44 $\pm$ 11,77*	51,15 $\pm$ 0,55	< L.D.	> L.D.	44,60 $\pm$ 0,58*	-
	GPTR29	37,00 $\pm$ 0,25	3,30 $\pm$ 0,04*	13,63 $\pm$ 0,24	42,84 $\pm$ 0,63*	4,35 $\pm$ 0,05	2,39 $\pm$ 0,03*	5,80 $\pm$ 0,09	44,56 $\pm$ 0,58	4,41 $\pm$ 0,09*	286,75 $\pm$ 10,14*	56,03 $\pm$ 0,81*	< L.D.	> L.D.	35,52 $\pm$ 0,25	-
50 mM Na ₂ SO ₄	Control	39,07 $\pm$ 0,04	2,70 $\pm$ 0,03	9,71 $\pm$ 1,00	41,00 $\pm$ 2,21	4,12 $\pm$ 0,14	2,64 $\pm$ 0,09	17,93 $\pm$ 0,72	49,31 $\pm$ 1,95	5,31 $\pm$ 0,11	137,29 $\pm$ 6,59	44,71 $\pm$ 0,89	< L.D.	> L.D.	34,46 $\pm$ 1,07	-
	SCPM31	38,52 $\pm$ 0,09	2,40 $\pm$ 0,03	12,42 $\pm$ 0,18*	35,60 $\pm$ 0,59	3,93 $\pm$ 0,06	2,51 $\pm$ 0,03	17,09 $\pm$ 0,24	47,50 $\pm$ 0,67	4,62 $\pm$ 0,14	204,35 $\pm$ 7,62*	45,15 $\pm$ 0,45	< L.D.	> L.D.	31,80 $\pm$ 0,37	-
	SCPM81	39,08 $\pm$ 0,14	2,15 $\pm$ 0,01	11,30 $\pm$ 0,81	34,56 $\pm$ 0,88	3,79 $\pm$ 0,07	2,45 $\pm$ 0,04	16,09 $\pm$ 0,70#	51,12 $\pm$ 1,25	4,68 $\pm$ 0,09	204,72 $\pm$ 12,21*	46,58 $\pm$ 0,61	< L.D.	> L.D.	33,72 $\pm$ 0,59	-
	HUTR05	38,14 $\pm$ 0,16	2,10 $\pm$ 0,03	11,63 $\pm$ 0,26*	36,87 $\pm$ 0,44	3,70 $\pm$ 0,04	2,34 $\pm$ 0,02	17,68 $\pm$ 0,34	47,03 $\pm$ 0,17	4,63 $\pm$ 0,06	200,51 $\pm$ 10,88*	40,77 $\pm$ 0,77	< L.D.	> L.D.	32,72 $\pm$ 0,25	-
	GPTR29	38,60 $\pm$ 0,06	2,28 $\pm$ 0,02	11,07 $\pm$ 0,13	36,34 $\pm$ 0,88	3,82 $\pm$ 0,06	2,18 $\pm$ 0,03	15,75 $\pm$ 0,15#	43,06 $\pm$ 0,94	4,30 $\pm$ 0,15	254,51 $\pm$ 8,00*	41,08 $\pm$ 0,62	< L.D.	> L.D.	33,49 $\pm$ 0,52	-

2.3. Análisis del contenido en micro y macronutrientes de las plantas de canónigo.

El contenido mineral de la parte aérea de las plantas de canónigo, así como las variaciones derivadas de la exposición a la salinidad y la inoculación bacteriana, están recogidas en la Tabla 53. Teniendo en cuenta todos los tratamientos analizados para cada una de las condiciones, en promedio, la salinidad por NaCl y Na₂SO₄ provocó reducciones de hasta un 23 % en el contenido de C, N, K, Mg y P. Aunque, de manera similar a la dinámica observada en las plantas de lechuga, ambas formas de estrés también causaron aumentos del contenido de Fe, Mo y Zn. En un trabajo reciente, Voutsinos-Frantzis y colaboradores (2023) informaron que la aplicación de dos tipos de salinidad (NaCl y CaCl₂) provocaba una reducción no significativa del contenido de Mg, K y P, si bien la concentración salina aplicada era menor a la utilizada en el presente trabajo. Además, Dalla-Costa y colaboradores (2011) determinaron que el estrés térmico tenía un efecto de disminución en la concentración del contenido en P, S y Cu en plantas de canónigo.

Los resultados del análisis indicaron que las plantas de canónigo expuestas a salinidad por NaCl y Na₂SO₄ presentaban una concentración de Na hasta 1000 veces superior que las plantas no expuestas a estrés. En contraste, el contenido en K fue reducido aproximadamente un 15 %. Como resultado, el ratio K:Na disminuyó más de un 90 % en comparación con las plantas no estresadas, de manera consistente a estudios previos (Voutsinos-Frantzis et al., 2023). Asimismo, la salinidad por Na₂SO₄ provocó un aumento en el contenido de azufre en las plantas de canónigo de más del 200 %, en comparación con las plantas expuestas a 50 mM NaCl y condiciones normales de crecimiento, mostrando una tendencia similar a la observada en los ensayos con lechuga y apio. Este aumento de la concentración de Na en verduras como el canónigo, considerados alimentos con bajo contenido en sodio, supondría un incremento considerable de la ingesta dietética de este elemento, alterando los valores recomendados por los organismos especializados en materia de salud, como la OMS o la EFSA (EFSA, 2019; Kloss et al., 2015). Por tanto, lograr reducir este efecto negativo derivado de la salinidad del suelo, podría tener relevancia a nivel de la salud del consumidor.

Tabla 53: Contenido en elementos químicos de las plantas de canónigo (control e inoculadas con los aislados seleccionados) desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄). Valores expresados como media ± error estándar. Los asteriscos y almohadillas indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo para cada respectiva condición de crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$).

		%		Mayoritarios (g elemento/Kg planta)					Minoritarios (mg elemento/Kg planta)							K:Na
		C	N	Ca	K	Mg	P	S	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Na	Zn	
Condiciones normales	Control	43,84 ± 0,12	3,92 ± 0,01	18,44 ± 0,14	41,37 ± 1,27	8,01 ± 0,17	3,48 ± 0,04	4,28 ± 0,07	47,00 ± 1,88	7,82 ± 0,11	140,60 ± 5,12	73,71 ± 0,24	2,96 ± 0,08	606,25 ± 15,77	24,87 ± 0,38	68,22 ± 0,44
	SCPM31	44,16 ± 0,12	3,53 ± 0,02	16,56 ± 0,39	42,83 ± 2,78	6,24 ± 0,21	2,62 ± 0,09	4,03 ± 0,13	51,38 ± 3,13	7,23 ± 0,05	131,00 ± 16,91	73,37 ± 2,58	2,98 ± 0,07	697,01 ± 40,63*	22,33 ± 1,18	61,39 ± 0,42
	SCPM81	44,06 ± 0,20	3,78 ± 0,02	18,62 ± 0,10	46,35 ± 0,83*	7,96 ± 0,08	3,66 ± 0,04	4,22 ± 0,04	54,53 ± 2,71*	8,14 ± 0,08	102,41 ± 3,87	74,72 ± 2,66	2,82 ± 0,06	704,86 ± 9,79*	25,09 ± 0,40	65,75 ± 0,29
	HUTR05	43,88 ± 0,14	3,82 ± 0,03	19,32 ± 0,44	41,07 ± 0,37	8,09 ± 0,11	3,74 ± 0,04*	4,40 ± 0,05	49,93 ± 1,49	7,60 ± 0,08	115,20 ± 7,98	75,55 ± 2,35	3,25 ± 0,04*	722,17 ± 9,52*	22,90 ± 0,38	56,88 ± 0,53
	GPTR29	43,51 ± 0,13	4,02 ± 0,03*	19,93 ± 0,56*	42,88 ± 1,21	8,69 ± 0,22*	3,65 ± 0,11	4,29 ± 0,09	49,01 ± 1,58	8,06 ± 0,27	172,97 ± 10,53*	77,53 ± 2,41	2,94 ± 0,10	711,41 ± 9,98*	23,17 ± 0,73	60,25 ± 0,86
50 mM NaCl	Control	39,84 ± 0,42	3,53 ± 0,06	21,09 ± 0,52	37,75 ± 0,70	7,01 ± 0,17	2,88 ± 0,03	4,15 ± 0,06	53,37 ± 0,21	9,46 ± 0,17	852,58 ± 151,41	81,48 ± 2,90	3,63 ± 0,12	11270,84 ± 274,22	31,21 ± 1,39	3,35 ± 0,10
	SCPM31	38,74 ± 0,90	3,43 ± 0,05	20,04 ± 0,07	35,06 ± 0,65	7,12 ± 0,13	2,78 ± 0,13	4,14 ± 0,07	50,36 ± 0,76	9,86 ± 0,61	1094,70 ± 91,53	83,97 ± 0,54	3,77 ± 0,21	10589,55 ± 159,26#	26,49 ± 1,53	3,31 ± 0,01
	SCPM81	38,71 ± 0,57	3,41 ± 0,05	21,28 ± 0,48	36,00 ± 1,30	6,56 ± 0,20	2,71 ± 0,08	3,93 ± 0,10	48,14 ± 0,69	8,66 ± 0,46	685,94 ± 90,59	80,12 ± 1,62	3,88 ± 0,18	11050,62 ± 146,42	26,20 ± 1,16	3,26 ± 0,07
	HUTR05	43,16 ± 1,57*	3,76 ± 0,12*	21,09 ± 0,47	35,50 ± 0,27	7,27 ± 0,05	2,73 ± 0,06	3,73 ± 0,04	47,56 ± 0,74	8,37 ± 0,31	625,33 ± 61,54	86,14 ± 1,99	3,53 ± 0,12	9290,51 ± 93,77#	21,77 ± 0,57	3,82 ± 0,01*
	GPTR29	41,14 ± 0,10	3,62 ± 0,01	19,39 ± 0,63	37,55 ± 0,32	6,32 ± 0,13	2,63 ± 0,03	4,03 ± 0,06	50,50 ± 0,70	10,16 ± 0,66	465,35 ± 35,09	81,63 ± 2,65	3,57 ± 0,12	8905,57 ± 203,37#	26,54 ± 0,42	4,22 ± 0,11*
50 mM Na ₂ SO ₄	Control	42,80 ± 0,34	3,43 ± 0,07	13,81 ± 0,23	38,67 ± 0,81	6,41 ± 0,24	2,56 ± 0,06	13,58 ± 0,17	52,78 ± 1,54	7,86 ± 0,37	730,30 ± 156,50	73,17 ± 1,80	3,33 ± 0,15	8460,25 ± 240,50	23,41 ± 0,48	4,57 ± 0,04
	SCPM31	42,71 ± 0,07	3,54 ± 0,02	12,99 ± 0,07	35,67 ± 0,13	5,51 ± 0,07	2,68 ± 0,06	14,29 ± 0,28	48,55 ± 0,96	7,22 ± 0,37	451,72 ± 62,71	59,79 ± 1,27	3,20 ± 0,11	9059,90 ± 121,16*	23,07 ± 0,38	3,94 ± 0,04#
	SCPM81	42,43 ± 0,01	3,85 ± 0,01*	13,09 ± 0,11	37,14 ± 0,72	5,95 ± 0,04	2,75 ± 0,03*	15,46 ± 0,26*	53,64 ± 1,51	7,56 ± 0,30	475,72 ± 42,87	66,35 ± 3,24	3,05 ± 0,04	9519,33 ± 104,89*	26,82 ± 0,07*	3,90 ± 0,12#
	HUTR05	42,41 ± 0,01	3,85 ± 0,03*	11,97 ± 0,03	39,24 ± 0,17	5,63 ± 0,05	2,90 ± 0,04*	13,80 ± 0,35	53,28 ± 1,18	6,94 ± 0,05	297,94 ± 35,98	57,78 ± 1,69	3,07 ± 0,01	8136,10 ± 214,11	31,02 ± 0,44*	4,83 ± 0,15
	GPTR29	43,09 ± 0,17	3,55 ± 0,04	13,42 ± 0,42	34,28 ± 0,73	6,20 ± 0,13	2,56 ± 0,01	11,86 ± 0,17#	48,95 ± 0,91	8,26 ± 0,36	268,92 ± 12,73	60,77 ± 0,29	3,08 ± 0,08	7692,34 ± 194,86#	19,56 ± 0,16	4,47 ± 0,19

La inoculación con los aislados seleccionados también indujo cambios en el contenido mineral de las plantas de canónigos (Tabla 53). Bajo condiciones normales de crecimiento, las plantas tratadas con cada una de las cepas exhibieron incrementos significativos en el contenido de Na, con un aumento de entre el 15% y el 20 % en comparación con las plantas sin inocular. Asimismo, la aplicación de SCPM81 mejoró la concentración de K y B, la de HUTR05 aumentó el contenido en P y Mo, y el tratamiento con GPTR29 mejoró el de N, Ca, Mg y Fe. En presencia de estrés por NaCl, el aislado HUTR05 indujo una mayor acumulación de C y N en comparación con las plantas control desarrolladas en las mismas condiciones. Además, los canónigos inoculados con SCPM31, HUTR05 y GPTR29 mostraron una reducción significativa del contenido en sodio respecto al control salino, lo que resultó en una mejora del ratio K:Na en las plantas tratadas con los aislados del género *Rhizobium*. Bajo 50 mM Na₂SO₄, el tratamiento con SCPM81 y HUTR05 indujo incrementos superiores al 8 % en la concentración de N, P y Zn, en comparación con el control estresado. También es importante destacar la reducción del contenido de S y Na en los canónigos inoculados con GPTR29, indicando los efectos de esta cepa en la protección del cultivo frente a los iones causantes del estrés salino por Na₂SO₄. Sin embargo, las plantas tratadas con SCPM31 y SCPM81 exhibieron incrementos en la concentración de sodio y azufre (solo en el caso de SCPM81), lo que resultó en una reducción del ratio K:Na.

Celador (2017) analizó el efecto de la inoculación con un aislado del género *Rhizobium* sobre el contenido mineral de plantas de canónigo desarrolladas bajo condiciones normales de crecimiento, observando un incremento significativo de la concentración de nitrógeno y sodio, similar a los resultados obtenidos por GPTR29 en condiciones no salinas. Collado-González y colaboradores (2023) también informaron que el tratamiento conjunto con cepas de los géneros *Azospirillum* y *Pantoea* provocó aumentos significativos en el contenido de nitrógeno de plantas de canónigo desarrolladas bajo condiciones normales y de estrés térmico. Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios que analicen el efecto de la inoculación bacteriana sobre el contenido mineral de plantas de canónigo sometidas a estrés salino.

En resumen, la inoculación con los aislados SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29 no solo indujo cambios en parámetros productivos de las plantas procedentes de los ensayos de invernadero, evidenciando su capacidad para potenciar el crecimiento vegetal y mitigar los efectos negativos del estrés salino. Sino que también provocó mejoras en el contenido mineral de las plantas, al modificar su contenido en macro y micronutrientes, lo que subraya el impacto

positivo del tratamiento bacteriano en la mejora nutricional de los cultivos. Además, este análisis confirmó la mitigación de los efectos del estrés iónico causados por la salinidad, gracias a la aplicación de inoculantes bacterianos. Así, las mejoras del ratio K:Na en las plantas expuestas a NaCl y Na₂SO₄, o la reducción del contenido en S de las plantas crecidas bajo Na₂SO₄, constataron estos hallazgos.

3. Análisis del contenido en compuestos fenólicos de las plantas de lechuga, apio y canónigo desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ubicuos en las plantas, producidos a través de las vías sintéticas siquimato/fenilpropanoide y policétido acetato/malonato (Naikoo et al., 2019). Estos compuestos desempeñan múltiples funciones fisiológicas en las plantas, que van desde el crecimiento, desarrollo y reproducción, hasta la defensa frente a estreses bióticos y abióticos, así como la interacción positiva con otros organismos (Cheynier, 2012; Jaganath & Crozier, 2010; Kumar et al., 2020; Naikoo et al., 2019). Por ejemplo, este tipo de metabolitos secundarios actúan como mecanismo de neutralización del daño oxidativo causado por la acumulación de ROS, resultado de la exposición de las plantas a diferentes tipos de estreses, como la salinidad (Kumar et al., 2020; Naikoo et al., 2019).

Asimismo, está descrito que los compuestos fenólicos poseen una gran variedad de actividades biológicas: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, vasodilatadora, cardioprotectora, anticancerígena y, sobre todo, antioxidante (Balasundram et al., 2006; Kumar et al., 2020). Por tanto, los alimentos que los contienen son considerados de gran interés por sus efectos beneficiosos sobre la salud humana, siendo, además, esenciales en la dieta (Cheynier, 2012; Jaganath & Crozier, 2010). En este sentido, los cultivos hortícolas son una fuente de alimentos rica en compuestos bioactivos, como ácidos fenólicos y flavonoides (Kaushik et al., 2015). Entre ellos, destacan la lechuga, el apio y el canónigo, cuya composición ha sido ampliamente estudiada, resaltando su abundancia en compuestos con propiedades nutraceuticas (Grzegorzewski et al., 2010; Kim et al., 2016; Kooti & Daraei, 2017; Marakova et al., 2022; Mou, 2008; Ramos-Bueno et al., 2016; Santander et al., 2022; Singh et al., 2022; Tan et al., 2023).

En los últimos años, ha sido comprobado que la inoculación con bacterias PGP puede inducir una mejora de las concentraciones de compuestos fenólicos en plantas (Flores-Félix et al., 2024; Wallis & Galarneau, 2020). Por lo tanto, el uso de bioinoculantes bacterianos no solo supone

una alternativa sostenible para mejorar el rendimiento de los cultivos, sino que constituye una estrategia en la mejora del contenido nutricional de las plantas. Sin embargo, la composición fenólica de las plantas puede variar según el tipo de inóculo aplicado, la especie o variedad vegetal utilizada e, incluso las condiciones de crecimiento del cultivo (Flores-Félix et al., 2018; García-Seco et al., 2015; Jiménez-Gómez et al., 2020; Jiménez-Gómez et al., 2021; Mahmoudi et al., 2010; Nautiyal et al., 2008; Rojas-Tapias et al., 2012; Santander et al., 2020). En consecuencia, es importante analizar cada interacción de manera individual para comprender los posibles efectos beneficiosos de la inoculación en el cultivo en cuestión, considerando las condiciones de crecimiento específicas.

En este apartado describimos la determinación mediante HPLC-DAD-MS del contenido en compuestos fenólicos de los extractos obtenidos de las plantas de lechuga, apio y canónigo procedentes de los ensayos en invernadero desarrollados bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄). Estos análisis fueron realizados en colaboración con el Grupo de Investigación en Polifenoles del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca.

3.1. Determinación del contenido en compuestos fenólicos de las plantas de lechuga.

El análisis realizado en las plantas de lechuga crecidas en invernadero permitió identificar un total de 10 compuestos fenólicos, 6 ácidos fenólicos y 4 flavonoides (Tabla 54). Los ácidos fenólicos fueron los compuestos más abundantes en las hojas de lechuga, suponiendo, aproximadamente, el 70 % del total. De entre ellos, el ácido cicórico fue el compuesto que presentó una concentración más alta, seguido del ácido cafeoil quínico. En cambio, todos los flavonoides obtenidos mostraron concentraciones similares entre ellos, siendo el hexóxido de acetilo de quercetina el que presentó unos valores promedio más elevados, entre todas las condiciones y tratamientos analizados. Así, la distribución de composición fenólica de las plantas analizadas en el presente trabajo coincide con estudios previos realizados en *Lactuca sativa* L. var. *romana*, (Llorach et al., 2008). Además, entre los compuestos identificados fueron detectados ácidos fenólicos y flavonoides que ya habían sido descritos previamente en otros estudios realizados sobre la composición orgánica de lechuga (Alarcón-Flores et al., 2016; Llorach et al., 2008; López et al., 2014).

Tabla 54: Contenido en compuestos fenólicos (g/kg) de las plantas de lechuga (control e inoculadas con los aislados seleccionados) desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄). Valores expresados como media $\pm$ error estándar. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo para cada respectiva condición de crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$).

		Condiciones normales					100 mM NaCl					50 mM Na ₂ SO ₄				
		Control	SCPM31	SCPM81	HUTR05	GPTR29	Control	SCPM31	SCPM81	HUTR05	GPTR29	Control	SCPM31	SCPM81	HUTR05	GPTR29
Ácidos fenólicos	Derivado del ácido protocatecuico	0,31 $\pm$ 0,008	0,40 $\pm$ 0,031*	0,34 $\pm$ 0,011	0,11 $\pm$ 0,049	0,26 $\pm$ 0,021	0,10 $\pm$ 0,046	0,24 $\pm$ 0,018	0,12 $\pm$ 0,055	0,18 $\pm$ 0,087	0,14 $\pm$ 0,012	0,01 $\pm$ 0,000	0,01 $\pm$ 0,000	0,01 $\pm$ 0,000	0,01 $\pm$ 0,000	0,01 $\pm$ 0,000
	Ácido cafeoil tartárico	0,38 $\pm$ 0,161	0,34 $\pm$ 0,019	0,33 $\pm$ 0,008	0,33 $\pm$ 0,013	0,14 $\pm$ 0,010	0,07 $\pm$ 0,004	0,08 $\pm$ 0,014	0,24 $\pm$ 0,021*	0,22 $\pm$ 0,014*	0,28 $\pm$ 0,051*	0,42 $\pm$ 0,014	0,38 $\pm$ 0,041	0,52 $\pm$ 0,072	0,48 $\pm$ 0,041	0,26 $\pm$ 0,065
	Ácido cafeoil quínico	4,58 $\pm$ 0,888	9,33 $\pm$ 1,845*	12,03 $\pm$ 2,358*	15,43 $\pm$ 3,325*	9,27 $\pm$ 1,901*	10,38 $\pm$ 2,840	8,86 $\pm$ 2,349	23,24 $\pm$ 5,167*	25,03 $\pm$ 6,472*	31,78 $\pm$ 8,035*	9,73 $\pm$ 1,613	11,50 $\pm$ 2,420*	9,31 $\pm$ 1,494	10,97 $\pm$ 2,046*	14,51 $\pm$ 3,072*
	Ácido dicafeoil quínico	0,58 $\pm$ 0,041	1,56 $\pm$ 0,066*	1,92 $\pm$ 0,008*	3,46 $\pm$ 0,366*	1,66 $\pm$ 0,133*	1,97 $\pm$ 0,120	1,61 $\pm$ 0,099	3,22 $\pm$ 0,042*	3,24 $\pm$ 0,023*	4,87 $\pm$ 0,193*	2,22 $\pm$ 0,080	3,68 $\pm$ 0,081*	1,37 $\pm$ 0,017	2,47 $\pm$ 0,058*	3,52 $\pm$ 0,047*
	Ácido cafeico	0,07 $\pm$ 0,038	0,01 $\pm$ 0,000	0,01 $\pm$ 0,000	0,01 $\pm$ 0,000	0,01 $\pm$ 0,000	0,01 $\pm$ 0,000	0,01 $\pm$ 0,000	0,01 $\pm$ 0,000	0,01 $\pm$ 0,000	0,76 $\pm$ 0,048*	0,73 $\pm$ 0,044	0,23 $\pm$ 0,112	0,44 $\pm$ 0,118	0,52 $\pm$ 0,025	0,20 $\pm$ 0,195
	Ácido cicórico	7,03 $\pm$ 0,883	41,93 $\pm$ 6,964*	41,79 $\pm$ 8,149*	45,70 $\pm$ 10,817*	22,47 $\pm$ 5,360*	12,96 $\pm$ 2,939	10,43 $\pm$ 2,304	32,10 $\pm$ 5,168*	30,38 $\pm$ 5,365*	34,53 $\pm$ 8,516*	25,22 $\pm$ 5,927	23,73 $\pm$ 5,400	26,13 $\pm$ 5,962*	32,62 $\pm$ 7,879*	38,70 $\pm$ 9,250*
Flavonoides	Glucósido de luteolina	3,43 $\pm$ 0,453	4,25 $\pm$ 0,196	4,47 $\pm$ 0,123	6,68 $\pm$ 0,753*	3,96 $\pm$ 0,423	4,20 $\pm$ 0,178	5,17 $\pm$ 0,233*	6,23 $\pm$ 0,049*	8,59 $\pm$ 0,180*	5,44 $\pm$ 0,080*	2,91 $\pm$ 0,260	3,95 $\pm$ 0,145*	3,74 $\pm$ 0,054*	4,54 $\pm$ 0,173*	5,82 $\pm$ 0,302*
	Glucurónido de luteolina	2,36 $\pm$ 0,257	7,12 $\pm$ 0,435*	4,89 $\pm$ 0,516*	3,96 $\pm$ 0,744*	2,12 $\pm$ 0,191	3,03 $\pm$ 0,460	1,64 $\pm$ 0,157	7,11 $\pm$ 0,098*	7,43 $\pm$ 0,312*	3,44 $\pm$ 0,238	2,18 $\pm$ 0,400	3,17 $\pm$ 0,353*	1,56 $\pm$ 0,293	3,41 $\pm$ 0,230*	2,79 $\pm$ 0,023
	Glucurónido de quercetina	1,24 $\pm$ 0,011	3,14 $\pm$ 0,035*	3,21 $\pm$ 0,038*	3,69 $\pm$ 0,303*	2,32 $\pm$ 0,150*	1,76 $\pm$ 0,173	1,62 $\pm$ 0,090	2,67 $\pm$ 0,043*	2,84 $\pm$ 0,117*	3,01 $\pm$ 0,040*	2,32 $\pm$ 0,045	1,76 $\pm$ 0,053	1,95 $\pm$ 0,024	2,83 $\pm$ 0,065*	2,86 $\pm$ 0,003*
	Hexóxido de acetilo de quercetina	2,54 $\pm$ 0,018	6,26 $\pm$ 0,030*	6,24 $\pm$ 0,041*	8,82 $\pm$ 0,717*	4,76 $\pm$ 0,388*	4,42 $\pm$ 0,305	3,80 $\pm$ 0,259	7,98 $\pm$ 0,086*	9,60 $\pm$ 0,172*	9,92 $\pm$ 0,081*	4,61 $\pm$ 0,079	3,59 $\pm$ 0,098	4,30 $\pm$ 0,014	5,61 $\pm$ 0,057*	7,37 $\pm$ 0,069*
TOTAL ÁCIDOS FENÓLICOS		12,95 $\pm$ 0,444	53,57 $\pm$ 1,418*	56,41 $\pm$ 0,123*	65,02 $\pm$ 4,245*	33,80 $\pm$ 1,635*	25,49 $\pm$ 1,805	21,22 $\pm$ 1,217	58,93 $\pm$ 0,609*	59,06 $\pm$ 1,128*	72,36 $\pm$ 0,381*	38,33 $\pm$ 0,262	39,52 $\pm$ 0,290	38,27 $\pm$ 0,628	47,07 $\pm$ 0,539*	57,19 $\pm$ 1,55*
TOTAL FLAVONOIDES		9,57 $\pm$ 0,654	20,77 $\pm$ 0,570*	18,82 $\pm$ 0,664*	23,15 $\pm$ 1,836*	13,15 $\pm$ 0,871*	13,42 $\pm$ 1,096	12,22 $\pm$ 0,732	24,00 $\pm$ 0,018*	28,45 $\pm$ 0,775*	21,82 $\pm$ 0,258*	12,03 $\pm$ 0,567	12,46 $\pm$ 0,592	11,55 $\pm$ 0,342	16,39 $\pm$ 0,323*	18,84 $\pm$ 0,32*
TOTAL		22,52 $\pm$ 1,095	74,34 $\pm$ 1,567*	75,23 $\pm$ 0,557*	88,17 $\pm$ 6,065*	46,95 $\pm$ 2,442*	38,91 $\pm$ 2,893	33,44 $\pm$ 1,943	82,93 $\pm$ 0,592*	87,51 $\pm$ 1,863*	94,18 $\pm$ 0,636*	50,36 $\pm$ 0,747	51,98 $\pm$ 1,080	49,82 $\pm$ 0,941	63,46 $\pm$ 0,830*	76,03 $\pm$ 1,81*

Los resultados obtenidos indicaron que el estrés salino provocó un incremento en el contenido de compuestos fenólicos totales (Tabla 54). Las plantas de lechuga cultivadas en condiciones de salinidad, tanto por NaCl como por Na₂SO₄, exhibieron un aumento promedio del contenido de compuestos fenólicos de aproximadamente un 30 % en comparación con las plantas cultivadas en condiciones normales, en base a todos los tratamientos analizados. Mahmoudi y colaboradores (2010) corroboraron este hallazgo al observar un aumento significativo del contenido fenólico total en plantas de lechuga var. *romana* expuesta a 100 mM NaCl, también cercano al 30 %. Sin embargo, no observaron un aumento de esta variable en condiciones de salinidad por Na₂SO₄ (77 mM), en comparación con las condiciones no estresadas (Mahmoudi et al., 2010). Neocleous y colaboradores (2013) también observaron una mejora significativa del contenido de fenoles y flavonoides en plantas de lechuga de dos variedades diferentes expuestas a salinidad por NaCl. Por otro lado, otros estudios determinaron que plantas de lechuga expuesta a salinidad por NaCl presentaban un menor contenido fenólico en las hojas, bajo concentraciones salinas más altas a las utilizadas en este estudio (Ahmed et al., 2019; Kim et al., 2008). Por tanto, diversos factores, como el tipo de salinidad, la variedad vegetal y la dosis salina aplicada, pueden influir en la acumulación de compuestos fenólicos.

Es importante tener en cuenta que una de las consecuencias del estrés salino en plantas es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que resulta en estrés oxidativo (Ilangumaran & Smith, 2017; Shrivastava & Kumar, 2015). En este sentido, está ampliamente descrito que los compuestos fenólicos tienen una alta actividad antioxidante, lo que ayuda a limitar los efectos del daño celular y molecular causado por las ROS (Kumar et al., 2020; Naikoo et al., 2019). Por tanto, el aumento del contenido en compuestos con capacidad antioxidante supondría una ventaja en las plantas sometidas a condiciones de estrés salino.

Por otro lado, la inoculación con los diferentes aislados seleccionados provocó mejoras significativas del contenido de ácidos fenólicos y flavonoides totales, así como de compuestos fenólicos totales, bajo las diferentes condiciones de crecimiento (Tabla 54).

Bajo condiciones de crecimiento normales observamos incrementos estadísticamente significativos en la concentración de compuestos fenólicos totales en las plantas tratadas con cada una de las cepas, en comparación con las plantas control. Específicamente, pudimos determinar un aumento de entre el 108,4 % y el 291,5 % debido a la inoculación bacteriana. Estas diferencias pueden ser atribuidas, principalmente, al bajo contenido de ácido cicórico en las hojas de las plantas control, en comparación con las plantas tratadas con cada uno de los

aislados. Asimismo, la inoculación con las cepas SCPM81, HUTR05 y GPTR29 también dio lugar a incrementos significativos del contenido total de ácidos fenólicos y flavonoides en las hojas de las plantas desarrolladas bajo 100 mM NaCl, en comparación con el control crecido en esas mismas condiciones. Las diferencias porcentuales fueron aproximadamente del 100 %. En cambio, bajo condiciones de salinidad por Na₂SO₄, únicamente la inoculación con los aislados identificados dentro del género *Rhizobium* generó un aumento significativo del contenido en compuestos fenólicos de la parte aérea de las plantas. Además, estos incrementos porcentuales únicamente alcanzaron entre el 20 % y el 50 % del valor obtenido en las plantas sin inocular y desarrolladas en esas mismas condiciones salinas.

