



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE BIOLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS
**CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN BACTERIAS
-PLANTAS EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO**

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

PRESENTA:

REYNA KARINA ACAMETITLA CID

DIRECTOR (A): DALIA MOLINA ROMERO
CO-DIRECTORA: MARÍA DEL ROCÍO BUSTILLOS
CRISTALES

NOVIEMBRE 2024



DEDICATORIA

A Dios, por permitirme concluir esta importante etapa de mi vida y no abandonarme.

A mi mamita hermosa, por todos los sacrificios que ha hecho por mí, no solo durante la carrera sino durante toda mi vida, por ser mi guía y mi luz, por su amor y comprensión. A mi papi, por ser un hombre ejemplar, porque nunca me dejó sola, por apoyarme siempre a pesar de las adversidades y por todo su cariño.

A mi hermana Areli, por ser mi ejemplo a seguir y mi fuente de inspiración, por enseñarme a no rendirme. A mi pequeño hermano Ángel, por alegrarme en los momentos más difíciles.

Gracia a los cuatro, por esperarme y brindarme todo su apoyo, sin ustedes nada de esto podría ser posible, quiero que sientan que este trabajo no solo es mío, sino también de ustedes, gracias por ser mi fortaleza y sacar lo mejor de mí.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Dalia Molina, por todo el apoyo y comprensión a lo largo de la carrera y sobre todo en mi estancia en el laboratorio, por sus conocimientos y por ser un pilar fundamental en mi vida académica, porque sin usted este trabajo no podría haber sido posible.

A mi co-asesora, la Dra. María del Rocío Bustillos, por la confianza y ayuda que me brindó durante la realización de esta tesis.

A mis compañeros y amigos, Marco y Renata, por ayudarme y enseñarme durante el tiempo que estuvimos juntos en el laboratorio. Fueron los mejores maestros que pude haber tenido.

A mis amigas inseparables de toda la carrera, Vero y Tefi, por todo su cariño, por alentarme y nunca dejarme sola en los momentos difíciles, siempre van a tener un lugar especial en mi corazón.

A Ruby, Alejandro, Jorge, Armando, Tadeo y Vicente, porque fueron más que mis compañeros de laboratorio, se convirtieron en mis amigos, ustedes hicieron especial mi tiempo en el laboratorio, todos los días me sacaron una sonrisa, me ayudaron cada vez que lo necesitaba y me animaron siempre, los quiero muchísimo.

A José Madero y al grupo de K-pop BTS, porque sus canciones me acompañaron durante la realización de esta tesis.

Índice

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
Mecanismos directos	12
Mecanismos indirectos	14
MARCO TEÓRICO	14
Salinidad y mecanismos de las PGPR	14
Estrés oxidativo	16
Catalasa	17
Superóxido dismutasa	18
ANTECEDENTES	18
CARACTERÍSTICAS DEL MODELO VEGETAL (<i>Raphanus sativus</i> L.)	20
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
OBJETIVO GENERAL	22
Objetivos específicos	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Bacterias	23
Sobrevivencia a la salinidad	23
Desinfección y germinación de semillas	24
Condiciones de invernadero y riego	24
Preparación de los inóculos	25
Solución salina	25
Inoculación de bacterias	25
Cosecha y tomas de datos morfométricos	28
Evaluación de la actividad fotosintética de <i>Raphanus sativus</i> L.	28
Cuantificación de proteínas para la determinación de catalasa y superóxido dismutasa	29
Determinación de la actividad enzimática de la catalasa	30
Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa	31
Colonización bacteriana en la raíz de <i>Raphanus sativus</i> L.	32
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
RESULTADOS	33
Sobrevivencia a la salinidad	33

Promoción del crecimiento de las PGPR en <i>Raphanus sativus</i> L. en diferentes condiciones de estrés salino	34
Evaluación de la actividad fotosintética de <i>Raphanus sativus</i> L.	54
Evaluación de la actividad enzimática de la catalasa y la superóxido dismutasa en condiciones de estrés salino al 100mM de cloruro de sodio	61
Colonización bacteriana en la raíz de <i>Raphanus sativus</i> L.	63
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIÓN	69
PERSPECTIVAS	70
BIBLIOGRAFÍA	70

TABLA DE ABREVIATURAS

°C	Centígrados
μl	Microlitros
CO	Condiciones óptimas
CES-75	Condiciones de estrés salino a 75 mili molar
CES-100	Condiciones de estrés salino a 100 mili molar
mL	Mililitros
dSm-1	Decisiemens por metro
mM	Milimolar
PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
UFC	Unidades formadoras de colonias
HT-PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal halotolerantes
CAT	Catalasa
SOD	Superóxido dismutasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1-2	Promedio de las UFC/mL <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 - Promedio de las UFC/mL de <i>Pseudomonas</i> sp. EpiPf10	34
3	Peso fresco de las hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 75mM	35
4	Peso fresco de las hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 75mM	36
5	Longitud total de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 75mM	37
6	Longitud foliar de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 75mM	38
7	Número de hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 75mM	39
8	Longitud total de la raíz de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 75mM	40
9	Peso fresco de la raíz de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 75mM	41
10	Peso seco de la raíz de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 75mM	42
11	Diámetro del bulbo de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 75mM	43
12	Longitud del bulbo de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 75mM	44
13	Peso fresco de las hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 100 mM	45
14	Peso seco de las hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 100 mM	46
15	Longitud total de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 100 mM	47
16	Longitud foliar de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 100 mM	48
17	Número de hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 100 mM	49
18	Longitud total de la raíz de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 100 mM	50
19	Peso fresco de la raíz de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 100 mM	51
20	Peso seco de la raíz de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 100 mM	52
21	Diámetro del bulbo de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 100 mM	53
22	Longitud del bulbo de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas y de estrés salino a 100 mM	54

23	Contenido de la clorofila A evaluada en las hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas	55
24	Contenido de la clorofila B evaluada en las hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas	56
25	Contenido de la clorofila Total evaluada en las hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas	57
26	Contenido de la clorofila A evaluada en las hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones de estrés salino a 75 mM	58
27	Contenido de la clorofila B evaluada en las hojas de <i>Raphanus sativus</i> en condiciones de estrés salino a 75 Mm	58
28	Contenido de la clorofila Total evaluada en las hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones de estrés salino a 75 mM	59
29	Contenido de la clorofila A evaluada en las hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones de estrés salino a 100 mM	60
30	Contenido de la clorofila B evaluada en las hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones de estrés salino a 100 Mm	60
31	Contenido de la clorofila Total evaluada en las hojas de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones de estrés salino a 100 mM	61
32	Actividad enzimática de la catalasa evaluada en las hojas de <i>Raphanus</i> <i>sativus</i> L. en condiciones de estrés salino a 100 mM	62
33	Actividad enzimática de la superóxido dismutasa de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones de estrés salino a 100 mM	62
34	Colonización de las HT-PGPR en la raíz de <i>Raphanus sativus</i> L. en condiciones óptimas, de estrés salino a 75 y 100 mM.	64

RESUMEN

En las últimas décadas la agricultura se ha visto afectada por el uso indiscriminado de fertilizantes y pesticidas, así como otros factores, como las sequías, la sobreexplotación de los suelos, el aumento de la temperatura y la salinidad, por lo que encontrar soluciones a este problema es de vital importancia. Los métodos convencionales para recuperar suelos salinos son costosos, prolongados y pueden afectar a la biodiversidad; una de las alternativas es el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal halotolerantes (HT-PGPR).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la sobrevivencia de *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 en diferentes porcentajes de Cloruro de sodio (NaCl), y demostrar que la mono-inoculación y co-inoculación en *Raphanus sativus* L. promoverá el crecimiento vegetal en condiciones óptimas y en ambientes con 75 y 100 mM de NaCl.

Se encontró que ambas cepas sobreviven al 4% de NaCl a las 72 horas, manteniendo una alta población bacteriana (8.42 ± 0.59 Log UFC/mL).

La evaluación de los parámetros morfométricos de *R. sativus* en condiciones óptimas y bajo estrés salino a 75 mM mostró que la co-inoculación incrementó el peso fresco de las hojas, la longitud total, la longitud foliar, el diámetro del bulbo, el peso fresco y seco de la raíz. En condiciones de estrés salino a 75 mM la mono-inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 mostró un mayor número de hojas y un incremento en su peso fresco y seco y en la longitud del bulbo. Bajo estrés salino a 100 mM la mono-inoculación de ambas cepas mostró un mayor número de hojas, mayor diámetro y longitud del bulbo. La cepa *P. putida* KT2440 incrementó el crecimiento vegetal en ambas condiciones de estrés salino en comparación con las condiciones óptimas.

Se observó que en condiciones de estrés salino a 100 mM la co-inoculación en *R. sativus* L. incrementó la clorofila B y la actividad enzimática de la catalasa (3.07 ± 0.18 U/mg proteína). En esta misma condición la mono-inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 (8.36 ± 0.75 U/mg proteína) presentó la mayor actividad enzimática de superóxido dismutasa.

Estos resultados sugieren que las cepas *P. putida* KT240 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 pueden considerarse como posibles HT-PGPR, ya que promovieron el crecimiento y protegieron a *R. sativus* en ambientes salinos.

INTRODUCCIÓN

La salinización es un estrés ambiental abiótico importante que afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas (Zhao, 2021), convirtiéndose en un problema para los ecosistemas (Mishra *et al.*, 2021), y una amenaza creciente para la agricultura en todo el mundo (van Zelm, 2020). El proceso de la salinización implica la acumulación progresiva de sales de cloro, sodio y fosfatos en el suelo (Oliva *et al.*, 2023). Este fenómeno puede causar inhibición del crecimiento en raíces y aumentar la susceptibilidad de las plantas a la enfermedad de la pudrición de la raíz (Egamberdieva, *et al.*, 2015), así como cambios fisiológicos y bioquímicos en el metabolismo de las plantas (Lamz-Piedra & González-Cepero, 2013).

Se estima que actualmente alrededor de 62 millones de hectáreas, que es equivalente al 20% de la tierra irrigada del mundo está afectada por la salinidad (Egamberdieva *et al.*, 2019), que ha aumentado por los impactos nocivos del cambio climático acelerando su desarrollo, lo que podría extender el problema en un futuro cercano a las regiones que actualmente no se encuentra afectadas (Mukhopadhyay, 2021), también las actividades antropogénicas que conducen a la degradación de las tierras agrícolas han acelerado la tasa de salinización en las regiones áridas y semiáridas (Mishra *et al.*, 2021), al igual que el uso de fertilizantes sintéticos los cuales provocan contaminación, daños a la salud y pérdida de la fertilidad de los suelos (Moreno-Reséndez, *et al.*, 2018), todo esto se traduce en pérdidas significativas en la producción de cultivos agrícolas (Hernández, 2019) y pese a los recientes avances en biotecnología molecular y la biotecnología vegetal, proporcionar seguridad alimentara a una población mundial en aumento sigue siendo un desafío (Bashir *et al.*, 2019).

Existen métodos convencionales de recuperación de suelo salino que involucran raspado, lavado, lixiviación o adición de una enmienda (por ejemplo; yeso, CaCl_2 entre otros) tienen poco éxito, consumen mucho tiempo y causan la pérdida de la biodiversidad de las especies autóctonas de plantas y microorganismos (Egamberdieva *et al.*, 2019).

Ante este escenario, la biotecnología ambiental juega un papel importante para contrarrestar las múltiples afectaciones antropogénicas, al hacer uso de diversas

estrategias (Singh *et al.*, 2017). Destacando la actividad de las comunidades microbianas, componentes fundamentales de los ecosistemas, que desempeñan roles importantes en el metabolismo de la materia orgánica e intervienen en la degradación de una amplia gama de contaminantes (Brennerova *et al.*, 2009), desencadenan tolerancia sistémica inducida (IST) en las plantas, confieren protección contra el estrés abiótico (Fukami, *et al.*, 2018), y mejoran el crecimiento, desarrollo y rendimiento de las plantas (Kumar, *et al.*, 2023).

La rizosfera es la región del suelo con la mayor actividad microbiana, con una gran riqueza en nutrientes, donde planta y microorganismo interaccionan mutuamente para su beneficio (Esquivel-Cote *et al.*, 2013), por un lado, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR estimulan el crecimiento y regulan el metabolismo de la raíz (Sarabia *et al.*, 2010) y por otro lado los productos fotosintéticos de las plantas (aproximadamente del 5 al 30%) que son secretados por las raíces en forma de diferentes azúcares, son utilizados por las poblaciones microbianas (Glick, 2014).

Estudios reportan que las PGPR pueden alterar la fenología de las plantas (Lu, *et al.*, 2018), modificando caracteres morfológicos como la longitud, la biomasa, el número de hojas, entre otras (Senthil Kumar, *et al.*, 2018). También tienen un papel positivo al conferir tolerancia ante los factores estresantes abióticos como la salinidad, la sequía y el estrés por metales pesados (Gupta, *et al.*, 2002; Lim & Kim, 2013; Kim *et al.*, 2014), además suprimen el crecimiento de microbios patógenos y activan las respuestas de defensa de la planta contra los patógenos (Niu, *et al.*, 2011; Prasannakumar, *et al.*, 2015).

Dentro de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal exhibidos por las PGPR encontramos el reconocimiento de señales química y nutrientes de los exudados de las raíces, actividades antioxidantes, producción de biopelículas, motilidad bacteriana, también producen compuestos antimicrobianos, como antibióticos, compuestos orgánicos volátiles, enzimas líticas que les permiten restringir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (Santoyo, *et al.*, 2021), producción de la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACC), enzimas degradantes de la pared celular, cianuro de hidrógeno, resistencia

sistémica inducida (ISR), inhibición de *Quorum Sensing* y sideróforos (Balogh et al. 2010; Frampton et al. 2012).

Estos mecanismos de acción se dividen principalmente en dos tipos: directos e indirectos. Su principal diferencia es que los mecanismos indirectos ocurren fuera de la planta, mientras que los directos ocurren dentro de ella y afectan directamente a su metabolismo (Birch y Kamoun, 2000).

En este sentido, los mecanismos directos incluyen aquellos que afectan al equilibrio de los reguladores de crecimiento de la planta, ya sea porque los propios microorganismos liberan reguladores de crecimiento que se integran en la planta o porque los microorganismos actúan como sumidero de las hormonas liberadas por la planta (Govindasamay, et al., 2011; Glick, 2014) y los mecanismos indirectos requieren la participación de los procesos metabólicos defensivos de las plantas, que responden a la señal enviada por las bacterias que influyen en la planta (Ramos-Solano, et al., 2008; Jha, et al., 2012; Glick, 2014)

- **Mecanismos directos**

Fijación biológica del nitrógeno:

El nitrógeno es el componente principal de las moléculas biológicas, como las proteínas y los ácidos nucleicos, constituye hasta el 78% de la atmósfera, pero la mayoría de las células son incapaces de utilizar el nitrógeno molecular, y absorben este elemento eficazmente cuando se convierte en amoníaco o sales de amonio (Stokstad, 2016). Solo una pequeña fracción de bacterias y arqueas puede fijar el nitrógeno (Boyd y Peters, 2013).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno llevan a cabo este proceso a través de la enzima dinitrogenasa, convirtiendo el di-nitrógeno inerte (N_2) de la atmósfera en amonio, nitrógeno biodisponible (Zhang, et al., 2023).

Solubilización de fosfatos:

El fósforo desempeña un papel clave en el desarrollo de las raíces (Elhaisoufi, et al., 2020), y su crecimiento se ve limitado si no se proporciona de manera óptima desde el suelo o si no se adiciona en cantidades mínimas a los fertilizantes (Shenoy & Kalagudi, 2005).