Como fue comentado previamente, la acumulación de compuestos fenólicos en plantas depende de las condiciones de cultivo, de la especie y variedad vegetal utilizada, pero también del tipo de inóculo utilizado. Por ejemplo, Avio y colaboradores (2017) comprobaron que el hongo micorrízico *Rhizoglyphus irregularis*, promovía la acumulación de compuestos fenólicos en hojas de lechuga var. *crispa* en comparación con muestras procedentes del control. Sin embargo, Santander y colaboradores (2020) informaron que la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en lechuga var. *capitata* no tenía un efecto significativo sobre el contenido fenólico en las hojas de lechuga, incluso cuando estaban desarrolladas bajo condiciones de salinidad por NaCl. En un estudio más reciente, Santander y colaboradores (2024) demostraron que la inoculación con PGPBs de los géneros *Bacillus* y *Priestia* tampoco mejoró el contenido de diversos compuestos fenólicos, ni de fenoles totales, en plantas de lechuga var. *capitata* desarrolladas bajo condiciones de crecimiento normal y de estrés hídrico. En cambio, otros estudios que analizan la inoculación con PGPBs en diversos cultivos expuestos a condiciones salinas mostraron un aumento en los niveles de compuestos fenólicos y flavonoides derivados de la inoculación bacteriana (Jiménez-Gómez et al., 2020; Jiménez-Gómez et al., 2021; Rojas-Tapias et al., 2013). Estos últimos resultados concuerdan con los descritos en el presente trabajo, y sugieren el efecto protector de los aislados seleccionados (principalmente SCPM81, HUTR05 Y GPTR29) frente a los efectos negativos e inhibidores provocados por la salinidad.

3.2. Determinación del contenido en compuestos fenólicos de las plantas de apio.

En los extractos obtenidos de la parte aérea de las plantas de apio fueron identificados un total de 16 compuestos fenólicos, de los cuales 6 eran ácidos fenólicos y 10 flavonoides (Tabla 55). En promedio, aproximadamente un 66 % de los compuestos identificados correspondieron a

flavonoides, mientras que el 33 % restante fueron ácidos fenólicos. Estudios previos han señalado que la distribución de la composición entre ácidos fenólicos y flavonoides puede variar según la variedad de apio utilizada, con contenidos que oscilan el 40-60 % de flavonoides respecto al total de compuestos fenólicos (Yao et al., 2010b; Yao & Ren, 2011). Cabe destacar que estos trabajos emplearon el sistema HPLC para la identificación y cuantificación, en lugar del HPLC-DAD-MS.

Los compuestos más abundantes obtenidos en las muestras de apio fueron los derivados de la apigenina y del crisoeriol, entre los flavonoides, y los ácidos clorogénico y cumaroil-quínico, entre los ácidos fenólicos (Tabla 55). Además, también fueron identificados otros compuestos como derivados de la luteolina o del ácido hidroxibenzoico. Investigaciones anteriores también han destacado la apigenina como el compuesto fenólico predominante en diversas variedades de apio (Yao et al., 2010b; Yao & Ren, 2011). Asimismo, estudios realizados con espectrometría de masas y enfocados en la detección de flavonoides en apio revelaron la presencia de compuestos similares a los indicados en la Tabla 55 (Hostetler et al., 2012; Lin et al., 2007; Liu et al., 2017).

Por otro lado, la salinidad por NaCl y Na₂SO₄ afectó de manera dispar a la acumulación de compuestos fenólicos en las plantas de apio (Tabla 55). En promedio, las plantas expuestas a 100 mM NaCl presentaron un contenido total de compuestos fenólicos un 25 % menor que las cultivadas en condiciones normales, mientras que bajo 50 mM Na₂SO₄, este contenido fue aproximadamente un 10 % superior. Sin embargo, es importante destacar que los valores de compuestos fenólicos totales variaron considerablemente para cada tratamiento y tipo de condición, lo que sugiere la influencia de factores como la inoculación o el tipo y la dosis de salinidad aplicada, en la respuesta observada. Así, Gao y colaboradores (2023) comprobaron que las plantas de apio desarrolladas bajo 100 mM NaCl mostraban un contenido de ácidos fenólicos (en hojas) y flavonoides (en peciolo) estadísticamente inferior a las plantas no estresadas, así como un menor contenido en sustancias antioxidantes no enzimáticas. Hasta la fecha, no han sido publicados estudios adicionales que aborden la variación en la composición fenólica del apio bajo condiciones de salinidad por NaCl, ni tampoco por Na₂SO₄.

Tabla 55: Contenido en compuestos fenólicos (g/kg) de las plantas de apio (control e inoculadas con los aislados seleccionados) desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄). Valores expresados como media $\pm$ error estándar. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo para cada respectiva condición de crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$).

		Condiciones normales					100 mM NaCl					50 mM Na ₂ SO ₄				
		Control	SCPM31	SCPM81	HUTR05	GPTR29	Control	SCPM31	SCPM81	HUTR05	GPTR29	Control	SCPM31	SCPM81	HUTR05	GPTR29
Ácidos fenólicos	Derivado del ácido hidroxibenzoico	0,10 $\pm$ 0,001	0,12 $\pm$ 0,004	0,13 $\pm$ 0,002*	0,27 $\pm$ 0,012*	0,23 $\pm$ 0,004*	0,19 $\pm$ 0,009	0,24 $\pm$ 0,015	0,58 $\pm$ 0,015*	0,40 $\pm$ 0,011*	0,56 $\pm$ 0,028*	0,26 $\pm$ 0,024	0,29 $\pm$ 0,012	0,16 $\pm$ 0,005	0,09 $\pm$ 0,003	0,20 $\pm$ 0,001
	Ácido clorogénico	14,00 $\pm$ 0,159	0,46 $\pm$ 0,045	11,20 $\pm$ 0,216	10,40 $\pm$ 0,082	16,12 $\pm$ 0,499*	0,78 $\pm$ 0,009	2,52 $\pm$ 0,194*	10,18 $\pm$ 0,223*	8,65 $\pm$ 0,166*	11,55 $\pm$ 0,285*	1,85 $\pm$ 0,120	12,37 $\pm$ 0,085*	0,66 $\pm$ 0,032	7,87 $\pm$ 0,103*	1,63 $\pm$ 0,017
	Ácido neoclorogénico	0,35 $\pm$ 0,038	0,07 $\pm$ 0,003	0,28 $\pm$ 0,005	0,21 $\pm$ 0,009	0,31 $\pm$ 0,015	0,05 $\pm$ 0,003	0,13 $\pm$ 0,004*	0,30 $\pm$ 0,012*	0,36 $\pm$ 0,020*	0,26 $\pm$ 0,007*	0,12 $\pm$ 0,004	0,36 $\pm$ 0,008*	0,09 $\pm$ 0,005	0,23 $\pm$ 0,005*	0,09 $\pm$ 0,001
	Ácido cumaroil-quínico	1,14 $\pm$ 0,011	0,63 $\pm$ 0,012	0,70 $\pm$ 0,011	0,51 $\pm$ 0,012	0,07 $\pm$ 0,002	0,57 $\pm$ 0,010	0,78 $\pm$ 0,053*	0,51 $\pm$ 0,002	0,40 $\pm$ 0,009	0,57 $\pm$ 0,011	0,47 $\pm$ 0,021	0,85 $\pm$ 0,001*	0,84 $\pm$ 0,004*	0,47 $\pm$ 0,012	0,57 $\pm$ 0,004*
	Cafeoil N-triptófano	0,04 $\pm$ 0,007	0,02 $\pm$ 0,001	0,12 $\pm$ 0,004*	0,08 $\pm$ 0,003*	0,07 $\pm$ 0,001*	0,01 $\pm$ 0,002	0,04 $\pm$ 0,003*	0,09 $\pm$ 0,004*	0,07 $\pm$ 0,003*	0,12 $\pm$ 0,002*	0,03 $\pm$ 0,002	0,10 $\pm$ 0,007*	0,01 $\pm$ 0,001	0,11 $\pm$ 0,003*	0,03 $\pm$ 0,001
	Hexósido del cafeoil N-triptófano	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,06 $\pm$ 0,004*	0,00 $\pm$ 0,000	0,04 $\pm$ 0,003*	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,10 $\pm$ 0,003*	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,22 $\pm$ 0,005*	0,00 $\pm$ 0,000
Flavonoides	3'-O-metiltaxifolina 3-O-acetilglucósido	0,42 $\pm$ 0,013	0,06 $\pm$ 0,007	0,33 $\pm$ 0,020	0,07 $\pm$ 0,012	0,07 $\pm$ 0,003	0,00 $\pm$ 0,000	0,06 $\pm$ 0,003*	0,17 $\pm$ 0,007*	0,04 $\pm$ 0,006*	0,12 $\pm$ 0,008*	0,01 $\pm$ 0,001	0,05 $\pm$ 0,009*	0,13 $\pm$ 0,005*	0,18 $\pm$ 0,012*	0,09 $\pm$ 0,010*
	3'-O-metiltaxifolina	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,01 $\pm$ 0,001*	0,01 $\pm$ 0,001	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000	0,00 $\pm$ 0,000
	Luteolina 7-O-apiosilglucósido	1,11 $\pm$ 0,008	0,63 $\pm$ 0,012	1,90 $\pm$ 0,041*	0,94 $\pm$ 0,022	0,86 $\pm$ 0,011	0,68 $\pm$ 0,009	0,65 $\pm$ 0,009	0,70 $\pm$ 0,020	0,79 $\pm$ 0,019*	0,75 $\pm$ 0,031*	0,88 $\pm$ 0,006	1,28 $\pm$ 0,049*	0,78 $\pm$ 0,021	0,89 $\pm$ 0,028	0,73 $\pm$ 0,012

	Luteolina 7-O-glucósido	0,44 ± 0,005	0,35 ± 0,007	0,41 ± 0,004	0,45 ± 0,014	0,59 ± 0,006*	0,48 ± 0,017	0,58 ± 0,003*	0,37 ± 0,003	0,38 ± 0,015	0,41 ± 0,018	0,39 ± 0,017	0,58 ± 0,001*	0,49 ± 0,013*	0,48 ± 0,002*	0,44 ± 0,001*
	Apigenina 7-O-apiosilglucósido (apiin)	7,46 ± 0,121	4,87 ± 0,042	7,14 ± 0,234	5,74 ± 0,214	6,12 ± 0,105	4,91 ± 0,147	4,70 ± 0,015	5,26 ± 0,166	4,38 ± 0,152	4,57 ± 0,036	5,84 ± 0,189	8,99 ± 0,575*	6,45 ± 0,091	6,65 ± 0,225	5,65 ± 0,100
	Crisoeriol-7-O-apiosilglucósido	4,39 ± 0,042	1,08 ± 0,028	3,28 ± 0,047	1,35 ± 0,025	1,33 ± 0,030	1,02 ± 0,030	1,13 ± 0,020*	1,25 ± 0,035*	1,20 ± 0,029*	1,22 ± 0,018*	0,96 ± 0,056	2,44 ± 0,140*	1,15 ± 0,018	1,72 ± 0,043*	1,00 ± 0,023
	Apigenina 7-O-glucósido	0,27 ± 0,010	0,32 ± 0,026	0,30 ± 0,015	0,33 ± 0,002	0,36 ± 0,022*	0,35 ± 0,013	0,46 ± 0,005*	0,32 ± 0,014	0,30 ± 0,017	0,33 ± 0,011	0,37 ± 0,007	0,40 ± 0,013	0,54 ± 0,010*	0,35 ± 0,018	0,43 ± 0,005*
	Apigenina 7-O-(6''-acetil)-apiosilglucósido	0,19 ± 0,002	0,18 ± 0,002	0,19 ± 0,004	0,18 ± 0,001	0,21 ± 0,003*	0,17 ± 0,001	0,19 ± 0,001*	0,18 ± 0,001*	0,18 ± 0,001*	0,17 ± 0,001	0,18 ± 0,001	0,20 ± 0,001*	0,19 ± 0,002*	0,19 ± 0,002*	0,18 ± 0,002
	Apigenina 7-O-(6''-malonil)-apiosilglucósido	14,24 ± 0,262	1,30 ± 0,125	7,70 ± 0,021	2,29 ± 0,050	2,40 ± 0,050	1,05 ± 0,029	1,28 ± 0,073*	2,21 ± 0,032*	1,79 ± 0,059*	2,00 ± 0,024*	1,25 ± 0,033	6,79 ± 0,198*	1,74 ± 0,020*	3,36 ± 0,145*	1,31 ± 0,018
	Crisoeriol-7-O-(6''-malonil)-apiosilglucósido	5,08 ± 0,064	0,77 ± 0,037	2,97 ± 0,019	1,22 ± 0,022	1,18 ± 0,010	0,69 ± 0,015	0,90 ± 0,018*	1,15 ± 0,027*	0,98 ± 0,037*	1,06 ± 0,015*	0,79 ± 0,035	2,45 ± 0,015*	1,08 ± 0,006*	1,71 ± 0,046*	0,83 ± 0,017
	TOTAL ÁCIDOS FENÓLICOS	15,64 ± 0,131	1,29 ± 0,062	12,48 ± 0,210	11,47 ± 0,122	16,85 ± 0,489*	1,62 ± 0,009	3,71 ± 0,277*	11,66 ± 0,241*	9,88 ± 0,189*	13,17 ± 0,338*	2,74 ± 0,175	13,98 ± 0,078*	1,77 ± 0,025	8,99 ± 0,130*	2,51 ± 0,010
	TOTAL FLAVONOIDES	33,61 ± 0,211	9,54 ± 0,231	24,22 ± 0,268	12,57 ± 0,339	13,13 ± 0,090	9,34 ± 0,200	9,95 ± 0,089	11,61 ± 0,236*	10,03 ± 0,323	10,64 ± 0,120*	10,67 ± 0,285	23,18 ± 0,641*	12,55 ± 0,186*	15,54 ± 0,435*	10,65 ± 0,184
	TOTAL	49,24 ± 0,338	10,84 ± 0,291	36,70 ± 0,154	24,04 ± 0,461	29,98 ± 0,429	10,96 ± 0,208	13,66 ± 0,366*	23,27 ± 0,273*	19,91 ± 0,492*	23,81 ± 0,451*	13,41 ± 0,258	37,16 ± 0,718*	14,32 ± 0,210	24,52 ± 0,521*	13,16 ± 0,174

La inoculación con los aislados seleccionados también afectó la composición fenólica en las plantas de apio (Tabla 55). Bajo condiciones normales de crecimiento, la inoculación no produjo mejoras del contenido de compuestos fenólicos, con la excepción de las plantas tratadas con la cepa GPTR29, que mostraron un incremento del 7,7 % en el contenido de ácidos fenólicos totales. Sin embargo, bajo condiciones salinas, las plantas tratadas con los aislados seleccionados exhibieron aumentos significativos en el contenido fenólico total, en comparación con las plantas control de las mismas condiciones. Así, la inoculación bacteriana provocó la acumulación de compuestos fenólicos totales en las plantas desarrolladas bajo 100 mM NaCl, con incrementos porcentuales de entre el 24,6 % y el 117,2 %. Además, el contenido en ácidos fenólicos también fue mejorado por los cuatro aislados, así como la concentración de flavonoides totales en el caso de SCPM81 y GPTR29. Respecto a la salinidad por Na₂SO₄, observamos mejoras estadísticamente significativas del contenido en ácidos y compuestos fenólicos totales en las plantas tratadas con SCPM31 y HUTR05. En cambio, la inoculación con las 4 cepas seleccionadas mejoró significativamente la concentración de flavonoides totales en comparación con el control desarrollado en las mismas condiciones.

Dada la escasez de investigaciones que aborden los efectos de la aplicación de PGPBs en el apio, este estudio representa el primer análisis de los cambios en la composición de compuestos fenólicos derivados de la inoculación bacteriana en este cultivo. El artículo más semejante encontrado fue realizado por Khalil y colaboradores (2019), quienes examinaron el efecto de la aplicación conjunta de NPK y hongos micorrícicos arbusculares sobre el contenido de fenólicos totales y flavonoides en el apio, observando diferencias en la concentración entre las plantas control (sin fertilizar), las plantas fertilizadas exclusivamente, y aquellas sometidas a la aplicación conjunta de ambos tratamientos. Por otro lado, Ahmed (2017) demostró que la combinación de bacterias PGP y fertilizantes químicos (al 50 % de la dosis recomendada) mejoraba el contenido de carotenoides, vitamina C, y otros compuestos en las plantas de apio, en comparación con aquellas fertilizadas con la dosis de NPK recomendada. Además, Rehman y colaboradores (2019) encontraron incrementos en la concentración de carotenoides y antocianinas en plantas de apio inoculadas con cepas bacterianas halotolerantes bajo salinidad por NaCl, respaldando así los hallazgos observados en nuestro estudio respecto al contenido de compuestos fenólicos totales bajo salinidad por NaCl y Na₂SO₄. Este aumento en compuestos con actividad antioxidante podría suponer una mejora de la capacidad de las plantas para hacer frente a los efectos negativos derivados del estrés salino.

3.3. Determinación del contenido en compuestos fenólicos de las plantas de canónigo.

A partir de los extractos procedentes de las plantas de canónigo, fueron detectados 18 compuestos fenólicos, incluyendo 16 ácidos fenólicos y 2 flavonoides (Tabla 56). Aproximadamente el 95 % del total de los compuestos identificados correspondían a ácidos fenólicos, siendo el ácido criptoclorogénico el más abundante, seguido del ácido 3,5-dicafeoil quínico. Entre los flavonoides identificados, la diosmetina-7-*O*-rutinósido fue el más destacable en cuanto a su concentración (Tabla 56). Investigaciones previas han evidenciado que los ácidos fenólicos predominan entre los compuestos fenólicos presentes en el canónigo, representando entre el 80 % y el 90 % del total (Długosz-Grochowska et al., 2017; Hernández et al., 2021; Skrypnik et al., 2021; Wojciechowska et al., 2015). Además, también está comprobado que el ácido clorogénico y sus derivados aparecen entre los compuestos con concentraciones más altas (Długosz-Grochowska et al., 2017; Hernández et al., 2021; Ramos-Bueno et al., 2016; Skrypnik et al., 2021), mientras que la diosmetina destaca como el flavonoide más abundante (Długosz-Grochowska et al., 2016; Długosz-Grochowska et al., 2017; Grzegorzewski et al., 2011; Hernández et al., 2021).

La exposición a la salinidad, inducida tanto por NaCl como por Na₂SO₄, resultó en una leve disminución del contenido promedio de fenólicos totales, con reducciones del 2 % y 12 % en comparación con las plantas no estresadas, respectivamente (Tabla 56). De manera similar, Hernández y colaboradores (2021) observaron una disminución progresiva en el contenido de ácidos hidroxicinámicos, flavonas, flavonoles y flavononas en plantas de canónigo cultivadas en diferentes concentraciones de NaCl, con una reducción del 14 % bajo 60 mM NaCl. Estos hallazgos respaldan el efecto adverso de la salinidad en la acumulación de compuestos fenólicos en el cultivo del canónigo, tal y como pudimos comprobar en este trabajo. Además, los resultados obtenidos bajo 50 mM Na₂SO₄ permiten determinar las variaciones observadas en función de las condiciones de crecimiento siendo, además, la primera vez que se describe.

Tabla 56: Contenido en compuestos fenólicos (g/kg) de las plantas de canónigo (control e inoculadas con los aislados seleccionados) desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄). Valores expresados como media $\pm$ error estándar. Los asteriscos indican que los valores son estadísticamente significativos con respecto al control negativo para cada respectiva condición de crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$).

		Condiciones normales					50 mM NaCl					50 mM Na ₂ SO ₄				
		Control	SCPM31	SCPM81	HUTR05	GPTR29	Control	SCPM31	SCPM81	HUTR05	GPTR29	Control	SCPM31	SCPM81	HUTR05	GPTR29
Ácidos fenólicos	Derivado del ácido hidroxibenzoico	0,03 $\pm$ 0,002	0,21 $\pm$ 0,002*	0,06 $\pm$ 0,005	0,19 $\pm$ 0,021*	0,14 $\pm$ 0,051*	0,09 $\pm$ 0,042	0,09 $\pm$ 0,010*	0,11 $\pm$ 0,007	0,07 $\pm$ 0,011	0,07 $\pm$ 0,007	0,24 $\pm$ 0,028	0,24 $\pm$ 0,018	1,89 $\pm$ 0,014*	0,36 $\pm$ 0,016*	0,08 $\pm$ 0,001
	Hexósido de ácido sinápico	0,16 $\pm$ 0,007	0,14 $\pm$ 0,001	0,15 $\pm$ 0,003	0,13 $\pm$ 0,008	0,14 $\pm$ 0,009	0,15 $\pm$ 0,007	0,15 $\pm$ 0,007	0,14 $\pm$ 0,003	0,14 $\pm$ 0,004	0,16 $\pm$ 0,003	0,17 $\pm$ 0,016	0,18 $\pm$ 0,017	0,17 $\pm$ 0,002	0,17 $\pm$ 0,003	0,20 $\pm$ 0,002
	Derivado del ácido cafeoil quínico	0,02 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,002	0,02 $\pm$ 0,002	0,02 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,001	0,01 $\pm$ 0,001	0,01 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,001	0,01 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,001
	Ácido clorogénico	0,12 $\pm$ 0,003	0,10 $\pm$ 0,001	0,09 $\pm$ 0,003	0,09 $\pm$ 0,007	0,09 $\pm$ 0,005	0,09 $\pm$ 0,002	0,09 $\pm$ 0,006	0,07 $\pm$ 0,003	0,07 $\pm$ 0,003	0,08 $\pm$ 0,002	0,11 $\pm$ 0,007	0,11 $\pm$ 0,003	0,01 $\pm$ 0,001	0,10 $\pm$ 0,001	0,12 $\pm$ 0,001*
	Ácido criptoclorogénico	13,28 $\pm$ 0,196	13,70 $\pm$ 0,012	13,05 $\pm$ 0,165	12,65 $\pm$ 0,843	13,07 $\pm$ 0,392	13,36 $\pm$ 0,058	13,36 $\pm$ 0,647	12,20 $\pm$ 0,187	13,40 $\pm$ 0,415	13,30 $\pm$ 0,176	13,63 $\pm$ 0,304	13,50 $\pm$ 0,272	0,70 $\pm$ 0,064	12,65 $\pm$ 0,038	14,03 $\pm$ 0,169
	Ácido neoclorogénico	0,19 $\pm$ 0,007	0,25 $\pm$ 0,003*	0,24 $\pm$ 0,006*	0,21 $\pm$ 0,021	0,24 $\pm$ 0,015*	0,28 $\pm$ 0,023	0,28 $\pm$ 0,018	0,21 $\pm$ 0,015	0,25 $\pm$ 0,016	0,24 $\pm$ 0,013	0,28 $\pm$ 0,013	0,31 $\pm$ 0,018	0,02 $\pm$ 0,003	0,25 $\pm$ 0,004	0,32 $\pm$ 0,011*
	Ácido cafeico	0,04 $\pm$ 0,003	0,03 $\pm$ 0,001	0,05 $\pm$ 0,002	0,04 $\pm$ 0,005	0,04 $\pm$ 0,009	0,04 $\pm$ 0,006	0,04 $\pm$ 0,001	0,03 $\pm$ 0,004	0,03 $\pm$ 0,002	0,03 $\pm$ 0,036	0,04 $\pm$ 0,002	0,04 $\pm$ 0,001	0,01 $\pm$ 0,001	0,03 $\pm$ 0,002	0,03 $\pm$ 0,001
	Cis ácido 5-cafeoyl quínico	0,38 $\pm$ 0,010	0,33 $\pm$ 0,001	0,38 $\pm$ 0,044	0,48 $\pm$ 0,017*	0,48 $\pm$ 0,042*	0,52 $\pm$ 0,022	0,52 $\pm$ 0,038	0,43 $\pm$ 0,018	0,47 $\pm$ 0,023	0,65 $\pm$ 0,003*	0,61 $\pm$ 0,084	0,70 $\pm$ 0,148	0,05 $\pm$ 0,003	0,55 $\pm$ 0,022	0,56 $\pm$ 0,029
	Ácido cumaroil-quínico	0,38 $\pm$ 0,006	0,26 $\pm$ 0,001	0,35 $\pm$ 0,007	0,31 $\pm$ 0,024	0,25 $\pm$ 0,063	0,19 $\pm$ 0,063	0,19 $\pm$ 0,012	0,14 $\pm$ 0,004	0,19 $\pm$ 0,012	0,13 $\pm$ 0,036	0,17 $\pm$ 0,026	0,14 $\pm$ 0,030	0,11 $\pm$ 0,002	0,14 $\pm$ 0,001	0,16 $\pm$ 0,006

	Ácido feruloil quínico	0,02 ± 0,001	0,03 ± 0,001	0,04 ± 0,005*	0,01 ± 0,009	0,01 ± 0,005	0,01 ± 0,003	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,02 ± 0,011	0,03 ± 0,012	0,00 ± 0,000	0,01 ± 0,002	0,03 ± 0,003
	Ácido 3,4-dicafeoil quínico	0,09 ± 0,004	0,08 ± 0,001	0,09 ± 0,003	0,08 ± 0,008	0,09 ± 0,007	0,11 ± 0,007	0,11 ± 0,007	0,07 ± 0,005	0,08 ± 0,006	0,07 ± 0,006	0,11 ± 0,008	0,13 ± 0,011	0,00 ± 0,000	0,11 ± 0,020	0,13 ± 0,008
	Ácido 3,5-dicafeoil quínico	4,03 ± 0,130	3,45 ± 0,003	3,47 ± 0,113	3,64 ± 0,217	3,72 ± 0,169	3,71 ± 0,107	3,71 ± 0,338	3,13 ± 0,053	3,57 ± 0,144	3,23 ± 0,011	3,80 ± 0,093	3,70 ± 0,081	0,28 ±0,015	3,55 ± 0,017	4,59 ± 0,116*
	Ácido 4,5,-dicafeoil quínico	0,16 ± 0,008	0,15 ± 0,001	0,16 ± 0,010	0,16 ± 0,013	0,19 ± 0,015	0,21 ± 0,008	0,21 ± 0,015	0,14 ± 0,002	0,18 ± 0,011	0,16 ± 0,003	0,18 ± 0,017	0,20 ± 0,014	0,00 ± 0,000	0,16 ± 0,002	0,22 ± 0,016*
	Ácido 4-cumaroil- 3-cafeoil quínico	0,16 ± 0,005	0,13 ± 0,002	0,14 ± 0,003	0,14 ± 0,008	0,13 ± 0,016	0,12 ± 0,015	0,12 ± 0,009	0,09 ± 0,001	0,11 ± 0,005	0,10 ± 0,003	0,12 ± 0,006	0,12 ± 0,004	0,02 ± 0,001	0,11 ± 0,003	0,15 ± 0,008*
	Ácido 5-cumaroil- 3-cafeoil quínico	0,24 ± 0,005	0,18 ± 0,002	0,19 ± 0,006	0,21 ± 0,012	0,19 ± 0,025	0,17 ± 0,026	0,17 ± 0,014	0,14 ± 0,001	0,16 ± 0,007	0,15 ± 0,005	0,18 ± 0,003	0,17 ± 0,007	0,02 ± 0,001	0,16 ± 0,001	0,21 ± 0,013*
	Derivado hexósido del ácido cafeico	0,91 ± 0,134	0,83 ± 0,126	0,92 ± 0,150	0,88 ± 0,134	0,84 ± 0,157	0,84 ± 0,145	0,84 ± 0,182	1,09 ± 0,170	0,92 ± 0,157	0,91 ± 0,115*	0,78 ± 0,104	0,82 ± 0,102	0,14 ± 0,025	0,84 ± 0,142	1,21 ± 0,222*
Flavonoides	3'-O-metiltaxifolina 3-O-acetilglucósido	0,03 ± 0,008	0,04 ± 0,007	0,04 ± 0,008	0,02 ± 0,017	0,01 ± 0,010	0,03 ± 0,011	0,03 ± 0,011	0,05 ± 0,009	0,04 ± 0,003	0,07 ± 0,008*	0,07 ± 0,022	0,09 ± 0,012	0,00 ± 0,000	0,11 ± 0,002*	0,09 ± 0,004
	Diosmetina-7-O- rutinósido	1,63 ± 0,268	0,94 ± 0,004	1,13 ± 0,298	1,00 ± 0,282	0,94 ± 0,233	0,93 ± 0,188	0,93 ± 0,265	0,94 ± 0,244	0,83 ± 0,153	1,28 ± 0,218	0,84 ± 0,127	1,04 ± 0,034	0,92 ± 0,033	1,05 ± 0,066	1,20 ± 0,029*
TOTAL ÁCIDOS FENÓLICOS		20,20 ± 0,413	19,88 ± 0,010	19,40 ± 0,364	19,23 ± 1,252	19,64 ± 0,727	19,89 ± 0,201	19,88 ± 1,098	18,00 ± 0,199	19,66 ± 0,674	19,30 ± 0,202	20,44 ± 0,463	20,40 ± 0,493	3,41 ± 0,090	19,21 ± 0,066	22,04 ± 0,338*
TOTAL FLAVONOIDES		1,66 ± 0,266	0,97 ± 0,009	1,17 ± 0,305	1,02 ± 0,274	0,95 ± 0,241	0,96 ± 0,182	0,96 ± 0,271	0,99 ± 0,235	0,87 ± 0,154	1,35 ± 0,213	0,90 ± 0,132	1,13 ± 0,032*	0,92 ± 0,033	1,16 ± 0,064*	1,29 ± 0,029*
TOTAL		21,85 ± 0,652	20,85 ± 0,018	20,57 ± 0,666	20,25 ± 1,048	20,58 ± 0,967	20,85 ± 0,364	20,84 ± 1,256	18,99 ± 0,175	20,53 ± 0,656	20,65 ± 0,014	21,34 ± 0,375	21,53 ± 0,515	4,33 ± 0,122	20,37 ± 0,130	23,34 ± 0,364*

La inoculación con los aislados seleccionados no dio lugar a mejoras significativas en el contenido en compuestos fenólicos totales de las plantas de canónigo (Tabla 56). Únicamente el tratamiento con el aislado GPTR29 mejoró significativamente el contenido fenólico en las plantas sometidas a estrés por Na_2SO_4 en comparación con las plantas control de las mismas condiciones, con incrementos porcentuales del 43,2 %, 7,8 % y 9,3 % de la concentración de ácidos fenólicos, flavonoides y compuestos fenólicos totales, respectivamente. Además, las plantas desarrolladas bajo 50 mM Na_2SO_4 y tratadas con SCPM31 y HUTR05, también presentaron un 24,9 % y 28,9 % más de flavonoides totales que las plantas no inoculadas y estresadas. Collado-González y colaboradores (2023) informaron que la aplicación de PGPBs sobre plantas de canónigo no inducía un aumento de la acumulación de compuestos fenólicos con respecto a plantas no inoculadas en condiciones normales de crecimiento, pero que el tratamiento bacteriano bajo estrés térmico provocaba un incremento del contenido fenólico total. Estos hallazgos respaldan los obtenidos en el presente trabajo, al observar una respuesta diferencial de la planta en función de las condiciones de crecimiento. Según Trivedi y colaboradores (2020), en condiciones de estrés biótico o abiótico, las plantas pueden modular selectivamente el microbioma, seleccionando microorganismos beneficiosos capaces de reducir el estrés. Por tanto, el crecimiento bajo salinidad podría inducir una respuesta en el canónigo que resulta en la acumulación de compuestos fenólicos por acción bacteriana, como una estrategia defensiva frente a dicho estrés.

En resumen, los resultados obtenidos revelan que la variación del contenido fenólico de los cultivos hortícolas está influenciada por múltiples factores, incluyendo la especie vegetal estudiada, las condiciones de crecimiento, el tipo y dosis de salinidad aplicada, así como el inóculo utilizado. Además, este estudio constituye el primer análisis de los efectos de la salinidad inducida por Na_2SO_4 y la inoculación bacteriana sobre el contenido de compuestos fenólicos en plantas de lechuga, apio y canónigo.

Hemos observado que, en ciertos contextos agronómicos, la inoculación con los aislados seleccionados resultó en mejoras significativas en el contenido de compuestos fenólicos de las plantas. Por ejemplo, la aplicación de los aislados SCPM81, HUTR05 y GPTR29 incrementó notablemente la concentración de compuestos fenólicos totales en las plantas de lechuga y apio expuestas a 100 mM NaCl , mientras que las plantas de lechuga y canónigos tratadas con GPTR29 mostraron un mayor contenido fenólico que las plantas control bajo 50 mM Na_2SO_4 . Este aumento en el contenido de compuestos fenólicos podría conferir a las plantas una mayor

capacidad para hacer frente a los efectos adversos de la salinidad, proporcionando un sistema de defensa más eficaz contra el estrés oxidativo que las plantas no inoculadas.

Por otro lado, bajo condiciones normales de crecimiento, las plantas de lechuga inoculadas con las 4 cepas seleccionadas presentaron mejoras significativas en el contenido de ácidos fenólicos y flavonoides, y, por lo tanto, en compuestos fenólicos totales, en comparación con las plantas no inoculadas. Estos hallazgos sugieren que el aumento del contenido de compuestos antioxidantes podría potenciar las propiedades nutraceuticas de las plantas, lo que posiblemente tendría un impacto positivo en la salud del consumidor. No obstante, es crucial considerar que la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos en este tipo de alimentos suele ser baja, y que, en su mayoría, son biotransformados al ser consumidos tanto por el propio consumidor como por la microbiota asociada al mismo (Ayuda-Durán et al., 2020). Por lo tanto, un aumento en el contenido no garantiza necesariamente efectos biológicos positivos para el consumidor, siendo imperativo evaluar dichos efectos nutraceuticos en modelos *in vivo* (Ayuda-Durán et al., 2020).

4. Análisis de la expresión génica en muestras de lechuga desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄).

La interacción entre las plantas y los microorganismos beneficiosos es un factor crucial para una mutua adaptación al entorno y sus posibles cambios ambientales (Xu et al., 2021). Así, entre los beneficios de la inoculación bacteriana de los cultivos destaca la promoción del crecimiento vegetal, pero también la mitigación de diferentes estreses bióticos y abióticos (Ilangumaran & Smith, 2017). Sin embargo, estas interacciones dependen de complejos intercambios moleculares que modifican la expresión genética en ambas partes, dando lugar a respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares únicas (Birch & Kamoun, 2000; Chen et al., 2022). Obtener una visión funcional de esta interacción es un aspecto clave en investigación. Y, para ello, es necesario combinar el estudio de los efectos de la bioinoculación bacteriana con análisis que nos permitan comprender los mecanismos y determinantes implicados en esta compleja interacción (Chen et al., 2022). En este sentido, la transcriptómica, que hace referencia a la cuantificación de la expresión génica en una muestra biológica, es una metodología ampliamente utilizada para estudiar la dinámica y regulación génica derivada de la interacción entre planta y microorganismo (Chen et al., 2022; Xu et al., 2021). Siendo, por tanto, un enfoque útil para analizar la respuesta de las plantas en relación con sus endófitos (Levy et al., 2018).

El presente apartado detalla la variación en la expresión de genes relacionados con la respuesta vegetal ante a la inoculación bacteriana y la exposición a la salinidad en las plantas de lechuga procedentes del ensayo en invernadero. Utilizamos la lechuga como planta modelo debido a la extensa información disponible para este cultivo, incluyendo su genoma completo y trabajos previos comparativos. La elección de la lechuga también se sustenta en la disponibilidad de mayor cantidad de material vegetal para realizar la investigación. A través de la técnica de qPCR, analizamos los cambios en la expresión de los genes *LsPIP2*, *LsHKT1;6*, *LsNHX2*, *LsPAL*, y *LsSOD* bajo las diferentes condiciones de crecimiento (normales, 100 mM NaCl y 50 mM Na₂SO₄) y tratamientos aplicados (SCPM81, HUTR05 y GPTR29). Cabe destacar que las plantas inoculadas con SCPM31 no fueron objeto de análisis debido a la limitada disponibilidad de material vegetal. La normalización de los datos de expresión fue realizada utilizando el gen endógeno *LsEIF2A* como referencia (ya que presentó una expresión más estable que *LsTIP41*), y una condición control (el tratamiento sin inocular desarrollado en condiciones normales de crecimiento), siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Los análisis estadísticos fueron realizados para cada condición de crecimiento (normales, 100 mM NaCl y 50 mM Na₂SO₄), aunque la expresión está relativizada en todos los casos frente a un calibrador o condición de normalización, representado por el tratamiento no inoculado desarrollado en condiciones normales.

4.1. Análisis de la expresión del gen *LsPIP2*.

El estrés osmótico, primera fase en el proceso de salinización del suelo, surge por la acumulación de sales en el sistema radicular de las plantas (Ilangumaran & Smith, 2017; Mukhopadhyay et al., 2021; Munns & Tester, 2008; Shrivastava & Kumar, 2015). Así, las plantas necesitan alcanzar un balance entre el agua perdida por la transpiración foliar y absorbida por la captación radicular, con el fin de reducir el déficit hídrico derivado del estrés (Marulanda et al., 2010; Ruiz-Lozano & Aroca, 2010). Para ello, emplean diversas estrategias, como el cierre estomático, la acumulación de osmolitos, y/o la activación del transporte de agua mediado por acuaporinas (Zawoznik et al., 2011). Estas últimas son proteínas transmembrana que facilitan y regulan el movimiento pasivo de moléculas de agua a lo largo de un gradiente de potencial hídrico (Ruiz-Lozano & Aroca, 2010; Yepes-Molina et al., 2020). Según su ubicación celular son clasificadas en dos clases principales, de membrana plasmática (*Plasma Membrane Intrinsic Proteins* o PIPs) o de tonoplasto (*Tonoplast Intrinsic Proteins* o TIPs), aunque existen otros tipos (Marulanda et al., 2010; Ruiz-Lozano & Aroca, 2010). La activación

de las acuaporinas podría representar una vía rápida de respuesta en situaciones en las que el ajuste del flujo de agua es fisiológicamente crítico (Zawoznik et al., 2011).

Por esta razón, analizamos la variación de la expresión relativa del gen *LsPIP2* en las plantas de lechuga procedentes de los ensayos de invernadero (Figura 67). Bajo condiciones normales de crecimiento, las plantas inoculadas con GPTR29 mostraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de expresión relativa con respecto del resto de tratamientos analizados, experimentando aumentos superiores al 800 % frente al control. La expresión relativa de *LsPIP2* en las plantas tratadas con HUTR05 también fue un 26 % superior a la de las plantas control sin inocular, mientras que la del tratamiento con SCPM81 fue ligeramente inferior. Sin embargo, estas últimas diferencias no alcanzaron significancia estadística.

La normalización de la expresión de *LsPIP2* en las plantas desarrolladas bajo 100 mM NaCl frente a la del control crecido en condiciones normales, indicó que únicamente los tratamientos control y de inoculación con HUTR05 presentaban una expresión relativa más de 4 veces superior a la de las condiciones de normalización. Mientras que en el caso de las plantas inoculadas con SCPM81 y GPTR29 encontramos una regulación negativa de la expresión relativa (Figura 67). El análisis estadístico realizado sobre las condiciones salinas reveló una diferencia significativa en la expresión relativa de *LsPIP2* en las plantas tratadas con HUTR05 frente al resto de tratamientos bacterianos, así como un incremento no significativo del 32 % con respecto al control salino. Además, la expresión relativa de las plantas inoculadas con SCPM81 y GPTR29 fue inferior, pero no estadísticamente significativa, a la del control desarrollado en las mismas condiciones.

La exposición de las plantas a salinidad por Na_2SO_4 no provocó cambios notables en la expresión relativa de *LsPIP2* tras la normalización frente al tratamiento calibrador (Figura 67). Solo las plantas tratadas con SCPM81 y GPTR29 mostraron ligeras diferencias, que se tradujeron en sobreexpresión e infraexpresión del gen, respectivamente. La comparación entre todos los tratamientos sometidos a 50 mM Na_2SO_4 reveló dos grupos estadísticos claramente diferenciados, el formado por las plantas control e inoculadas con SCPM81 y HUTR05, y el del tratamiento con GPTR29. La expresión relativa del gen fue cerca de un 80 % inferior en las plantas tratadas con GPTR29, y un 55 % superior en las inoculadas con SCPM81, con respecto al control expuesto a salinidad por Na_2SO_4 .

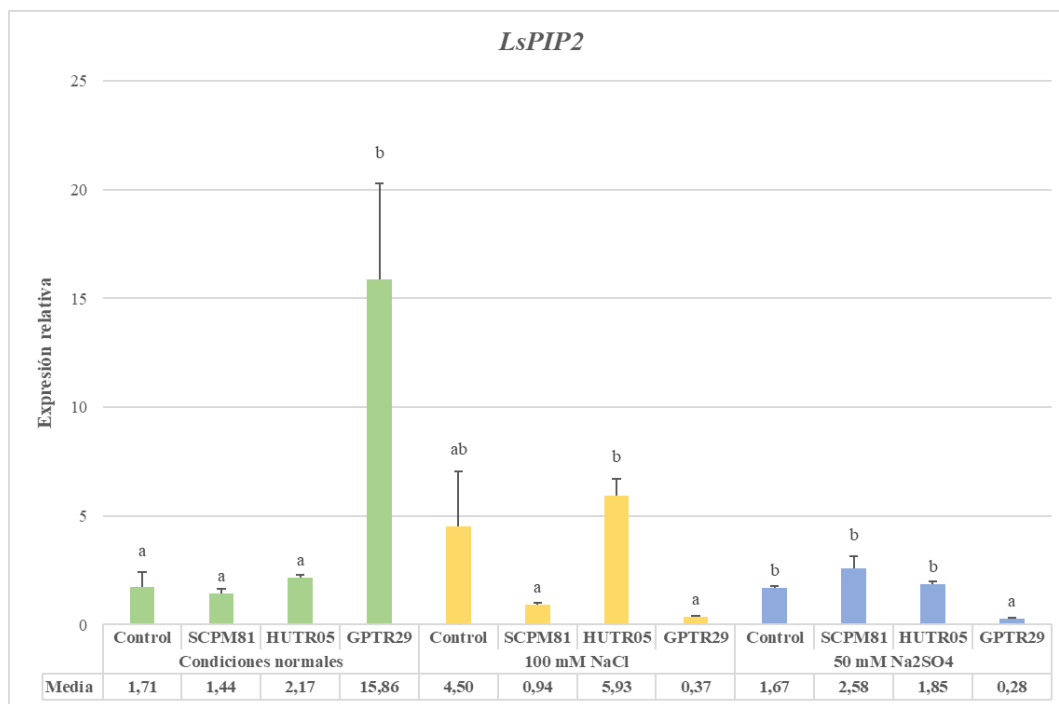


Figura 67: Análisis por qPCR de la expresión relativa del gen *LsPIP2* en plantas de lechuga (control e inoculadas con los aislados SCPM81, HUTR05 y GPTR29) desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄). Normalización frente al gen endógeno *LsEIF2A* y al tratamiento control en condiciones normales. Tratamientos con las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos en su respectiva condición del crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Como ha sido comentado previamente, las acuaporinas parecen tener un papel importante en el control del transporte celular del agua en los tejidos vegetales. Sin embargo, la vinculación entre la expresión de las acuaporinas y las respuestas de las plantas al estrés osmótico sigue sin estar clara, debido a la complejidad de los mecanismos de regulación que presentan este tipo de proteínas (Alguacil et al., 2009; Ruiz-Lozano & Aroca, 2010; Yepes-Molina et al., 2020). Por ejemplo, algunas investigaciones señalan un aumento en la expresión relativa de diferentes miembros de la familia de genes *PIP* durante el crecimiento en condiciones salinas de plantas de maíz y cebada (Marulanda et al., 2010; Zawoznik et al., 2011), mientras que otros estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* (150 mM NaCl) indican que la expresión de genes *PIP* no se ve afectada o, incluso, es reprimida por la salinidad (Jang et al., 2004; Pou et al., 2016). Asimismo, ha sido constatada una disminución en la expresión del gen *PIP2* en plantas de lechuga y soja sometidas a estrés osmótico por sequía (Alguacil et al., 2009; Porcel et al., 2006). De acuerdo con Yepes-Molina y colaboradores (2020) los cambios en las condiciones experimentales, como la especie o variedad utilizada, o el tipo y la duración del estrés aplicado, pueden influir considerablemente en los resultados obtenidos. Al mismo tiempo, la

modificación de la expresión genética y la acumulación de proteínas en respuesta a la salinidad o la sequía no siempre están correlacionadas, por lo que el momento de medición también juega un papel clave (Yepes-Molina et al., 2020). Hay que tener en cuenta que el aumento de la presión osmótica es la primera fase en el desarrollo del estrés salino, y suele ocurrir de manera rápida (Munns & Tester, 2008) y, en el presente ensayo, las muestras fueron recogidas en plantas con 30 días de desarrollo en invernadero (25 días *post* inoculación). Esto sugiere que la limitada variación observada en la expresión del gen *LsPIP2* entre condiciones salinas y no salinas podría estar derivada del momento de recolección de las muestras, cuando otras fases de estrés, como el iónico u oxidativo, estuvieran ejerciendo un mayor efecto en las plantas.

La influencia de los microorganismos en la regulación de la expresión génica también es un tema de discusión, ya que, al igual que observamos con nuestros resultados, en función del inóculo aplicado y las condiciones de crecimiento, la respuesta transcripcional de la planta varía notablemente. Algunos autores han indicado que la inoculación con hongos micorrícicos arbusculares o bacterias PGP puede aumentar la expresión de *PIP2* en plantas de lechuga y cebada bajo estrés osmótico (Alguacil et al., 2009; Zawoznik et al., 2011). Marulanda y colaboradores (2010) informaron que la inoculación con una cepa de *Priestia megaterium* en plantas de maíz ha demostrado inducir cambios diferenciales en la expresión de diversos genes de la familia *PIP*, dependiendo del gen analizado y las condiciones de crecimiento (salinas o no salinas). Por ejemplo, el gen *ZmPIP2;1* era sobreexpresado debido al tratamiento con dicha cepa en condiciones normales de crecimiento, pero infraexpresado bajo salinidad e inoculación, al igual que ocurría con GPTR29 en nuestro trabajo. En cambio, el gen *ZmPIP1;2* no sufría cambios de expresión en condiciones normales, pero su expresión aumentaba bajo estrés salino en las plantas sometidas al tratamiento bacteriano, de forma similar a la observada para SCPM81. Finalmente, al igual que ocurría con las plantas inoculadas con HUTR05, el gen *ZmPIP1;5* no mostraba cambios de expresión al ser sometido a la inoculación bacteriana, tanto en condiciones normales de crecimiento como bajo estrés por NaCl (Marulanda et al., 2010). Un trabajo más reciente realizado sobre plantas de *Phaseolus vulgaris* L. expuestas a estrés salino reveló que la inoculación de una cepa de *Rhizobium leguminosarum* regulaba negativamente la expresión de dos isoformas de los genes *PIP1* y *PIP2*, aunque la cantidad de proteínas PIP aumentó (Franzini et al., 2019).

Una hipótesis emergente sugiere que la acumulación de proteínas traducidas podría inhibir la expresión génica, lo que explicaría las discrepancias en la regulación transcripcional de las acuaporinas entre diferentes condiciones de crecimiento y tratamientos microbianos (Franzini

et al., 2019; Yepes-Molina et al., 2020). Estas variaciones podrían ser asociadas con la diferente capacidad de adaptación de las plantas a condiciones ambientales adversas y los distintos efectos (fisiológicos, bioquímicos o moleculares) inducidos por los microorganismos aplicados, lo que subraya la complejidad de los mecanismos de regulación en estudio y corrobora los resultados obtenidos en el presente apartado.

4.2. Análisis de la expresión de los genes *LsHKT1;6* y *LsNHX2*.

La salinidad del suelo provoca una prolongada exposición de las plantas a altas concentraciones de iones como Na^+ , Cl^- , o SO_4^{2-} , lo que resulta en una fase de toxicidad iónica (Munns & Tester, 2008). Frente a estas condiciones, las plantas deben restringir la absorción de dichos iones, favorecer su expulsión de las células, o acumularlos en vacuolas, con el objetivo de minimizar los efectos fitotóxicos (Kumar & Mosa, 2015; Zhang et al., 2008). Es por ello por lo que las plantas han desarrollado mecanismos adaptativos frente a la salinidad, como es el caso de la regulación del balance iónico a través de transportadores específicos (principalmente de Na^+), entre los que destacan los transportadores de K^+ de alta afinidad o HKT (del inglés *High-Affinity K^+ Transporters*), y los antiportadores de cationes/protones NHX (del inglés *Na^+/H^+ exchangers*) (Jia et al., 2018; Saddhe et al., 2021). Los transportadores HKT son proteínas de membrana que median el transporte de K^+ y Na^+ en plantas, por ejemplo, recuperado el Na^+ del xilema hacia el floema, y recirculándolo de brotes a raíces (Dave et al., 2022; Jia et al., 2018; Kumar & Mosa, 2015). En cambio, los transportadores NHX son proteínas localizadas en la membrana vacuolar, que actúan como portadores de Na^+ , impulsados por el gradiente electroquímico de protones, favoreciendo la compartimentalización del Na^+ en las vacuolas o regulando el potencial osmótico intracelular (Dave et al., 2022; Jia et al., 2018; Kumar & Mosa, 2015).

La variación de la expresión del gen *LsHKT1;6* en las plantas de lechuga desarrolladas en invernadero está recogida en la Figura 68. Bajo condiciones normales de crecimiento, solo las plantas inoculadas con GPTR29 exhibieron un aumento significativo de más del 400 % en la expresión relativa del gen *LsHKT1;6* en comparación con las plantas control. La expresión de este gen en las plantas tratadas con HUTR05 también fue superior, aunque no alcanzó significancia estadística. Por el contrario, la inoculación con SCPM81 resultó en una reducción cercana al 50 % en la expresión del gen *LsHKT1;6* en comparación con el control negativo, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Las plantas cultivadas bajo 100 mM NaCl exhibieron patrones de expresión relativa diferenciados para el gen *LsHKT1;6* (Figura 68). Al normalizar la expresión frente al control en condiciones normales, pudimos observar que las plantas control e inoculadas con HUTR05 (sometidas al estrés) mostraban una mayor expresión relativa que dicho tratamiento, siendo aproximadamente 3 veces superior en el caso del control salino y 28 veces superior en el tratamiento bacteriano. En contraste, la expresión relativa de *LsHKT1;6* en las plantas tratadas con SCPM81 y GPTR29 fue inferior a la del control en condiciones normales. Por otro lado, sólo las plantas tratadas con HUTR05 presentaron una diferencia significativa en comparación con el control desarrollado bajo 100 mM NaCl, con un aumento de más del 800 % en la expresión. En cambio, la expresión relativa en las plantas inoculadas con SCPM81 y GPTR29 fue inferior al control salino, aunque esta diferencia no alcanzó significancia estadística.

La exposición de las plantas a 50 mM Na₂SO₄ condujo a una disminución de la expresión relativa de *LsHKT1;6* en comparación con las condiciones de normalización, con valores que oscilaban entre 0,26 y 0,71. En el análisis estadístico entre los diferentes tratamientos sometidos al estrés por Na₂SO₄ observamos un incremento significativo del 33,3 % en la expresión relativa del gen en las plantas inoculadas con SCPM81, en comparación con el control salino. Sin embargo, la aplicación de HUTR05 y GPTR29 resultó en valores de expresión relativa similares a los obtenidos por el tratamiento control.

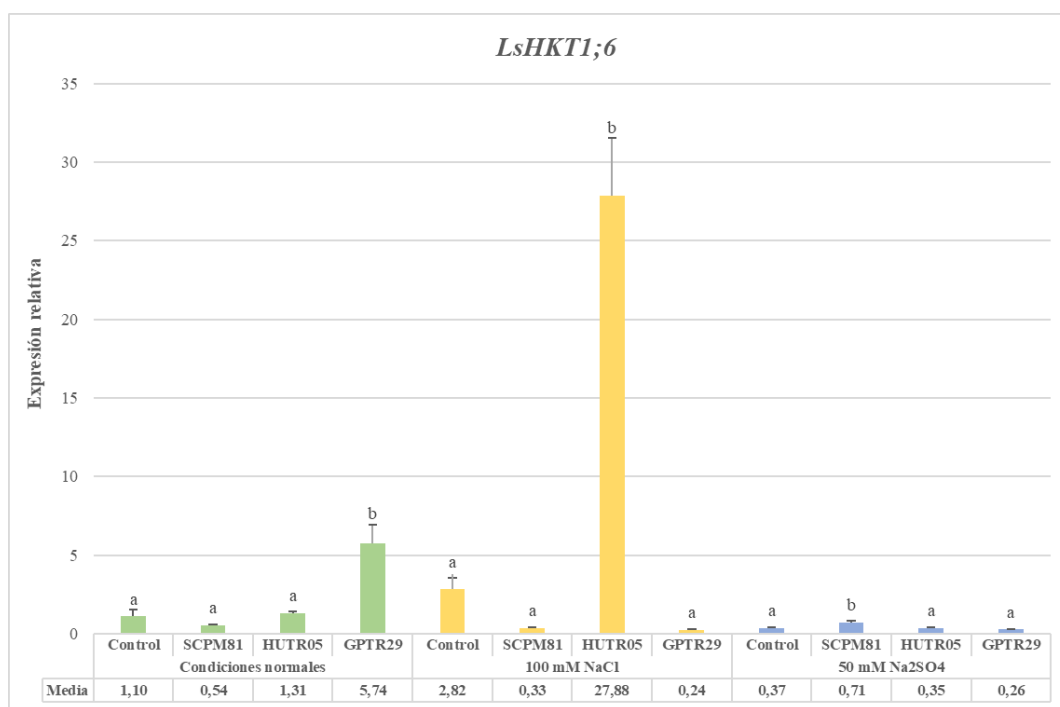


Figura 68: Análisis por qPCR de la expresión relativa del gen *LsHKT1;6* en plantas de lechuga (control e inoculadas con los aislados SCPM81, HUTR05 y GPTR29) desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄). Normalización frente al gen endógeno *LsEIF2A* y al tratamiento control en condiciones normales. Tratamientos con las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos en su respectiva condición del crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Los resultados del análisis de la expresión del gen *LsNHX2* están recogidos en la Figura 69. Bajo condiciones normales de crecimiento, sólo las plantas tratadas con GPTR29 mostraron aumentos significativos en la expresión relativa de *LsNHX2* en comparación con el control sin inocular, con un incremento superior al 500 %. El tratamiento con HUTR05 mostró una expresión similar al de la condición control, mientras que las plantas inoculadas con SCPM81 exhibieron una reducción del 67,9 % en la expresión relativa de *LSNHX2*, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En condiciones de salinidad por NaCl, las plantas sin inocular y las tratadas con HUTR05 mostraron una expresión relativa 2,5 y 3,1 veces superior a la de las condiciones control de normalización, respectivamente. En contraste, los tratamientos con SCPM81 y GPTR29 redujeron la expresión relativa de *LsNHX2*, aproximadamente 0,2 veces en comparación con las condiciones de normalización. El análisis estadístico en los tratamientos sometidos a 100 mM NaCl reveló que la inoculación con los aislados SCPM81 y GPTR29 resultaba en una infraexpresión relativa de *LsNHX2* de aproximadamente el 91 %, con respecto al control salino.

En cambio, las plantas tratadas con la cepa HUTR05 presentaron un aumento no significativo del 24,1 % frente al control.

Finalmente, las plantas expuestas a 50 mM Na₂SO₄ exhibieron una disminución de la expresión relativa de *LsNHX2*, con valores desde 0,5 veces inferiores a la del control desarrollado en condiciones normales (control de normalización). Además, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre los tratamientos desarrollados bajo ese tipo de salinidad (Figura 69).

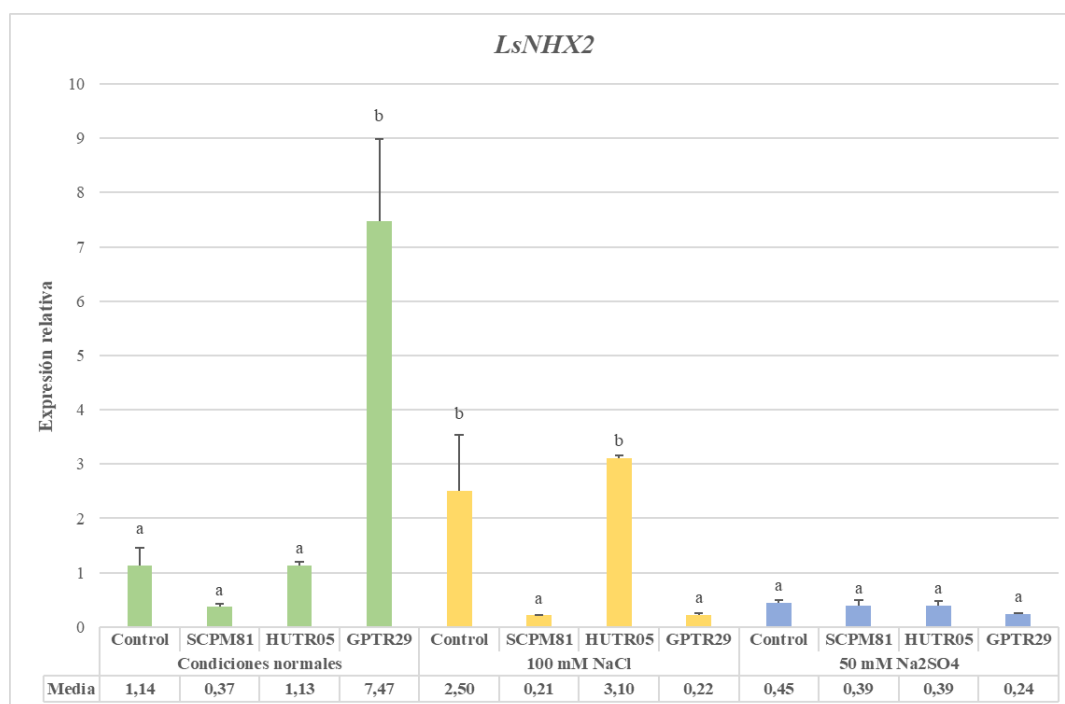


Figura 69: Análisis por qPCR de la expresión relativa del gen *LsNHX2* en plantas de lechuga (control e inoculadas con los aislados SCPM81, HUTR05 y GPTR29) desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄). Normalización frente al gen endógeno *LsEIF2A* y al tratamiento control en condiciones normales. Tratamientos con las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos en su respectiva condición del crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

Los resultados obtenidos para los genes *LsHKT1;6* y *LsNHX2* siguen una tendencia similar: incremento significativo en la expresión relativa gracias a la inoculación con GPTR29 bajo condiciones normales de crecimiento, aumento de expresión relativa en las plantas inoculadas con HUTR05 y disminución en las tratadas con SCPM81 y GPTR29 bajo salinidad por NaCl, y regulación negativa de la expresión en todos los tratamientos bajo salinidad por Na₂SO₄, en comparación con las condiciones de normalización.

Investigaciones previas han explorado la variación de la expresión de genes similares a los utilizados en el presente trabajo en diversas variedades de lechuga sometidas a condiciones de estrés salino. Por ejemplo, Santander y colaboradores (2021) informaron que la expresión de *LsHKT1;6* y genes de la familia *NHX* no aumentaba en presencia de NaCl, excepto en las plantas inoculadas con un aislado fúngico, además, observaron que esta variación era dependiente de la variedad de lechuga utilizada. Sin embargo, Molina-Montenegro et al., (2020) descubrieron que la expresión relativa de *NHX1* en plantas de lechuga var. *romana* aumentaba con la exposición al NaCl y la inoculación con hongos endófitos. Además, Zhang y colaboradores (2008) demostraron que la expresión del gen *HKT1* en plantas de *Arabidopsis thaliana* desarrolladas en salinidad por NaCl dependía del tejido vegetal analizado, siendo también modulada positivamente por los compuestos volátiles emitidos por una cepa PGPB. Nuestros resultados y la revisión realizada sugieren que la variación en la expresión génica está influenciada por diversos factores, como la variedad del cultivo, las condiciones de crecimiento, o el tipo de inóculo aplicado.

Como se ha mencionado anteriormente, la familia de proteínas HKT participa en el transporte de K^+ y Na^+ en plantas, lo que sugiere que su sobreexpresión bajo condiciones de salinidad podría suponer una ventaja adaptativa. En este sentido, encontramos que la inoculación con HUTR05 mejoró la relación K:Na en las plantas de lechuga expuestas a 100 mM NaCl, y aumentó significativamente la expresión del gen *LsHKT1;6*. Estos hallazgos son consistentes con otros estudios que han probado que un aumento en la expresión de genes de la familia *HKT* en la parte aérea de la plantas es crucial para mantener un ratio K:Na adecuado, favoreciendo así la tolerancia al estrés salino (Li et al., 2020; Niu et al., 2016; Zhang et al., 2008). SCPM81 y GPTR29 también mejoraron significativamente el ratio K:Na en las plantas expuestas a NaCl y Na_2SO_4 , aunque la expresión relativa de los genes *NHX2* y *LsHKT1;6* fue igual o inferior a la de sus respectivos controles estresados, salvo en el caso de las plantas tratadas con SCPM81 bajo Na_2SO_4 . Sin embargo, es importante tener en cuenta que existen otros mecanismos PGP que pueden ayudar reducir la absorción de iones tóxicos en las raíces de las plantas, como es la producción de exopolisacáridos (Ashraf et al., 2004; Telabi Atouei et al., 2019).

4.3. Análisis de la expresión de los genes *LsPAL* y *LsSOD*.

Con el fin de mitigar los efectos del estrés oxidativo, generado durante las fases de estrés osmótico e iónico de la salinidad, las plantas poseen sistemas enzimáticos y no enzimáticos

encargados de regular el estado redox celular (Ilangumaran & Smith, 2017; Jha & Subramanian, 2014; Kumar et al., 2020; Shrivastava & Kumar, 2015). Entre ellos encontramos enzimas con funciones antioxidantes, como superóxido dismutasas o glutatión reductasas, y mecanismos no enzimáticos, como es la producción de compuestos fenólicos (Jha & Subramanian, 2014; Kumar et al., 2020). Las superóxido dismutasas (*Superoxide dismutases* o SODs) son un grupo de metaloenzimas que convierten el ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2), mediante la oxidación/reducción alternativa del metal catalítico (Fe, Cu o Mn) del sitio activo de la enzima (Liu et al., 2020a). Posteriormente, el H_2O_2 formado es reducido a H_2O mediante la acción de catalasas o peroxidasas (Stephenie et al., 2020). Por tanto, la SOD actúa como la primera línea de protección frente al daño oxidativo y, por tanto, como un regulador clave en la homeostasis de ROS en células vegetales (Liu et al., 2020a; Stephenie et al., 2020). Asimismo, la producción de compuestos fenólicos también juega un papel clave en la respuesta frente al estrés osmótico, gracias a su elevada actividad antioxidante (Kumar et al., 2020). La regulación de la biosíntesis de los fenilpropanoides es considerada una adaptación evolutiva de gran importancia en la defensa de las plantas frente a estreses bióticos y abióticos (Astaneh et al., 2018; Naikoo et al., 2019). En este sentido, la síntesis de compuestos fenólicos comienza con la conversión de la fenilalanina en ácido cinámico, catalizado por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (Kulbat, 2016; Kumar et al., 2020).