Las bacterias solubilizadoras de fosfato (BFP) transforman el fósforo inorgánico precipitado en ortofosfatos solubles (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2022), a través de la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Richardson, 2001), provenientes del metabolismo de compuestos como carbohidratos, péptidos y lípidos; estos ácidos actúan como quelantes favoreciendo la formación de complejos insolubles con metales, con la consecuente liberación del fosfato (Beltrán, 2014).

Producción de fitohormonas:

Las fitohormonas son componentes de señalización de las plantas que constituyen una red de comunicación interconectada para ajustar el crecimiento y el desarrollo en respuesta a un entorno en constante cambio (Bittner, *et al.*, 2022), de acuerdo con su estructura química realizan diferentes funciones. Entre las principales fitohormonas utilizadas en el crecimiento vegetal se encuentran las auxinas, giberelinas y citoquininas (Alcántara-Cortés, *et al.*, 2019),

- Auxinas:

Las auxinas son hormonas vegetales que desempeñan un papel central en el control del crecimiento y desarrollo de las plantas, pueden regular la expresión génica a través de factores de transcripción específicos y proteínas que modulan las respuestas ambientales en la cascada de señalización (Gomes, *et al.*, 2021), por lo que se les considera multifuncionales, ya que las distintas células responden de forma diferente a los cambios en los niveles de auxina (Leyser, 2018).

- Giberelinas

Fitohormona que incrementa de forma significativa la altura de las plantas (Takehara, 2018), además modula varios procesos que incluyen la germinación, la ruptura de la latencia, la elongación del tallo y la floración (Van De Velde, *et al.*, 2017). Las giberelinas inducen la absorción de iones dentro de la planta, y mantienen su metabolismo en condiciones normales bajo niveles de estrés (Iqbal y Ashraf, 2013).

- Citoquininas

Desempeñan un papel importante actuando como molécula de señalización en la comunicación a larga distancia entre los órganos (Sakakibara, 2021). Inducen la

iniciación y elongación de las raíces, también pueden activar la senescencia de las hojas (Yong, *et al.*, 2009).

Las citoquininas se producen de manera abundante en la punta de la raíz y generalmente se transportan por el xilema vegetal hacia las partes aéreas de la planta (Bottini, *et al.*, 2004).

- **Mecanismos indirectos**

Sideróforos:

El hierro es un elemento importante para los seres vivos, juega un papel significativo en procesos metabólicos esenciales como: la síntesis y reparación de ácidos nucleicos, transporte fotosintético, reducción de nitratos, fijación de nitrógeno, entre otros (Liu, *et al.*, 2007; Narrillos-Rodríguez, 2014). Pese a que el hierro es abundante en la corteza terrestre, su biodisponibilidad es generalmente baja (Boyd & Ellwood, 2010; Emerson *et al.*, 2012), por lo que las bacterias adquieren este nutriente mediante la secreción de sideróforos (Kramer, *et al.*, 2020), estos actúan de manera específica como agentes quelantes para secuestrar hierro en presencia de otros metales y reducirlo a Fe^{2+} (Aguado-Santacruz, *et al.*, 2012).

Antibióticos:

Son sustancias químicas que inhiben el crecimiento (bacteriostáticos) o matan a las bacterias (bactericidas), son producidos por una variedad de organismos tales como bacterias y hongos (Vester & Douthwaite, 2001). Actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alteran la membrana citoplásmica o interfieren en algunos aspectos del metabolismo del ADN, también pueden inhibir la síntesis proteica (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

MARCO TEÓRICO

Salinidad y mecanismos de las PGPR

La salinidad del suelo prevalece principalmente en las zonas áridas y semiáridas del mundo, en donde las precipitaciones son insuficientes y la tasa de evapotranspiración es mayor, lo que conduce a condiciones de estrés hídrico (Zörb *et al.*, 2019), y por ende estos suelos son pobres en nutrientes, con poca actividad

bacteriana, biomasa y materia orgánica haciéndolos infértiles (Diacono y Montemurro, 2015).

Este fenómeno vuelve vulnerable a las plantas, ya que tienen que enfrentar el estrés osmótico, el desequilibrio iónico (Shetty *et al.*, 2019), que es causado por la acumulación de Na^+ y Cl^- en las células vegetales, durante este estrés osmótico se generan las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), se afecta el metabolismo del carbono y el nitrógeno, y se reduce la tasa de fotosíntesis (Kang *et al.*, 2019).

Se han adoptado una amplia gama de estrategias para contrarrestar este problema, y una de las nuevas alternativas efectivas es la aplicación (Zahra *et al.*, 2024) de las PGPR, en específico un subgrupo que son las bacterias conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal halotolerantes (HT-PGPR, por sus siglas en inglés) (Sunita, 2020), estas pueden sobrevivir en entornos contaminados por la salinidad y proporcionar protección a las plantas a través de mecanismos como la producción (Zahra *et al.*, 2024) de ácido indol-3-acético (AIA) (Hardoim *et al.*, 2008) y la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2020).

- **Ácido indol-3-acético (AIA)**

El ácido indol-3-acético (AIA) es la principal auxina natural de las plantas (Casanova-Sáez *et al.*, 2021), desempeña un papel importante en la interacción planta-microorganismo, ya que es esencial para la fisiología y correcto desarrollo morfológico de la planta (Ricaño-Rodríguez *et al.*, 2023). Funciona en múltiples procesos de desarrollo como la organogénesis, las respuestas trópicas (Zhou & Luo, 2018), también estimula la elongación celular al modificar condiciones en los organelos vegetales modificando el contenido osmótico de la célula, provocando un incremento en la permeabilidad de agua y por consiguiente disminuye la presión de la pared (Keswani *et al.*, 2020).

Entre las PGPR que se destacan por sintetizar AIA son *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Azospirillum* sp., *Enterobacter* sp., y *Serratia* sp. (Singh *et al.*, 2017; Singh Egamberdieva *et al.*, 2019). El AIA en bacterias se sintetiza a partir del

Triptófano o intermediarios, también a partir de las vías de indol-3-acetamida (IAM), la triptamina (TMP) y las vías de indol-3-piruvato. (Zhang *et al.*, 2019)

- **Ácido 1 – aminociclopropano-1-carboxílico (ACC desaminasa)**

La actividad de la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACC desaminasa) ha sido ampliamente reportada en algunas PGPR para promover el crecimiento de plantas influenciadas por el estrés ambiental, la cual les aporta dos ventajas importantes: disminuir las concentraciones de etileno en la planta e incrementar la disponibilidad de amonio en la rizosfera (Tank & Saraf, 2010). Al estar en un ambiente salino, las plantas incrementan su biosíntesis de etileno, lo que induce ciertos cambios característicos en la planta, como detener la elongación de la raíz e inducir la producción y elongación de raíces adventicias, acelerar la senescencia de flores, promover la abscisión de flores y frutos, finalmente, provoca la muerte de la planta (Des Marais & Juenger, 2010).

La ACC desaminasa puede detener la senescencia celular y favorece el desarrollo de la planta para incrementar la disponibilidad de nutrientes, regulando los niveles de etileno mediante la transformación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) en α -cetobutirato y amonio, metabolitos precursores para la síntesis de auxinas (fitohormonas) (Willey & Woolverton 2013).

La producción de la enzima ACC desaminasa dependen de la expresión del gen *acdS* identificado en múltiples especies bacterianas tipo PGPR, dentro de estas PGPR está el género *Pseudomonas* (Fan *et al.*, 2018), en donde se ha identificado la presencia y expresión de este gen, específicamente en especies como *P. putida* y *Pseudomonas fluorescens* (Belimov *et al.*, 2001).

Estrés oxidativo

El estrés abiótico producido por el cambio climático da lugar a cambios a nivel fisiológico y molecular que afectan el desarrollo y crecimiento de la planta (Nadarajah, 2020), altera la adquisición de nutrientes, puede modificar las vías de señalización, la expresión de proteínas, entre otros, causando una reducción grave en la productividad de los cultivos (Wang *et al.*, 2016; Zhu, 2016). La salinidad, así

como otros tipos de estrés ambiental, ya sea de forma individual o en combinación, generan cantidades excesivas de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hasanuzzaman *et al.*, 2020), entre las que destacan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$) y el ión super oxido ($\text{O}_2^\cdot$) (Thorpe *et al.*, 2013), estos provocan daño celular, por lo que las plantas han desarrollado mecanismos para contralar su producción y eliminarlas a través de procesos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Nadarajah, 2020).

Un equilibrio entre la generación de ROS y el sistema de defensa antioxidante que protege la maquinaria fotosintética, mantiene la integridad de la membrana y previene el daño a los ácidos nucleicos y las proteínas (Hasanuzzaman *et al.*, 2020). El cambio en la actividad antioxidante enzimática, funciona coordinando numerosas enzimas como la Catalasa (CAT) y la Superóxido dismutasa (SOD), ya que reducen a las ROS para disminuir su concentración (Lang *et al.*, 2020; Cui *et al.*, 2021).

- **Catalasa (CAT)**

El H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) es una molécula de señalización importante que interviene en el desarrollo de las plantas y en las respuestas ambientales (Mhamdi *et al.*, 2010), H_2O_2 en ambientes abióticos a temperatura ambiente y pH neutro es estable (Mahaseth & Kuzminov, 2017), sin embargo, en condiciones ambientales adversas, su biosíntesis se intensifica, aumentando sus niveles y oxidando a las proteínas, lípidos de la membrana y ácidos nucleicos (Singh *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2019; Javed & Athar, 2021). La eliminación de H_2O_2 debe ser rápida y eficiente, se han identificado a tres familias de proteínas capaces de catalizar esta dismutación a velocidades razonables, dos de las familias de proteínas son enzimas hemo: catalasas típicas (en plantas y animales) y catalasas-peroxidasas, y un tercer grupo conocido como catalasas de manganeso (no hemo), los tres difieren en su arquitectura general y en el mecanismo de reacción (Zamocky *et al.*, 2008).

La Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) es una enzima oxidorreductasa esencial en el sistema antioxidante de las plantas (Arora *et al.*, 2002), desempeña un papel crítico en la protección de las células contra los efectos tóxicos del H_2O_2 (Goyal & Basak, 2010). La CAT actúa reduciendo el H_2O_2 en agua y oxígeno para prevenir el daño celular causado por este (Pan *et al.*, 2022).

- **Superóxido dismutasa (SOD)**

Al igual que la CAT la superóxido dismutasa (SOD) desempeña un papel en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno causadas por estreses ambientales (Shiraya *et al.*, 2015), o durante la actividad metabólica celular normal de las plantas (Wang *et al.*, 2016).

Es una familia de genes cuyos productos enzimáticos son capaces de dismutar activamente los radicales superóxido (O_2^-) en diferentes orgánulos de las plantas (Hossain *et al.*, 2015; Elshafei, 2020), principalmente en el cloroplasto (Asada, 2006). Se han registrado tres tipos de SOD que contienen Manganeseo (Mn), Hierro (Fe) o Cobre (Cu) (Fridovich, 1975).

La SOD (EC 1.15.1.1) es la primera enzima en el proceso de desintoxicación, convierte los radicales superóxido (O_2^-) en H_2O_2 (Sakhno & Slyvets, 2014), el cual puede degradarse más fácilmente por antioxidantes, como la CAT (Groß *et al.*, 2013).

ANTECEDENTES

Pseudomonas es uno de los géneros bacterianos más estudiados y de mayor aplicación biotecnológica (Mező *et al.*, 2022), es un factor de patogenicidad significativo en humanos (Mielko *et al.*, 2019), y por otro lado, al estar en ambientes contaminados también se utilizan en la biorremediación (Medić & Karadžić *et al.*, 2022).

Especies como *Pseudomonas aeruginosa* (patógena en humanos) y *Pseudomonas syringae* (patógena en plantas) y otras como *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* (benéficas para las plantas) se han utilizado como agentes de biorremediación para suelos contaminados (Sitaraman, 2015).

P. putida posee una cápsula compuesta de exopolisacáridos que facilita la adhesión celular, la formación de biopelículas y protege a las bacterias de la fagocitosis o los radicales libres formados en la potabilización del agua, aumentando así su adaptación a condiciones estresantes (Salazar & Blanco, 2004; Willey & Woolverton 2013).

En el estudio realizado por Pastor y colaboradores (2016) encontraron que la inoculación de *Pseudomonas putida* cepa PC12 en semillas de tomate, las plantas inoculadas aumentaron la resistencia a la pudrición de la raíz causada por *Fusarium oxysporum*, sugiriendo que el ácido salicílico y el ácido jasmónico producidos por *Pseudomonas putida* cepa PC12 desempeñaron un papel en el desencadenamiento de una resistencia sistémica inducida (ISR), también la interacción bacteria-planta aumentó los pesos secos de los brotes y las raíces en las plantas inoculadas. (Pastor *et al.*, 2016)

Nascimento y colaboradores (2021) describieron que la inoculación de *Pseudomonas thivervalensis* SC5 promovió el crecimiento de las plantas de pepino, así como le confirió resistencia a la planta ante el estrés salino (100 mM/L NaCl), también limitó el crecimiento *in vitro* de los patógenos *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas syringae*. Además, revelaron que el genoma de esta bacteria contiene elementos genéticos involucrados en la tolerancia al estrés osmótico, modulación de hormonas vegetales y rasgos de antagonista de fitopatógenos bacterianos y fúngicos. (Nascimento *et al.*, 2021)

Gupta y colaboradores (2023), demostraron que las cepas *Pantoea agglomerans* R1 y *Pseudomonas fragi* R4 en mono-inoculación y en consorcio modularon significativamente la morfología del sistema radicular, también hubo un aumento de la longitud, la biomasa fresca y seca de las raíces y brotes de las plantas de frijol francés en condiciones de estrés salino (Gupta *et al.*, 2023).

Molina-Romero y colaboradores (2017) encontraron que la inoculación en consorcio de las bacterias *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* OF178, *Acinetobacter* EMMS02 y *A. brasilense* Sp7 proporcionó mayores beneficios al crecimiento de las plantas del maíz azul aumentando el peso seco de los brotes y las raíces, también la altura y el diámetro de las plantas en comparación con los tratamientos en mono-inoculación y los que no fueron inoculados (Molina-Romero *et al.*, 2017).

Sarker y colaboradores (2023) utilizaron cepas aisladas de regiones propensas a la salinidad en inoculantes individuales y en consorcio, promovieron el crecimiento y el rendimiento del arroz, también hubo una retención de clorofila significativamente mayor (Sarker *et al.*, 2023).

Egamberdieva y colaboradores (2015) utilizaron cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, mejoraron la germinación de las semillas, hubo un incremento significativo en el crecimiento de brotes y raíces, así como en el peso de la materia seca de las plantas de algodón, así mismo, hubo una reducción en la enfermedad causada por *Fusarium solani* (Egamberdieva *et al.*, 2015)

CARACTERISTICAS DEL MODELO VEGETAL (*Raphanus sativus* L.)

El rábano (*Raphanus sativus* L.) es un cultivo de interés económico que pertenece a la familia Brassicaceae, que incluye el repollo, la col rizada y el brócoli (Seo *et al.*, 2018), se caracteriza por hipocótilos grandes y raíces pivotantes, es cultivada y consumida principalmente por las raíces y las hojas, las cuales presentan un alto valor nutricional (Hara *et al.*, 2011; Banihani, 2017).