El análisis de la expresión del gen *LsSOD* en las plantas cultivadas en invernadero está recogido en la Figura 70. Bajo condiciones normales de crecimiento, las plantas inoculadas con HUTR05 y GPTR29 mostraron aumentos de más del 100 % y 600 % en la expresión relativa del gen, respectivamente, en comparación con las no inoculadas, siendo significativas estas diferencias solo en el último tratamiento. Por el contrario, la expresión relativa de *LsSOD* disminuyó un 44 % de manera no significativa debido al tratamiento con SCPM81 en relación con las condiciones control.

El análisis de las plantas sometidas a salinidad por NaCl reveló patrones de respuesta distintos en función del tratamiento (Figura 70). Tanto las plantas control como aquellas inoculadas con HUTR05 mostraron una sobreexpresión del gen *LsSOD*, mientras que las tratadas con SCPM81 y GPTR29 exhibieron una infraexpresión, en comparación con las condiciones de normalización. Además, únicamente el tratamiento con HUTR05 presentó diferencias significativas con respecto al control salino, con un aumento de más del 200 % en la expresión relativa de *LsSOD*. En contraste, las plantas inoculadas con SCPM81 y GPTR29 mostraron una

disminución no significativa en la expresión relativa en comparación con el control desarrollado en las mismas condiciones.

La salinidad por Na₂SO₄ provocó una disminución en la expresión relativa de *LsSOD* de hasta 0,09 veces en comparación con las condiciones de normalización (Figura 70). Además, el análisis estadístico de los distintos tratamientos expuestos a 50 mM Na₂SO₄ reveló una reducción significativa en la expresión relativa del gen, en comparación con el tratamiento control, con una disminución que superó el 60 %.

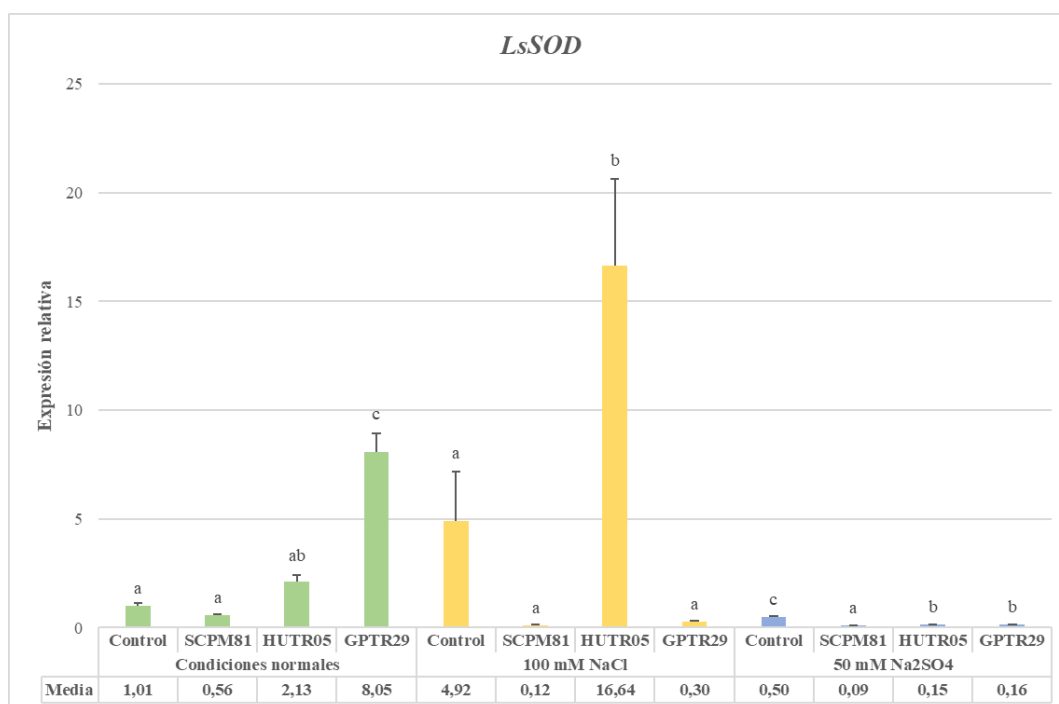


Figura 70: Análisis por qPCR de la expresión relativa del gen *LsSOD* en plantas de lechuga (control e inoculadas con los aislados SCPM81, HUTR05 y GPTR29) desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄). Normalización frente al gen endógeno *LsEIF2A* y al tratamiento control en condiciones normales. Tratamientos con las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos en su respectiva condición del crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

La Figura 71 ilustra las variaciones en la expresión del gen *LsPAL* en las plantas de lechuga obtenidas de los ensayos en invernadero. La inoculación con cada uno de los aislados generó un aumento en la expresión relativa del gen en comparación con las plantas control. Sin embargo, solo las plantas tratadas con GPTR29 alcanzaron significancia estadística, con una expresión relativa más de un 9000 % superior.

La exposición de las plantas a la salinidad inducida por NaCl y Na₂SO₄ resultó en aumentos en la expresión relativa del gen *LsPAL*, de hasta 138 veces en comparación con las condiciones de

normalización. No obstante, el comportamiento de los diferentes tratamientos varió en función de cada tipo de condición salina (Figura 71).

Bajo salinidad por NaCl, el análisis reveló dos grupos estadísticos distintos: uno conformado por las plantas control y las inoculadas con SCPM81 y GPTR29, y otro por el tratamiento con HUTR05. La expresión relativa del gen fue un 395 % mayor en las plantas tratadas con HUTR05, mientras que fue aproximadamente un 70 % menor en aquellas inoculadas con los otros tratamientos bacterianos, en comparación con el control desarrollado en esas mismas condiciones.

En las plantas sometidas a 50 mM Na₂SO₄, también fueron obtenidos dos grupos estadísticos diferentes: uno conformado por el tratamiento control y la inoculación con GPTR29, y otro por la inoculación con SCPM81 y HUTR05. En este caso, todos los tratamientos bacterianos lograron aumentar la expresión relativa de *LsPAL* en comparación con el control salino, con incrementos que oscilaron entre un 12 % y un 500 %.

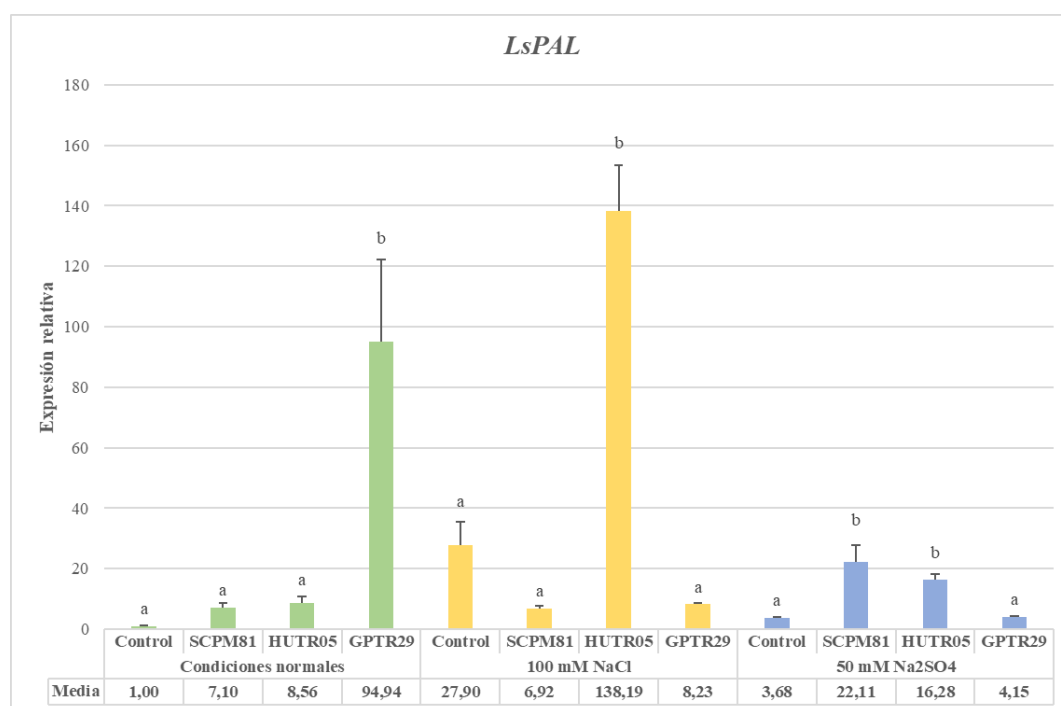


Figura 71: Análisis por qPCR de la expresión relativa del gen *LsPAL* en plantas de lechuga (control e inoculadas con los aislados SCPM81, HUTR05 y GPTR29) desarrolladas en invernadero bajo condiciones de crecimiento normales y salinas (NaCl y Na₂SO₄). Normalización frente al gen endógeno *LsEIF2A* y al tratamiento control en condiciones normales. Tratamientos con las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos en su respectiva condición del crecimiento, en base a la prueba Fisher's Protected LSD ($p \leq 0,05$). Las barras de error representan el error estándar.

La revisión realizada por Gill y colaboradores (2015) establece que la sobreexpresión de genes *SOD* y el aumento de la actividad de las proteínas derivadas de su expresión están asociados con la tolerancia al estrés abiótico en plantas, hallazgos también corroborados en estudios posteriores (Bruno et al., 2020; Franzoni et al., 2022; Li et al., 2017; Rossi et al., 2021). Los datos de expresión relativa del gen *LsSOD* en plantas de lechuga cultivadas bajo 100 mM NaCl, obtenidos en el presente trabajo, siguen la tendencia reportada en la literatura, excepto en los tratamientos con SCPM81 y GPTR29. Los resultados de los ensayos de invernadero indicaron mejoras en diferentes parámetros productivos gracias a la inoculación con estos aislados, así como un aumento del contenido en compuestos fenólicos totales en comparación con las plantas control, mecanismo que podría ejercer un efecto protector frente el estrés oxidativo causado por el NaCl, reduciendo la respuesta transcripcional de *SOD*. Por otro lado, la expresión relativa de dicho gen en las plantas cultivadas bajo salinidad por Na₂SO₄ fue inferior a la condición de normalización, en contraste con la tendencia previamente mencionada. Sin embargo, los valores de expresión del gen *PAL*, así como el contenido en compuestos fenólicos bajo estas condiciones de crecimiento fueron superiores al tratamiento de normalización (control en condiciones normales), por lo que, como ha sido comentado previamente, la respuesta al estrés oxidativo podría estar siendo regulada mediante la síntesis de compuestos fenólicos.

El efecto de la inoculación bacteriana en la actividad génica y enzimática de las superóxido dismutasas es complejo. Algunos estudios han informado que la actividad enzimática de *SOD* es incrementada con la inoculación de algunas bacterias PGP, tanto en condiciones normales de crecimiento como bajo estrés salino (Bruno et al., 2020; Li et al., 2017; Rossi et al., 2021). Sin embargo, tanto Rossi y colaboradores (2021) como otros estudios independientes (Ren et al., 2019) han revelado que la aplicación de otros aislados promotores del crecimiento vegetal en cultivos agronómicos sometidos a estrés abiótico no producía cambios significativos en la actividad de esta enzima. Además, los estudios de expresión de genes *SOD* en plantas como respuesta al estrés abiótico y la inoculación bacteriana muestran una tendencia similar a la observada en este estudio: su expresión varía en función del tipo de inóculo aplicado (Bruno et al., 2020; Fukami et al., 2017). Así, la inoculación de maíz con cepas del género *Azospirillum* bajo salinidad por NaCl indujo una sobreexpresión del gen *SOD4* en comparación con el control no inoculado, mientras que la aplicación de un aislado del género *Rhizobium* no provocaba diferencias significativas en la expresión (Fukami et al., 2017).

El gen que codifica la enzima *PAL* juega un papel crucial en la vía de los fenilpropanoides y, por ende, en la biosíntesis de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos (Kulbat,

2016; Kumar et al., 2020). Según la revisión realizada por Boudet (2007), existe una correlación entre los aumentos en la expresión del gen *PAL* y los incrementos en el contenido de compuestos fenólicos en la planta, como respuesta a diferentes estímulos externos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo respaldan esta afirmación, al observar un aumento en el contenido de fenólicos totales y en la expresión relativa del gen *LsPAL* en las plantas de lechuga sometidas al estrés salino por NaCl y Na₂SO₄, en comparación con las plantas cultivadas en condiciones normales de crecimiento (tratamiento control de normalización para el análisis de la expresión génica).

Al igual que con el gen *SOD*, la activación transcripcional de *PAL* representa una respuesta compleja al estrés biótico y abiótico, que puede variar según las condiciones experimentales. Esta respuesta puede ser rápida y transitoria, si se alcanza una regulación temprana del estado redox, volviendo a niveles de expresión normales, o bien prolongarse en el tiempo al ser activada por factores externos (Battini et al., 2016; Boudet, 2007). Por ejemplo, varios estudios han informado que los niveles de expresión de *PAL* en inoculaciones con micorrizas y PGPBs no difirieron significativamente de los controles no inoculados (Battini et al., 2016; Hayek et al., 2014; García-Seco et al., 2015). Sin embargo, otros trabajos han observado una regulación positiva de los genes *PAL* durante las etapas iniciales de interacción entre micorrizas arbusculares o bacterias rizosféricas y plantas (Blilou et al., 2000; Chen et al., 2017b; Wiggins et al., 2022). Esta dinámica también ocurre cuando otras variables entran en juego, como las condiciones de estrés. En este sentido, han sido publicados artículos que relacionan aumentos en la expresión relativa de este gen o del contenido de la enzima PAL con la inoculación bacteriana o la aplicación de otro tipo de tratamientos bioestimulantes en plantas sometidas a estrés salino (Vaishnav et al., 2013; Zuluaga et al., 2023), así como trabajos en los que ciertos tratamientos no muestran diferencias significativas con respecto a las condiciones control (El-Esawi et al., 2019). Estos hallazgos están en línea con los resultados obtenidos en este estudio.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo revelan que la respuesta transcripcional de la planta está condicionada por las condiciones de crecimiento y el tipo de inóculo aplicado. Observamos respuestas diferenciales en la expresión de diversos genes vegetales según el tratamiento, la presencia o ausencia de salinidad, así como el tipo de salinidad. Además, pudimos establecer correlaciones entre las respuestas fisiológicas y moleculares observadas en plantas y posibles determinantes genéticos involucrados en esta respuesta.

Por ejemplo, las plantas cultivadas bajo 100 mM NaCl e inoculadas con HUTR05 mostraron aumentos significativos en la relación K:Na y en la expresión relativa del gen *LsHKT1;6* en comparación con el control desarrollado en las mismas condiciones. Estos mecanismos podrían contribuir a la regulación del balance iónico en la parte aérea de las plantas, reduciendo así los efectos tóxicos causados por el estrés iónico.

Además, el contenido en compuestos fenólicos y la expresión relativa del gen *LsPAL* fue incrementada significativamente en las plantas tratadas con HUTR05 en condiciones de crecimiento con NaCl y Na₂SO₄, en comparación con sus respectivos controles y las condiciones normales de crecimiento. Este hallazgo sugiere un posible mecanismo de respuesta frente al estrés oxidativo derivado de la salinidad.

5. Evaluación de la influencia de extracto ricos en compuestos fenólicos de plantas de lechuga en la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*.

Los compuestos fenólicos representan una amplia categoría de metabolitos secundarios en plantas, con una notable importancia sobre la dieta humana (Santos-Buelga et al., 2019). La actividad de los compuestos fenólicos ha sido tradicionalmente relacionada con sus propiedades antioxidantes, derivadas de su poder reductor y su capacidad para eliminar radicales libres. Sin embargo, en la actualidad están siendo investigados otros mecanismos de acción involucrados en los efectos biológicos de este tipo de compuestos, como procesos de señalización celular o regulación de la expresión génica a distintos niveles (Ayuda-Durán et al., 2020; Gutiérrez-Zetina et al., 2021). Existe una creciente evidencia que vincula el consumo moderado de estos compuestos con beneficios significativos sobre la salud humana, al prevenir o reducir el riesgo de diferentes enfermedades crónicas o trastornos degenerativos (Del Río et al., 2013; Fraga et al., 2019; Jaganath & Crozier, 2010; Santos-Buelga et al., 2019). Por ejemplo, numerosos estudios sugieren que los polifenoles dietéticos pueden mitigar el daño celular asociado al envejecimiento, un proceso degenerativo influenciado por diversas fuentes de daño molecular y celular, incluido el estrés oxidativo (Asthana et al., 2016; Ayuda-Durán et al., 2019a, Ayuda-Durán et al., 2019b; Queen & Tollefsbol, 2010;).

Por consiguiente, mejorar las propiedades nutraceuticas de los cultivos hortícolas, fundamentales en la pirámide nutricional, podría ser una estrategia prometedora para influenciar positivamente la salud de los consumidores (Asthana et al., 2016). Sin embargo, la baja disponibilidad de compuestos fenólicos en este tipo de alimentos, así como su biotransformación durante la ingesta, hacen necesario el análisis de su actividad biológica

mediante modelos *in vivo* (Ayuda-Durán et al., 2020; Gutiérrez-Zetina et al., 2021). El nematodo *Caenorhabditis elegans* ha sido ampliamente utilizado como organismo modelo para estudiar los efectos y mecanismos moleculares subyacentes a la actividad biológica de los compuestos fenólicos, ofreciendo una perspectiva prometedora para investigar la influencia de compuestos vegetales sobre la salud, incluido el envejecimiento (Asthana et al., 2016; Ayuda-Durán et al., 2019a, Ayuda-Durán et al., 2019b; Ayuda-Durán et al., 2020; Gutiérrez-Zetina et al., 2021). De esta manera, una estrategia eficaz para investigar los efectos antioxidantes en *Caenorhabditis elegans* consiste en someterlo a un estrés oxidativo, como la temperatura, después de haber sido expuesto a los compuestos que se desean analizar (Ayuda-Durán et al., 2020).

En este contexto, en el presente apartado detallamos el efecto de la aplicación de extractos ricos en compuestos fenólicos de las plantas de lechuga obtenidas del ensayo de invernadero en la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* y su capacidad para contrarrestar el daño oxidativo inducido. El principal objetivo de este ensayo fue comprobar si los cambios en la composición fenólica de las plantas, derivados de la inoculación bacteriana, mejoraban la actividad biológica de estas. Para ello seleccionamos los extractos procedentes de las plantas cultivadas en condiciones normales de crecimiento, incluyendo el control no inoculado y cada uno de los tratamientos bacterianos, utilizando como control interno del ensayo un tratamiento con DMSO al 0,1 %. Los nematodos sincronizados fueron expuestos a una concentración de 10 µg/mL de cada extracto y, tras someterlos a estrés térmico, evaluamos la supervivencia a los 2 y 9 días de crecimiento, una vez alcanzada la fase adulta. El análisis estadístico (prueba Chi-Cuadrado) fue realizado de manera independiente para cada uno de los tiempos de medida, comparando todos los tratamientos entre sí. Estos análisis fueron realizados en colaboración con el Grupo de Investigación en Polifenoles del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca.



Figura 72: Placa de NGM con individuos de *Caenorhabditis elegans* en diferentes fases de crecimiento.

La concentración del extracto aplicada fue seleccionada en base a una revisión bibliográfica y ensayos preliminares en los que evaluamos los efectos producidos por diferentes concentraciones de extractos de lechuga. Fan y colaboradores (2011) informaron que la aplicación en *Caenorhabditis elegans* de extractos de espinacas ricos en fenólicos condujo a un aumento de la supervivencia del nematodo a partir de concentraciones de 10 µg/mL, siendo 100 µg/mL la concentración más beneficiosa. Nuestros ensayos preliminares con extractos de lechuga mostraron una tendencia similar, por lo que decidimos utilizar la concentración de 10 µg/mL, la cual generaba efectos positivos en la supervivencia, pero sin que pudiera llegar a ejercer hormesis o atenuar los posibles efectos derivados de los cambios en la composición fenólica inducidos por la inoculación bacteriana. A este respecto, la hormesis es un fenómeno de dosis-respuesta que describe un efecto opuesto entre dosis altas y bajas de un agente químico, físico o biológico (Dilberger et al., 2021; Saul et al., 2011). Así, ha sido ampliamente descrito que la aplicación de compuestos fenólicos puede ejercer una respuesta hormética en la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*, con efectos beneficiosos en rangos de concentraciones bajas y efectos nocivos o perjudiciales a partir de concentraciones más altas (Ayuda-Durán et al., 2019a; Dilberger et al., 2021; Gutiérrez-Zetina et al., 2021; Saul et al., 2011).

La Figura 73 muestra los porcentajes de supervivencia del nematodo en el segundo y noveno día de etapa adulta en cada uno de los tratamientos, tras haber sido sometido a 8 horas de estrés térmico (35 °C). La tasa de supervivencia aumentó significativamente en los gusanos estresados y tratados con diferentes extractos procedentes de las plantas inoculadas, en comparación con los gusanos control y aquellos tratados con los extractos de las plantas sin inocular.

Los nematodos expuestos a DMSO alcanzaron un porcentaje de supervivencia del 81,3 % y 75,3 % a los 2 y 9 días, respectivamente. En cambio, los gusanos tratados con los extractos procedentes de las plantas control (sin inocular) mostraron porcentajes de supervivencia del 86,8 % y 76,1 %, superiores al tratamiento con DMSO, pero no estadísticamente significativos.

Todos los extractos procedentes de las plantas inoculadas indujeron un aumento significativo de la supervivencia de *Caenorhabditis elegans*, al compararlo con el tratamiento control con DMSO, excepto en el caso de GPTR29 a los 9 días de adultos (aunque el *p*-valor obtenido fue de 0,052, es decir, muy cercano al punto de corte para considerarlo significativo) (Figura 73). Los porcentajes de supervivencia fueron de 89,6 % y 83,0 %, 90,4 % y 87,3 %, 92,1 % y 86,5, y 92,5 % y 82,3 %, para los tratamientos con los extractos de las plantas inoculadas con

SCPM31, SCPM81, HUTR05 y GPTR29, en los días 2 y 9 de fase adulta en los nematodos, respectivamente. Sin embargo, solo los gusanos expuestos a extractos procedentes de plantas inoculadas con ciertos tratamientos bacterianos mostraron aumentos de supervivencias significativos al compararlos con aquellos expuestos a los extractos de las plantas control. Así, en el segundo día de etapa adulta, los extractos de las plantas inoculadas con GPTR29 indujeron un aumento significativo de la tasa de supervivencia en *Caenorhabditis elegans*. Mientras que en el segundo tiempo de medida, fueron los nematodos expuestos a los extractos procedentes de las plantas tratadas con SCPM81 y HUTR05 los que exhibieron porcentajes de supervivencia superiores y estadísticamente significativos con respecto a aquellos tratados con extractos de plantas sin inocular (Figura 73).

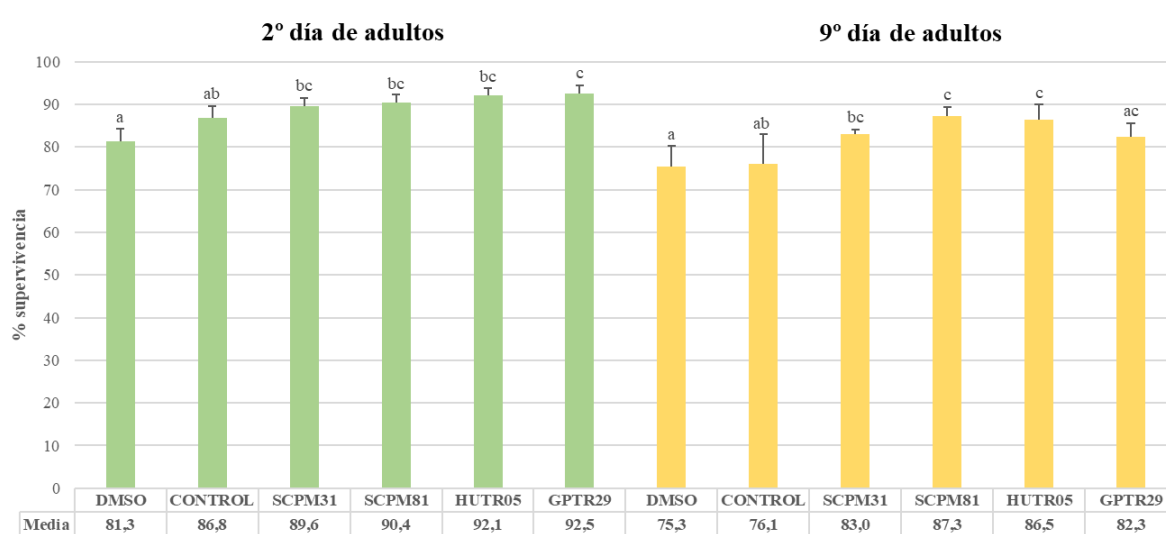


Figura 73: Porcentaje de supervivencia de *Caenorhabditis elegans* sometido a estrés térmico (35 °C, 8 h) en el 2º y 9º día de etapa adulta, en ausencia (DMSO) y presencia de extractos ricos en compuestos fenólicos procedentes de las lechugas cultivadas en el ensayo de invernadero. Los resultados representan la media $\pm$ error estándar. Tratamientos con las mismas letras indican que los valores no son estadísticamente significativos en su respectivo tiempo de medida, en base a la prueba Chi Cuadrado ($p \leq 0,05$).

Los resultados obtenidos revelaron que los extractos procedentes de las lechugas inoculadas con las cepas bacterianas exhibieron una mayor actividad biológica que los extractos procedentes de las plantas control (sin inocular), ya que, ante la misma concentración de extractos, únicamente aquellos procedentes de las plantas inoculadas indujeron un aumento significativo en la supervivencia y la resistencia al estrés oxidativo de *Caenorhabditis elegans*, en comparación con el tratamiento con DMSO. Además, los extractos obtenidos de las plantas inoculadas con GPTR29, así como SCPM81 y HUTR05, también lograron generar aumentos

significativos en el porcentaje de supervivencia del nemátodo con respecto a los extractos de plantas control.

Hasta la fecha, este es el primer trabajo que evalúa los efectos biológicos producidos por los cambios en la composición fenólica y nutricional derivados, a su vez, de la inoculación bacteriana sobre plantas de interés alimentario, como es la lechuga. El estudio más parecido publicado fue realizado por Fan y colaboradores (2011), donde informaron que el aumento del contenido de flavonoides en hojas de espinaca, derivado de la aplicación de extractos comerciales de macroalgas, ejercía efectos beneficiosos en la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* sometido a condiciones de estrés térmico. Además, sugirieron que el aumento de la actividad antioxidante de los extractos de espinacas estaba asociado con el aumento del contenido en flavonoides (Fan et al., 2011). En este sentido, todas las inoculaciones bacterianas resultaron en un aumento significativo del contenido de flavonoides totales en las hojas de lechuga crecidas en condiciones normales (Tabla 54), lo que podría estar generando ese efecto beneficioso sobre la supervivencia de los nematodos. Además, las plantas inoculadas con SCPM81 y HUTR05 fueron las que presentaron un mayor contenido en fenólicos totales, siendo los extractos procedentes de estos tratamientos los que indujeron un mayor aumento de la supervivencia del gusano a los 9 días de fase adulta (Figura 73). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la concentración de cada compuesto fenólico en los extractos de lechuga era distinta en función del tipo de tratamiento aplicado sobre ellas. Por lo tanto, ante la misma concentración de extracto, la cantidad de cada compuesto en las placas de cultivo era diferente, lo que explicaría la variación en la respuesta biológica dependiendo del tratamiento analizado.

De acuerdo con Ayuda-Durán y colaboradores (2019a), a la hora de analizar los efectos biológicos observados no solo es necesario tener en cuenta la concentración fenólica total, sino también los compuestos que están presentes en cada caso. Así, entre los ácidos fenólicos más abundantes en las hojas de lechuga encontramos el ácido cicórico y el ácido cafeoil quínico, que presentaban una distribución diferente en función del tratamiento, aunque las mayores concentraciones fueron observadas en las plantas inoculadas con SCPM81 y HUTR05 (Tabla 54). Diversos estudios han comprobado la bioactividad de ambos compuestos, así como su capacidad para aumentar la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* a través de la modulación de vías de señalización intracelular (Li et al., 2021; Peng et al., 2019; Schlernitzauer et al., 2013). Por otro lado, entre los flavonoides detectados en las hojas de lechuga encontramos derivados de la quercetina y la luteolina, también presentes de forma más abundante en las plantas inoculadas con las bacterias seleccionadas que en las plantas control (Tabla 54).

Trabajos independientes han determinado los efectos beneficiosos de la aplicación de quercetina sobre el aumento de la vida útil y la resistencia al estrés oxidativo en el nematodo modelo (Kampkötter et al., 2008; Pietsch et al., 2011; Surco-Laos et al., 2011). No obstante, ha sido demostrado que el tratamiento con luteolina no induce incrementos en la esperanza de vida de *Caenorhabditis elegans*, pero mejora la tasa de supervivencia del nematodo bajo estrés oxidativo y promueve mecanismos de resistencia frente a patógenos, mediante la regulación de la expresión génica (Lin et al., 2020; Xiao et al., 2023; Yamamoto et al., 2024).

Estos resultados sugieren que los cambios nutricionales observados en las plantas debido a la inoculación bacteriana incrementan los efectos biológicos beneficiosos del cultivo, al inducir un aumento de la supervivencia del organismo modelo *Caenorhabditis elegans* y de su resistencia al estrés oxidativo, lo que podría ser traducido en una mejora de la salud derivada del consumo de las plantas bioinoculadas.

DISCUSIÓN GENERAL

La salinidad del suelo es considerada una de las principales causas de estrés abiótico en plantas, suponiendo, además, uno de los desafíos más significativos en la actualidad para los sistemas agrícolas y el mantenimiento de su producción (Corwin, 2019; Minhas et al., 2017; Shrivastava & Kumar, 2015). La importancia de este trabajo radica en la búsqueda de alternativas que permitan, de manera sostenible, mantener la productividad agrícola, minimizando para ello los efectos negativos causados por estas condiciones ambientales adversas. Así, el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal ha sido confirmada como una herramienta de gran interés para alcanzar este objetivo (García-Fraile et al. 2015; Ilangumaran & Smith, 2017). Si bien, en la presente tesis doctoral hemos querido profundizar en los mecanismos y determinantes implicados en las relaciones planta-bacteria-salinidad, para avanzar en el conocimiento en este campo de investigación.

La metodología empleada para realizar el aislamiento bacteriano ha resultado ser efectiva para cumplir con los objetivos planteados en la tesis doctoral. Los aislados procedentes del interior de nódulos de *Trifolium repens* L., así como de suelo rizosférico y del interior de raíces de *Plantago maritima* L. y *Camphorosma monspeliaca* L., exhibieron resultados positivos en las pruebas *in vitro* relacionadas con los mecanismos PGP y las características fenotípicas. Así, la búsqueda de bacterias asociadas a la endorizosfera de plantas halófitas ya ha sido establecido como un valioso recurso para la obtención de bacterias halotolerantes con aptitud para contribuir al crecimiento y productividad de la planta bajo estrés abiótico (Dragojević et al., 2023; Hindersah et al., 2023). A su vez, la utilización de bacterias noduladoras de leguminosas, como los *rhizobia*, es un valor seguro en los estudios de interacción beneficiosa con cultivos de interés agronómico, incluso bajo condiciones ambientales adversas, como ya ha sido demostrado de manera extensa (Bano & Fatima, 2009; Chen et al., 2017b; García-Fraile et al., 2012; Flores-Félix et al., 2013; Flores-Félix et al., 2018; Flores-Félix et al., 2020; Flores-Félix et al., 2021; Fukami et al., 2017; Jiménez-Gómez et al., 2018; Jiménez-Gómez et al., 2021). Además, el análisis *in silico* de los genomas, junto con los ensayos *in vitro* de los mecanismos PGP, han resultado ser unas herramientas útiles para una correcta selección de aislados de interés. En este sentido, los estudios genómicos aportan una visión holística en esta materia, impulsando y facilitando los trabajos relacionados con el desarrollo de bioinoculantes bacterianos (Flores-Félix et al., 2021; Paterson et al., 2017).

De acuerdo con los artículos de referencia en taxonomía y filogenia bacteriana, el uso de herramientas filogenómicas es un enfoque necesario para una identificación adecuada de especies bacterianas (Chun et al., 2018; Saati-Santamaría et al., 2021; Young et al., 2021). La

secuencia del gen ribosómico ARNr 16S indicaba que los aislados HUTR05 y GPTR29 estaban agrupados de manera muy cercana con las especies del complejo *Rhizobium leguminosarum* (Young et al., 2021). Sin embargo, el análisis con las herramientas ANIb y dDDH reveló que HUTR05 estaba clasificada dentro del taxón *Rhizobium laguerreae*, y que GPTR29 podía ser considerada una nueva especie de este género bacteriano. Estos resultados concuerdan con las descripciones de nuevas especies en este género, en las que subrayan el bajo poder discriminatorio del gen ribosómico 16S para la delimitación a nivel específico (Hsouna et al., 2023; Kumar et al., 2023; Young et al., 2023). De manera similar ocurría con la cepa SCPM31 en la que, según lo indicado en artículos de descripción de nuevas especies del género *Pseudomonas*, la secuenciación del gen ARNr 16S no fue suficiente para la identificación como una posible nueva especie, requiriendo del uso de las herramientas genómicas para llegar a este resultado (Garrido-Sanz et al., 2021; Peral-Aranega et al., 2020; Saati-Santamaría et al., 2021).

Aunque la producción de compuestos orgánicos volátiles es un mecanismo cada vez más estudiado en el campo de las PGPBs, la información disponible es confusa y muchas veces limitada a ciertos géneros bacterianos como *Pseudomonas* o *Bacillus* (Tyc et al., 2017). Por esa razón, decidimos caracterizar el volatiloma de las cepas seleccionadas, así como analizar el efecto de la exposición de plantas de lechuga, apio y canónigo a los compuestos volátiles emitidos por estos aislados bacterianos. Al igual que han indicado algunos autores, las interacciones de las bacterias con las plantas están condicionadas por la producción de volátiles bacterianos (Soto et al., 2021), si bien la síntesis de este tipo de metabolitos depende, en gran medida, del microorganismo analizado y las condiciones de crecimiento de este, como hemos podido observar en el presente trabajo (Capellari & Banchio, 2019; Liu et al., 2018; Liu et al., 2020b; Massawe et al., 2018). Sin embargo, esta tesis doctoral constituye el primer análisis sobre la influencia ejercida por los compuestos volátiles emitidos por PGPBs en la mitigación del estrés salino por Na₂SO₄ en plantas de lechuga, apio y canónigo. Hasta ahora, los estudios previos sólo habían analizado esta interacción bajo estrés inducido por NaCl (Capellari & Banchio, 2019; Liu et al., 2020b; Vaishnav et al., 2015; Vaishnav et al., 2016a; Zhang et al., 2008), siendo, además, muy escasa la información relativa a bacterias del género *Rhizobium* (Cardoso et al., 2017).

Los endosimbiontes nodulares aislados de plantas de *Trifolium repens* L. mostraron un menor grado de adaptación a las condiciones salinas que los obtenidos de nichos halófilos, como el suelo rizosférico e interior de raíces de *Plantago maritima* L. y *Camphorosma monspeliaca* L. Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, indican que los aislados

Rhizobium laguerreae HUTR05 y *Rhizobium* sp. GPTR29, generan una mayor promoción del crecimiento vegetal y mitigación del estrés salino que aquellos aislados obtenidos de entornos con una conductividad eléctrica alta, gracias a una variedad de interacciones con las plantas con las que se asocian: producción de compuestos orgánicos volátiles, alteración del contenido mineral y en compuestos fenólicos, o variación de la expresión génica vegetal de respuesta al estrés salino. En este sentido, y a pesar de que tradicionalmente las bacterias del género *Rhizobium* hayan sido estudiadas por la interacción simbiótica ejercida con plantas leguminosas, en los últimos años han surgido numerosos estudios que revelan su capacidad para interactuar estrechamente con otros cultivos no leguminosos, favoreciendo su desarrollo e, incluso, aliviando condiciones ambientalmente adversas para las plantas, a través de una gran variedad de mecanismos (Bellabarba et al., 2019; Díaz-Méndez & Menéndez, 2021). Por ejemplo, dentro de la especie *Rhizobium laguerreae* han sido descritas una gran variedad de cepas con potencial como bioinoculantes en cultivos como la espinaca, lechuga, zanahoria, o escarola, al mejorar su crecimiento vegetal e, incluso, reducir los efectos negativos ocasionados por la salinidad del suelo (Flores-Félix et al., 2020; Flores-Félix et al., 2021; Jiménez-Gómez et al., 2018; Jiménez-Gómez et al., 2021). Además, esta familia bacteriana sigue siendo una fuente de nuevas especies con potencial PGP, como demuestran trabajos recientes, además de la presente tesis doctoral (Hsouna et al., 2023; Kumar et al., 2023; Menéndez et al., 2021; Roca-Couso et al., 2023).

No obstante, los resultados exhibidos por los aislados *Pseudomonas* sp. SCPM31 y *Priestia megaterium* SCPM81 también fueron destacables, como demuestra su aptitud para colonizar el sistema radicular de las plantas de lechuga, apio y canónigo, para producir compuestos volátiles capaces de ejercer un efecto positivo en la planta, o modificar el contenido mineral y fenólico de las tres plantas utilizadas en el presente trabajo. Estos resultados concuerdan con lo establecido en la literatura científica, como la idoneidad de muchos miembros de género *Pseudomonas* para formar *biofilms*, y la ventaja adaptativa que esto supone a nivel ecológico (Gupta et al., 2017; Knights et al., 2021; Masák et al., 2014), o la capacidad de promover el crecimiento vegetal y mejorar el perfil nutricional de los cultivos con los que se asocian, como ocurre con especies filogenéticamente cercanas a *Priestia megaterium* SCPM81 (Cappellari & Banchio, 2019; Chen et al., 2016; Chen et al., 2017a; Chu et al., 2018; Jiménez-Gómez et al., 2021).

La salinidad del suelo afecta a diferentes aspectos del desarrollo vegetal, al imponer estrés osmótico, iónico y oxidativo, que resultan en efectos negativos a nivel morfológico, fisiológico

y bioquímico (Ilangumaran & Smith, 2017). Por este motivo decidimos llevar a cabo análisis para determinar cómo los aislados seleccionados y las diferentes condiciones de salinidad influían en las respuestas de las plantas frente a las distintas fases del estrés salino.

Uno de los principales efectos del aumento de la concentración de sales en el suelo, como el NaCl o el Na₂SO₄, es la acumulación de iones tóxicos, como el Na y el S (Munns & Tester, 2008; Mukhopadhyay et al., 2021; Safdar et al., 2019). Por tanto, mantener ratios K:Na elevados es decisivo para reducir el efecto negativo ocasionado en la planta, y la inoculación con PGPBs juega un papel importante en esta regulación iónica (Ashraf et al., 2004; Bacilio et al., 2016; Liu et al., 2024a; Nadeem et al., 2009; Telabi Atouei et al., 2019; Yue et al., 2022). Como observamos en las plantas de lechuga desarrolladas bajo 100 mM NaCl, aquellas tratadas con HUTR05 mostraron una mejora significativa del ratio K:Na, que pudimos relacionar con el aumento en la expresión del gen *LsHKT1*;6. Así, otros trabajos realizados con bacterias promotoras del crecimiento vegetal han encontrado resultados similares, constatando que la regulación transcripcional de los genes *HKT* mediado por bacterias es un mecanismo crucial para mejorar la tolerancia vegetal al estrés salino (Li et al., 2020; Niu et al., 2016).

La diferentes respuestas de las plantas en la acumulación de compuestos fenólicos derivadas de la salinidad y la inoculación bacteriana indican que la variación de la síntesis de este tipo de compuestos es dependiente de factores como la especie vegetal utilizada, las condiciones de crecimiento o el tipo de inóculo aplicado, tal y como había sido previamente establecido por diversos autores (Ahmed et al., 2019; Avio et al., 2017; Jiménez-Gómez et al., 2020; Jiménez-Gómez et al., 2021; Kim et al., 2008; Mahmoudi et al., 2010; Neocleous et al., 2013; Rojas-Tapias et al., 2013; Santander et al., 2020; Santander et al., 2024). Las plantas sintetizan compuestos fenólicos como un mecanismo adaptativo frente al estrés oxidativo derivado de la salinidad (Kumar et al., 2020; Naikoo et al., 2019). Además, la inoculación bacteriana también juega un papel importante en la acumulación de compuestos fenólicos. Algunos autores indican que esta alteración en el contenido fenólico puede ser una respuesta de la planta a la colonización bacteriana, la cual puede inducir la biosíntesis de estos compuestos mediante la activación del proceso de IST (*Induced Systemic Tolerance*) (Kaushal & Wani, 2016). Además, también ha sido propuesto que, bajo condiciones de estrés, la planta puede alterar de manera selectiva el microbioma para reducir la respuesta al estrés (Trivedi et al., 2020), regulando la variación en la acumulación de compuestos fenólicos en función de las condiciones de crecimiento y la presencia de inoculantes bacterianos. El análisis de la expresión del gen *LsPal*, encargado de iniciar el proceso de síntesis de compuestos fenólicos, constituye un ejemplo claro

de las relaciones observadas. Bajo condiciones de estrés por NaCl y Na₂SO₄, las plantas de lechuga exhibían un mayor contenido en compuestos fenólicos que las plantas desarrolladas sin salinidad, así como una sobreexpresión de este gen en comparación con las condiciones de normalización. Y, a su vez, el contenido en compuestos fenólicos totales de las plantas inoculadas con HUTR05 y crecidas bajo 100 mM NaCl y 50 mM Na₂SO₄ fue estadísticamente superior al control en sus respectivas condiciones, al igual que ocurrió con la expresión relativa de *LsPAL*. Estos resultados siguen la tendencia establecida en la bibliografía. Existe una correlación entre los aumentos en la expresión del gen *PAL* y los incrementos en el contenido de compuestos fenólicos en la planta, como respuesta a diferentes estímulos externos (Boudet, 2007). Si bien es cierto, la activación transcripcional de genes como el *PAL* representa una respuesta compleja al estrés biótico y abiótico, que puede variar según las condiciones experimentales (Battini et al., 2016; Blilou et al., 2000; Chen et al., 2017b; (El-Esawi et al., 2019; Hayek et al., 2014; García-Seco et al., 2015; Vaishnav et al., 2013; Wiggins et al., 2022; Zuluaga et al., 2023).

El consumo dietético de compuestos fenólicos ha sido ampliamente vinculado con beneficios significativos sobre la salud humana (Santos-Buelga et al., 2019). Por ello, en la presente tesis doctoral evaluamos por primera vez si la mejora del contenido fenólico de las plantas de lechuga, derivada de la inoculación bacteriana, ejercía un efecto positivo en la supervivencia del modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans* y si, por tanto, mejoraba las propiedades nutraceuticas del cultivo. Así, los resultados obtenidos indicaron que los cambios en el perfil de compuestos fenólicos de plantas de lechuga, inducidos por los aislados seleccionados, modifican positivamente la actividad biológica del extracto procedente de las plantas de lechuga. Apenas hay estudios previos que sigan esta línea de trabajo. Únicamente Fan y colaboradores (2011), en un estudio con extractos de algas, obtuvieron resultados análogos a los observados en esta tesis doctoral. Además, correlacionaron las mejoras de la supervivencia del nematodo con un aumento del contenido de flavonoides totales. Así, la inoculación bacteriana en las plantas de lechuga también indujo un incremento del contenido de este tipo de compuestos fenólicos, así como de ácido fenólicos. Además, entre los polifenoles detectados encontramos ácido cicórico, ácido cafeoil quínico o derivados de la quercetina y la luteolina, compuestos cuya bioactividad en modelos *in vivo*, como *Caenorhabditis elegans*, ya ha sido demostrada previamente (Kampkötter et al., 2008; Li et al., 2021; Lin et al., 2020; Peng et al., 2019; Pietsch et al., 2011; Schlernitzauer et al., 2013; Surco-Laos et al., 2011; Xiao et al., 2023; Yamamoto et al., 2024).

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, hemos podido establecer las siguientes conclusiones:

- La diversidad bacteriana aislada del interior de nódulos de *Trifolium repens* L., y del suelo rizosférico y el interior de raíces de *Plantago maritima* L. y *Camphorosma monspeliaca* L., es más alta de la esperada e indica que estos nichos ecológicos constituyen una potencial fuente de aislamiento de nuevas especies bacterianas y de microorganismos con potencial de promover el crecimiento vegetal y mitigar el estrés salino.
- La capacidad de las cepas *Pseudomonas* sp. SCPM31, *Priestia megaterium* SCPM81, y, especialmente *Rhizobium laguerreae* HUTR05 y *Rhizobium* sp. GPTR29 para colonizar el sistema radicular, promover el crecimiento vegetal, reducir los efectos negativos causados por NaCl y Na₂SO₄, y mejorar el contenido nutricional de plantas de lechuga, apio y canónigo hace que puedan ser consideradas como candidatas adecuadas para su uso como bioinoculantes sobre estos cultivos hortícolas de importancia mundial.
- La inoculación bacteriana de plantas de lechuga con las cepas SCPM81, HUTR05 y GPTR29, pertenecientes a los géneros bacterianos *Priestia* y *Rhizobium* provoca cambios en el contenido mineral y en la expresión de genes relacionados con la respuesta vegetal al estrés salino. Estos hallazgos apuntan a que la acción de las bacterias PGP induce un efecto adaptativo ante condiciones de estrés que provoca cambios a nivel nutricional, fisiológico y transcripcional, y pone de manifiesto la importancia de integrar el análisis de los efectos directos observados en la planta con estudios que ahonden en los mecanismos subyacentes a estos.
- La respuesta transcriptómica de las plantas de lechuga a la inoculación bacteriana y a las condiciones salinas sugiere que existe una importante dependencia a nivel de cepa, remarcando la necesidad de realizar estudios pormenorizados para cada aislado con potencial bioestimulante.
- La acumulación de compuestos fenólicos en plantas de lechuga, apio y canónigo está condicionada por factores como la salinidad del suelo y la interacción con el inoculante bacteriano.
- La utilización de bioinoculantes bacterianos supone una importante estrategia para la mejora de la actividad biológica y de las propiedades nutraceuticas del cultivo de la

lechuga, como demuestra el aumento en la supervivencia y la resistencia al estrés oxidativo del organismo modelo *Caenorhabditis elegans* derivado de los cambios en el contenido en compuestos fenólicos de las plantas inoculadas con los aislados seleccionados.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, G., Saqib, M., Akhtar, J., & Haq, M. A. U. (2015). Interactive effects of salinity and iron deficiency on different rice genotypes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 178(2), 306-311.

Abraham, D., Braguini, W. L., Kelmer-Bracht, A. M., & Ishii-Iwamoto, E. L. (2000). Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *Journal of chemical ecology*, 26, 611-624.

Abrol, I. P., Yadav, J. S., & Massoud, F. I. *Salt-Affected Soils and their Management*, FAO Soils Bulletin 39, 1st ed; Food & Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 1988; pp. 13–90.

Adhikari, B., Olorunwa, O. J., Horgan, T. E., Wilson, J., Barickman, T. C., Li, T., & Bheemanahalli, R. (2024). Seed priming attenuates the impact of salt stress and enhances lettuce yields. *Journal of Agriculture and Food Research*, 15, 100947.

Adhikari, B., Olorunwa, O. J., Wilson, J. C., & Barickman, T. C. (2021). Morphological and physiological response of different lettuce genotypes to salt stress. *Stresses*, 1(4), 285-304.

Adolf, L. A., Müller-Jochim, A., Kricks, L., Puls, J. S., Lopez, D., Grein, F., & Heilbronner, S. (2023). Functional membrane microdomains and the hydroxamate siderophore transporter ATPase *FhuC* govern Isd-dependent heme acquisition in *Staphylococcus aureus*. *Elife*, 12, e85304.

Ahmad, F., Ahmad, I., & KHAN, M. S. (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology*, 29(1), 29-34.

Ahmed, Z. A. (2017). Effect of NPK and Bio Fertilization on Growth and Oil Yield of Celery (*Apium graveolens*L.) and Dill (*Anethum graveolens* L.) Plants. *Journal of Plant Production*, 8(2), 247-251.

Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of soils*, 12, 39-45.

Alguacil, M. D. M., Kohler, J., Caravaca, F., & Roldán, A. (2009). Differential effects of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* on lettuce plants physiological response and aquaporin *PIP2* gene expression under elevated atmospheric CO₂ and drought. *Microbial ecology*, 58, 942-951.

Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 160-167.

ALKahtani, M., Hafez, Y., Attia, K., Al-Ateeq, T., Ali, M. A., Hasanuzzaman, M., & Abdelaal, K. (2021). *Bacillus thuringiensis* and silicon modulate antioxidant metabolism and improve the physiological traits to confer salt tolerance in lettuce. *Plants*, 10(5), 1025.

Almeida, O. A. C., De Araujo, N. O., Mulato, A. T. N., Persinoti, G. F., Sforça, M. L., Calderan-Rodrigues, M. J., & Oliveira, J. V. D. C. (2023). Bacterial volatile organic compounds (VOCs) promote growth and induce metabolic changes in rice. *Frontiers in plant science*, 13, 1056082.

Al-Rashdi, A., Al-Sadi, A. M., Al-Harrasi, M. M. A., Al-Sabahi, J. N., Janke, R., & Velazhahan, R. (2023). The effect of NaCl on growth and volatile metabolites produced by antagonistic endophytic bacteria isolated from *Prosopis cineraria*. *Australasian Plant Pathology*, 52(5), 377-384.

Altaf, M. M., & Ahmad, I. (2017). In vitro and in vivo biofilm formation by *Azotobacter* isolates and its relevance to rhizosphere colonization. *Rhizosphere*, 3, 138-142.

Amaresan, N., Kumar, K., Naik, J. H., Bapatla, K. G., & Mishra, R. K. (2018). *Streptomyces* in plant growth promotion: mechanisms and role. In Singh, B. P., Gupta, V. K., & Passari, A. K., *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 125-135). Elsevier.

Amaro, F., Pinto, J., Rocha, S., Araújo, A. M., Miranda-Gonçalves, V., Jerónimo, C., ... & Guedes de Pinho, P. (2020). Volatilomics reveals potential biomarkers for identification of renal cell carcinoma: an in vitro approach. *Metabolites*, 10(5), 174.

Ambastha, V., Friedmann, Y., & Leshem, Y. (2020). Laterals take it better—emerging and young lateral roots survive lethal salinity longer than the primary root in *Arabidopsis*. *Scientific reports*, 10(1), 3291.

Andrews, J. S., Rolfe, S. A., Huang, W. E., Scholes, J. D., & Banwart, S. A. (2010). Biofilm formation in environmental bacteria is influenced by different macromolecules depending on genus and species. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2496-2507.

Annapurna, K., Ramadoss, D., Bose, P., & VithalKumar, L. (2013). In situ localization of *Paenibacillus polymyxa* HKA-15 in roots and root nodules of soybean (*Glycine max*. L.). *Plant and soil*, 373, 641-648.

- Araújo, J., Flores-Félix, J. D., Igual, J. M., Peix, A., González-Andrés, F., Díaz-Alcántara, C. A., & Velázquez, E. (2017). *Bradyrhizobium cajani* sp. nov. isolated from nodules of *Cajanus cajan*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(7), 2236-2241.
- Arfaoui, A., Sifi, B., Boudabous, A., Hadrami, I. E., & Cherif, M. (2006). Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the causal agent of *Fusarium* wilt of chickpea. *Journal of Plant Pathology*, 67-75.
- Arora, N. K. (2019). Impact of climate change on agriculture production and its sustainable solutions. *Environmental Sustainability*, 2(2), 95-96.
- Arora, N. K., Tewari, S., Singh, S., Lal, N., & Maheshwari, D. K. (2011). PGPR for protection of plant health under saline conditions. *Bacteria in agrobiolgy: stress management*, 239-258.
- Arruda, L., Beneduzi, A., Martins, A., Lisboa, B., Lopes, C., Bertolo, F., ... & Vargas, L. K. (2013). Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied Soil Ecology*, 63, 15-22.
- Arumugam, M. K., Paal, M. C., Donohue Jr, T. M., Ganesan, M., Osna, N. A., & Kharbanda, K. K. (2021). Beneficial effects of betaine: A comprehensive review. *Biology*, 10(6), 456.
- Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O., & Mahmood, T. (2004). Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of soils*, 40, 157-162.
- Astaneh, R. K., Bolandnazar, S., Nahandi, F. Z., & Oustan, S. (2018). Effect of selenium application on phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, phenol leakage and total phenolic content in garlic (*Allium sativum* L.) under NaCl stress. *Information processing in Agriculture*, 5(3), 339-344.
- Asthana, J., Mishra, B. N., & Pandey, R. (2016). Acacetin promotes healthy aging by altering stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Research*, 50(8), 861-874.
- Audrain, B., Farag, M. A., Ryu, C. M., & Ghigo, J. M. (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS microbiology reviews*, 39(2), 222-233.
- Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., Gil-Sánchez, I., Moreno-Arribas, M. V., Bartolomé, B., Sanz-Buenhombre, M., ... & González-Paramás, A. M. (2019a). Antioxidant characterization and biological effects of grape pomace extracts supplementation in *Caenorhabditis elegans*. *Foods*, 8(2), 75.

- Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., González-Paramás, A. M., & Santos-Buelga, C. (2020). *Caenorhabditis elegans* as a model organism to evaluate the antioxidant effects of phytochemicals. *Molecules*, 25(14), 3194.
- Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., Miranda-Vizueté, A., Dueñas, M., Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A. M. (2019b). Epicatechin modulates stress-resistance in *C. elegans* via insulin/IGF-1 signaling pathway. *PLoS One*, 14(1), e0199483.
- Ayuso-Calles, M., Flores-Félix, J. D., & Rivas, R. (2021). Overview of the role of rhizobacteria in plant salt stress tolerance. *Agronomy*, 11(9), 1759.
- Ayuso-Calles, M., Flores-Félix, J. D., Amaro, F., García-Estévez, I., Jiménez-Gómez, A., de Pinho, P. G., ... & Rivas, R. (2023). Effect of *Rhizobium* mechanisms in improving tolerance to saline stress in lettuce plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10(1), 89.
- Azarmi-Atajan, F., & Sayyari-Zohan, M. H. (2020). Alleviation of salt stress in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Horticulture and Postharvest Research*, 3(Special Issue-Abiotic and Biotic Stresses), 67-78.
- Bachran, M., Kluge, S., Lopez-Fernandez, M., & Cherkouk, A. (2019). Microbial diversity in an arid, naturally saline environment. *Microbial ecology*, 78, 494-505.
- Bacilio, M., Moreno, M., & Bashan, Y. (2016). Mitigation of negative effects of progressive soil salinity gradients by application of humic acids and inoculation with *Pseudomonas stutzeri* in a salt-tolerant and a salt-susceptible pepper. *Applied Soil Ecology*, 107, 394-404.
- Bacilio, M., Rodriguez, H., Moreno, M., Hernandez, J. P., & Bashan, Y. (2004). Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biology and fertility of soils*, 40(3), 188-193.
- Balabanova, L., Pentekhina, I., Nedashkovskaya, O., Degtyarenko, A., Grigorchuk, V., Yugay, Y., ... & Shkryl, Y. (2022). Shift of Choline/Betaine Pathway in Recombinant *Pseudomonas* for Cobalamin Biosynthesis and Abiotic Stress Protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 13934.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
- Balsanelli, E., Serrato, R. V., De Baura, V. A., Sassaki, G., Yates, M. G., Rigo, L. U., ... & Monteiro, R. A. (2010). *Herbaspirillum seropedicae* *rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. *Environmental microbiology*, 12(8), 2233-2244.

- Banchio, E., Xie, X., Zhang, H., & Pare, P. W. (2009). Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emissions in sweet basil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 653-657.
- Bano, A., & Fatima, M. (2009). Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biology and fertility of soils*, 45, 405-413.
- Bashan, Y., Kamnev, A. A., & de-Bashan, L. E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and fertility of soils*, 49(4), 465-479.
- Battini, F., Bernardi, R., Turrini, A., Agnolucci, M., & Giovannetti, M. (2016). *Rhizophagus intraradices* or its associated bacteria affect gene expression of key enzymes involved in the rosmarinic acid biosynthetic pathway of basil. *Mycorrhiza*, 26, 699-707.
- Becher, P. G., Verschut, V., Bibb, M. J., Bush, M. J., Molnár, B. P., Barane, E., ... & Flärdh, K. (2020). Developmentally regulated volatiles geosmin and 2-methylisoborneol attract a soil arthropod to *Streptomyces* bacteria promoting spore dispersal. *Nature Microbiology*, 5(6), 821-829.
- Bellabarba, A., Fagorzi, C., diCenzo, G. C., Pini, F., Viti, C., & Checcucci, A. (2019). Deciphering the symbiotic plant microbiome: translating the most recent discoveries on *rhizobia* for the improvement of agricultural practices in metal-contaminated and high saline lands. *Agronomy*, 9(9), 529.
- Berger, B. A., Ambrose, B. A., Tong, J., & Howarth, D. G. (2021). Flower development in *Fedia graciliflora* and *Valerianella locusta* (Valerianaceae). *Flora*, 275, 151754.
- Besaury, L., Martinet, L., Mühle, E., Clermont, D., & Rémond, C. (2021). *Streptomyces silvae* sp. nov., isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(12), 005147.
- Beye, M., Fahsi, N., Raoult, D., & Fournier, P. E. (2018). Careful use of 16S rRNA gene sequence similarity values for the identification of *Mycobacterium* species. *New microbes and new infections*, 22, 24-29.
- Bie, Z., Ito, T., & Shinohara, Y. (2004). Effects of sodium sulfate and sodium bicarbonate on the growth, gas exchange and mineral composition of lettuce. *Scientia Horticulturae*, 99(3-4), 215-224.

Birch, P. R., & Kamoun, S. (2000). Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions. *New technologies for life sciences: a trends guide, 1931*, 77-82.

Blilou, I., Ocampo, J. A., & García-Garrido, J. M. (2000). Induction of *Ltp* (lipid transfer protein) and *Pal* (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Journal of experimental botany*, 51(353), 1969-1977.

Blom, D., Fabbri, C., Connor, E. C., Schiestl, F. P., Klauser, D. R., Boller, T., ... & Weiskopf, L. (2011). Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environmental microbiology*, 13(11), 3047-3058.

Bontemps-Gallo, S., & Lacroix, J. M. (2015). New insights into the biological role of the osmoregulated periplasmic glucans in pathogenic and symbiotic bacteria. *Environmental microbiology reports*, 7(5), 690-697.

Borowski, J. M., Galli, V., da Silva Messias, R., Perin, E. C., Buss, J. H., dos Anjos e Silva, S. D., & Rombaldi, C. V. (2014). Selection of candidate reference genes for real-time PCR studies in lettuce under abiotic stresses. *Planta*, 239, 1187-1200.

Boudet, A. M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2722-2735.

Boysen, A. K., Durham, B. P., Kumler, W., Key, R. S., Heal, K. R., Carlson, L. T., ... & Ingalls, A. E. (2022). Glycine betaine uptake and metabolism in marine microbial communities. *Environmental Microbiology*, 24(5), 2380-2403.

Bremer, E., & Krämer, R. (2019). Responses of microorganisms to osmotic stress. *Annual review of Microbiology*, 73, 313-334.

Brenner, S. E. (1995). BLAST, Blitz, BLOCKS and BEAUTY: sequence comparison on the net. *Trends in genetics: TIG*, 11(8), 330-331.

Breś, W., Kleiber, T., Markiewicz, B., Mieloszyk, E., & Mieloch, M. (2022). The effect of NaCl stress on the response of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Agronomy*, 12(2), 244.

Bridier, A., Le Coq, D., Dubois-Brissonnet, F., Thomas, V., Aymerich, S., & Briandet, R. (2011). The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging. *PloS one*, 6(1), e16177.

- Brígido, C., Alexandre, A., & Oliveira, S. (2012). Transcriptional analysis of major chaperone genes in salt-tolerant and salt-sensitive mesorhizobia. *Microbiological research*, 167(10), 623-629.
- Brill, J., Hoffmann, T., Putzer, H., & Bremer, E. (2011). T-box-mediated control of the anabolic proline biosynthetic genes of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 157(4), 977-987.
- Brown, J. S., Gilliland, S. M., Ruiz-Albert, J., & Holden, D. W. (2002). Characterization of *pit*, a *Streptococcus pneumoniae* iron uptake ABC transporter. *Infection and immunity*, 70(8), 4389-4398.
- Bucher, T., Oppenheimer-Shaanan, Y., Savidor, A., Bloom-Ackermann, Z., & Kolodkin-Gal, I. (2015). Disturbance of the bacterial cell wall specifically interferes with biofilm formation. *Environmental microbiology reports*, 7(6), 990-1004.
- Burrell, M., Hanfrey, C. C., Kinch, L. N., Elliott, K. A., & Michael, A. J. (2012). Evolution of a novel lysine decarboxylase in siderophore biosynthesis. *Molecular microbiology*, 86(2), 485-499.
- Cappellari, L. D. R., & Banchio, E. (2020). Microbial volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* GB03 ameliorate the effects of salt stress in *Mentha piperita* principally through acetoin emission. *Journal of plant growth regulation*, 39, 764-775.
- Cardarelli, M., Woo, S. L., Rouphael, Y., & Colla, G. (2022). Seed treatments with microorganisms can have a biostimulant effect by influencing germination and seedling growth of crops. *Plants*, 11(3), 259.
- Carter, R. A., Worsley, P. S., Sawers, G., Challis, G. L., Dilworth, M. J., Carson, K. C., ... & Yeoman, K. H. (2002). The *vbs* genes that direct synthesis of the siderophore vicibactin in *Rhizobium leguminosarum*: their expression in other genera requires ECF σ factor RpoI. *Molecular Microbiology*, 44(5), 1153-1166.
- Celador, L. (2017). *Selección de bioinoculantes agrícolas mediante la caracterización molecular y funcional de bacterias asociadas a Zea mays y su análisis práctico en la mejora del rendimiento de cultivos de maíz, canónigos, albahaca, berros y rúcula* [Tesis doctoral, Universidad de Salamanca]. Repositorio Documental Gredos.
- Chakraborty, T., & Akhtar, N. (2021). Biofertilizers: prospects and challenges for future. In Ahamed, M. I., Boddula, R., & Rezakazemi, M. (Eds.), *Biofertilizers: study and impact* (pp. 575-590). Scrivener Publishing LLC.