Es originario de Europa y Asia, se caracteriza por crecer en climas templados a altitudes entre los 900 y 1240 m (Gutiérrez & Perez, 2004), y por ser una especie de rápido crecimiento (Ramírez-Pisco & Pérez-Arena, 2006)

- Aporte nutricional

Tradicionalmente se ha sabido que tiene beneficios antiinflamatorios, promueve la digestión, protege el estómago y anticancerígenos (Oh *et al.*, 2019). Las raíces de rábano se cosechan y consumen comúnmente como verduras (Sciarappa *et al.*, 2016). Se considera un alimento rico en nutrientes, contiene carbohidratos, azúcares, fibras dietéticas, proteínas e incluso algo de grasa y flúor, además de diversas vitaminas hidrosolubles (B 1, B 2, B 3, B 5, B 6, B 9 y C), minerales (calcio, hierro, magnesio, manganeso, zinc, potasio y fósforo) (Khattak, 2011) y ácido fólico, también es una fuente de compuestos bioactivos como los compuestos fenólico y glucosinolatos (Pérez-Balibrea *et al.*, 2008). El glucosinolato predominante es la

glucorafanina, cuyo producto de hidrólisis es el sulforafano que posee propiedades anticancerígenas (Papi, et al., 2008).

Dentro de los fenoles se pueden encontrar al ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico y el ácido isosinápico (Li et al., 2018).

- Cultivo

El cultivo de *R. sativus* L. se da primordialmente en estaciones de frío, obteniendo una mejor calidad de raíces a una temperatura de 10 a 15.5 °C, sin embargo, también se puede cultivar a temperaturas altas (Ghimire et al., 2020), esto varía su ciclo de cultivo, pudiendo ser desde los 20 a más de 70 días (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2020).

Se puede adaptar a cualquier tipo de suelo, sin embargo, prefiere los suelos profundos, sueltos, con un buen drenaje, pero con un alto contenido de materia orgánica y capaz de retener la humedad (Hernández-Villaseñor, 2024)

- Importancia económica

En México la producción anual de rábano es de más de 64,000 toneladas, destacan los estados de Puebla, Baja California y Jalisco como líderes en la materia. En conjunto aportan el 88 por ciento, lo que equivale a 57, 000 toneladas (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2017).

En 2017, México exportó a Estados Unidos 37 mil toneladas de esta hortaliza, lo que generó un ingreso de 14 millones 488 mil dólares al país (Infoagro, 2018)

JUSTIFICACIÓN

La salinidad es un problema de escala global que ha ido en aumento por las actividades antropogénicas y el uso indebido de fertilizantes, afectando en gran cantidad a los suelos utilizados en la industria agrícola y por ende a los cultivos, provocando enfermedades en la raíz, una inhibición en su crecimiento, entre otros. Al mismo tiempo el aumento de las poblaciones en todo el mundo ha causado una mayor demanda alimenticia, por lo que se ha practicado la agricultura intensiva en consecuencia se ha aumentado el uso de fertilizantes químicos así como el estrés por salinidad, que representa un problema de escala mundial. Actualmente se están

implementando distintas estrategias para poder sobrellevar esta dificultad, entre ellas destaca el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR), estas ayudan a combatir los efectos de la salinidad en los suelos (Halo-bacterias promotoras de crecimiento vegetal) y también aumentan la productividad de las plantas de importancia agronómica.

HIPÓTESIS

- La inoculación de las cepas halotolerantes *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10, en el cultivo de *Raphanus sativus* L., incrementarán el crecimiento de la hortaliza. Además, la inoculación de *Raphanus sativus* con las cepas halotolerantes aumentaran la tolerancia y la supervivencia al estrés salino de la planta.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿La inoculación de bacterias halotolerantes en mono-inoculación y co-inoculación promoverán el crecimiento de *Raphanus sativus* L.?
- ¿La mono-inoculación y co-inoculación protegerán a *Raphanus sativus* L. del estrés generado por diferentes concentraciones Cloruro de sodio?
- ¿Habrá alguna característica metabólica vegetal que afirme la protección al estrés salino en *Raphanus sativus* L.?

OBJETIVO GENERAL

Evidenciar si la inoculación de las bacterias halotolerantes en *Raphanus sativus* L. es benéfica.

Objetivos específicos

- Demostrar si la inoculación de bacterias halotolerantes en mono-inoculación y co-inoculación promueven el crecimiento vegetal de *Raphanus sativus* L.
- Documentar si la inoculación de bacterias halotolerantes en mono-inoculación y co-inoculación protegen del estrés salino a *Raphanus sativus* L.

- Mostrar algún cambio metabólico en *Raphanus sativus* L. que sustente la protección contra el estrés salino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias

Las cepas bacterianas fueron proporcionadas por el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana en el Instituto de Ciencias Microbiológicas ICUAP-BUAP. Cada una de las cepas fueron reactivadas y cultivadas de acuerdo a su medio selectivo, *Pseudomonas putida* KT2440 en Citrato de Simmons (CM) y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 en agar Glicerol-Peptona (GP), la cual fue aislada de la cactácea *Pseudo mitrocereus fulviceps* en la Reserva de la Biosfera de Tehuacán - Cuicatlán.

Fórmula del medio GP para un litro de medio:

Peptona: 10g

Glicerol: 10mL

Agar: 16g

Sobrevivencia a salinidad

Las cepas fueron resembradas en su medio selectivo (MS) mediante la técnica de sembrado en estría cruzada, posterior a su crecimiento se tomó una colonia aislada y se sembró en MS líquido en tubos de 15 mL con 8 mL del MS, al cual se le consideró como el pre – inóculo.

Del pre – inóculo se tomó 1mL y se midió la Densidad Óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro de luz visible, se calculó el volumen del pre-cultivo para inocular con una DO de 0.02. El cultivo se estableció en tubos de 50 mL con 15 mL del medio LB, se establecieron los siguientes tratamientos: *Pseudomonas* sp. EpiPf10 con una concentración de 1% (0.86mM), 2% (1.7mM) y 4% (3.4mM) de NaCl y *Pseudomonas putida* KT2440 con una concentración de 1% (0.86mM), 2% (1.7mM) y 4% (3.4mM) de NaCl.

Los tubos fueron incubados a una temperatura de 30°C en una agitadora orbital a 140 revoluciones por minuto (rpm) durante 72 horas.

Para valorar la resistencia de la cepa ante la presencia de NaCl en distintas concentraciones se aplicó la metodología de Goteo por Sellado en Placa Masiva (GSPM) descrita por Corral-Lugo and *et al.*, 2012, a las 0, 24, 48 y 72 horas para determinar la población bacteriana. Se utilizaron los MS destinados para cada cepa.

Desinfección y germinación de semillas.

Las semillas se lavaron con agua común para eliminar los productos agroquímicos que protegen a la semilla certificada, posteriormente se lavaron 10 veces con agua destilada y se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1.5% durante 3 minutos, posteriormente las semillas se lavaron aproximadamente 10 veces con agua destilada estéril, o hasta no percibir el olor a hipoclorito de sodio, de manera inmediata se sumergieron en alcohol al 70% durante 3 minutos, finalmente se lavaron con agua destilada estéril 10 veces o hasta eliminar el olor a alcohol.

Finalmente, las semillas desinfectadas se traspasaron a una placa Petri con agar agua y papel filtro (estéril), las cajas Petri se sellaron con cinta adhesiva y se dejaron en un cuarto con limitación de luz hasta la emergencia radicular de las semillas (Modificado de Molina-Romero *et al.*, 2017).

Los procesos anteriormente descritos se realizaron en un ambiente estéril con mecheros Bunsen.

Condiciones de invernadero y riego

Una vez emergida la parte radicular de las semillas se traspasaron a bolsas negras para vivero de 15 x 25 cm (esterilizadas con luz UV) con turba estéril, en cada bolsa se sembraron dos semillas y después de 10 días se eliminó la que tenía un menor tamaño para evitar que compitieran por nutrientes.

Las bolsas fueron colocadas en condiciones de invernadero, en donde solo recibían luz solar por las tardes, por un máximo de 4 horas diarias, con una temperatura mínima de 8°C y una máxima de 27°C.

El riego se realizó dos veces al día (mañana y noche) con agua estéril mediante aspersión hasta que la plántula alcanzo una altura de 5 cm, posterior a esto se comenzó con un riego mediante goteo dos veces al día (mañana y noche) hasta su

cosecha, no se utilizó ningún tipo de solución nutritiva. Se mantuvo la turba húmeda y se evitó que hubiese encharcamiento.

Preparación de los inóculos.

Los inóculos se prepararon de manera individual. Las cepas seleccionadas se sembraron en su medio selectivo por la técnica de sembrado masivo. El crecimiento celular de cada una de las cepas bacterianas se colectó en botellas de vidrio (400 mL) con 50 mL de agua destilada estéril. La co-inoculación se preparó con 50% de cada uno de los inóculos individuales en un volumen total de 50 mL.

Para determinar el número de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se realizó el método de goteo en placa (drope plate), este se fundamenta en realizar diluciones decimales seriadas con un volumen final de 1mL; se toman 100 µl de los inóculos y 900 µl del diluyente Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 10 mM.

Solución salina.

Se preparó una Solución Salina de Cloruro de Sodio (NaCl) al 75 mM para el experimento de estrés salino (segundo experimento) y se preparó una solución de NaCl al 100 mM para una segunda condición de estrés (tercer experimento). Para la Sol. Salina de 75 mM se pesaron 3.5 g de Cloruro de Sodio (NaCl) y se diluyeron en 800 mL de agua destilada, la Sol. Salina se esterilizo en autoclave a 15 libras por 20 minutos, para la Sol. Salina de 100 mM se utilizaron 4.7g de NaCl y se diluyeron en 800 mL de agua destilada, la Sol. Salina se esterilizó en autoclave a 15 libras por 20 minutos.

La solución fue preparada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$g = (M) (V) (PM)$$

En donde: g= Gramos

M= Moles

PM= Peso Molecular

V= Volumen

Inoculación de bacterias.

- **Primer experimento (Condiciones óptimas)**

A los 20 días posteriores del traspaso de la plántula a las bolsas de vivero, se inoculó por primera vez a las plantas con 500 µl del inóculo, esto se hizo cercano al tallo de la planta y sobre la turba estéril. Las plantas fueron inoculadas de acuerdo con los tratamientos establecidos a continuación:

Tratamiento	Tipo de inóculo	UFC/mL
Grupo control (CT)	Sin inóculo	Sin presencia
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (KT)	Mono-inoculación	2.4×10^7
<i>Pseudomonas</i> sp. EpiPf10 (E.10)	Mono-inoculación	6×10^5
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> sp. EpiPf 10 (KT – E.10)	Co-inoculación	7.43×10^6

A los 20 días después de la primera inoculación se inoculó una segunda ocasión con 500 µl del inóculo de acuerdo con su tratamiento previamente establecido. Para esta inoculación se tuvieron las siguientes poblaciones bacterianas:

Tratamiento	Tipo de inóculo	UFC/mL
Grupo control (CT)	Sin inóculo	Sin presencia
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (KT)	Mono-inoculación	8.5×10^7
<i>Pseudomonas</i> sp. EpiPf10 (E.10)	Mono-inoculación	1.5×10^7
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> sp. EpiPf10 (KT – E.10)	Co-inoculación	5.03×10^7

Las plantas fueron extraídas del sustrato, lavadas, desinfectadas y separadas para determinar los parámetros morfométricos. En este primer experimento no se agregó Sol. Salina a ninguna de las plantas de los tratamientos establecidos

- **Segundo experimento (Concentración salina a 75 mM)**

A los 20 días posteriores del traspaso de las plántulas a las bolsas de vivero, se inoculó por primera vez a las plantas con 500 µl del inóculo, próximo al tallo de la planta y sobre la turba. Pasadas 24 horas, se añadieron 10 mL de la Sol. salina a 75mM sobre la turba en cada una de las plantas de los tratamientos establecidos en el experimento. La Sol. salina se añadió tres veces a la semana hasta un día antes de la cosecha. Las plantas fueron inoculadas de acuerdo con los tratamientos establecidos a continuación:

Tratamiento	Tipo de inóculo	UFC/mL
Grupo control (CT)	Sin inóculo	Sin presencia
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (KT)	Mono-inoculación	9×10^5
<i>Pseudomonas</i> sp. EpiPf10 (E.10)	Mono-inoculación	1.1×10^6
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> sp. EpiPf10 (KT – E.10)	Co-inoculación	1×10^6

Se realizó una segunda inoculación (500 µl), 20 días después de la primera. Para esta inoculación se tuvieron las siguientes poblaciones bacterianas:

Tratamiento	Tipo de inóculo	UFC/mL
Grupo control (CT)	Sin inóculo	Sin presencia
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (KT)	Mono-inoculación	1×10^6
<i>Pseudomonas</i> sp. EpiPf10 (E.10)	Mono-inoculación	1.15×10^7
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> sp. EpiPf10 (KT – E.10)	Co-inoculación	6.25×10^6

Las plantas fueron extraídas del sustrato, lavadas, desinfectadas y separadas para determinar los parámetros morfométricos.

Tercer experimento (Concentración salina a 100 mM)

A los 20 días posteriores del traspaso de las plántulas a las bolsas de vivero, se inoculó por primera vez a las plantas con 500 µl del inóculo, próximo al tallo de la planta y sobre la turba. Transcurridas las 24 horas, se añadieron 10 mL de la Sol. Salina al 100 mM sobre la turba en cada una de las plantas de los tratamientos establecidos en el experimento. La Sol. Salina se añadió tres veces a la semana hasta un día antes de la cosecha. Las plantas fueron inoculadas de acuerdo con los tratamientos establecidos a continuación:

Tratamiento	Tipo de inóculo	UFC/mL
Grupo control (CT)	Sin inóculo	Sin presencia
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (KT)	Mono-inoculación	1.7×10^7
<i>Pseudomonas</i> sp. EpiPf10 (E.10)	Mono-inoculación	6.5×10^6
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> sp. EpiPf10 (KT – E.10)	Co-inoculación	1.18×10^7

Se realizó una segunda inoculación (500 µl), 20 días después de la primera. Para esta inoculación se tuvieron las siguientes poblaciones bacterianas:

Tratamiento	Tipo de inóculo	UFC/mL
Grupo control (CT)	Sin inóculo	Sin presencia
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (KT)	Mono-inoculación	1.45×10^7
<i>Pseudomonas</i> sp. EpiPf10 (E.10)	Mono-inoculación	3.5×10^5
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> sp. EpiPf10 (KT – E.10)	Co-inoculación	7.4×10^6

Las plantas fueron extraídas del sustrato, lavadas y separadas para determinar los parámetros morfométricos.

Cosecha y toma de datos morfométricos.

Las plantas de *R. sativus* L. se cosecharon 60 días después del traspaso a las bolsas negra para vivero.

Para evaluar la biomasa fresca y seca de la parte aérea y de la raíz, las plantas de *R. sativus* L. fueron retiradas de la bolsa negra para vivero cuidadosamente, la raíz se sumergió en un recipiente con agua para quitar el exceso de turba y con una balanza analítica portátil se determinó el peso tanto de la parte aérea como de la raíz. Para obtener el peso fresco de la parte aérea y la raíz, éstas se colocaron en sobres de papel (cada parte en un sobre diferente) y se llevaron a un horno de secado a una temperatura de 75°C por 120 h, esto hasta obtener un peso constante. Se contabilizó el número de hojas presentes en cada planta, para evaluar la longitud foliar, la longitud total de la planta y la longitud total de la raíz se utilizó una regla y para el diámetro y longitud del bulbo se utilizó un Vernier electrónico.

- Evaluación de la actividad fotosintética de *R. sativus* L.

Para determinar los pigmentos fotosintéticos presentes en *R. sativus* L. (Clorofila A, B y Total) se siguió la metodología propuesta por Hiscox e Israelstam, 1979. Se seleccionaron de manera aleatoria cinco plantas de cada tratamiento.