- Chandra, G., Chater, K. F., & Bornemann, S. (2011). Unexpected and widespread connections between bacterial glycogen and trehalose metabolism. *Microbiology*, 157(6), 1565-1572.
- Chandra, P., Dhuli, P., Verma, P., Singh, A., Choudhary, M., Prajapat, K., ... & Yadav, R. K. (2020). Culturable microbial diversity in the rhizosphere of different biotypes under variable salinity. *Tropical Ecology*, 61, 291-300.
- Chávez-Díaz, L., González, P., Rubio, E., & Melchiorre, M. (2013). Diversity and stress tolerance in rhizobia from Parque Chaqueño region of Argentina nodulating *Prosopis alba*. *Biology and fertility of soils*, 49(8), 1153-1165.
- Chen, L. X., Anantharaman, K., Shaiber, A., Eren, A. M., & Banfield, J. F. (2020). Accurate and complete genomes from metagenomes. *Genome research*, 30(3), 315-333.
- Chen, L., Liu, Y., Wu, G., Veronican Njeri, K., Shen, Q., Zhang, N., & Zhang, R. (2016). Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Physiologia plantarum*, 158(1), 34-44.
- Chen, L., Liu, Y., Wu, G., Zhang, N., Shen, Q., & Zhang, R. (2017a). Beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 induces plant salt tolerance through spermidine production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(5), 423-432.
- Chen, X. L., Sun, M. C., Chong, S. L., Si, J. P., & Wu, L. S. (2022). Transcriptomic and metabolomic approaches deepen our knowledge of plant–endophyte interactions. *Frontiers in Plant Science*, 12, 700200.
- Chen, Y., Li, F., Tian, L., Huang, M., Deng, R., Li, X., ... & Wu, G. (2017b). The phenylalanine ammonia lyase gene *LjPAL1* is involved in plant defense responses to pathogens and plays diverse roles in *Lotus japonicus*-*Rhizobium* symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(9), 739-753.
- Cheng, H. P., & Walker, G. C. (1998). Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*, 180(19), 5183-5191.
- Cheyrier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry reviews*, 11(2-3), 153-177.
- Chhetri, G., Kim, I., Kang, M., So, Y., Kim, J., & Seo, T. (2022). An isolated *Arthrobacter* sp. enhances rice (*Oryza sativa* L.) plant growth. *Microorganisms*, 10(6), 1187.

Chouyia, F. E., Ventrino, V., & Pepe, O. (2022). Diversity, mechanisms and beneficial features of phosphate-solubilizing *Streptomyces* in sustainable agriculture: A review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1035358.

Chu, S., Zhang, D., Zhi, Y., Wang, B., Chi, C. P., Zhang, D., ... & Zhou, P. (2018). Enhanced removal of nitrate in the maize rhizosphere by plant growth-promoting *Bacillus megaterium* NCT-2, and its colonization pattern in response to nitrate. *Chemosphere*, 208, 316-324.

Chuljerm, H., Deudom, M., Fucharoen, S., Mazzacuva, F., Hider, R. C., Srichairatanakool, S., & Cilibrizzi, A. (2020). Characterization of two siderophores produced by *Bacillus megaterium*: A preliminary investigation into their potential as therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1864(10), 129670.

Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., ... & Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(1), 461-466.

Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. *Clinical microbiology reviews*, 33(4), 10-1128.

Collado-González, J., Piñero, M. C., Otalora, G., Lopez-Marín, J., & Del Amor, F. M. (2023). Plant growth-promoting bacteria as affected by N availability as a suitable strategy to enhance the nutritional composition of lamb's lettuce affected by global warming. *Food Chemistry*, 426, 136559.

Comité de Agentes Biológicos (ABAS). (2010). *Classification of Prokaryotes (Bacteria and Archea) into Risk Groups* (Technical Rules for Biological Agents 466). <https://www.baua.de/EN/Service/Technical-rules/TRBA/TRBA-466.html>

Compant, S., Cambon, M. C., Vacher, C., Mitter, B., Samad, A., & Sessitsch, A. (2021). The plant endosphere world—bacterial life within plants. *Environmental Microbiology*, 23(4), 1812-1829.

Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., ... & Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology*, 17, 1-19.

Consentino, B. B., Aprile, S., Roupael, Y., Ntatsi, G., De Pasquale, C., Iapichino, G., ... & Sabatino, L. (2022). Application of PGPB combined with variable n doses affects growth, yield-

related traits, n-fertilizer efficiency and nutritional status of lettuce grown under controlled condition. *Agronomy*, 12(2), 236.

Corwin, D. L. (2021). Climate change impacts on soil salinity in agricultural areas. *European Journal of Soil Science*, 72(2), 842-862.

Czaczyk, K., & Myszka, K. (2007). Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(6).

Dahal, B., NandaKafle, G., Perkins, L., & Brözel, V. S. (2017). Diversity of free-Living nitrogen fixing *Streptomyces* in soils of the badlands of South Dakota. *Microbiological Research*, 195, 31-39.

Dalla-Costa, L., Tomasi, N., Gottardi, S., Iacuzzo, F., Cortella, G., Manzocco, L., ... & Cesco, S. (2011). The effect of growth medium temperature on corn salad [*Valerianella locusta* (L.) Laterr] baby leaf yield and quality. *HortScience*, 46(12), 1619-1625.

Damalas, C. A., Koutroubas, S. D., & Fotiadis, S. (2019). Hydro-priming effects on seed germination and field performance of faba bean in spring sowing. *Agriculture*, 9(9), 201.

Dave, A., Agarwal, P., & Agarwal, P. K. (2022). Mechanism of high affinity potassium transporter (HKT) towards improved crop productivity in saline agricultural lands. *Biotech*, 12(2), 51.

De Pascale, S., Maggio, A., Ruggiero, C., & Barbieri, G. (2003). Growth, water relations, and ion content of field-grown celery [*Apium graveolens* L. var. dulce (Mill.) Pers.] under saline irrigation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(1), 136-143.

Del Buono, D. (2021). Can biostimulants be used to mitigate the effect of anthropogenic climate change on agriculture? It is time to respond. *Science of the Total Environment*, 751, 141763.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 18(14), 1818-1892.

Delgado-García, M., Contreras-Ramos, S. M., Rodríguez, J. A., Mateos-Díaz, J. C., Aguilar, C. N., & Camacho-Ruiz, R. M. (2018). Isolation of halophilic bacteria associated with saline and alkaline-sodic soils by culture dependent approach. *Heliyon*, 4(11).

Díaz-Alcántara, C. A., Ramírez-Bahena, M. H., Mulas, D., García-Fraile, P., Gómez-Moriano, A., Peix, A., ... & González-Andrés, F. (2014). Analysis of *rhizobial* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* from Hispaniola Island, a geographic bridge between Meso and South

America and the first historical link with Europe. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(2), 149-156.

Dickschat, J. S. (2016). Bacterial terpene cyclases. *Natural product reports*, 33(1), 87-110.

Díez-Méndez, A., & Menéndez, E. (2021). *Rhizobium* presence and functions in microbiomes of non-leguminous plants. *Symbiotic Soil Microorganisms: Biology and Applications*, 241-266.

Dilberger, B., Weppler, S., & Eckert, G. P. (2021). Phenolic acid metabolites of polyphenols act as inductors for hormesis in *C. elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 198, 111518.

Długosz-Grochowska, O., Kołton, A., & Wojciechowska, R. (2016). Modifying folate and polyphenol concentrations in Lamb's lettuce by the use of LED supplemental lighting during cultivation in greenhouses. *Journal of Functional Foods*, 26, 228-237.

Długosz-Grochowska, O., Wojciechowska, R., Kruczek, M., & Habela, A. (2017). Supplemental lighting with LEDs improves the biochemical composition of two *Valerianella locusta* (L.) cultivars. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 58, 441-449.

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A., & Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and soil*, 212(2), 153-162.

Dodd, I. C., & Perez-Alfocea, F. (2012). Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of experimental botany*, 63(9), 3415-3428.

Don, N. T., & Diep, C. N. (2014). Isolation, characterization and identification of phosphate- and potassium solubilizing bacteria from weathered materials of granite rock mountain, That Son, An Giang province, Vietnam. *American Journal of Life Sciences*, 2(5), 282-291.

Doukyu, N., & Taguchi, K. (2021). Involvement of catalase and superoxide dismutase in hydrophobic organic solvent tolerance of *Escherichia coli*. *Amb Express*, 11(1), 97.

Dragojević, M., Stankovic, N., Djokic, L., Raičević, V., & Jovičić-Petrović, J. (2023). Endorhizosphere of indigenous succulent halophytes: a valuable resource of plant growth promoting bacteria. *Environmental Microbiome*, 18(1), 1-16.

Duan, L., Dietrich, D., Ng, C. H., Chan, P. M. Y., Bhalerao, R., Bennett, M. J., & Dinneny, J. R. (2013). Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell*, 25(1), 324-341.

- Duca, D. R., & Glick, B. R. (2020). Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 8607-8619.
- Dueñas, M., Martínez-Villaluenga, C., Limón, R. I., Peñas, E., & Frias, J. (2015). Effect of germination and elicitation on phenolic composition and bioactivity of kidney beans. *Food Research International*, 70, 55-63.
- Duijff, B. J., De Kogel, W. J., Bakker, P. A. H. M., & Schippers, B. (1994). Influence of pseudobactin 358 on the iron nutrition of barley. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(12), 1681-1688.
- EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck, D., Castenmiller, J., de Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Kearney, J., ... & Naska, A. (2019). Dietary reference values for sodium. *EFSA Journal*, 17(9), e05778.
- Egamberdieva, D., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S. D., Mishra, J., & Arora, N. K. (2019). Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in microbiology*, 10, 2791.
- Egamberdiyeva, D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied soil ecology*, 36(2-3), 184-189.
- El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S., & Bakour, R. (2013). Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, 61(5), 209-216.
- El Othmany, R., Zahir, H., Ellouali, M., & Latrache, H. (2021). Current understanding on adhesion and biofilm development in actinobacteria. *International Journal of Microbiology*, 2021.
- El-Esawi, M. A., Al-Ghamdi, A. A., Ali, H. M., & Alayafi, A. A. (2019). *Azospirillum lipoferum* FK1 confers improved salt tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) by modulating osmolytes, antioxidant machinery and stress-related genes expression. *Environmental and Experimental Botany*, 159, 55-65.
- Etesami, H., & Adl, S. M. (2020). Can interaction between silicon and non-rhizobial bacteria help in improving nodulation and nitrogen fixation in salinity-stressed legumes? A review. *Rhizosphere*, 15, 100229.
- Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., & Collet, J. F. (2017). Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 385-396.

- Falaleeva, M., Zurek, O. W., Watkins, R. L., Reed, R. W., Ali, H., Sumby, P., ... & Korotkova, N. (2014). Transcription of the *Streptococcus pyogenes* hyaluronic acid capsule biosynthesis operon is regulated by previously unknown upstream elements. *Infection and immunity*, 82(12), 5293-5307.
- Fan, D., Hodges, D. M., Zhang, J., Kirby, C. W., Ji, X., Locke, S. J., ... & Prithiviraj, B. (2011). Commercial extract of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* enhances phenolic antioxidant content of spinach (*Spinacia oleracea* L.) which protects *Caenorhabditis elegans* against oxidative and thermal stress. *Food Chemistry*, 124(1), 195-202.
- Farag, M. A., Ryu, C. M., Sumner, L. W., & Paré, P. W. (2006). GC–MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*, 67(20), 2262-2268.
- Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., García-Fraile, P., Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., ... & Velázquez, E. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae. *PLoS One*, 6(5), e20223.
- Ferreira, M. J., Silva, H., & Cunha, A. (2019). Siderophore-producing rhizobacteria as a promising tool for empowering plants to cope with iron limitation in saline soils: A review. *Pedosphere*, 29(4), 409-420.
- Fincheira, P., & Quiroz, A. (2018). Microbial volatiles as plant growth inducers. *Microbiological Research*, 208, 63-75.
- Finch-Savage, W. E., & Bassel, G. W. (2016). Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. *Journal of experimental botany*, 67(3), 567-591.
- Flemming, H. C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of bacteriology*, 189(22), 7945-7947.
- Flores-Félix, J. D. (2018). *Caracterización molecular y funcional de biofertilizantes bacterianos, y análisis de su potencial para mejorar la producción de cultivos de maíz, guisante, lechuga, fresa y zanahoria* (Tesis de Doctorado, Universidad de Salamanca).
- Flores-Félix, J. D., Carro, L., Cerda-Castillo, E., Squartini, A., Rivas, R., & Velázquez, E. (2020). Analysis of the interaction between *Pisum sativum* L. and *Rhizobium laguerreae* strains nodulating this Legume in Northwest Spain. *Plants*, 9(12), 1755.
- Flores-Félix, J. D., Gonçalves, A. C., Meirinho, S., Nunes, A. R., Alves, G., Garcia-Viguera, C., ... & Silva, L. R. (2024). Differential response of blueberry to the application of bacterial

inoculants to improve yield, organoleptic qualities and concentration of bioactive compounds. *Microbiological Research*, 278, 127544.

Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Marcos-García, M., Celador-Lera, L., & Rivas, R. (2015a). Calcofluor white, an alternative to propidium iodide for plant tissues staining in studies of root colonization by fluorescent-tagged *Rhizobia*. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 2(1), 65-70.

Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Rivera, L. P., Marcos-García, M., Martínez-Hidalgo, P., Mateos, P. F., ... & Rivas, R. (2013). Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176(6), 876-882.

Flores-Félix, J. D., Silva, L. R., Rivera, L. P., Marcos-García, M., García-Fraile, P., Martínez-Molina, E., ... & Rivas, R. (2015b). Plants probiotics as a tool to produce highly functional fruits: the case of *Phyllobacterium* and vitamin C in strawberries. *PLoS One*, 10(4), e0122281.

Flores-Félix, J. D., Velázquez, E., García-Fraile, P., González-Andrés, F., Silva, L. R., & Rivas, R. (2018). *Rhizobium* and *Phyllobacterium* bacterial inoculants increase bioactive compounds and quality of strawberries cultivated in field conditions. *Food Research International*, 111, 416-422.

Flores-Félix, J. D., Velázquez, E., Martínez-Molina, E., González-Andrés, F., Squartini, A., & Rivas, R. (2021). Connecting the lab and the field: Genome analysis of *Phyllobacterium* and *Rhizobium* strains and field performance on two vegetable crops. *Agronomy*, 11(6), 1124

Formstone, A., Carballido-López, R., Noirot, P., Errington, J., & Scheffers, D. J. (2008). Localization and interactions of teichoic acid synthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 190(5), 1812-1821.

Franzini, V. I., Azcón, R., Ruiz-Lozano, J. M., & Aroca, R. (2019). Rhizobial symbiosis modifies root hydraulic properties in bean plants under non-stressed and salinity-stressed conditions. *Planta*, 249, 1207-1215.

Franzoni, G., Cocetta, G., Trivellini, A., Garabello, C., Contartese, V., & Ferrante, A. (2022). Effect of exogenous application of salt stress and glutamic acid on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Horticulturae*, 299, 111027.

Fu, Q., Liu, C., Ding, N., Lin, Y., & Guo, B. (2010). Ameliorative effects of inoculation with the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* sp. DW1 on growth of eggplant

(*Solanum melongena* L.) seedlings under salt stress. *Agricultural Water Management*, 97(12), 1994-2000.

Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L., & Hirsch, A. M. (2006). Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS microbiology ecology*, 56(2), 195-206.

Fukami, J., de la Osa, C., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2017). Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Functional Plant Biology*, 45(3), 328-339.

Furtado, B. U., Gołębiewski, M., Skorupa, M., Hulisz, P., & Hryniewicz, K. (2019). Bacterial and fungal endophytic microbiomes of *Salicornia europaea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(13), e00305-19.

Gáll, T., Lehoczki, G., Gyémánt, G., Emri, T., Szigeti, Z. M., Balla, G., ... & Pócsi, I. (2016). Optimization of desferrioxamine E production by *Streptomyces parvulus*. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 63(4), 475-489.

Gallardo, J. F., & González-Hernández, M. I. (18-25 September 1995). *Characterics of the Sodic saline soils of the Duero Basin (Spain) a Review*. International Symposium on Salt-affected Lagoon Ecosystems, Valencia, Spain. ISSALE 95: 99-108 (1995).

Gámez-Arcas, S., Baroja-Fernández, E., García-Gómez, P., Muñoz, F. J., Almagro, G., Bahaji, A., ... & Pozueta-Romero, J. (2022). Action mechanisms of small microbial volatile compounds in plants. *Journal of Experimental Botany*, 73(2), 498-510.

Gao, Y., Lu, Y., Zhang, D., & Chen, J. (2016). Ability to remove Na⁺ and retain K⁺ correlates with salt tolerance in two maize inbred lines seedlings. *Frontiers in plant science*, 7, 224987.

Gao, Y., Zhang, J., Wang, C., Han, K., Hu, L., Niu, T., ... & Xie, J. (2023). Exogenous proline enhances systemic defense against salt stress in celery by regulating photosystem, phenolic compounds, and antioxidant system. *Plants*, 12(4), 928.

García-Fraile, P., Carro, L., Robledo, M., Ramirez-Bahena, M. H., Flores-Felix, J. D., Fernández, M. T., ... & Velazquez, E. (2012). *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS One*, 7(5), e38122.

García-Fraile, P., Menéndez, E., & Rivas, R. (2015). Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *Aims Bioengineering*, 2(3), 183-205.

- García-Fraile, P., Menéndez, E., Celador-Lera, L., Díez-Méndez, A., Jiménez-Gómez, A., Marcos-García, M., ... & Rivas, R. (2017). Bacterial probiotics: A truly green revolution. In Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S., & Prasad, R. (eds.), *Probiotics and plant health* (pp. 131-162). Springer, Singapore.
- García-Seco, D., Zhang, Y., Gutierrez-Manero, F. J., Martin, C., & Ramos-Solano, B. (2015). Application of *Pseudomonas fluorescens* to blackberry under field conditions improves fruit quality by modifying flavonoid metabolism. *PLoS One*, 10(11), e0142639.
- Garrido-Sanz, D., Redondo-Nieto, M., Martin, M., & Rivilla, R. (2021). Comparative genomics of the *Pseudomonas corrugata* subgroup reveals high species diversity and allows the description of *Pseudomonas ogarae* sp. nov. *Microbial genomics*, 7(6), 000593.
- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A., & Young, J. P. (2001). Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(6), 2037-2048.
- Gennari, M., Abbate, C., Porta, V. L., Baglieri, A., & Cignetti, A. (2007). Microbial response to Na₂SO₄ additions in a volcanic soil. *Arid Land Research and Management*, 21(3), 211-227.
- Ghosh, S., Ghosh, P., & Maiti, T. K. (2011). Production and metabolism of indole acetic acid (IAA) by root nodule bacteria (*Rhizobium*): a review. *J Pure Appl Microbiol*, 5, 523-540.
- Gil, S. S., Cappellari, L. D. R., Giordano, W., & Banchio, E. (2023). Antifungal Activity and Alleviation of Salt Stress by Volatile Organic Compounds of Native *Pseudomonas* Obtained from *Mentha piperita*. *Plants*, 12(7), 1488.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., ... & Tuteja, N. (2015). Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental science and pollution research*, 22, 10375-10394.
- Gil-Ramírez, Y., Conde-Álvarez, R., Palacios-Chaves, L., Zúñiga-Ripa, A., Grilló, M. J., Arce-Gorvel, V., ... & Iriarte, M. (2014). The identification of *wadB*, a new glycosyltransferase gene, confirms the branched structure and the role in virulence of the lipopolysaccharide core of *Brucella abortus*. *Microbial pathogenesis*, 73, 53-59.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Gond, S. K., Torres, M. S., Bergen, M. S., Helsel, Z., & White Jr, J. F. (2015). Induction of salt tolerance and up-regulation of aquaporin genes in tropical corn by rhizobacterium *Pantoea agglomerans*. *Letters in Applied Microbiology*, 60(4), 392-399.

- González, F., Santander, C., Ruiz, A., Pérez, R., Moreira, J., Vidal, G., ... & Cornejo, P. (2023). Inoculation with *Actinobacteria* spp. isolated from a hyper-arid environment enhances tolerance to salinity in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). *Plants*, 12(10), 2018.
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192.
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2015). Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from l-tryptophan (Trp) using HPTLC. *Journal of Microbiological Methods*, 110, 7-14.
- Granada, C. E., Arruda, L., Lisboa, B. B., Passaglia, L. M., & Vargas, L. K. (2014). Diversity of native *rhizobia* isolated in south Brazil and their growth promotion effect on white clover (*Trifolium repens*) and rice (*Oryza sativa*) plants. *Biology and fertility of soils*, 50, 123-132.
- Grewal, H. S., & Maheshwari, B. L. (2013). Treated effluent and saline water irrigation influences soil properties, yield, water productivity and sodium content of snow peas and celery. *Journal of plant nutrition*, 36(7), 1102-1119.
- Groenhagen, U., Baumgartner, R., Bailly, A., Gardiner, A., Eberl, L., Schulz, S., & Weisskopf, L. (2013). Production of bioactive volatiles by different *Burkholderia ambifaria* strains. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 892-906.
- Groppa, M. D., Benavides, M. P., & Zawoznik, M. S. (2012). Root hydraulic conductance, aquaporins and plant growth promoting microorganisms: A revision. *Applied Soil Ecology*, 61, 247-254.
- Grzegorzewski, F., Ehlbeck, J., Schlüter, O., Kroh, L. W., & Rohn, S. (2011). Treating lamb's lettuce with a cold plasma—Influence of atmospheric pressure Ar plasma immanent species on the phenolic profile of *Valerianella locusta*. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2285-2289.
- Grzegorzewski, F., Rohn, S., Kroh, L. W., Geyer, M., & Schlüter, O. (2010). Surface morphology and chemical composition of lamb's lettuce (*Valerianella locusta*) after exposure to a low-pressure oxygen plasma. *Food Chemistry*, 122(4), 1145-1152.
- Gumiere, T., Ribeiro, C. M., Vasconcellos, R. L. F., & Cardoso, E. J. B. N. (2014). Indole-3-acetic acid producing root-associated bacteria on growth of Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*) and Slash Pine (*Pinus elliottii*). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 105, 663-669.

Gupta, G., Snehi, S. K., & Singh, V. (2017). Role of PGPR in biofilm formations and its importance in plant health. In Ahmad, I., & Husain F. M., *Biofilms in plant and soil health*, (ed. 1, pp. 27-42). John Wiley & Sons Ltd.

Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(11), 5753-5798.

Gutiérrez-Zetina, S. M., González-Manzano, S., Ayuda-Durán, B., Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A. M. (2021). Caffeic and dihydrocaffeic acids promote longevity and increase stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by modulating expression of stress-related genes. *Molecules*, 26(6), 1517.

Hagelueken, G., Wiehlmann, L., Adams, T. M., Kolmar, H., Heinz, D. W., Tümmeler, B., & Schubert, W. D. (2007). Crystal structure of the electron transfer complex rubredoxin–rubredoxin reductase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(30), 12276-12281.

Hakim, S., Naqqash, T., Nawaz, M. S., Laraib, I., Siddique, M. J., Zia, R., ... & Imran, A. (2021). Rhizosphere engineering with plant growth-promoting microorganisms for agriculture and ecological sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 617157.

Halder, U., Banerjee, A., & Bandopadhyay, R. (2017). Structural and functional properties, biosynthesis, and patenting trends of bacterial succinoglycan: a review. *Indian journal of microbiology*, 57, 278-284.

Han, H. S., & Lee, K. D. (2005). Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Res J Agric Biol Sci*, 1(3), 210-215.

Hayat, K., Bundschuh, J., Jan, F., Menhas, S., Hayat, S., Haq, F., ... & Zhou, P. (2020). Combating soil salinity with combining saline agriculture and phytomanagement with salt-accumulating plants. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(11), 1085-1115.

Hayek, S., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., & Franken, P. (2014). Elucidating mechanisms of mycorrhiza-induced resistance against *Thielaviopsis basicola* via targeted transcript analysis of *Petunia hybrida* genes. *Physiological and molecular plant pathology*, 88, 67-76.

- Heenan-Daly, D., Coughlan, S., Dillane, E., & Doyle Prestwich, B. (2021). Volatile compounds from *Bacillus*, *Serratia*, and *Pseudomonas* promote growth and alter the transcriptional landscape of *Solanum tuberosum* in a passively ventilated growth system. *Frontiers in Microbiology*, 12, 628437.
- Hemissi, I., Mabrouk, Y., Abdi, N., Bouraoui, M., Saidi, M., & Sifi, B. (2011). Effects of some *Rhizobium* strains on chickpea growth and biological control of *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(24), 4080-4090.
- Hernández, L., Loyola González, O., Valle, B., Martínez, J., Díaz López, L., Aragón, C., ... & Lorenzo, J. C. (2015). Identification of discriminant factors after exposure of maize and common bean plantlets to abiotic stresses. *NOTULAE BOTANICAE HORTI AGROBOTANICI*, 43(2), 589-598.
- Hernández, V., Botella, M. Á., Hellín, P., Cava, J., Fenoll, J., Mestre, T., ... & Flores, P. (2021). Phenolic and carotenoid profile of lamb's lettuce and improvement of the bioactive content by preharvest conditions. *Foods*, 10(1), 188.
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Macías-Rodríguez, L. I., Reyes-de la Cruz, H., ... & Santoyo, G. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological control*, 81, 83-92.
- Hindersah, R., Pratiwi, E., Fatma, Y. S., & Simarmata, T. (2023). Diversity and structure of bacterial communities in saline and non-saline rice fields in Cilacap Regency, Indonesia. *Open Agriculture*, 8(1), 20220225.
- Holz, M., Zarebanadkouki, M., Kuzyakov, Y., Pausch, J., & Carminati, A. (2018). Root hairs increase rhizosphere extension and carbon input to soil. *Annals of Botany*, 121(1), 61-69.
- Hosono, R. (1978). Sterilization and growth inhibition of *Caenorhabditis elegans* by 5-fluorodeoxyuridine. *Experimental gerontology*, 13(5), 369-373.
- Hostetler, G. L., Riedl, K. M., & Schwartz, S. J. (2012). Endogenous enzymes, heat, and pH affect flavone profiles in parsley (*Petroselinum crispum* var. *neapolitanum*) and celery (*Apium graveolens*) during juice processing. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(1), 202-208.
- Hsouna, J., Ilahi, H., Han, J. C., Gritli, T., Ellouze, W., Zhang, X. X., ... & Mnasri, B. (2023). *Rhizobium acaciae* sp. nov., a new nitrogen-fixing symbiovar isolated from root nodules of *Acacia saligna* in Tunisia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(5), 005900.

Huang, J., & Redmann, R. E. (1995). Salt tolerance of *Hordeum* and *Brassica* species during germination and early seedling growth. *Canadian Journal of Plant Science*, 75(4), 815-819.

Ibrahim, E. A. (2016). Seed priming to alleviate salinity stress in germinating seeds. *Journal of plant physiology*, 192, 38-46.

Ilangumaran, G., & Smith, D. L. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria in amelioration of salinity stress: a systems biology perspective. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1768.

IPCC. (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. *Cambridge University Press*, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.

IPCC. (2014). Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [R.K. Pachauri y L.A. Meyer (eds.)]. *IPCC*, Ginebra, Suiza, 157 pp.

Irakoze, W., Prodjimoto, H., Nijimbere, S., Bizimana, J. B., Bigirimana, J., Rufyikiri, G., & Lutts, S. (2021). NaCl- and Na₂SO₄-induced salinity differentially affect clay soil chemical properties and yield components of two rice cultivars (*Oryza sativa* L.) in Burundi. *Agronomy*, 11(3), 571.

Irakoze, W., Prodjimoto, H., Nijimbere, S., Rufyikiri, G., & Lutts, S. (2020). NaCl and Na₂SO₄ salinities have different impact on photosynthesis and yield-related parameters in rice (*Oryza sativa* L.). *Agronomy*, 10(6), 864.

Jacob, S., & Sudini, H. K. (2016). Indirect plant growth promotion in grain legumes: Role of actinobacteria. *Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes*, 17-32.

Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. *Frontiers in plant science*, 8, 1617.

Jaganath, I. B., & Crozier, A. (2010). Dietary flavonoids and phenolic compounds. In: Fraga, C. G. (ed.), *Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition, and pharmacology*, (Vol. 1, pp. 1-50). Wiley.

Jain, S., Varma, A., & Choudhary, D. K. (2021). Perspectives on nitrogen-fixing *Bacillus* species. *Soil Nitrogen Ecology*, 359-369.

- Jamil, A., Riaz, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2011). Gene expression profiling of plants under salt stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(5), 435-458.
- Jha, Y., & Subramanian, R. B. (2014). PGPR regulate caspase-like activity, programmed cell death, and antioxidant enzyme activity in paddy under salinity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20, 201-207.
- Jia, Q., Zheng, C., Sun, S., Amjad, H., Liang, K., & Lin, W. (2018). The role of plant cation/proton antiporter gene family in salt tolerance. *Biologia plantarum*, 62(4), 617-629.
- Jiang, L., Jung, W. Y., Li, Z., Lee, M. K., Park, S. H., Kang, S. W., ... & Lee, J. (2021). *Peribacillus faecalis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from the faeces of a cow. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(3), 004721.
- Jiang, Y., Song, Y., Jiang, C., Li, X., Liu, T., Wang, J., ... & Gao, J. (2022). Identification and Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* JI39, a Novel Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Strain From *Panax ginseng*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 873621.
- Jiménez-Gómez, A., Flores-Félix, J. D., García-Fraile, P., Mateos, P. F., Menéndez, E., Velázquez, E., & Rivas, R. (2018). Probiotic activities of *Rhizobium laguerreae* on growth and quality of spinach. *Scientific Reports*, 8(1), 295.
- Jiménez-Gómez, A., García-Estévez, I., Escribano-Bailón, M. T., García-Fraile, P., & Rivas, R. (2021). Bacterial fertilizers based on *Rhizobium laguerreae* and *Bacillus halotolerans* enhance *Cichorium endivia* L. phenolic compound and mineral contents and plant development. *Foods*, 10(2), 424.
- Jiménez-Gómez, A., García-Estévez, I., García-Fraile, P., Escribano-Bailón, M. T., & Rivas, R. (2020). Increase in phenolic compounds of *Coriandrum sativum* L. after the application of a *Bacillus halotolerans* biofertilizer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2742-2749.
- Jin, C. W., Li, G. X., Yu, X. H., & Zheng, S. J. (2010). Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. *Annals of botany*, 105(5), 835-841.
- Jones, D. L., Nguyen, C., & Finlay, R. D. (2009). Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface. *Plant and soil*, 321, 5-33.
- Jyothikumar, V., Tilley, E. J., Wali, R., & Herron, P. R. (2008). Time-lapse microscopy of *Streptomyces coelicolor* growth and sporulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6774-6781.

- Kai, M. (2020). Diversity and distribution of volatile secondary metabolites throughout *Bacillus subtilis* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 11, 478645.
- Kampkötter, A., Nkwonkam, C. G., Zurawski, R. F., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen, W., & Kahl, R. (2007). Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology*, 234(1-2), 113-123.
- Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R. F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P., & Wätjen, W. (2008). Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(2), 314-323.
- Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in plant science*, 6, 133272.
- Kandel, S. L., Joubert, P. M., & Doty, S. L. (2017). Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*, 5(4), 77.
- Kang, S. M., Khan, A. L., You, Y. H., Kim, J. G., Kamran, M., & Lee, I. J. (2014a). Gibberellin production by newly isolated strain *Leifsonia soli* SE134 and its potential to promote plant growth. *Journal of microbiology and biotechnology*, 24(1), 106-112.
- Kang, S. M., Radhakrishnan, R., Khan, A. L., Kim, M. J., Park, J. M., Kim, B. R., ... & Lee, I. J. (2014b). Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 115-124.
- Kapadia, C., Patel, N., Rana, A., Vaidya, H., Alfarraj, S., Ansari, M. J., ... & Sayyed, R. Z. (2022). Evaluation of plant growth-promoting and salinity ameliorating potential of halophilic bacteria isolated from saline soil. *Frontiers in plant science*, 13, 946217.
- Kappes, R. M., Kempf, B., & Bremer, E. (1996). Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. *Journal of Bacteriology*, 178(17), 5071-5079.
- Kassinger, S. J., & van Hoek, M. L. (2020). Biofilm architecture: An emerging synthetic biology target. *Synthetic and systems biotechnology*, 5(1), 1-10.

- Kaushal, M., & Wani, S. P. (2016). Rhizobacterial-plant interactions: strategies ensuring plant growth promotion under drought and salinity stress. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 231, 68-78.
- Khalid, A., Arshad, M., & Zahir, Z. A. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of applied microbiology*, 96(3), 473-480.
- Khalid, M. F., Hussain, S., Ahmad, S., Ejaz, S., Zakir, I., Ali, M. A., ... & Anjum, M. A. (2019). Impacts of abiotic stresses on growth and development of plants. In: Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Oku, H., & Islam, M. T. (eds.), *Plant tolerance to environmental stress* (pp. 1-8). CRC Press.
- Khalil, M. K., Taha, K. F., Nesem, M. A., & Sallam, S. S. (2019). Phytochemical studies on celery (*Apium graveolens* L.) plant under using chemical fertilization, biofertilizer and thidiazuron treatments. *AI-Azhar journal of Pharmaceutical Sciences*, 59.
- Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., ... & Lee, I. J. (2014). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology*, 52, 689-695.
- Khatkar, D., & Kuhad, M. S. (2000). Short-term salinity induced changes in two wheat cultivars at different growth stages. *Biologia Plantarum*, 43, 629-632.
- Khianngam, S., Meetum, P., Chiangmai, P. N., & Tanasupawat, S. (2023). Identification and Optimisation of Indole-3-Acetic Acid Production of Endophytic Bacteria and Their Effects on Plant Growth. *Tropical life sciences research*, 34(1), 219.
- Kim, M. J., Moon, Y., Tou, J. C., Mou, B., & Waterland, N. L. (2016). Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 19-34.
- Kimes, N. E., López-Pérez, M., Flores-Félix, J. D., Ramírez-Bahena, M. H., Igual, J. M., Peix, A., ... & Velázquez, E. (2015). *Pseudorhizobium pelagicum* gen. nov., sp. nov. isolated from a pelagic Mediterranean zone. *Systematic and applied microbiology*, 38(5), 293-299.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16, 111-120.
- Kloss, L., Meyer, J. D., Graeve, L., & Vetter, W. (2015). Sodium intake and its reduction by food reformulation in the European Union—A review. *NFS journal*, 1, 9-19.

- Knights, H. E., Jorin, B., Haskett, T. L., & Poole, P. S. (2021). Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. *Environmental Microbiology Reports*, 13(4), 428-444.
- Kohler, J., Caravaca, F., Carrasco, L., & Roldan, A. (2006). Contribution of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* to aggregate stabilization and promotion of biological fertility in rhizosphere soil of lettuce plants under field conditions. *Soil Use and Management*, 22(3), 298-304.
- Kohler, J., Hernández, J. A., Caravaca, F., & Roldán, A. (2008). Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Functional Plant Biology*, 35(2), 141-151.
- Kooti, W., & Daraei, N. (2017). A review of the antioxidant activity of celery (*Apium graveolens* L). *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 22(4), 1029-1034.
- Kramer, J., Özkaya, Ö., & Kümmerli, R. (2020). Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 152-163.
- Krishnaraj, P. U., & Pasha, M. A. (2017). Metagenome of rhizosphere and endophytic ecosystem. *Understanding Host-Microbiome Interactions-An Omics Approach: Omics of Host-Microbiome Association*, 125-156.
- Kulbat, K. (2016). The role of phenolic compounds in plant resistance. *Biotechnology and Food Science*, 80(2), 97-108.
- Kumar, A., Patel, J. S., Meena, V. S., & Ramteke, P. W. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria: strategies to improve abiotic stresses under sustainable agriculture. *Journal of Plant Nutrition*, 42(11-12), 1402-1415.
- Kumar, K., & Mosa, K. A. (2015). Ion transporters: a decisive component of salt stress tolerance in plants. In Wani, S. H., & Hossain, M. A. (Eds.), *Managing salt tolerance in plants: molecular and genomic perspectives*. CRC Press, Boca Raton, 373-390.
- Kumar, M. S., Reddy, G. C., Phogat, M., & Korav, S. (2018). Role of bio-fertilizers towards sustainable agricultural development: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(6), 1915-1921.
- Kumar, P. S., Rangasamy, G., Gayathri, K. V., & Parthasarathy, V. (2023). *Rhizobium mayense* sp. Nov., an efficient plant growth-promoting nitrogen-fixing bacteria isolated from rhizosphere soil. *Environmental Research*, 220, 115200.

- Kumar, P., & Singh, R. P. (2021). Microbial Diversity and Multifunctional Microbial Biostimulants for Agricultural Sustainability. In Kaushik, A., Kaushik, C. P., & Attri, S. D., (Eds.): *Climate Resilience and Environmental Sustainability Approaches: Global Lessons and Local Challenges* (pp. 141-184). Springer.
- Kumar, S., Abedin, M. M., Singh, A. K., & Das, S. (2020). Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture: Volume 1*, 517-532.
- Kumari, N., & Thakur, S. K. (2014). Randomly amplified polymorphic DNA-a brief review. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 9(1), 6-13.
- Kundan, R., Pant, G., Jadon, N., & Agrawal, P. K. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria: mechanism and current prospective. *J Fertil Pestic*, 6(2), 9.
- Kunova, A., Bonaldi, M., Saracchi, M., Pizzatti, C., Chen, X., & Cortesi, P. (2016). Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. *BMC microbiology*, 16, 1-11.
- Ladero, M., Valle, C. J., Amor, A., Santos, M. T., Santos, F., & Gutierrez, A. (1997). Halosubnitrophilous pastures of the west of the regional community of Castilla y León (Spain). *Phytocoenologia*, 27(4), 573-588.
- Lai, W. A., Rekha, P. D., Arun, A. B., & Young, C. C. (2008). Effect of mineral fertilizer, pig manure, and *Azospirillum rugosum* on growth and nutrient contents of *Lactuca sativa* L. *Biology and fertility of soils*, 45(2), 155-164.
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E. (2020). Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes*, 11(2), 139.
- Land, M., Hauser, L., Jun, S. R., Nookaew, I., Leuze, M. R., Ahn, T. H., ... & Ussery, D. W. (2015). Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & integrative genomics*, 15, 141-161.
- Latif, S., Khan, S., Naveed, M., Mustafa, G., Bashir, T., & Mumtaz, A. S. (2013). The diversity of *Rhizobia*, *Sinorhizobia* and novel non-*Rhizobial* *Paenibacillus* nodulating wild herbaceous legumes. *Archives of microbiology*, 195, 647-653.
- Lefort, V., Desper, R., & Gascuel, O. (2015). FastME 2.0: a comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program. *Molecular biology and evolution*, 32(10), 2798-2800.

- Levitt, J. (1980). *Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses* (N° Ed. 2, pp. 607). Academic Press.
- Levy, A., Conway, J. M., Dangl, J. L., & Woyke, T. (2018). Elucidating bacterial gene functions in the plant microbiome. *Cell host & microbe*, 24(4), 475-485.
- Li, H. Q., & Jiang, X. W. (2017). Inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) improves salt tolerance of maize seedling. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64, 235-241.
- Li, J. H., Wang, E. T., Chen, W. F., & Chen, W. X. (2008). Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 238-246.
- Li, L., & Chen, X. (2023). Auxin regulation on crop: from mechanisms to opportunities in soybean breeding. *Molecular Breeding*, 43(3), 16.
- Li, Q., & Chen, S. (2020). Transfer of nitrogen fixation (nif) genes to non-diazotrophic hosts. *ChemBioChem*, 21(12), 1717-1722.
- Li, R., Tao, M., Wu, T., Zhuo, Z., Xu, T., Pan, S., & Xu, X. (2021). A promising strategy for investigating the anti-aging effect of natural compounds: A case study of caffeoylquinic acids. *Food & Function*, 12(18), 8583-8593.
- Li, S., Chen, F., Li, Y., Wang, L., Li, H., Gu, G., & Li, E. (2022). Rhamnose-containing compounds: biosynthesis and applications. *Molecules*, 27(16), 5315.
- Li, X., Sun, P., Zhang, Y., Jin, C., & Guan, C. (2020). A novel PGPR strain *Kocuria rhizophila* Y1 enhances salt stress tolerance in maize by regulating phytohormone levels, nutrient acquisition, redox potential, ion homeostasis, photosynthetic capacity and stress-responsive genes expression. *Environmental and Experimental Botany*, 174, 104023.
- Lidbury, I., Kimberley, G., Scanlan, D. J., Murrell, J. C., & Chen, Y. (2015). Comparative genomics and mutagenesis analyses of choline metabolism in the marine *Roseobacter* clade. *Environmental microbiology*, 17(12), 5048-5062.
- Lin, H. R., Shu, H. Y., & Lin, G. H. (2018). Biological roles of indole-3-acetic acid in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiological research*, 216, 30-39.
- Lin, L. Z., Lu, S., & Harnly, J. M. (2007). Detection and quantification of glycosylated flavonoid malonates in celery, Chinese celery, and celery seed by LC-DAD-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1321-1326.

- Lin, L., Pratt, S., Crick, O., Xia, J., Duan, H., & Ye, L. (2021). Salinity effect on freshwater Anammox bacteria: Ionic stress and ion composition. *Water Research*, 188, 116432.
- Lin, Y., Yang, N., Bao, B., Wang, L., Chen, J., & Liu, J. (2020). Luteolin reduces fat storage in *Caenorhabditis elegans* by promoting the central serotonin pathway. *Food & function*, 11(1), 730-740.
- Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial biotechnology*, 13(5), 1314-1335.
- Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z., & Ma, B. (2013). Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 9155-9164.
- Liu, G., Zhuang, L., Song, D., Lu, C., & Xu, X. (2017). Isolation, purification, and identification of the main phenolic compounds from leaves of celery (*Apium graveolens* L. var. *dulce* Mill./Pers.). *Journal of separation science*, 40(2), 472-479.
- Liu, J., Li, Z., Ghanizadeh, H., Kerckhoffs, H., Sofkova-Bobcheva, S., Wu, W., ... & Wang, A. (2020a). Comparative genomic and physiological analyses of a superoxide dismutase mimetic (SODm-123) for its ability to respond to oxidative stress in tomato plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(47), 13608-13619.
- Liu, S., Tian, Y., Jia, M., Lu, X., Yue, L., Zhao, X., ... & Wang, R. (2020b). Induction of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* by volatiles from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 via the jasmonic acid signaling pathway. *Frontiers in Microbiology*, 11, 562934.
- Liu, W., Wang, Q., Hou, J., Tu, C., Luo, Y., & Christie, P. (2016). Whole genome analysis of halotolerant and alkalotolerant plant growth-promoting rhizobacterium *Klebsiella* sp. D5A. *Scientific reports*, 6(1), 26710.
- Liu, X., Ji, H., Zhang, C., Sun, N., Xia, T., Wang, Z., & Wang, X. (2024a). The poly- γ -glutamic acid-producing bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* W25 enhanced the salt tolerance of lettuce by regulating physio-biochemical processes and influencing the rhizosphere soil microbial community. *Environmental and Experimental Botany*, 220, 105679.
- Liu, Y., Xu, Z., Chen, L., Xun, W., Shu, X., Chen, Y., ... & Zhang, R. (2024b). Root colonization by beneficial rhizobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 48(1), fuad066.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Lopes, L. D., Hao, J., & Schachtman, D. P. (2021). Alkaline soil pH affects bulk soil, rhizosphere and root endosphere microbiomes of plants growing in a Sandhills ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(4), fiab028.

López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. I., & Valencia-Cantero, E. (2007). *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(2), 207-217.

Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3143-3153.

Lushchak, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(2), 175-190.

Ma, B., & Gong, J. (2013). A meta-analysis of the publicly available bacterial and archaeal sequence diversity in saline soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 2325-2334.

Maas, E. V. (1993, August). Testing crops for salinity tolerance. In *Proc. workshop on adaptation of plants to soil stresses* (Vol. 94, pp. 234-247). Lincoln, NE: University of Nebraska.

Maas, E. V., & Grattan, S. R. (1999). Crop yields as affected by salinity. *Agricultural drainage*, 38, 55-108.

Maćik, M., Gryta, A., & Frąc, M. (2020). Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in agronomy*, 162, 31-87.

MacKellar, D., Lieber, L., Norman, J. S., Bolger, A., Tobin, C., Murray, J. W., ... & Prell, J. (2016). *Streptomyces thermoautotrophicus* does not fix nitrogen. *Scientific reports*, 6(1), 20086.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock Biología de los Microorganismos*. Pearson Education.

Maffei, M. E., Gertsch, J., & Appendino, G. (2011). Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Natural product reports*, 28(8), 1359-1380.

- Maheshwari, D. K., Dheeman, S., & Agarwal, M. (2015). Phytohormone-producing PGPR for sustainable agriculture. In Maheshwari, D. (eds), *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem* (pp. 159-182, vol 12). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3_7
- Mahmoudi, H., Huang, J., Gruber, M. Y., Kaddour, R., Lachaal, M., Ouerghi, Z., & Hannoufa, A. (2010). The impact of genotype and salinity on physiological function, secondary metabolite accumulation, and antioxidative responses in lettuce. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(8), 5122-5130.
- Mahmoudi, H., Massoud, R. B., Baatour, O., Tarchoune, I., Salah, I. B., Nasri, N., ... & Ouerghi, Z. (2012). Influence of different seed priming methods for improving salt stress tolerance in lettuce plants. *Journal of plant nutrition*, 35(12), 1910-1922.
- Makarova, E. I., Bokov, D. O., Sergunova, E. V., Chevadaev, V. V., Kakhramanova, S. D., Bessonov, V. V., ... & Luferov, A. N. (2022). *Apium graveolens* L.: A phytochemical and pharmacological review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 15(2), 927-934.
- Marulanda, A., Azcón, R., Chaumont, F., Ruiz-Lozano, J. M., & Aroca, R. (2010). Regulation of plasma membrane aquaporins by inoculation with a *Bacillus megaterium* strain in maize (*Zea mays* L.) plants under unstressed and salt-stressed conditions. *Planta*, 232, 533-543.
- Marvasi, M., Visscher, P. T., & Casillas Martinez, L. (2010). Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS microbiology letters*, 313(1), 1-9.
- Masák, J., Čejková, A., Schreiberová, O., & Řezanka, T. (2014). *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. *FEMS microbiology ecology*, 89(1), 1-14.
- Massawe, V. C., Hanif, A., Farzand, A., Mburu, D. K., Ochola, S. O., Wu, L., ... & Gao, X. (2018). Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 108(12), 1373-1385.
- Matamoros, V., Casas, M. E., Mansilla, S., Tadić, Đ., Cañameras, N., Carazo, N., ... & Bayona, J. M. (2022). Occurrence of antibiotics in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) and Radish (*Raphanus sativus* L.) following organic soil fertilisation under plot-scale conditions: Crop and human health implications. *Journal of hazardous materials*, 436, 129044.
- Matthijs, S., Brandt, N., Ongena, M., Achouak, W., Meyer, J. M., & Budzikiewicz, H. (2016). Pyoverdine and histicorrugatin-mediated iron acquisition in *Pseudomonas thivervalensis*. *Biometals*, 29, 467-485.

- May, J. J., Wendrich, T. M., & Marahiel, M. A. (2001). The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2, 3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7209-7217.
- Meena, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P., & Meena, R. S. (eds.). (2016). *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture* (Vol. 331). New Delhi: Springer.
- Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. (2019). TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature communications*, 10(1), 2182.
- Meier-Kolthoff, J. P., Carbasse, J. S., Peinado-Olarte, R. L., & Göker, M. (2022). TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic acids research*, 50(D1), D801-D807.
- Mekureyaw, M. F., Pandey, C., Hennessy, R. C., Nicolaisen, M. H., Liu, F., Nybroe, O., & Roitsch, T. (2022). The cytokinin-producing plant beneficial bacterium *Pseudomonas fluorescens* G20-18 primes tomato (*Solanum lycopersicum*) for enhanced drought stress responses. *Journal of Plant Physiology*, 270, 153629.
- Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Abou Jaoudé, R., Ficca, A. G., & Ruzzi, M. (2023). Effect of microbial plant biostimulants on fruit and vegetable quality: current research lines and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1251544.
- Mellidou, I., & Karamanoli, K. (2022). Unlocking PGPR-mediated abiotic stress tolerance: What lies beneath. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6.
- Mendoza-Suárez, M., Andersen, S. U., Poole, P. S., & Sánchez-Cañizares, C. (2021). Competition, nodule occupancy, and persistence of inoculant strains: key factors in the *rhizobium*-legume symbioses. *Frontiers in plant science*, 12, 690567.
- Menendez, E., & Garcia-Fraile, P. (2017). Plant probiotic bacteria: solutions to feed the world. *AIMS microbiology*, 3(3), 502.
- Menéndez, E., Flores-Félix, J. D., Ramírez-Bahena, M. H., Igual, J. M., García-Fraile, P., Peix, A., & Velázquez, E. (2020). Genome analysis of *Endobacterium cerealis*, a novel genus and species isolated from *Zea mays* roots in North Spain. *Microorganisms*, 8(6), 939.
- Migahed, H. A., Ahmed, A. E., & Abd El-Ghany, B. F. (2004). Effect of different bacterial strains as biofertilizer agents on growth, production and oil of *Apium graveolens* under calcareous soil. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 12(2), 511-525.

Miller, S. H., Browne, P., Prigent-Combaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J. P., & O'Gara, F. (2010). Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environmental microbiology reports*, 2(3), 403-411.

Minhas, P.S., Rane, J., & Pasala, R.K. (2017). Abiotic Stresses in Agriculture: An Overview. In: Minhas, P., Rane, J., Pasala, R. (eds.), *Abiotic Stress Management for Resilient Agriculture*. Springer, Singapore.

Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté alimentaire (24 de octubre de 2023). *Statistique agricole annuelle 2022*. https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/download/publication/publie/Chd2310/cd2023-10_SAA2022-Provisoirev2.pdf

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (20 de octubre de 2023). *Superficies y producciones anuales de cultivos*. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/>

Mitchell, D. H., Stiles, J. W., Santelli, J., & Sanadi, D. R. (1979). Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *Journal of gerontology*, 34(1), 28-36.

Molina, M. A., Ramos, J. L., & Espinosa-Urgel, M. (2003). Plant-associated biofilms. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2, 99-108.

Molina-Montenegro, M. A., Acuña-Rodríguez, I. S., Torres-Díaz, C., Gundel, P. E., & Dreyer, I. (2020). Antarctic root endophytes improve physiological performance and yield in crops under salt stress by enhanced energy production and Na⁺ sequestration. *Scientific reports*, 10(1), 5819.

Moon, C. D., Zhang, X. X., Matthijs, S., Schäfer, M., Budzikiewicz, H., & Rainey, P. B. (2008). Genomic, genetic and structural analysis of pyoverdine-mediated iron acquisition in the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *BMC microbiology*, 8, 1-13.

More, N., Verma, A., Bharagava, R. N., Kharat, A. S., Gautam, R., & Navaratna, D. (2022). Sustainable Development in Agriculture by Revitalization of PGPR. In Bharagava, R. N., Mishra, S., Saratale, G. D., Saratale, R. G., Ferreira, L. F. R. (eds.), *Bioremediation: Green Approaches for a Clean and Sustainable Environment* (pp. 127-142). CRC Press, E.E. U.U.

Mou, B. (2008). Lettuce. In: Prohens, J., Nuez, F. (eds) *Vegetables I. Handbook of Plant Breeding* (Vol. 1, pp. 75-116). Springer, New York.

- Msimbira, L. A., & Smith, D. L. (2020). The roles of plant growth promoting microbes in enhancing plant tolerance to acidity and alkalinity stresses. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 106.
- Mukhopadhyay, R., Sarkar, B., Jat, H. S., Sharma, P. C., & Bolan, N. S. (2021). Soil salinity under climate change: Challenges for sustainable agriculture and food security. *Journal of Environmental Management*, 280, 111736.
- Muminovic, J., Melchinger, A. E., & Luubberstedt, T. (2004). Genetic diversity in cornsalad (*Valerianella locusta*) and related species as determined by AFLP markers. *Plant Breeding*, 123(5), 460-466.
- Munns, R., & Rawson, H. M. (1999). Effect of salinity on salt accumulation and reproductive development in the apical meristem of wheat and barley. *Functional Plant Biology*, 26(5), 459-464.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Nadeem, S. M., Zahir, Z. A., Naveed, M., & Arshad, M. (2009). Rhizobacteria containing ACC-deaminase confer salt tolerance in maize grown on salt-affected fields. *Canadian journal of microbiology*, 55(11), 1302-1309.
- Naikoo, M. I., Dar, M. I., Raghib, F., Jaleel, H., Ahmad, B., Raina, A., ... & Naushin, F. (2019). Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: An overview. *Plant signaling molecules*, 157-168.
- Natesh, H. N., Abbey, L., & Asiedu, S. K. (2017). An overview of nutritional and antinutritional factors in green leafy vegetables. *Hortic. Int. J*, 1(00011), 10-15406.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
- Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J. M., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Camacho, M., Caviedes, M. A., ... & Rodríguez-Llorente, I. D. (2017). Assessing the role of endophytic bacteria in the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* salt tolerance. *Plant Biology*, 19(2), 249-256.
- Netuschil, L., Auschill, T. M., Sculean, A., & Arweiler, N. B. (2014). Confusion over live/dead stainings for the detection of vital microorganisms in oral biofilms-which stain is suitable?. *BMC oral health*, 14(1), 1-12.

Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4), 503-515.

Niu, G., Davis, T. D., & Masabni, J. (2019). A review of salinity tolerance research in horticultural crops. *Journal of Arid Land Studies*, 29(2), 53-59.

Niu, S. Q., Li, H. R., Paré, P. W., Aziz, M., Wang, S. M., Shi, H., ... & Zhang, J. L. (2016). Induced growth promotion and higher salt tolerance in the halophyte grass *Puccinellia tenuiflora* by beneficial rhizobacteria. *Plant and Soil*, 407, 217-230.

Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Woyke, T., Kyrpides, N. C., ... & Göker, M. (2018). Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria*. *Frontiers in microbiology*, 9, 355158.

O'Gara, F., & Shanmugam, K. T. (1976). Regulation of nitrogen fixation by *Rhizobia* export of fixed N₂ as NH₄⁺. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 437(2), 313-321.

Olsen, A., Vantipalli, M. C., & Lithgow, G. J. (2006). Using *Caenorhabditis elegans* as a model for aging and age-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067(1), 120-128.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (20 de octubre de 2023). FAOSTAT, Cultivos y productos de ganadería. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>

Orozco-Mosqueda, M. C., Macías-Rodríguez, L. I., Santoyo, G., Farías-Rodríguez, R., & Valencia-Cantero, E. (2013). *Medicago truncatula* increases its iron-uptake mechanisms in response to volatile organic compounds produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Folia Microbiologica*, 58, 579-585.

Orozco-Mosqueda, M. D. C., Duan, J., DiBernardo, M., Zetter, E., Campos-García, J., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2019). The production of ACC deaminase and trehalose by the plant growth promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4 synergistically protect tomato plants against salt stress. *Frontiers in microbiology*, 10, 1392.

Orozco-Mosqueda, M. D. C., Santoyo, G., & Glick, B. R. (2023). Recent advances in the bacterial phytohormone modulation of plant growth. *Plants*, 12(3), 606.

Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology*, 6, 745.

- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., ... & Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic acids research*, 42(D1), D206-D214.
- Palestrant, D., Holzkecht, Z. E., Collins, B. H., Parker, W., Miller, S. E., & Bollinger, R. R. (2004). Microbial biofilms in the gut: visualization by electron microscopy and by acridine orange staining. *Ultrastructural pathology*, 28(1), 23-27.
- Pandit, S., Fazilati, M., Gaska, K., Derouiche, A., Nypelö, T., Mijakovic, I., & Kádár, R. (2020). The exo-polysaccharide component of extracellular matrix is essential for the viscoelastic properties of *Bacillus subtilis* biofilms. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6755.
- Pané-Farré, J., Lewis, R. J., & Stülke, J. (2005). The RsbRST stress module in bacteria: a signalling system that may interact with different output modules. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 9(2), 65-76.
- Pantoja-Guerra, M., Valero-Valero, N., & Ramírez, C. A. (2023). Total auxin level in the soil–plant system as a modulating factor for the effectiveness of PGPR inocula: A review. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10(1), 6.
- Pardossi, A., Bagnoli, G., Malorgio, F., Campiotti, C. A., & Tognoni, F. (1999a). NaCl effects on celery (*Apium graveolens* L.) grown in NFT. *Scientia Horticulturae*, 81(3), 229-242.
- Pardossi, A., Malorgio, F., & Tognoni, F. (1999b). Salt tolerance and mineral relations for celery. *Journal of plant nutrition*, 22(1), 151-161.
- Park, Y. S., Dutta, S., Ann, M., Raaijmakers, J. M., & Park, K. (2015). Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(2), 361-365.
- Parnell, J., & Foley, C. (2000). Morphological variation in *Valerianella* (Valerianaceae) in Ireland. *Irish Naturalists' Journal*, 26(9), 314-321.
- Patel, S., & Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(1), 406-438.

- Paterson, J., Jahanshah, G., Li, Y., Wang, Q., Mehnaz, S., & Gross, H. (2017). The contribution of genome mining strategies to the understanding of active principles of PGPR strains. *FEMS microbiology ecology*, 93(3), fiw249.
- Patten, C. L., Blakney, A. J., & Coulson, T. J. (2013). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 39(4), 395-415.
- Paul, D. (2013). Osmotic stress adaptations in rhizobacteria. *Journal of basic microbiology*, 53(2), 101-110.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2015). Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 17-42.
- Peng, Y., Sun, Q., Gao, R., & Park, Y. (2019). AAK-2 and SKN-1 are involved in chicoric-acid-induced lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(33), 9178-9186.
- Pereira, S. I., & Castro, P. M. (2014). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. *Ecological Engineering*, 73, 526-535.
- Péron, J., & Rees, D. (1996, September). High-tech production of corn salad (*Valerianella locusta* (L) Laterr.), a local, French vegetable crop. In *III International Symposium Diversification of Vegetable Crops* 467 (pp. 259-268).
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180-201.
- Pi, H. W., Chiang, Y. R., & Li, W. H. (2024). Mapping geological events and nitrogen fixation evolution onto the timetree of the evolution of nitrogen-fixation genes. *Molecular Biology and Evolution*, msae023.
- Pieterse, C. M., Berendsen, R. L., de Jonge, R., Stringlis, I. A., Van Dijken, A. J., Van Pelt, J. A., ... & Bakker, P. A. (2021). *Pseudomonas simiae* WCS417: star track of a model beneficial rhizobacterium. *Plant and Soil*, 461, 245-263.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*, 52, 347-375.

Pietsch, K., Saul, N., Chakrabarti, S., Stürzenbaum, S. R., Menzel, R., & Steinberg, C. E. (2011). Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid-and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology*, 12, 329-347.

Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*, 17, 362-370.

Pink, D. A. C. & Keane, E. M. (1993). Lettuce: *Lactuca sativa* L. In *Genetic improvement of vegetable crops* (pp. 543-571). Pergamon.

Plyuta, V. A., Chernikova, A. S., Sidorova, D. E., Kupriyanova, E. V., Koksharova, O. A., Chernin, L. S., & Khmel, I. A. (2021). Modulation of *Arabidopsis thaliana* growth by volatile substances emitted by *Pseudomonas* and *Serratia* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37, 1-9.

Porcel, R., Aroca, R., Azcon, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2006). *PIP* aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant molecular biology*, 60, 389-404.

Pou, A., Jeanguenin, L., Milhiet, T., Batoko, H., Chaumont, F., & Hachez, C. (2016). Salinity-mediated transcriptional and post-translational regulation of the *Arabidopsis aquaporin PIP2; 7*. *Plant Molecular Biology*, 92, 731-744.

Pradhan, A., Pahari, A., Mohapatra, S., & Mishra, B. B. (2017). Phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: genetic mechanism and application. In Adhya, T., Mishra, B., Annapurna, K., Verma, D., Kumar, U. (eds), *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects*. (Vol. 2, pp. 81-97). Springer.

Probanza, A., Garcia, J. L., Palomino, M. R., Ramos, B., & Mañero, F. G. (2002). *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Applied Soil Ecology*, 20(2), 75-84.

Puri, A., Padda, K. P., & Chanway, C. P. (2016). Seedling growth promotion and nitrogen fixation by a bacterial endophyte *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R and its GFP derivative in corn in a long-term trial. *Symbiosis*, 69, 123-129.

Qadir, M., Quill  rou, E., Nangia, V., Murtaza, G., Singh, M., Thomas, R. J., ... & Noble, A. D. (2014, November). Economics of salt-induced land degradation and restoration. In *Natural resources forum* (Vol. 38, No. 4, pp. 282-295).

Qiu, L., Kong, W., Zhu, H., Zhang, Q., Banerjee, S., Ishii, S., ... & Wei, X. (2022). Halophytes increase rhizosphere microbial diversity, network complexity and function in inland saline ecosystem. *Science of the Total Environment*, 831, 154944.

Queen, B. L., & Tollefsbol, T. O. (2010). Polyphenols and aging. *Current aging science*, 3(1), 34-42.

Quintero, J. J. (1977). *La lechuga*. Ministerio de Agricultura, Publicaciones de Extensión Agraria.

Qurashi, A. W., & Sabri, A. N. (2012). Bacterial exopolysaccharide and biofilm formation stimulate chickpea growth and soil aggregation under salt stress. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1183-1191.

Radwan, S., Mahmoud, H., Khanafer, M., Al-Habib, A., & Al-Hasan, R. (2010). Identities of epilithic hydrocarbon-utilizing diazotrophic bacteria from the Arabian Gulf coasts, and their potential for oil bioremediation without nitrogen supplementation. *Microbial ecology*, 60, 354-363.

Rahman, M. A., Amirkhani, A., Parvin, F., Chowdhury, D., Molloy, M. P., Deva, A. K., ... & Hu, H. (2022). One step forward with dry surface biofilm (DSB) of *Staphylococcus aureus*: TMT-based quantitative proteomic analysis reveals proteomic shifts between DSB and hydrated biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12238.

Rajabi Dehnavi, A., Zahedi, M., Ludwiczak, A., Cardenas Perez, S., & Piernik, A. (2020). Effect of salinity on seed germination and seedling development of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) genotypes. *Agronomy*, 10(6), 859.

Ramadoss, D., Lakkineni, V. K., Bose, P., Ali, S., & Annapurna, K. (2013). Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. *SpringerPlus*, 2, 1-7.

Ramesh, A., Sharma, S. K., Yadav, N., & Joshi, O. P. (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. *Agricultural Research*, 3, 118-127.

Ramos-Bueno, R. P., Rincón-Cervera, M. A., González-Fernández, M. J., & Guil-Guerrero, J. L. (2016). Phytochemical composition and antitumor activities of new salad greens: Rucola (*Diplotaxis tenuifolia*) and corn salad (*Valerianella locusta*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 71, 197-203.