Se pesaron 0.5g de la muestra (hojas) y se cortó de manera fina para macerarla en un mortero con 5 mL de acetona al 80% hasta extraer la mayor cantidad de pigmento de la muestra, posteriormente la muestra se coloca en tubos de ensayo y se separó

el sobrenadante, cada tubo con el sobrenadante se ajustó a 6 mL con acetona al 80%, de esta muestra se toman 0.5 mL del y se ajustó a 5 mL con acetona al 80%. En un espectrofotómetro se midió la Densidad Óptica (DO) a las longitudes de onda 645 y 663 nm, para determinar la concentración de los pigmentos se empleó la siguiente ecuación, descrita por Ali *et al*, 2022.

$$\text{Clorofila A} = (12.7 \times \text{Abs. 663}) - (2.49 \times \text{Abs. 645})$$

$$\text{Clorofila B} = (12.9 \times \text{Abs. 645}) - (4.7 \times \text{Abs. 663})$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

La cuantificación de clorofila se realizó para las plantas de *R. sativus* L. de los tres experimentos anteriormente descritos.

- Cuantificación de proteínas para la determinación de Catalasa y Superóxido dismutasa

Para cuantificar a las proteínas de *R. sativus* L. se utilizó el método descrito por Lowry, 1951. Se seleccionaron de manera aleatoria cinco plantas de cada tratamiento.

Se pesaron 0.5g de la muestra (hojas), se cortó de manera fina y se macero en un mortero con 5 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ estéril, se tomó un 1 mL de la muestra macerada y se colocó en un tubo de 1.5 mL que se llevó a centrifugar durante 3 minutos a 12 000 rpm.

En un tubo de 1.5 mL se agregaron 190 μL de agua destilada y se añadieron 10 μL de la muestra centrifugada, posteriormente se añadió 1 mL de la solución reactiva (Sol. A; Na_2CO_3 2% y NaOH 0.1N, Sol. B: Tartrato de NaK 2% y Sol. C: CuSO_4), se mezcló con un vórtex y se dejó reposar por 10 minutos.

Pasados los 10 minutos se agregó 100 μL de reactivo Folin y se dejó reposar por 30 minutos. La solución se mezcló con ayuda de un vórtex e inmediatamente se transfirió a una celda de cuarzo. La DO se leyó a una longitud de onda de 625 nm. Al mismo tiempo se corrió una curva de calibración usando albúmina sérica 2 mg/mL. Esta se hizo de acuerdo a las siguientes concentraciones:

Albúmina (μL)	Agua destilada (μL)	Concentración de albúmina $\mu\text{g/mL}$
0	200	0
2	198	4
4	196	8
8	192	16
16	184	32
32	168	64

Se añadió 1 mL de la solución reactiva, se mezcló con un vórtex y se dejó reposar por 10 minutos, posteriormente se agregó el reactivo Folin y se dejó reposar por 30 minutos, finalmente a solución se mezcló con un vórtex e inmediatamente se transfirió a una celda de cuarzo. La DO se midió a una longitud de onda de 625 nm.

- **Determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT)**

Para determinar la actividad de la enzima CAT se siguió el método descrito por Aebi, 1984. Se seleccionaron de manera aleatoria cinco plantas de cada tratamiento.

Se pesaron 0.5g de la muestra (hojas), se cortó de manera fina y se macero en un mortero (sometido a refrigeración durante 24 h) con 5 mL de tampón fosfato frío, el homogenizado se centrifugo a 14 700 rpm durante 10 min a 4°C, se recogió el sobrenadante. El espectrofotómetro se configuro a 240nm y se calibró con una mezcla de 2 mL de tampón fosfato y 1 mL de peróxido de hidrogeno a 30 mM en una cubeta de cuarzo de 3 mL (blanco).

Para el ensayo con las muestras, en una cubeta de cuarzo de 3 mL se agregó un 1 mL de buffer fosfato, 1 mL de la muestra y de manera inmediata la cubeta de cuarzo se colocó en el espectrofotómetro para añadir 1 mL de peróxido de hidrógeno a 30 mM, se inició con la toma de datos (estas cantidades fueron cambiando de acuerdo con la muestra que se utilizó). La DO se leyó durante 3 min en periodos de 30 seg (la DO inicial debe ser aproximadamente de 0.500 – 0.520, si es necesario agragr PB para disminuirla o agregar H_2O_2 para aumentarla).

La actividad de la CAT se calculó con la siguiente fórmula:

$$U/\text{mg} = (A_0 - A_{180}) \times V_t / \epsilon_{240} \times d \times V_s \times C_t \times 0.001$$

En donde: $(A_0 - A_{180})$ es la diferencia entre la absorbancia inicial y la absorbancia final.
 V_t es el volumen total de reacción (3 mL).
 ϵ_{240} es el coeficiente de extinción molar para H_2O_2 a OD 240 ($34.9 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).
 d es la longitud del camino óptico de la cubeta (1 cm).
 V_s es el volumen de la muestra (1 mL).
 C_t es la concentración de proteína total en la muestra.
0.001 es el cambio de absorbancia causado por 1 U de enzima por minuto a 240 nm OD.

Este experimento se llevó a cabo en las plantas de *R. sativus* sometidas a estrés salino con una concentración al 100 mM.

- **Determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)**

Para determinar la actividad de la enzima SOD se siguió el método descrito por Minami y Yoshikawa, 1979. Se seleccionaron de manera aleatoria cinco plantas de cada tratamiento.

Para obtener el blanco, en una cubeta de cuarzo de 3 mL se mezcló 2.8 mL de la solución amortiguadora de Tris-HCL, 100 μL de agua destilada y 50 μL de la solución EDTA, la cubeta de cuarzo se colocó en el espectrofotómetro y finalmente se añadieron 50 μL de la solución de Pirogallol, la solución se dejó reaccionar por 10 segundos e inmediatamente se comenzó a medir la diferencia de densidades ópticas, esto se midió a una longitud de onda de 420 nm. La DO se leyó durante 1 min en periodos de 10 seg.

Este procedimiento se repitió más de tres veces para que el valor promedio resultante sea igual a 0.020 ± 0.001 , para obtener este valor, se debe incrementar o disminuir el volumen de la solución de Pirogalol, hasta alcanzar la DO de 0.020. Este valor se toma como $\Delta D.O.$ del blanco.

Para las plantas de *R. sativus* se utilizaron 0.5g de las hojas y se maceraron en un mortero con 5 mL de buffer fosfato, se centrifugaron por 3 min a 8000 rpm y se utilizó el sobrenadante para la determinación.

Finalmente, en una cubeta de vidrio se añadió de manera inicial 50 µL de muestra, 25 µL EDTA, 50 µL Pirogallol y 940 µL Tris-HCl (estas cantidades fueron cambiando de acuerdo con las muestras analizadas).

La actividad de la SOD se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\left| \left[\frac{VM\Delta DO \text{ muestra} \times 100}{VM\Delta DO \text{ Blanco}} - 100 \right] \times 0.6 \right|$$

Dónde: Δ DO.m: Diferencia de DO de la muestra.

Δ DO.b: Diferencia de DO del blanco.

V.M. valor medio

Este experimento se realizó con las plantas de *R. sativus* L. sometidas a estrés salino con una concentración al 100 mM.

- **Colonización bacteriana en la raíz de *R. sativus* L.**

Para determinar la colonización de las cepas bacterianas inoculadas en la raíz de las plantas de *R. sativus* L., se realizó un muestro aleatorio a los 60 días después de la siembra en bolsas negras para vivero, se tomaron cinco plantas de cada tratamiento.

En un ambiente estéril con mecheros Bunsen la raíz fue retirada de manera cuidadosa de la turba y colocada en un recipiente estéril con MgSO₄.7H₂O a 10 mM para poder retirar el exceso de turba.

Posteriormente la raíz se colocó en un tubo de 50 mL con 35 mL de MgSO₄.7H₂O a 10 mM y se agitó de manera manual durante 10 min y se dejaron reposar por 10 min.

La cuantificación de bacterias en la raíz se realizó mediante la metodología de Goteo por Sellado en Placa Masivo (GSPM) descrita por Corral-Lugo *et al.*, 2012, se utilizaron los medios selectivos de acuerdo con cada cepa, en el tratamiento inoculado con *P. putida* KT2440 se utilizó agar King B, en *Pseudomonas* sp. EpiPf10 se utilizó agar Glicerol-Peptona y la co-inoculación (*P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10) en agar GP.

ANALISIS ESTADISTÍCO

Para evaluar los datos morfométricos de *Raphanus sativus* L., los datos se sometieron a un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías) para comparar la diferencia de medias entre grupos y una prueba de Tukey.

Por otro lado, para evaluar la actividad fotosintética de *R. sativus* L., la actividad enzimática de la Catalasa y la Superóxido dismutasa los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) para comparar la diferencia de medias entre los tratamientos y una prueba de Tukey.

Finalmente, para evaluar la colonización bacteriana de la raíz se realizó una prueba de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

Sobrevivencia a la salinidad.

Se evaluó la capacidad de sobrevivencia a la salinidad de las cepas *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 en diferentes concentraciones de NaCl (1%-0.86 mM, 2%-1.7 mM, y 4%-3.4 mM), a las 0, 24, 48 y 72 horas.

La cepa *P. putida* KT2440 mostró una sobrevivencia a la salinidad similar en todas las concentraciones de estrés salino y a las diferentes horas, es decir la cepa presento una sobrevivencia similar en toso los porcentajes de NaCl y sus respectivas horas, sin embargo, se observó una mayor sobrevivencia microbiana en la concentración de 2% (1.7 mM) NaCl a las 48 horas (9.45 ± 0.49 Log UFC/mL).

(Figura 1)

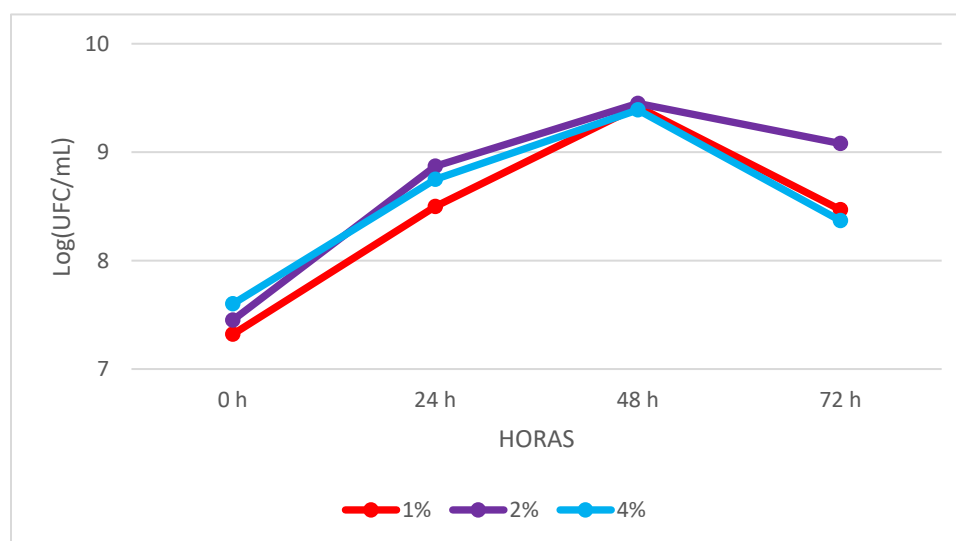


Figura 1. Promedio de las UFC/mL de *Pseudomonas putida* KT2440 ante una concentración de 1%-0.86 mM, 2%-1.7 mM, y 4%-3.4 mM, a las 0, 24, 48 y 72 horas.

En *Pseudomonas* sp EpiPf10 se encontró que al igual que en *P. putida* KT2440 hay una mayor sobrevivencia bacteriana ante una concentración de 2% (1.7 mM) NaCl a las 72 horas (8.42 ± 0.59 Log UFC/mL), sin embargo, hay una notable disminución en las demás concentraciones de NaCl a las diferentes horas respecto a la cepa *P. putida* KT2440. (Figura 2)

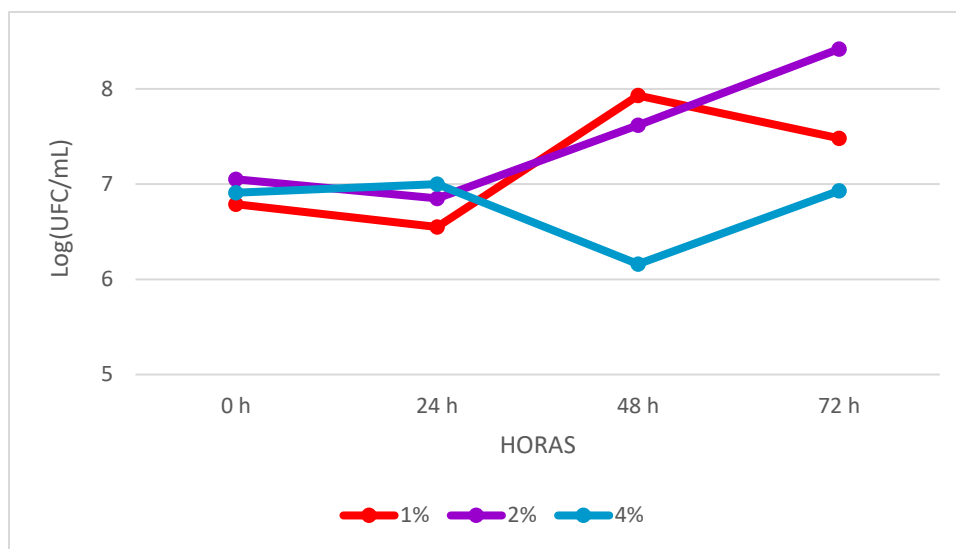


Figura 2. Promedio de las UFC/mL de *Pseudomonas* sp. EpiPf10 ante una concentración de 1%-0.86 mM, 2%-1.7 mM, y 4%-3.4 mM, a las 0, 24, 48 y 72 horas

Promoción del crecimiento de la PGPR en *Raphanus sativus* L. en diferentes condiciones de estrés salino.

- **Cultivo de las plantas de *R. sativus* L. en Condiciones Óptimas y Condiciones de Estrés Salino a 75 mM de cloruro de sodio.**

Las características morfológicas de *R. sativus* L. evaluadas fueron el pesos fresco y seco de la biomasa de la parte aérea y del bulbo, longitud total de la planta, longitud foliar, de la raíz y del bulbo, número de hojas y el diámetro del bulbo; los cambios observados en la morfometría de la planta, sustentaron si la inoculación de la planta promovió el crecimiento vegetal.

A los 60 días posteriores de la siembra las plantas crecidas en condiciones Óptimas (CO) presentaron el mayor peso fresco de la parte aérea en el tratamiento inoculado con *P. putida* KT2440, seguido de la co-inoculación y, el tratamiento control, estos mostraron diferencia estadísticamente significativa con respecto a las plantas

inoculadas con *Pseudomonas* sp. EpiPf10. En contraste, en las plantas cultivadas en condiciones de estrés salino al 75 mM (CES-75) se registró que el peso fresco de la parte aérea en el grupo control es menor (con diferencia estadística significativa, prueba Tukey post-hoc $P < 0.05$) en comparación a los tratamientos inoculados con *P. putida* KT2440, *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y la co-inoculación, en los que se observó una tendencia similar (**Figura 3**).