- Rasheed, F., Anjum, N. A., Masood, A., Sofo, A., & Khan, N. A. (2020). The key roles of salicylic acid and sulfur in plant salinity stress tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-14.
- Rashid, M. I., Mujawar, L. H., Shahzad, T., Almeelbi, T., Ismail, I. M., & Oves, M. (2016). Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiological research*, 183, 26-41.
- Rasul, M., Yasmin, S., Suleman, M., Zaheer, A., Reitz, T., Tarkka, M. T., ... & Mirza, M. S. (2019). Glucose dehydrogenase gene containing phosphobacteria for biofortification of Phosphorus with growth promotion of rice. *Microbiological research*, 223, 1-12.
- Rath, K. M., Fierer, N., Murphy, D. V., & Rousk, J. (2019). Linking bacterial community composition to soil salinity along environmental gradients. *The ISME journal*, 13(3), 836-846.
- Reginato, M., Luna, V., & Papenbrock, J. (2021). Current knowledge about Na₂SO₄ effects on plants: what is different in comparison to NaCl?. *Journal of plant research*, 134(6), 1159-1179.
- Rehman, S., Afzal, W., Anjum, T., Choudhry, H. J., Ahmad, S. R., & Aslam, M. (2019). Screening and evaluation of indigenous halo-tolerant microbes for salt stress alleviation in celery (*Apium graveolens*). *Soil & Environment*, 38(1).
- Reich, M., Aghajanzadeh, T., Helm, J., Parmar, S., Hawkesford, M. J., & De Kok, L. J. (2017). Chloride and sulfate salinity differently affect biomass, mineral nutrient composition and expression of sulfate transport and assimilation genes in *Brassica rapa*. *Plant and Soil*, 411, 319-332.
- Remans, R., Beebe, S., Blair, M., Manrique, G., Tovar, E., Rao, I., ... & Vanderleyden, J. (2008). Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and soil*, 302, 149-161.
- Ren, X. M., Guo, S. J., Tian, W., Chen, Y., Han, H., Chen, E., ... & Chen, Z. J. (2019). Effects of plant growth-promoting bacteria (PGPB) inoculation on the growth, antioxidant activity, Cu uptake, and bacterial community structure of rape (*Brassica napus* L.) grown in Cu-contaminated agricultural soil. *Frontiers in microbiology*, 10, 1455.
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., & Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, 32(6), 929-931.

Riesco, R., & Trujillo, M. E. (2024). Update on the proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 74(3), 006300.

Rivas, R., Velázquez, E., Palomo, J. L., Mateos, P. F., García-Benavides, P., & Martínez-Molina, E. (2002). Rapid identification of *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus* using two primers random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) fingerprints. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 179-184.

Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P. F., & Martínez-Molina, E. (2001). A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis*, 22(6), 1086-1089.

Robledo, M., Rivera, L., Jiménez-Zurdo, J. I., Rivas, R., Dazzo, F., Velázquez, E., ... & Mateos, P. F. (2012). Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microbial cell factories*, 11, 1-12.

Roca-Couso, R., Flores-Felix, J. D., Igual, J. M., García-Fraile, P., Velázquez, E., & Rivas, R. (2023). *Ferranicluiibacter rubi* gen. nov., sp. nov., a new member of family *Rhizobiaceae* isolated from stems of elmleaf blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott) in Northwest Spain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 73(4), 005789.

Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and soil*, 287, 15-21.

Rodríguez, M., Reina, J. C., Sampedro, I., Llamas, I., & Martínez-Checa, F. (2022). *Peribacillus castrilensis* sp. nov.: a plant-growth-promoting and Biocontrol species isolated from a river otter in Castril, Granada, southern Spain. *Frontiers in Plant Science*, 13, 896728.

Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61, 264-272.

Romera, F. J., García, M. J., Lucena, C., Martínez-Medina, A., Aparicio, M. A., Ramos, J., ... & Pérez-Vicente, R. (2019). Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 287.

Romero, C. M., Martorell, P. V., López, A. G., Peñalver, C. N., Chaves, S., & Mechetti, M. (2018). Architecture and physicochemical characterization of *Bacillus* biofilm as a potential enzyme immobilization factory. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 162, 246-255.

- Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2015). Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and applied microbiology*, 38(4), 209-216.
- Rossi, M., Borromeo, I., Capo, C., Glick, B. R., Del Gallo, M., Pietrini, F., & Forni, C. (2021). PGPB improve photosynthetic activity and tolerance to oxidative stress in *Brassica napus* grown on salinized soils. *Applied Sciences*, 11(23), 11442.
- Rudra, B., & Gupta, R. S. (2024). Phylogenomics studies and molecular markers reliably demarcate genus *Pseudomonas* sensu stricto and twelve other *Pseudomonadaceae* species clades representing novel and emended genera. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1273665.
- Ruiz-Lozano, J. M., & Aroca, R. (2010). Modulation of aquaporin genes by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in relation to osmotic stress tolerance: aquaporin in AM plants under osmotic stress. In Seckbach, J., & Grube, M. (Eds.), *Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology* (1 ed., pp. 357-374). Springer.
- Rungin, S., Indananda, C., Suttiviriya, P., Kruasuwan, W., Jaemsaeng, R., & Thamchaipenet, A. (2012). Plant growth enhancing effects by a siderophore-producing endophytic streptomycete isolated from a Thai jasmine rice plant (*Oryza sativa* L. cv. KDML105). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102, 463-472.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 134(3), 1017-1026.
- Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Paré, P. W., & Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4927-4932.
- Saati-Santamaría, Z., Baroncelli, R., Rivas, R., & García-Fraile, P. (2022). Comparative genomics of the genus *Pseudomonas* reveals host-and environment-specific evolution. *Microbiology spectrum*, 10(6), e02370-22.
- Saati-Santamaría, Z., Peral-Aranega, E., Velázquez, E., Rivas, R., & García-Fraile, P. (2021). Phylogenomic analyses of the genus *Pseudomonas* lead to the rearrangement of several species and the definition of new genera. *Biology*, 10(8), 782.
- Saddhe, A. A., Mishra, A. K., & Kumar, K. (2021). Molecular insights into the role of plant transporters in salt stress response. *Physiologia plantarum*, 173(4), 1481-1494.

Saeid, A., Prochownik, E., & Dobrowolska-Iwanek, J. (2018). Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. *Molecules*, 23(11), 2897.

Safdar, H., Amin, A., Shafiq, Y., Ali, A., Yasin, R., Shoukat, A., ... & Sarwar, M. I. (2019). A review: Impact of salinity on plant growth. *Nat. Sci*, 17(1), 34-40.

Sahin, U., Ekinci, M., Kiziloglu, F. M., Yildirim, E., Turan, M., Kotan, R., & Ors, S. (2015). Ameliorative effects of plant growth promoting bacteria on water-yield relationships, growth, and nutrient uptake of lettuce plants under different irrigation levels. *Hortscience*, 50(9), 1379-1386.

Sahoo, R. K., Ansari, M. W., Dangar, T. K., Mohanty, S., & Tuteja, N. (2014). Phenotypic and molecular characterisation of efficient nitrogen-fixing *Azotobacter* strains from rice fields for crop improvement. *Protoplasma*, 251, 511-523.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.

Salah, I. B., Albacete, A., Messedi, D., Gandour, M., Andújar, C. M., Zribi, K., ... & Pérez-Alfocea, F. (2013). Hormonal responses of nodulated *Medicago ciliaris* lines differing in salt tolerance. *Environmental and experimental botany*, 86, 35-43.

Saleem, S., Iqbal, A., Ahmed, F., & Ahmad, M. (2021). Phytobeneficial and salt stress mitigating efficacy of IAA producing salt tolerant strains in *Gossypium hirsutum*. *Saudi journal of biological sciences*, 28(9), 5317-5324.

Sallam, S. (2019). Effect of chemical fertilization, biofertilizer and thidiazuron on growth and yield of celery (*Apium graveolens* L.) Plant. *Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(1), 27-53.

Salomon, M. V., Bottini, R., de Souza Filho, G. A., Cohen, A. C., Moreno, D., Gil, M., & Piccoli, P. (2014). Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine. *Physiologia plantarum*, 151(4), 359-374.

Sandrin, T. R., Goldstein, J. E., & Schumaker, S. (2013). MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass spectrometry reviews*, 32(3), 188-217.

Santander, C., Aroca, R., Cartes, P., Vidal, G., & Cornejo, P. (2021). Aquaporins and cation transporters are differentially regulated by two arbuscular mycorrhizal fungi strains in lettuce cultivars growing under salinity conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 158, 396-409.

Santander, C., González, F., Pérez, U., Ruiz, A., Aroca, R., Santos, C., ... & Vidal, G. (2024). Enhancing Water Status and Nutrient Uptake in Drought-Stressed Lettuce Plants (*Lactuca sativa* L.) via Inoculation with Different *Bacillus* spp. Isolated from the Atacama Desert. *Plants*, 13(2), 158.

Santander, C., Ruiz, A., García, S., Aroca, R., Cumming, J., & Cornejo, P. (2020). Efficiency of two arbuscular mycorrhizal fungal inocula to improve saline stress tolerance in lettuce plants by changes of antioxidant defense mechanisms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(4), 1577-1587.

Santander, C., Vidal, G., Ruiz, A., Vidal, C., & Cornejo, P. (2022). Salinity eustress increases the biosynthesis and accumulation of phenolic compounds that improve the functional and antioxidant quality of red lettuce. *Agronomy*, 12(3), 598.

Santoro, M., Cappellari, L., Giordano, W., & Banchio, E. (2015). Production of volatile organic compounds in PGPR. In Cassán, F. D., Okon, Y., & Creus, M. C., (Eds.): *Handbook for Azospirillum* (pp. 307-317). Springer.

Santos-Beneit, F. (2015). The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 6, 138714.

Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M., Oludemi, T., Ayuda-Durán, B., & González-Manzano, S. (2019). Plant phenolics as functional food ingredients. *Advances in food and nutrition research*, 90, 183-257.

Santoyo, G., Gamalero, E., & Glick, B. R. (2021a). Mycorrhizal-bacterial amelioration of plant abiotic and biotic stress. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 672881.

Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021b). Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Biology*, 10(6), 475.

Sasse, J., Martinoia, E., & Northen, T. (2018). Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome?. *Trends in plant science*, 23(1), 25-41.

Saul, N., Pietsch, K., Menzel, R., Stürzenbaum, S. R., & Steinberg, C. E. (2009). Catechin induced longevity in *C. elegans*: from key regulator genes to disposable soma. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(8), 477-486.

Saul, N., Pietsch, K., Stürzenbaum, S. R., Menzel, R., & Steinberg, C. E. (2011). Diversity of polyphenol action in *Caenorhabditis elegans*: between toxicity and longevity. *Journal of natural products*, 74(8), 1713-1720.

Saygin, H., Ay, H., Guven, K., Cetin, D., & Sahin, N. (2020). *Streptomyces cahuitamycinicus* sp. nov., isolated from desert soil and reclassification of *Streptomyces galilaeus* as a later heterotypic synonym of *Streptomyces bobili*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2750-2759.

Schlernitzauer, A., Oiry, C., Hamad, R., Galas, S., Cortade, F., Chabi, B., ... & Wrutniak-Cabello, C. (2013). Chicoric acid is an antioxidant molecule that stimulates AMP kinase pathway in L6 myotubes and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, 8(11), e78788.

Schmidt, R., Cordovez, V., De Boer, W., Raaijmakers, J., & Garbeva, P. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME journal*, 9(11), 2329-2335.

Schönian, G., Meusel, O., Tietz, H. J., Meyer, W., Gräser, Y., Tausch, I., ... & Mitchell, T. G. (1993). Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction: Identifizierung von klinischen *Candida albicans*-Stämmen durch DNA-Fingerprinting mittels Polymerase-Kettenreaktion. *Mycoses*, 36(5-6), 171-179.

Schuster, J. J., & Markx, G. H. (2014). Biofilm architecture. *Productive biofilms*, 77-96.

Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.

Seneviratne, G., Weerasekara, M. L. M. A. W., Seneviratne, K. A. C. N., Zavahir, J. S., Kecskés, M. L., & Kennedy, I. R. (2011). Importance of biofilm formation in plant growth promoting rhizobacterial action. In Maheshwari, D. K., *Plant growth and health promoting bacteria*, (MICROMONO, Vol. 18, pp. 81-95). Springer.

Shahid, I., Malik, K. A., & Mehnaz, S. (2018). A decade of understanding secondary metabolism in *Pseudomonas* spp. for sustainable agriculture and pharmaceutical applications. *Environmental Sustainability*, 1, 3-17.

Sharma, V., Bhattacharyya, S., Kumar, R., Kumar, A., Ibañez, F., Wang, J., ... & Pandey, M. K. (2020). Molecular Basis of Root Nodule Symbiosis between *Bradyrhizobium* and ‘Crack-Entry’ Legume Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plants*. 9(2) 276.

Shehata, S. M., Abdel-Azem, H. S., Abou El-Yazied, A., & El-Gizawy, A. M. (2010). Interactive effect of mineral nitrogen and biofertilization on the growth, chemical composition and yield of celeriac plant. *European Journal of Scientific Research*, 47(2), 248-255.

Shen, P., Yue, Y., & Park, Y. (2018). A living model for obesity and aging research: *Caenorhabditis elegans*. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(5), 741-754.

Sheoran, N., Nadakkakath, A. V., Munjal, V., Kundu, A., Subaharan, K., Venugopal, V., ... & Kumar, A. (2015). Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemo-profiling of its antimicrobial volatile organic compounds. *Microbiological research*, 173, 66-78.

Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi journal of biological sciences*, 22(2), 123-131.

Shukla, P. S., Agarwal, P. K., & Jha, B. (2012). Improved salinity tolerance of *Arachis hypogaea* (L.) by the interaction of halotolerant plant-growth-promoting rhizobacteria. *Journal of plant growth regulation*, 31, 195-206.

Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210-3212.

Singh, M., Nara, U., Rani, N., & Jaswal, C. (2022). Genetic, genomic and biochemical insights of celery (*Apium graveolens* L.) in the era of molecular breeding. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 100420.

Singh, R. K., Singh, P., Li, H. B., Song, Q. Q., Guo, D. J., Solanki, M. K., ... & Li, Y. R. (2020). Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: a comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum* spp. *BMC Plant Biology*, 20, 1-21.

Sirichoat, A., Sankuntaw, N., Engchanil, C., Buppasiri, P., Faksri, K., Namwat, W., ... & Lulitanond, V. (2021). Comparison of different hypervariable regions of 16S rRNA for taxonomic profiling of vaginal microbiota using next-generation sequencing. *Archives of Microbiology*, 203, 1159-1166.

Skrypnik, L., Styran, T., Savina, T., & Golubkina, N. (2021). Effect of selenium application and growth stage at harvest on hydrophilic and lipophilic antioxidants in lamb's lettuce (*Valerianella locusta* L. Laterr.). *Plants*, 10(12), 2733.

Soares-Castro, P., Soares, F., & Santos, P. M. (2020). Current advances in the bacterial toolbox for the biotechnological production of monoterpene-based aroma compounds. *Molecules*, 26(1), 91.

Song, Y., Guan, Z., van Merkerk, R., Pramastya, H., Abdallah, I. I., Setroikromo, R., & Quax, W. J. (2020). Production of squalene in *Bacillus subtilis* by squalene synthase screening and metabolic engineering. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(15), 4447-4455.

Soper, F. M., Simon, C., & Jauss, V. (2021). Measuring nitrogen fixation by the acetylene reduction assay (ARA): is 3 the magic ratio?. *Biogeochemistry*, 152(2), 345-351.

Soto, M. J., López-Lara, I. M., Geiger, O., Romero-Puertas, M. C., & Van Dillewijn, P. (2021). Rhizobial volatiles: potential new players in the complex interkingdom signaling with legumes. *Frontiers in Plant Science*, 12, 698912.

Sridevi, M., & Mallaiah, K. V. (2009). Phosphate solubilization by *Rhizobium* strains. *Indian journal of microbiology*, 49, 98-102.

Stephenie, S., Chang, Y. P., Gnanasekaran, A., Esa, N. M., & Gnanaraj, C. (2020). An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *Journal of Functional Foods*, 68, 103917.

Straub, D., Blackwell, N., Langarica-Fuentes, A., Peltzer, A., Nahnsen, S., & Kleindienst, S. (2020). Interpretations of environmental microbial community studies are biased by the selected 16S rRNA (gene) amplicon sequencing pipeline. *Frontiers in Microbiology*, 11, 550420.

Suleman, M., Yasmin, S., Rasul, M., Yahya, M., Atta, B. M., & Mirza, M. S. (2018). Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *PloS one*, 13(9), e0204408.

Surco-Laos, F., Cabello, J., Gomez-Orte, E., Gonzalez-Manzano, S., Gonzalez-Paramas, A. M., Santos-Buelga, C., & Duenas, M. (2011). Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. *Food & function*, 2(8), 445-456.

Szymańska, S., Lis, M. I., Piernik, A., & Hryniewicz, K. (2022). *Pseudomonas stutzeri* and *Kushneria marisflavi* alleviate salinity stress-associated damages in barley, lettuce, and sunflower. *Frontiers in Microbiology*, 13, 788893.

Talebi Atouei, M., Pourbabaee, A. A., & Shorafa, M. (2019). Alleviation of salinity stress on some growth parameters of wheat by exopolysaccharide-producing bacteria. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 43, 2725-2733.

Tan, T. Y. C., Lim, X. Y., Norahmad, N. A., Chanthira Kumar, H., Teh, B. P., Lai, N. M., & Syed Mohamed, A. F. (2023). Neurological Applications of Celery (*Apium graveolens*): A Scoping Review. *Molecules*, 28(15), 5824.

Tang, L., Wang, B., Song, L., Yu, C., Lin, C., Gao, C., ... & Wang, A. (2023). RNAseq-based transcriptome analysis of lettuce infected by the necrotrophic fungus *Sclerotinia Sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 165(1), 85-96.

Tejera, N. L. C. M. M. G. J., Lluch, C., Martinez-Toledo, M. V., & Gonzalez-Lopez, J. (2005). Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and soil*, 270, 223-232.

Tilocca, B., Cao, A., & Migheli, Q. (2020). Scent of a killer: microbial volatilome and its role in the biological control of plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11, 509409.

Tiwari, S., Prasad, V., Chauhan, P. S., & Lata, C. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. *Frontiers in Plant Science*, 8, 283109.

Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S., & Molin, S. (2000). Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *Journal of bacteriology*, 182(22), 6482-6489.

Tóth et al. (2008) Updated Map of Salt Affected Soils in the European Union. In Tóth, G., Montanarella, L. and Rusco, E. (eds.) *Threats to Soil Quality in Europe*. EUR23438 – Scientific and Technical Research series Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities pp.61-74.

Tovi, N., Frenk, S., Hadar, Y., & Minz, D. (2019). Host specificity and spatial distribution preference of three *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology*, 9, 431510.

Tripathi, R. S. (2009). *Alkali land reclamation*. Mittal Publications.

Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature reviews microbiology*, 18(11), 607-621.

Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P. (2017). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in microbiology*, 25(4), 280-292.

Vaishnav, A., Jain, S., Kasotia, A., Kumari, S., Gaur, R. K., & Choudhary, D. K. (2013). Effect of nitric oxide signaling in bacterial-treated soybean plant under salt stress. *Archives of microbiology*, 195, 571-577.

Vaishnav, A., Kumari, S., Jain, S., Varma, A., & Choudhary, D. K. (2015). Putative bacterial volatile-mediated growth in soybean (*Glycine max* L. Merrill) and expression of induced proteins under salt stress. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 539-551.

Vaishnav, A., Kumari, S., Jain, S., Varma, A., Tuteja, N., & Choudhary, D. K. (2016a). PGPR-mediated expression of salt tolerance gene in soybean through volatiles under sodium nitroprusside. *Journal of basic microbiology*, 56(11), 1274-1288.

Vaishnav, A., Varma, A., Tuteja, N., & Choudhary, D. K. (2016b). PGPR-mediated amelioration of crops under salt stress. *Plant-microbe interaction: an approach to sustainable agriculture*, 205-226.

Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E., & Velazquez, E. (2006). *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(11), 2631-2637.

Velázquez, E., García-Fraile, P., Ramírez-Bahena, M. H., Rivas, R., & Martínez-Molina, E. (2017). Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. *Microbes for legume improvement*, 1-43.

Verdin, E., Marais, A., Wipf-Scheibel, C., Faure, C., Pelletier, B., David, P., ... & Candresse, T. (2018). Biological and genetic characterization of new and known necroviruses causing an emerging systemic necrosis disease of corn salad (*Valerianella locusta*) in France. *Phytopathology*, 108(8), 1002-1010.

Verma, V. C., Singh, S. K., & Prakash, S. (2011). Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of basic microbiology*, 51(5), 550-556.

Villa, R., Martorana, A. M., Okuda, S., Gourlay, L. J., Nardini, M., Sperandeo, P., ... & Polissi, A. (2013). The *Escherichia coli* Lpt transenvelope protein complex for lipopolysaccharide export is assembled via conserved structurally homologous domains. *Journal of bacteriology*, 195(5), 1100-1108.

Villalobos-Martín, F. J., Mateos, L., Quemada, M., Delgado, A., & Fereres-Castiel, E. (2017). El control de la salinidad. In: Villalobos-Martín, F. J., & Fereres-Castiel, E. (eds.), *Fitotecnia: principios de agronomía para una agricultura sostenible* (pp. 333-363). Ediciones Mundi-Prensa.

Vincent, J.M. (1970). A Manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria. Londres, Oxford: Blackwell Scientific.

- Vincente, A. R., Manganaris, G. A., Ortiz, C. M., Sozzi, G. O., & Crisosto, C. H. (2014). Nutritional quality of fruits and vegetables. In Florkowski, W. J., Shewfelt, R. L., Brueckner, B., & Prussia, S. E. (Eds.), *Postharvest handling* (3 ed., pp. 69-122). Academic press.
- Vogt, M., Brüsseler, C., van Ooyen, J., Bott, M., & Marienhagen, J. (2016). Production of 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol in engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic engineering*, 38, 436-445.
- Volpiano, C. G., Lisboa, B. B., São José, J. F. B., de Oliveira, A. M. R., Beneduzi, A., Passaglia, L. M. P., & Vargas, L. K. (2018). *Rhizobium* strains in the biological control of the phytopathogenic fungi *Sclerotium (Athelia) rolfsii* on the common bean. *Plant and Soil*, 432, 229-243.
- Voutsinos-Frantzis, O., Karavidas, I., Petropoulos, D., Zioviris, G., Fortis, D., Ntanasi, T., ... & Ntatsi, G. (2023). Effects of NaCl and CaCl₂ as eustress factors on growth, yield, and mineral composition of hydroponically grown *Valerianella locusta*. *Plants*, 12(7), 1454.
- Wang, H., Hu, D., Wang, Z., Yang, C., Zhu, S., Gu, C., & Wang, E. T. (2021a). *Paenibacillus glycinis* sp. nov., an Endophytic Bacterium Isolated from the Nodules of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr). *Current Microbiology*, 78, 1678-1685.
- Wang, J., Ding, Z., AL-Huqail, A. A., Hui, Y., He, Y., Reichman, S. M., ... & Abou-Zaid, E. A. (2022). Potassium source and biofertilizer influence K release and fruit yield of Mango (*Mangifera indica* L.): A three-year field study in sandy soils. *Sustainability*, 14(15), 9766.
- Wang, S., Fang, Y., Wang, Z., Zhang, S., Wang, L., Guo, Y., & Wang, X. (2021b). Improving L-threonine production in *Escherichia coli* by elimination of transporters ProP and ProVWX. *Microbial cell factories*, 20, 1-13.
- Wang, X., Preston III, J. F., & Romeo, T. (2004). The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 186(9), 2724-2734.
- Wang, Y. (2002). The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, 292(2), 396-401.
- Wang, Z., Lu, K., Liu, X., Zhu, Y., & Liu, C. (2023). Comparative functional genome analysis reveals the habitat adaptation and biocontrol characteristics of plant growth-promoting bacteria in NCBI databases. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e05007-22.

Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Brucoleri, R., ... & Medema, M. H. (2015). antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic acids research*, 43(W1), W237-W243.

Wiggins, G., Thomas, J., Rahmatallah, Y., Deen, C., Haynes, A., Degon, Z., ... & Mukherjee, A. (2022). Common gene expression patterns are observed in rice roots during associations with plant growth-promoting bacteria, *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. *Scientific Reports*, 12(1), 8827.

Williams, J. C., Sheldon, J. R., Imlay, H. D., Dutter, B. F., Draelos, M. M., Skaar, E. P., & Sulikowski, G. A. (2019). Synthesis of the siderophore coelichelin and its utility as a probe in the study of bacterial metal sensing and response. *Organic letters*, 21(3), 679-682.

Winand, R., Bogaerts, B., Hoffman, S., Lefevre, L., Delvoye, M., Van Braekel, J., ... & Vanneste, K. (2019). Targeting the 16s rRNA gene for bacterial identification in complex mixed samples: Comparative evaluation of second (illumina) and third (oxford nanopore technologies) generation sequencing technologies. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 298.

Wojciechowska, R., Długosz-Grochowska, O., Kołton, A., & Żupnik, M. (2015). Effects of LED supplemental lighting on yield and some quality parameters of lamb's lettuce grown in two winter cycles. *Scientia Horticulturae*, 187, 80-86.

World Integrated Trade Solution (22 de octubre de 2023). *Vegetables; celery (other than celeriac), fresh or chilled exports by country in 2018*. <https://wits.worldbank.org/trade/comtrade/en/country/ALL/year/2018/tradeflow/Exports/partner/WLD/product/070940#>

Xiao, Y., Zhang, L., Zhu, X., Qin, Y., Yu, C., Jiang, N., ... & Liu, Y. (2023). Luteolin promotes pathogen resistance in *Caenorhabditis elegans* via DAF-2/DAF-16 insulin-like signaling pathway. *International immunopharmacology*, 115, 109679.

Xie, X., Zhang, H., & Pare, P. (2009). Sustained growth promotion in *Arabidopsis* with long-term exposure to the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03). *Plant signaling & behavior*, 4(10), 948-953.

Xu, L., Pierroz, G., Wipf, H. M. L., Gao, C., Taylor, J. W., Lemaux, P. G., & Coleman-Derr, D. (2021). Holo-omics for deciphering plant-microbiome interactions. *Microbiome*, 9, 1-11.

Yahia, E. M., García-Solís, P., & Celis, M. E. M. (2019). Contribution of fruits and vegetables to human nutrition and health. In: Yahia, E. M. (ed.), *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables* (pp. 19-45). Woodhead Publishing.

- Yamamoto, R., Takahashi, E., Harada, M., Sawahata, I., & Nishizuka, M. (2024). Luteolin enhances oxidative stress tolerance via the *daf-16* pathway in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Food Science and Technology Research*, 30(2), 253-260.
- Yan, K., Dong, Y., Gong, Y., Zhu, Q., & Wang, Y. (2021). Climatic and edaphic factors affecting soil bacterial community biodiversity in different forests of China. *Catena*, 207, 105675.
- Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C., & Qin, W. (2015). Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International soil and water conservation Research*, 3(4), 316-323.
- Yang, N., Ding, R., & Liu, J. (2022). Synthesizing glycine betaine via choline oxidation pathway as an osmoprotectant strategy in *Haloferacales*. *Gene*, 847, 146886.
- Yao, L., Wu, Z., Zheng, Y., Kaleem, I., & Li, C. (2010a). Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. *European Journal of Soil Biology*, 46(1), 49-54.
- Yao, Y., & Ren, G. (2011). Effect of thermal treatment on phenolic composition and antioxidant activities of two celery cultivars. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 181-185.
- Yao, Y., Sang, W., Zhou, M., & Ren, G. (2010b). Phenolic composition and antioxidant activities of 11 celery cultivars. *Journal of food science*, 75(1), C9-C13.
- Yehuda, Z., Shenker, M., Romheld, V., Marschner, H., Hadar, Y., & Chen, Y. (1996). The role of ligand exchange in the uptake of iron from microbial siderophores by gramineous plants. *Plant Physiology*, 112(3), 1273-1280.
- Yepes-Molina, L., Bárzana, G., & Carvajal, M. (2020). Controversial regulation of gene expression and protein transduction of aquaporins under drought and salinity stress. *Plants*, 9(12), 1662.
- Yohannes, H. (2016). A review on relationship between climate change and agriculture. *Journal of Earth Science & Climatic Change*, 7(2).
- Young, J. P. W., Jorin, B., Moeskjær, S., & James, E. K. (2023). *Rhizobium brockwellii* sp. nov., *Rhizobium johnstonii* sp. nov. and *Rhizobium beringeri* sp. nov., three genospecies within the *Rhizobium leguminosarum* species complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(7), 005979.

Young, J. P. W., Moeskjær, S., Afonin, A., Rahi, P., Maluk, M., James, E. K., ... & Tian, C. F. (2021). Defining the *Rhizobium leguminosarum* species complex. *Genes*, 12(1), 111.

Yue, Z., Chen, Y., Wang, Y., Zheng, L., Zhang, Q., Liu, Y., ... & Sun, Z. (2022). Halotolerant *Bacillus altitudinis* WR10 improves salt tolerance in wheat via a multi-level mechanism. *Frontiers in Plant Science*, 13, 941388.

Yusnawan, E., Taufiq, A., Wijanarko, A., Susilowati, D. N., Praptana, R. H., Chandra-Hioe, M. V., ... & Inayati, A. (2021). Changes in volatile organic compounds from salt-tolerant *Trichoderma* and the biochemical response and growth performance in saline-stressed groundnut. *Sustainability*, 13(23), 13226.

Zaman, M., Shahid, S. A., Heng, L., Shahid, S. A., Zaman, M., & Heng, L. (2018). Soil salinity: Historical perspectives and a world overview of the problem. *Guideline for salinity assessment, mitigation and adaptation using nuclear and related techniques*, 43-53.

Zapata, P. J., Serrano, M., Pretel, M. T., Amorós, A., & Botella, M. Á. (2003). Changes in ethylene evolution and polyamine profiles of seedlings of nine cultivars of *Lactuca sativa* L. in response to salt stress during germination. *Plant Science*, 164(4), 557-563.

Zawoznik, M. S., Ameneiros, M., Benavides, M. P., Vázquez, S., & Groppa, M. D. (2011). Response to saline stress and aquaporin expression in *Azospirillum*-inoculated barley seedlings. *Applied microbiology and biotechnology*, 90, 1389-1397.

Zebec, Z., Wilkes, J., Jervis, A. J., Scrutton, N. S., Takano, E., & Breitling, R. (2016). Towards synthesis of monoterpenes and derivatives using synthetic biology. *Current opinion in chemical biology*, 34, 37-43.

Zerbino, D. R., & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), 821-829.

Zhang, C., & Kong, F. (2014). Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. *Applied soil ecology*, 82, 18-25.

Zhang, H., Kim, M. S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., ... & Paré, P. W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 226, 839-851.

Zhang, H., Kim, M. S., Sun, Y., Dowd, S. E., Shi, H., & Paré, P. W. (2008). Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HKT1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(6), 737-744.

- Zhang, H., Sun, Y., Xie, X., Kim, M. S., Dowd, S. E., & Paré, P. W. (2009). A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *The Plant Journal*, 58(4), 568-577.
- Zhang, J. J., Jing, X. Y., de Lajudie, P., Ma, C., He, P. X., Singh, R. P., ... & Wang, E. T. (2016). Association of white clover (*Trifolium repens* L.) with *rhizobia* of sv. *trifolii* belonging to three genomic species in alkaline soils in North and East China. *Plant and Soil*, 407, 417-427.
- Zhang, J., Singh, D., Guo, C., Shang, Y., & Peng, S. (2020). Rhizobia at extremes of acidity, alkalinity, salinity, and temperature. *Microbial Versatility in Varied Environments: Microbes in Sensitive Environments*, 51-65.
- Zhang, W. W., Chong, W. A. N. G., Rui, X. U. E., & Wang, L. J. (2019). Effects of salinity on the soil microbial community and soil fertility. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(6), 1360-1368.
- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, 61, 49-64.
- Zörb, C., Geilfus, C. M., & Dietz, K. J. (2019). Salinity and crop yield. *Plant biology*, 21, 31-38.
- Zouagui, R., Zouagui, H., Aurag, J., Ibrahimi, A., & Sbabou, L. (2024). Functional analysis and comparative genomics of *Rahnella perminowiae* S11P1 and *Variovorax* sp. S12S4, two plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Crocus sativus* L.(saffron) rhizosphere. *BMC genomics*, 25(1), 289.
- Zuluaga, M. Y. A., Monterisi, S., Rouphael, Y., Colla, G., Lucini, L., Cesco, S., & Pii, Y. (2023). Different vegetal protein hydrolysates distinctively alleviate salinity stress in vegetable crops: A case study on tomato and lettuce. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1077140.