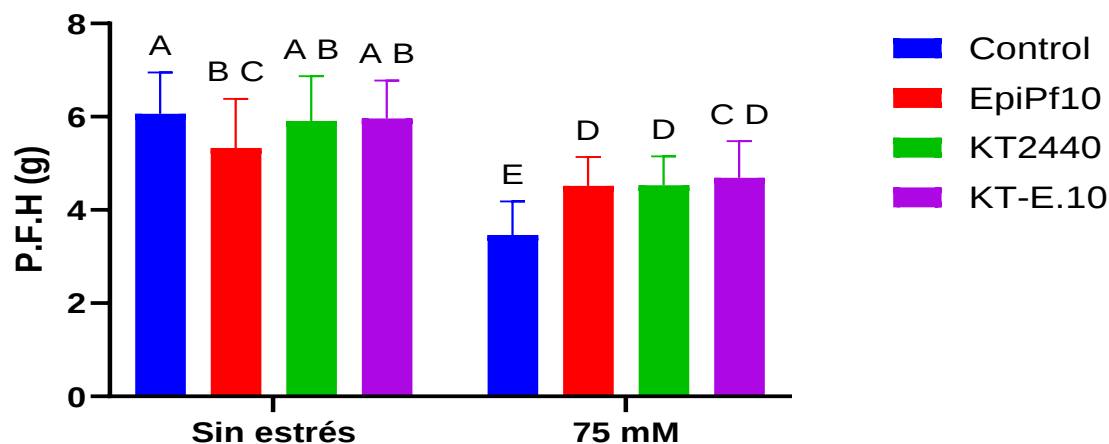


Figura 3. Media del Peso Fresco de las Hojas (P.F.H) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 75 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$

Por otro lado, el peso seco de la parte aérea fue similar en todos los tratamientos de las plantas cultivadas en condiciones óptimas (CO), y en condiciones de estrés salino al 75mM (CES-75) el mayor peso seco de la parte aérea lo presentó el tratamiento de la co-inoculación, seguido de *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y la inoculación con *P. putida* KT2440 que superaron al control (**Figura 4**).

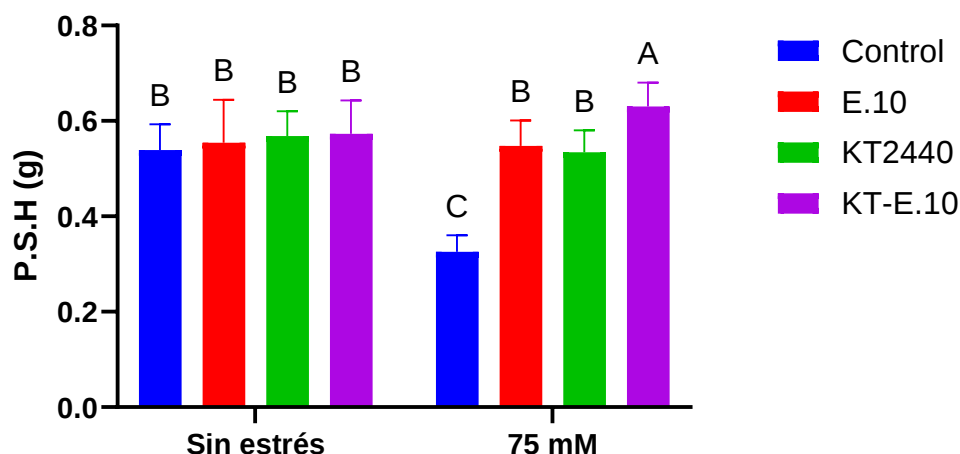


Figura 4. Media del Peso Seco de las Hojas (P.S.H) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 75 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$

En la condición óptima (CO) de cultivo, el tratamiento de la co-inoculación registró la mayor longitud total, seguido del tratamiento inoculado con *Pseudomonas* sp. EpiPf10, la inoculación con *P. putida* KT2440 y el control presentaron una longitud total similar, de la misma forma en la condición de cultivo con estrés salino al 75 mM (CES-75) se observó que, la co-inoculación registró la mayor longitud total seguido de la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y *P. putida* KT2440, estos tratamientos presentaron diferencias estadísticas con respecto al control, sin embargo, la longitud total registrada en CES-75 es menor a la registrada en CO para todos los tratamientos (**Figura 5**).

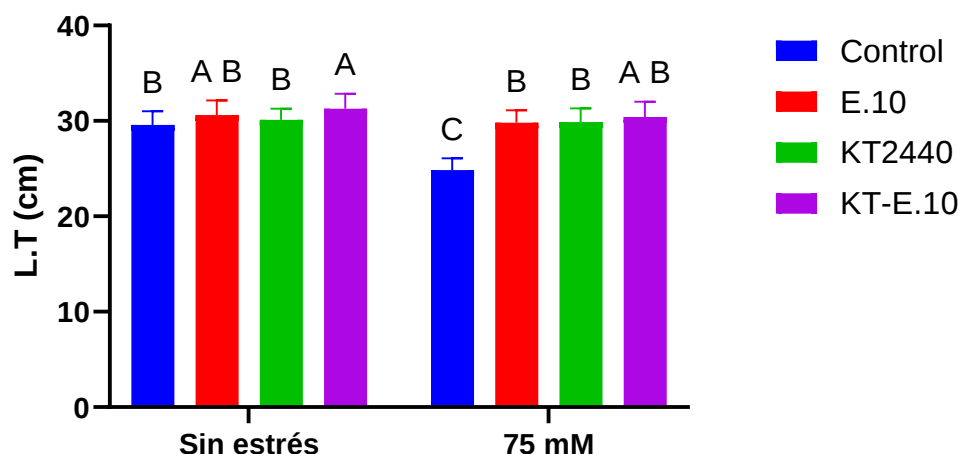


Figura 5. Media de la Longitud Total (L.T) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 75 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$

La longitud foliar en condiciones óptimas (CO) de crecimiento se registró una tendencia semejante en todos los tratamientos, este parámetro fue menor en las plantas del tratamiento con *Pseudomonas* sp. EpiPf10. De igual forma, en condiciones de estrés salino a 75mM (CES-75), la co-inoculación presentó la mayor longitud foliar, seguida de la inoculación con *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10. El control presentó la menor longitud foliar con diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, la longitud foliar de hojas registrada en CES-75 es menor a la registrada en CO para los tratamientos de co-inoculación, inoculación con *P. putida* KT2440 y el control, excepto la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 en la que se registró una tendencia similar en ambas condiciones de crecimiento. (**Figura 6**).

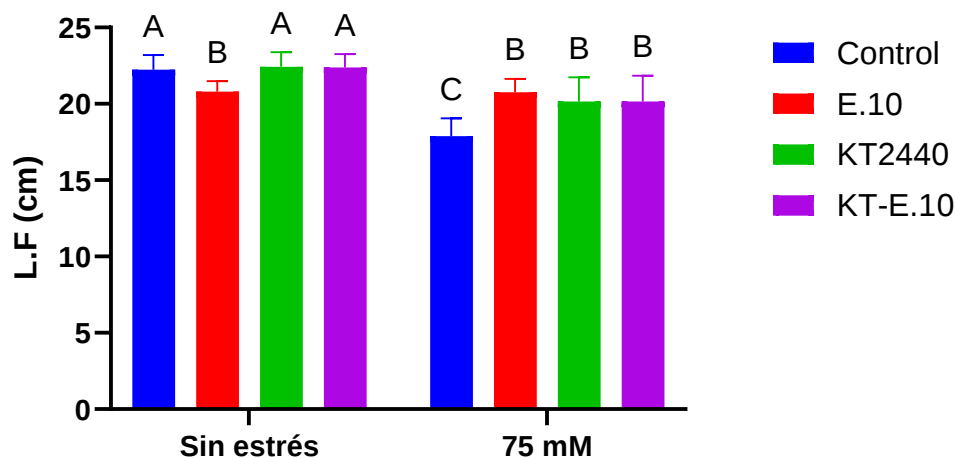


Figura 6. Media de la Longitud Foliar (L.F) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 75 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

Las plantas cultivadas en condiciones óptimas (CO) exhibieron un mayor número de hojas en el tratamiento inoculado con *Pseudomonas* sp. EpiPf10, seguido del control, la co-inoculación y *P. putida* KT2440, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Por otro lado, en condiciones de estrés salino al 75 mM (CES-75) se obtuvo un mayor número de hojas en el tratamiento con *Pseudomonas* sp. EpiPf10, seguido de *P. putida* KT2440, la co-inoculación y el menor número de hojas lo presentó el control, en los cuatro tratamientos en CES-75 se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con respecto a los tratamientos de CO. (CO y CES-75). (**Figura 7**)

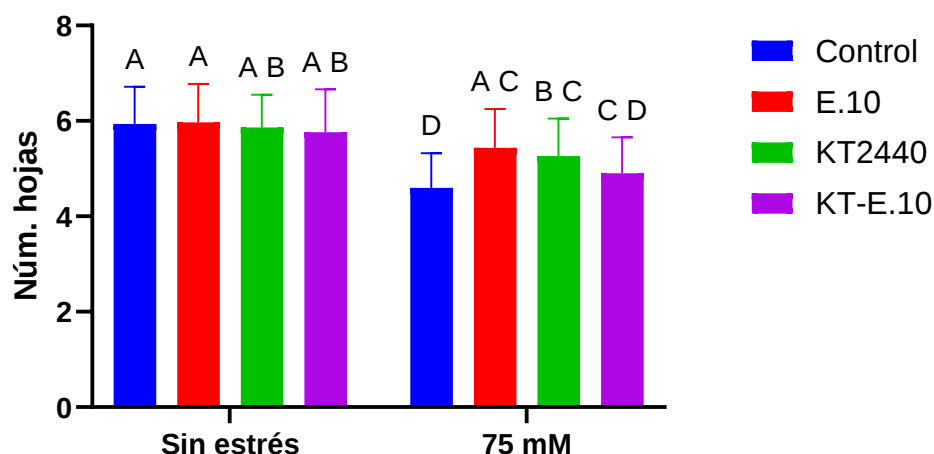


Figura 7. Media del número de hojas (Núm. hojas) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 75 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

En el parámetro longitud de la raíz, se observó una longitud mayor en las plantas sometidas a condiciones de estrés salino al 75 mM (CES-75), la mayor longitud de la raíz se obtuvo en la co-inoculación, la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y *P. putida* KT2440, estos tres tratamientos presentaron medias similares y presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control (una media menor). Para las condiciones óptimas de crecimiento (CO), la mayor longitud total de la raíz la presentó el tratamiento con *Pseudomonas* sp. EpiPf10, seguido de la co-inoculación, el control y *P. putida* KT2440, este último presentó diferencias estadísticamente significativas, respecto a los otros tratamientos. (**Figura 8**)

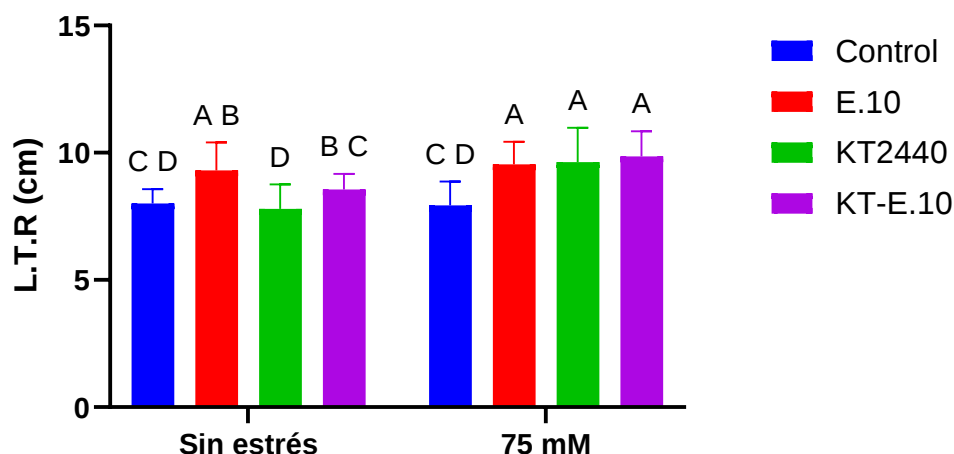


Figura 8. Media de la longitud total de la raíz (L.T.R) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 75 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

En las condiciones óptimas (CO) de crecimiento vegetal se obtuvo un mayor peso fresco de la raíz en la co-inoculación, seguido de la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y el control, en ambos tratamientos antes mencionados hubo una tendencia similar, la inoculación con *P. putida* KT2440 tuvo un menor peso fresco de la raíz respecto a los tratamientos antes mencionados. Para la condición de estrés salino al 75 mM (CES-75) se registró un mayor peso fresco de la raíz en co-inoculación, seguido de la inoculación con *P. putida* KT2440, estos dos tratamientos fueron similares, seguidos de la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y el control, estos dos tratamientos presentaron el menor peso fresco de la raíz respecto a los dos tratamientos anteriores. En la condición de crecimiento CES-75 el peso fresco de la raíz fue menor respecto a la condición CO en todos los tratamientos, presentando diferencias estadísticamente significativas en ambas condiciones. (Figura 9)

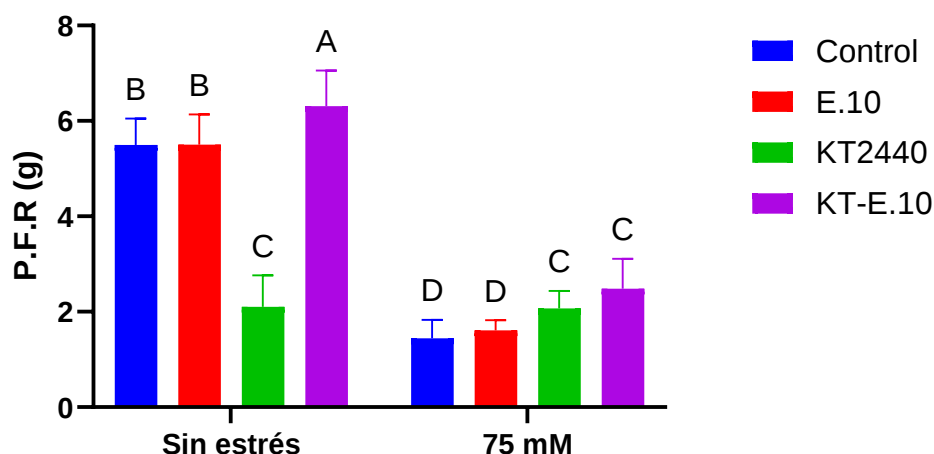


Figura 9. Media del peso fresco de la raíz (P.F.R) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 75 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

Para la condición óptima (CO) de crecimiento vegetal se obtuvo el mayor peso seco de la raíz en los tratamientos: co-inoculación y la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10, seguidos del control y la inoculación con *P. putida* KT2440, este último tuvo un menor peso seco de la raíz con diferencias significativa respecto a los otros tratamientos. Para la condición en estrés salino a 75mM (CES-75) el mayor peso seco de la raíz los registró la co-inoculación, seguido de la inoculación con *P. putida* KT2440; la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y el control, presentaron una tendencia similar y el peso seco de la raíz menor respecto a los dos tratamientos anteriores. La condición CES-75 tuvo un peso fresco de la raíz menor respecto a la condición CO en todos los tratamientos, presentando diferencias estadísticamente significativas en ambas condiciones. (**Figura 10**)

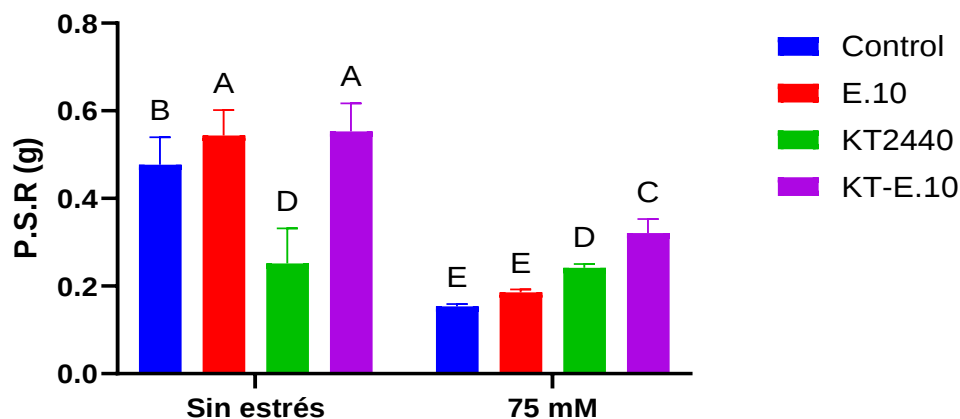


Figura 10. Media del peso seco de la raíz (P.S.R) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 75 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

En la condición óptima de crecimiento (CO), se obtuvo mayor diámetro del bulbo en la co-inoculación, seguido de la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y el control, estos dos tratamientos presentaron una tendencia similar. La inoculación con *P. putida* KT2440 presentó menor diámetro del bulbo, con una diferencia estadísticamente significativa respecto a los anteriores tratamientos. Por otro lado, en la condición de estrés salino al 75mM (CES-75) los tratamientos: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y *P. putida* KT2440 presentaron el diámetro del bulbo mayor, seguido de la co-inoculación y el menor diámetro el control, con diferencia estadísticamente significativa con los anteriores tratamientos. Cabe mencionar que, los tratamientos en la condición CES-75 tuvieron un diámetro del bulbo menor respecto a los tratamientos en CO, en ambas condiciones presentaron diferencias estadísticamente significativas. (**Figura 11**)

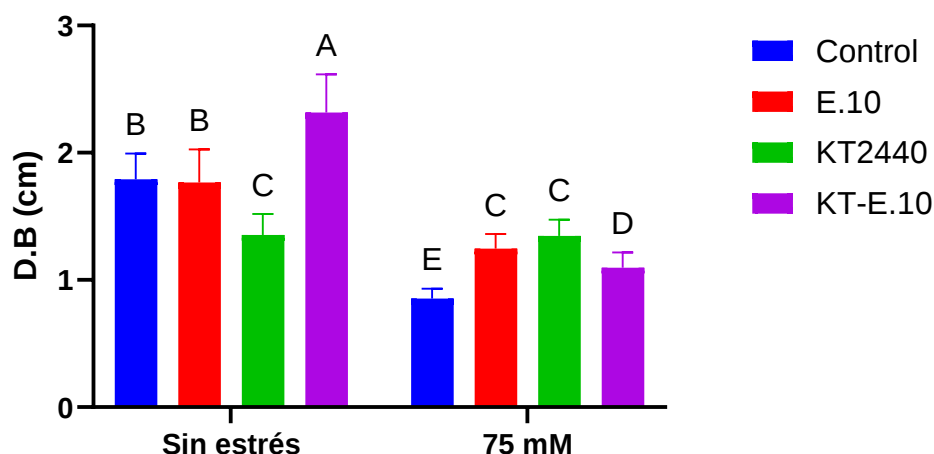


Figura 11. Media del Diámetro del Bulbo (D.B) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 75 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

En el parámetro de la longitud del bulbo, en las condiciones óptimas (CO) se obtuvo la longitud del bulbo mayor en la co-inoculación, la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y el control, estos tres tratamientos presentaron una tendencia similar. La inoculación con *P. putida* KT2440 presentó una pequeña diferencia respecto a los tratamientos antes mencionados, para la condición con estrés salino al 75 mM (CES-75) se obtuvo una tendencia semejante a la observada con CO, el diámetro del bulbo fue mayor en la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10, seguido de la co-inoculación, inoculación con *P. putida* KT2440 y el control, estos tres tratamientos presentaron una tendencia similar, por otro lado, no se encontraron estadísticas significativas entre ambas condiciones de cultivo de las plantas de rábano. (**Figura 12**)

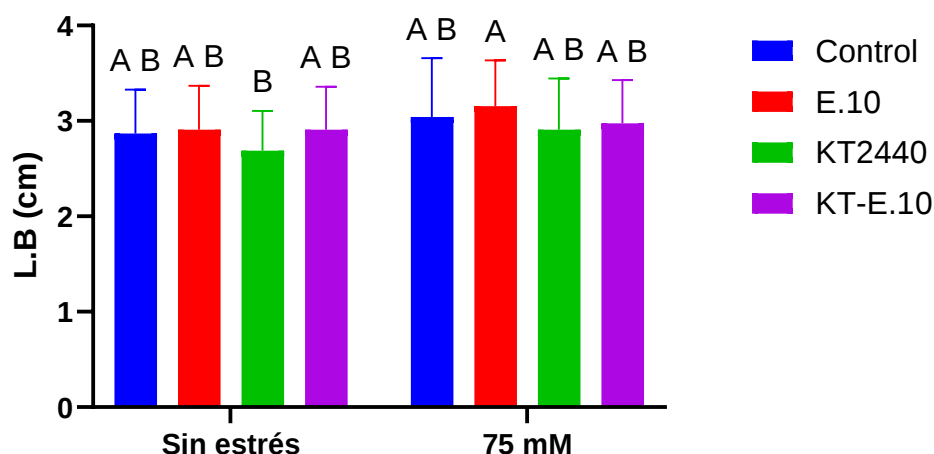


Figura 12. Media de la Longitud del Bulbo (L.B) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 75 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

- Cultivo de las plantas de rábano en Condiciones óptimas y Condiciones de Estrés Salino a 100 mM de cloruro de sodio.

A los 60 días posteriores a la siembra de las plantas de rábano, las cultivadas en condiciones Óptimas (CO) presentaron el mayor peso fresco de la parte aérea en el tratamiento inoculado con *P. putida* KT2440. Los resultados de la co-inoculación y el control mostraron pesos similares, con una diferencia estadísticamente significativa respecto a la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10. Por otro lado, las plantas en condiciones de estrés salino 100 mM (CES-100) registraron un mayor peso fresco de la parte aérea en los tratamientos inoculados con *P. putida* KT2440 y la co-inoculación, seguido del grupo control. La inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10, presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos antes mencionados. Las plantas en CES-100 presentaron un menor peso fresco de la parte aérea en todos los tratamientos respecto a las plantas crecidas en CO, mostrando diferencias estadísticamente significativas en ambas condiciones. (Figura 13)

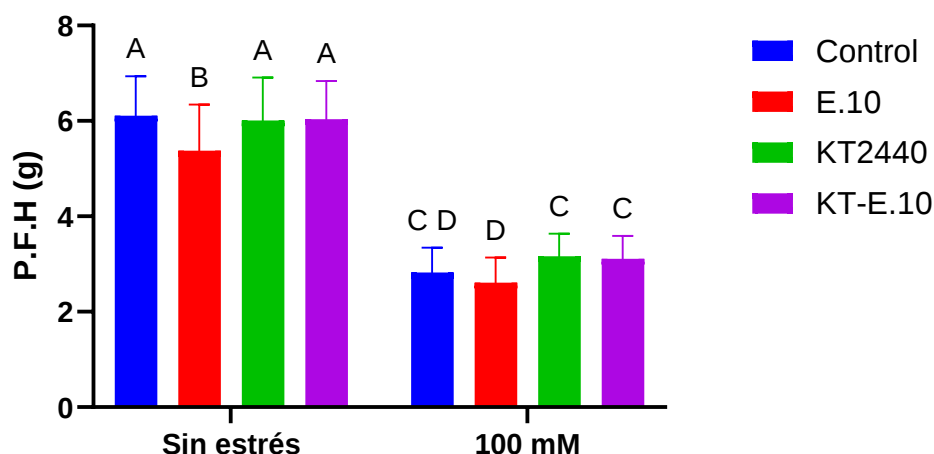


Figura 13. Media del Peso Fresco de las Hojas (P.F.H) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 100 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

Por otro lado, en las plantas cultivadas bajo condiciones óptimas (CO) el peso seco de la parte aérea fue similar en todos los tratamientos. De manera similar, las plantas crecidas bajo condiciones de estrés salino a 100 mM (CES-100) mostraron una tendencia comparable en todos los tratamientos, sin embargo, entre ambas condiciones se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todos los tratamientos, la condición CES-100 presentó el menor peso seco de la parte aérea. (Figura 14.)

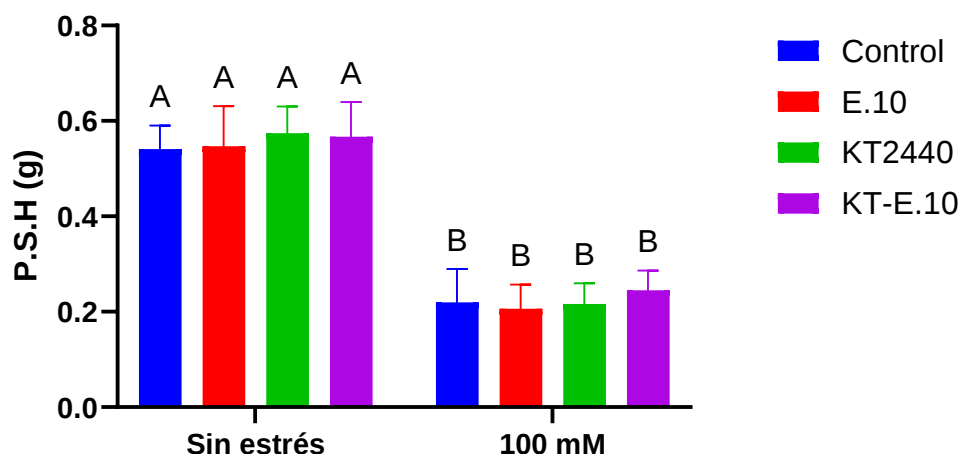


Figura 14. Media del Peso Seco de las Hojas (P.S.H) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 100 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

Bajo condiciones óptimas (CO), se observó la mayor longitud total en el tratamiento de la co-inoculación, seguido por el tratamiento inoculado con *Pseudomonas* sp. EpiPf10. Los tratamientos con *P. putida* KT2440 y el control mostraron una longitud total similar. En condiciones de estrés salino a 100 mM de cloruro de sodio (CES-100), la mayor longitud total se registró en el tratamiento de co-inoculación, seguido de los tratamientos con *P. putida* KT2440 y el control, los cuales presentaron una tendencia similar. Estos tres tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el tratamiento inoculados con *Pseudomonas* sp. EpiPf10. Sin embargo, la longitud total registrada en CES-100 es menor a la registrada en CO para todos los tratamientos, presentando diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones de cultivo de las plantas. (Figura 15).

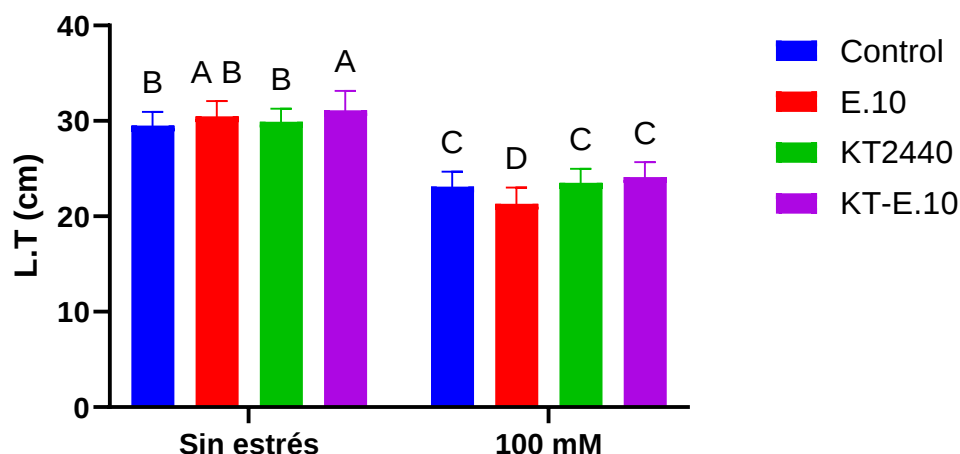


Figura 15. Media de la Longitud Total (L.T) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 100 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

En condiciones óptimas (CO) de crecimiento, se registró una longitud foliar similar en la co-inoculación, la inoculación con *P. putida* KT2440 y el control. Estos tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10. En condiciones de estrés salino a 100 mM (CES-100) se observó una tendencia similar a la de CO; la co-inoculación, la inoculación con *P. putida* KT2440 y el control mostraron longitudes foliares equivalentes, y también se observó una diferencia estadísticamente significativa respecto a la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10. Por otro lado, la longitud foliar en condiciones de estrés salino 100 mM de cloruro de sodio (CES-100) registró una menor longitud foliar en todos los tratamientos respecto a los tratamientos en CO, marcando una diferencia estadísticamente significativa en ambas condiciones. (**Figura 16**).

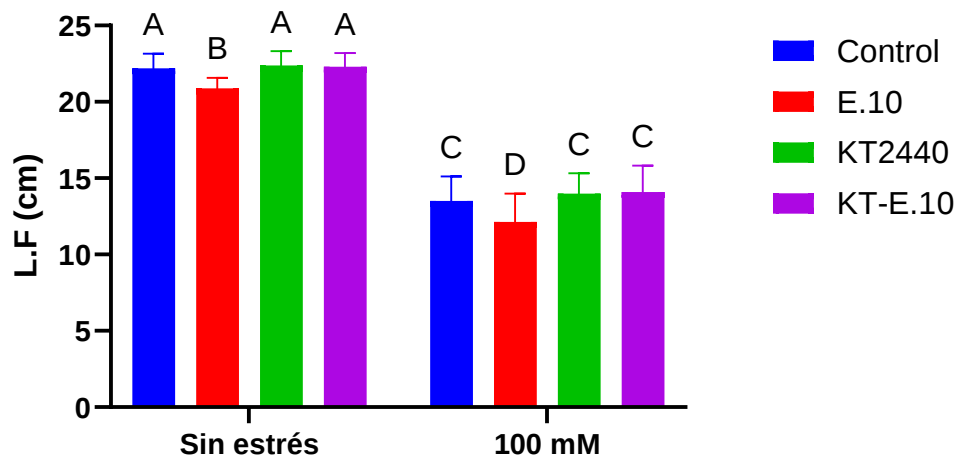


Figura 16. Media de la Longitud Foliar (L.F) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 100 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

En condiciones óptimas (CO) se registró un mayor número de hojas en la co-inoculación y en la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y *P. putida* KT2440; estos tratamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control. En condiciones de estrés salino a 100 mM (CES-100), se obtuvo un mayor número de hojas en la inoculación con *P. putida* KT2440 y en el tratamiento con *Pseudomonas* sp. EpiPf10, los cuales mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos de co-inoculación y control. En CO se registró un mayor número de hojas en los tratamientos co-inoculación y el control respecto a CES-100, mostrando diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, la inoculación con *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 mostraron una tendencia similar en ambas condiciones. (Figura 17)

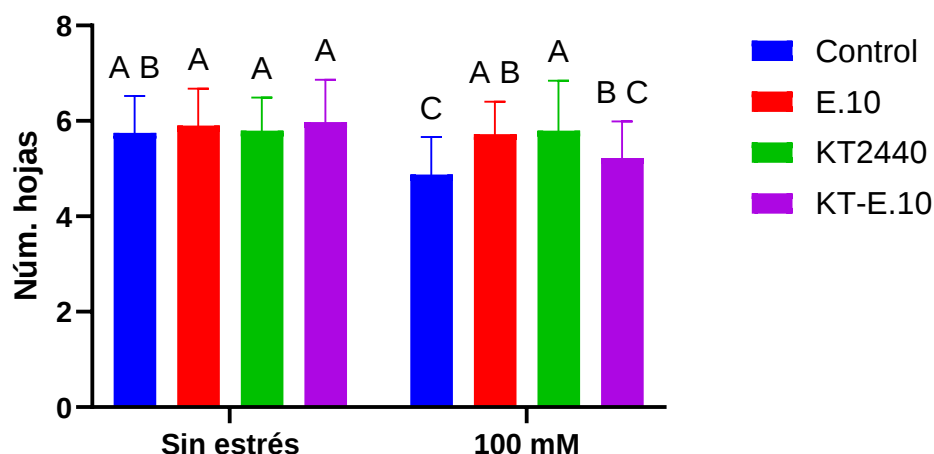


Figura 17. Media del número de hojas (Núm. hojas) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 100 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

En el caso de la longitud total de la raíz, se observó que en todos los tratamientos cultivados en condiciones de estrés salino a 100 mM (CES-100) se obtuvo una mayor longitud total de la raíz. En contraste, en condiciones óptimas (CO), la longitud total de la raíz fue mayor en la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10. La longitud de la raíz fue similar en la co-inoculación y la inoculación con *P. putida* KT2440, mientras que el control reportó la menor longitud. Todos los tratamientos en CO presentaron diferencias estadísticamente significativas, al igual que entre ambas condiciones. (**Figura 18**)

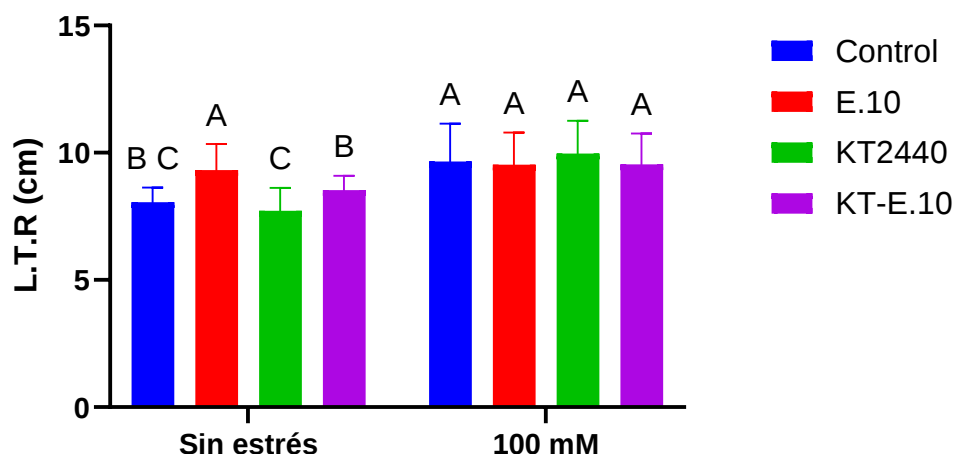


Figura 18. Media de la longitud total de la raíz (L.T.R) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 100 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

El mayor peso fresco de la raíz, bajo condiciones óptimas (CO) de crecimiento, se observó en el tratamiento de co-inoculación, seguido por los tratamientos inoculados con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y el control, los cuales mostraron valores similares para este parámetro. La inoculación con *P. putida* KT2440 tuvo el menor peso fresco de la raíz respecto a los tratamientos antes mencionados con diferencias estadísticamente significativa, de forma similar en condiciones de estrés salino 100 mM (CES-100) el mayor peso fresco de la raíz lo presentó la co-inoculación, y la inoculación con *P. putida* KT2440, seguido de *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y el control, estos dos tratamientos presentaron el peso fresco de la raíz menor, respecto a los dos tratamientos anteriormente mencionados. Las condiciones CES-100 mostraron un peso fresco de la raíz menor respecto a CO en todos los tratamientos con, diferencias estadísticamente significativas en ambas condiciones. (**Figura 19**)

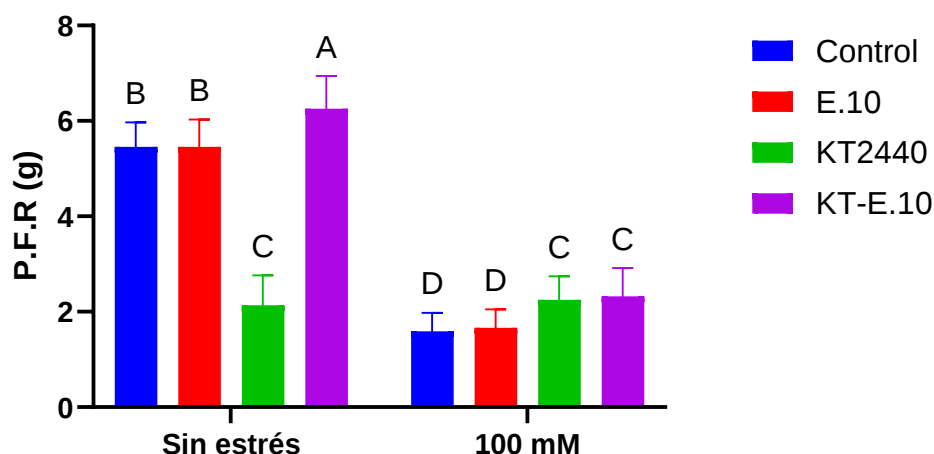


Figura 19. Media del peso fresco de la raíz (P.F.R) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 100 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y sKT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

Para las condiciones óptimas de crecimiento (CO) el mayor peso seco de la raíz lo presentó la co-inoculación y la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10, seguido del control. El menor peso seco de la raíz se observó con la inoculación con *P. putida* KT2440, respecto a los tratamientos antes mencionados. Para condiciones de estrés salino 100 mM (CES-100) el peso seco de la raíz fue similar en todos los tratamientos; en las dos condiciones de crecimiento el menor peso seco de la raíz lo presentaron las plantas crecidas en CES-100 en comparación con CO, por lo que ambas condiciones presentan diferencias estadísticamente significativas en todos los tratamientos. (**Figura 20**)

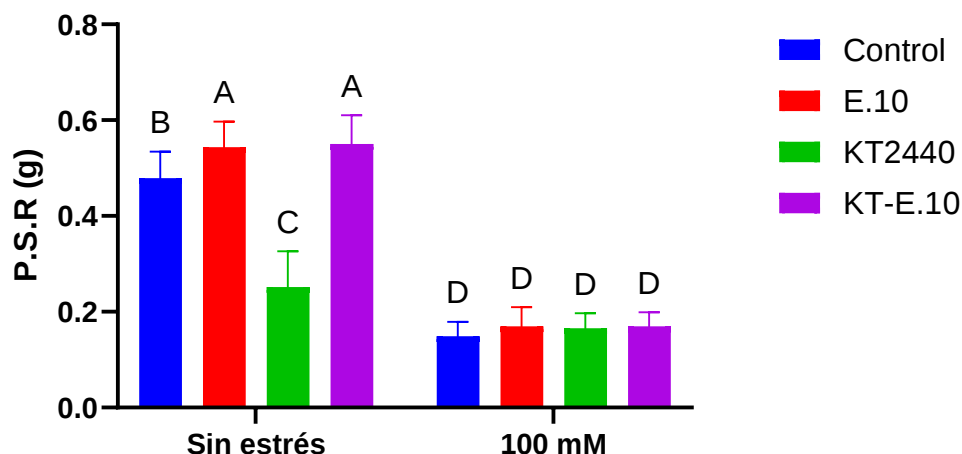


Figura 20. Media del peso seco de la raíz (P.S.R) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 100 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

El mayor diámetro del bulbo en condiciones óptimas (CO), lo presentó el tratamiento co-inoculación, seguido de la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y el control, que presentaron una tendencia similar. La inoculación con *P. putida* KT2440 presentó el menor parámetro y con una diferencia estadísticamente significativa respecto a los tratamientos antes mencionados. Por otro lado, en condiciones de estrés salino 100 mM (CES-100) la co-inoculación, la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y *P. putida* KT2440 presentaron el mayor diámetro del bulbo con respecto al control. La condición CES-100 presentó un diámetro del bulbo menor respecto a la CO en todos los tratamientos, en ambas condiciones se observó que presentaron diferencias estadísticamente significativas. (**Figura 21**).

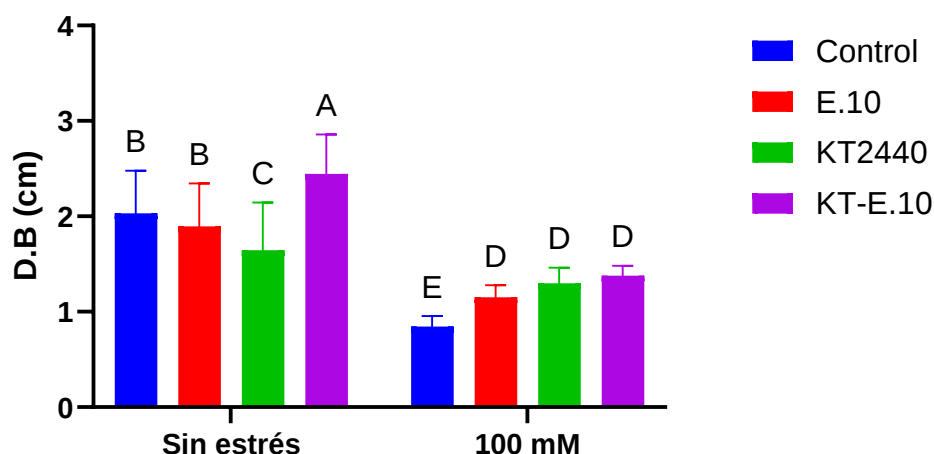


Figura 21. Media del Diámetro del Bulbo (D.B) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 75 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

En condiciones óptimas (CO) se obtuvo una longitud del bulbo mayor en la co-inoculación y la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10, presentando una tendencia similar, seguido del control y *P. putida* KT2440, este último presentó una diferencia estadísticamente significativa respecto a los otros tratamientos, para CES-100 se obtuvo una mayor longitud del bulbo en la co-inoculación y en la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10, seguido de la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y el control, estos dos presentaron una diferencia estadísticamente significativa respecto a los tratamientos antes mencionados. La inoculación en CO presentó una mayor longitud del bulbo en todos sus tratamientos respecto a CES-100, marcando una diferencia estadísticamente significativa. (Figura 22).

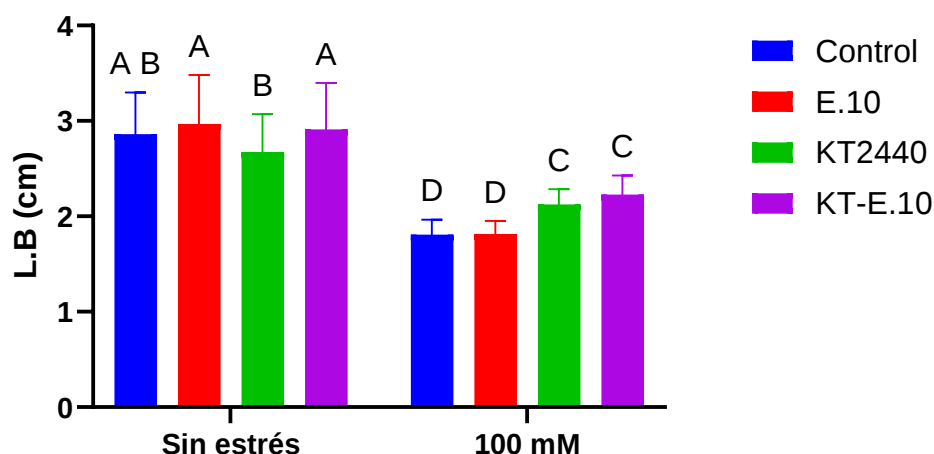


Figura 22. Media de la Longitud del Bulbo (L.B) presentes en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino al 100 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

Evaluación de la actividad fotosintética de *Raphanus sativus* L.

Se determinó la concentración de clorofila A, B y total de todos los tratamientos en las diferentes condiciones de crecimiento vegetal: condiciones óptimas (CO), condiciones de estrés salino 75 mM (CES-75) y Condiciones de estrés salino 100 Mm (CES-100) evaluadas en *R. sativus* L.

- Cultivo de las plantas de *R. sativus* L. en Condiciones Óptimas

En primera instancia se evaluaron los tratamientos establecidos en condiciones óptimas de crecimiento vegetal (CO), el primer parámetro evaluado fue la Clorofila A (ChlA), el tratamiento que mostró un mayor valor de ChlA fue el grupo control ($4.23 \pm 0.94 \mu\text{g/mL}$) con una diferencia significativa respecto al tratamiento co-inoculación ($3.20 \pm 0.52 \mu\text{g/mL}$), seguido del tratamiento con *P. putida* KT2440 ($2.99 \pm 0.28 \mu\text{g/mL}$) y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 ($2.74 \pm 0.51 \mu\text{g/mL}$), estos tres tratamientos no presentaron ninguna diferencia entre sí (**Figura 23**)

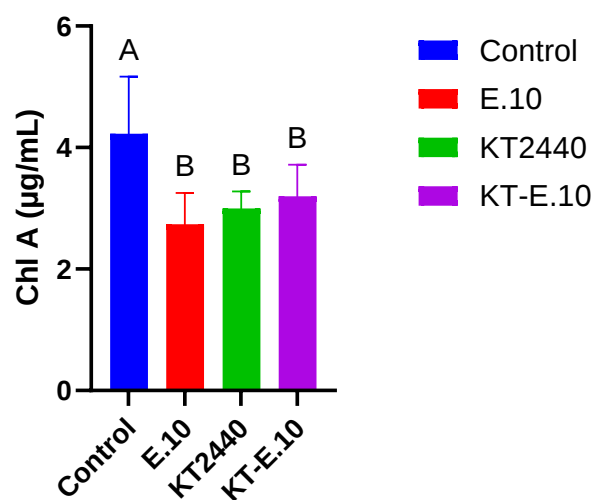


Figura 23. Media del contenido de Clorofila A (ChlA) presente en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas a los 60 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

Para la Clorofila B (ChlB) se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre los cuatro tratamientos, mostrando una mayor cantidad de ChlB en el grupo control (0.50 ± 0.06 µg/mL), seguido de la co-inoculación (0.40 ± 0.04 µg/mL), la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 (0.34 ± 0.07 µg/mL) y *P. putida* KT2440 (0.15 ± 0.02 µg/mL), este último fue el tratamiento con una menor cantidad de ChlB. (Figura 24)

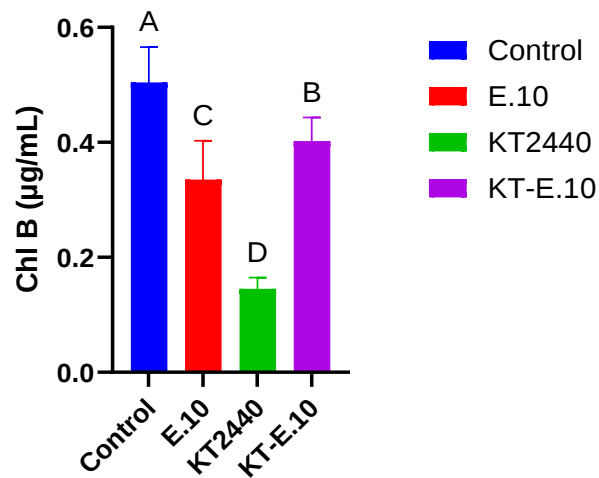


Figura 24. Media del contenido de Clorofila B (ChlB) presente en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas a los 60 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

La cuantificación de la Clorofila Total (ChlTotal) mostró su mayor concentración en el tratamiento control (4.73 ± 0.95 µg/mL) con una diferencia estadísticamente significativa respecto a los tratamientos co-inoculación (3.68 ± 0.47 µg/mL), inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 (3.27 ± 0.35 µg/mL) y la inoculación con *P. putida* KT2440 (3.11 ± 0.25 µg/mL), estos últimos tres presentaron una concentración similar de ChlTotal. Los cuatro tratamientos mostraron una cantidad de ChlTotal parecida a Clorofila B (ChlB). (**Figura 25**)

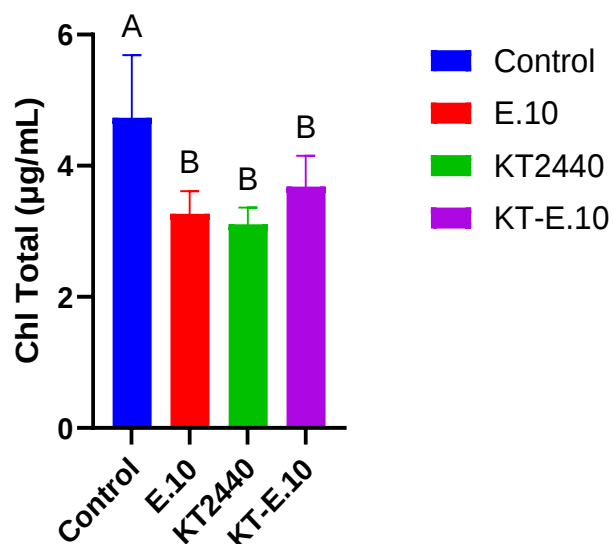


Figura 25. Media del contenido de Clorofila Total (ChlTotal) presente en *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas a los 60 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

- **Cultivo de las plantas de *R. sativus* L. en Condiciones de Estrés Salino a 75 mM de cloruro de sodio.**

También se cuantificó la clorofila a las plantas de los tratamientos sometidos a estrés salino con una concentración de 75mM de NaCl. Se evaluó la ChlA, los tratamientos control (3.03 ± 0.33 µg/mL), co-inoculación (3.12 ± 0.55 µg/mL) e inoculación con *P.putida* KT2440 (2.99 ± 0.44 µg/mL) mostraron una mayor cantidad de ChlA y una diferencia estadísticamente significativa respecto a la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 (1.65 ± 0.53 µg/mL). (**Figura 26**)

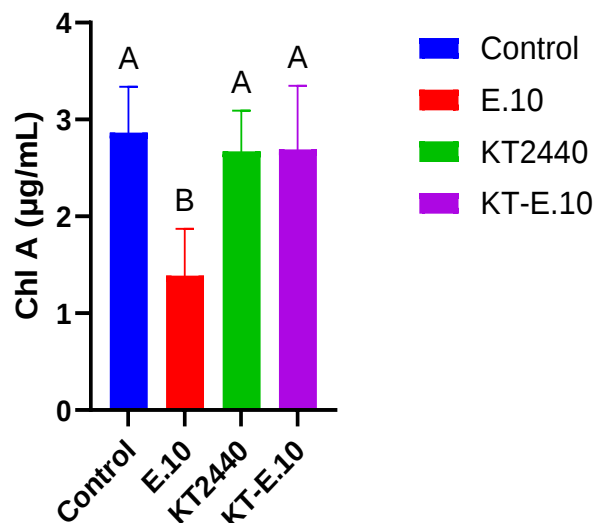


Figura 26. Media del contenido de Clorofila A (ChlA) presente en *Raphanus sativus* L. en condiciones de estrés salino al 75mM a los 60 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

Para ChlB se obtuvo una tendencia similar en los cuatro tratamientos. Co-inoculación (0.27 ± 0.05 µg/mL), inoculación con *P. putida* KT2440 (0.28 ± 0.04 µg/mL), inoculación *Pseudomonas* sp. EpiPf10 (0.26 ± 0.06 µg/mL) y el control (0.27 ± 0.02 µg/mL). (Figura 27)

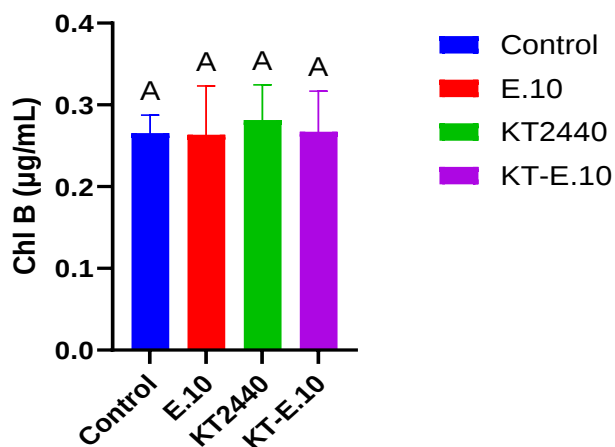


Figura 27. Media del contenido de Clorofila B (ChlB) presente en *Raphanus sativus* L. en condiciones de estrés salino al 75mM a los 60 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

En Clorofila total (ChlTotal) se encontró una tendencia similar en los tratamientos co-inoculación ($3.12 \pm 0.55 \mu\text{g/mL}$), inoculación con *P. putida* KT2440 ($2.98 \pm 0.44 \mu\text{g/mL}$) y el control ($3.03 \pm 0.33 \mu\text{g/mL}$) hubo una mayor cantidad y una diferencia estadísticamente significativa respecto a la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 ($1.65 \pm 0.53 \mu\text{g/mL}$). Al igual que en condiciones óptimas, los tratamientos mostraron una cantidad de ChlTotal parecida a ChlB. (Figura 28)

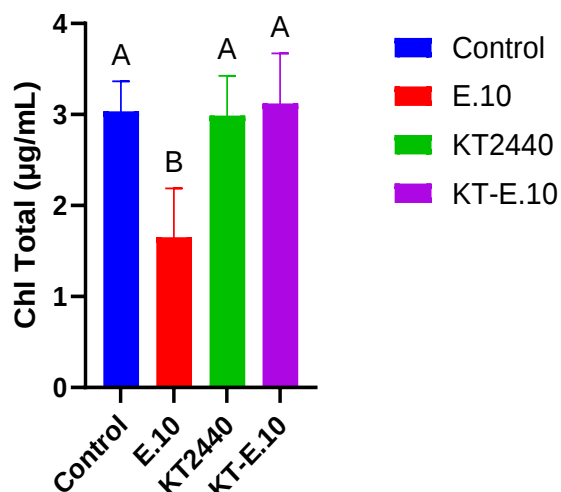


Figura 28. Media del contenido de Clorofila Total (ChlTotal) presente en *Raphanus sativus* L. en condiciones de estrés salino al 75mM a los 60 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

- **Cultivo de las plantas de *R. sativus* L. en condiciones de Estrés Salino a 100 mM de cloruro de sodio.**

Por último, se evaluaron los tratamientos sometidos a estrés salino con una concentración al 100mM, al igual que en las condiciones anteriores se evaluó primero a la ChlA, se obtuvo una cantidad similar en todos los tratamientos co-inoculación ($2.77 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$), inoculación con *P. putida* KT2440 ($2.83 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$), inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 ($2.80 \pm 0.30 \mu\text{g/mL}$) y control ($2.81 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$), no hubo diferencias estadísticamente significativas. (Figura 29).

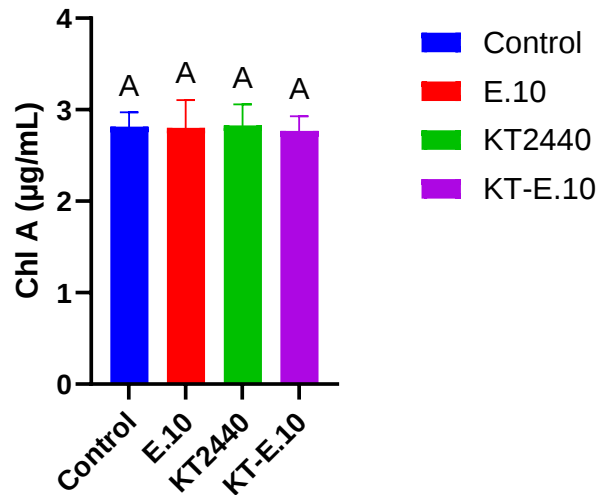


Figura 29. Media del contenido de Clorofila A (ChlA) presente en *Raphanus sativus* L. en condiciones de estrés salino al 100mM a los 60 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

En el caso de ChlB se obtuvo una mayor cantidad en la co-inoculación (0.29 ± 0.04 µg/mL) seguido de la inoculación con *P. putida* KT2440 (0.26 ± 0.04 µg/mL), los tratamientos mencionados anteriormente presentaron una pequeña diferencia respecto a la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 (0.24 ± 0.02 µg/mL) y control (0.24 ± 0.03 µg/mL). (Figura 30).

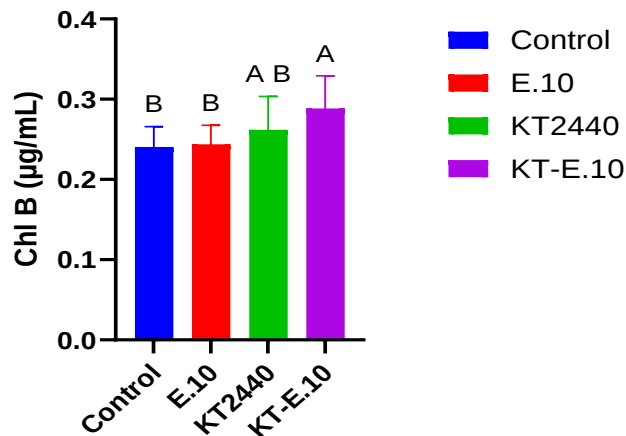


Figura 30. Media del contenido de Clorofila B (ChlB) presente en *Raphanus sativus* L. en condiciones de estrés salino al 100mM a los 60 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

Finalmente, se evaluó la cantidad de ChlTotal, se encontró una cantidad similar en todos los tratamientos co-inoculación ($3.19 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$), inoculación con *P. putida* KT2440 ($3.12 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$), inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 ($3.05 \pm 0.31 \mu\text{g/mL}$) y control ($3.05 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$), no hubo diferencias estadísticamente significativas. Al igual que en las condiciones anteriormente descritas, los tratamientos mostraron una cantidad de ChlTotal parecida a ChlA (**Figura 31**).

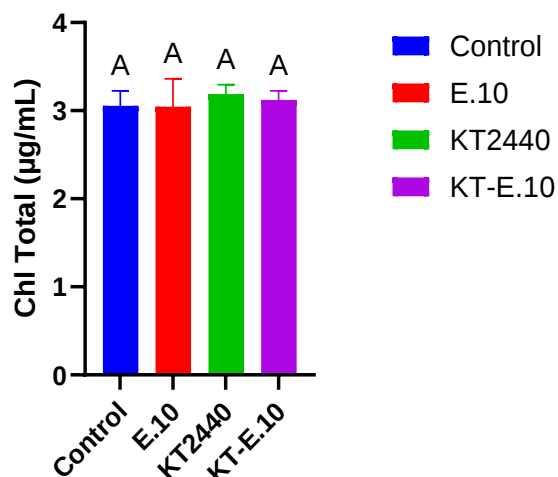


Figura 31. Media del contenido de Clorofila Total (ChlTotal) presente en *Raphanus sativus* L. en condiciones de estrés salino al 100mM a los 60 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

Evaluación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) en condiciones de estrés salino al 100 mM de cloruro de sodio

Se cuantificó la actividad enzimática de la catalasa (CAT) en condiciones de estrés salino al 100 mM. Se obtuvo una mayor actividad enzimática en el tratamiento co-inoculación ($3.07 \pm 0.18 \text{ U/mg proteína}$), seguido del control ($2.21 \pm 0.40 \text{ U/mg proteína}$) y la inoculación con *P. putida* KT2440 ($2.19 \pm 0.40 \text{ U/mg proteína}$), la inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 ($1.75 \pm 0.24 \text{ U/mg proteína}$) fue el tratamiento con menor actividad de catalasa (CAT). Los tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas, a excepción del tratamiento control y la inoculación con *P. putida* KT2440 que presentaron una tendencia similar. (**Figura 32**)

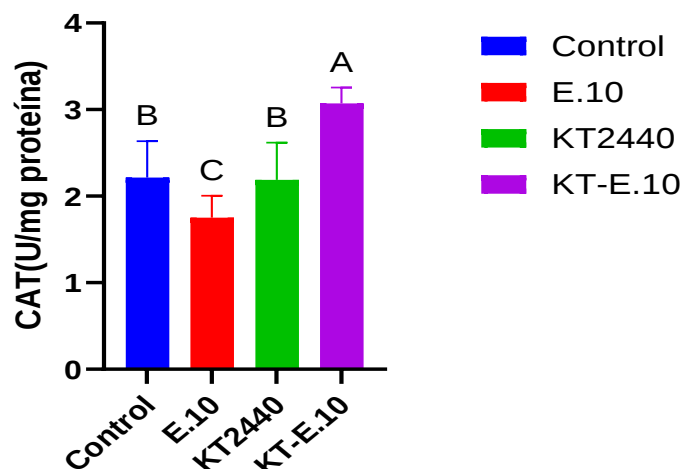


Figura 32. Media de la actividad enzimática de Catalasa (CAT) presente en las hojas de *Raphanus sativus* L. en condiciones de estrés salino al 100mM a los 60 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

Para la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), se obtuvo una mayor actividad enzimática en el tratamiento inoculado con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 (8.36 ± 0.75 U/mg proteína) y *P. putida* KT2440 (7.77 ± 0.74 U/mg proteína), seguido de la co-inoculación (7.32 ± 0.79 U/mg proteína) y finalmente el control (6.89 ± 0.33 U/mg proteína) mostró una menor actividad enzimática. (Figura 33)

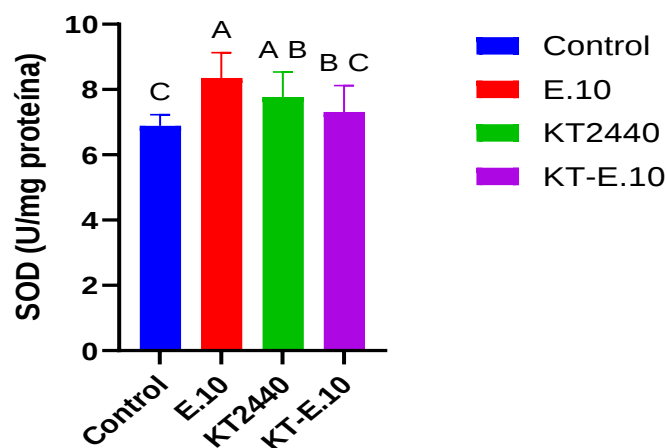


Figura 33. Media de la actividad enzimática de Superóxido dismutasa (SOD) presente en las hojas de *Raphanus sativus* L. en condiciones de estrés salino al 100mM a los 60 días después de la siembra e inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida* KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. Tukey post-hoc $P < 0.05$.

Colonización bacteriana en la raíz de *R. sativus* L.

La evaluación de la adherencia de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal halotolerantes (HT-PGPR) mostró que en condiciones óptimas la co-inoculación presenta una mayor colonización de la raíz de *R. sativus* L. (Kruskall-Wallis, $p= 0.003$) teniendo una población promedio de 10^6 UFC/mL (6.90 ± 0.09), la mono-inoculación de *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 presentaron una población bacteriana similar a 10^5 UFC/mL, de la misma manera, en condiciones de estrés salino a 75 mM (Kruskall-Wallis, $p= 0.01$) la co-inoculación fue quien presentó la mayor colonización de la raíz con una población promedio de 10^5 UFC/m (5.80 ± 0.59) seguido de la mono-inoculación de *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 con una adherencia a la raíz de 10^4 UFC/mL. Por último, en condiciones de estrés salino a 100 mM (Kruskall-Wallis, $p= 0.09$), la co-inoculación y la mono-inoculación de *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 no presentaron diferencias significativas entre sí, en los tres tratamientos se obtuvo una adherencia de la raíz similar, con una población bacteriana de 10^4 UFC/mL. (Figura 34).

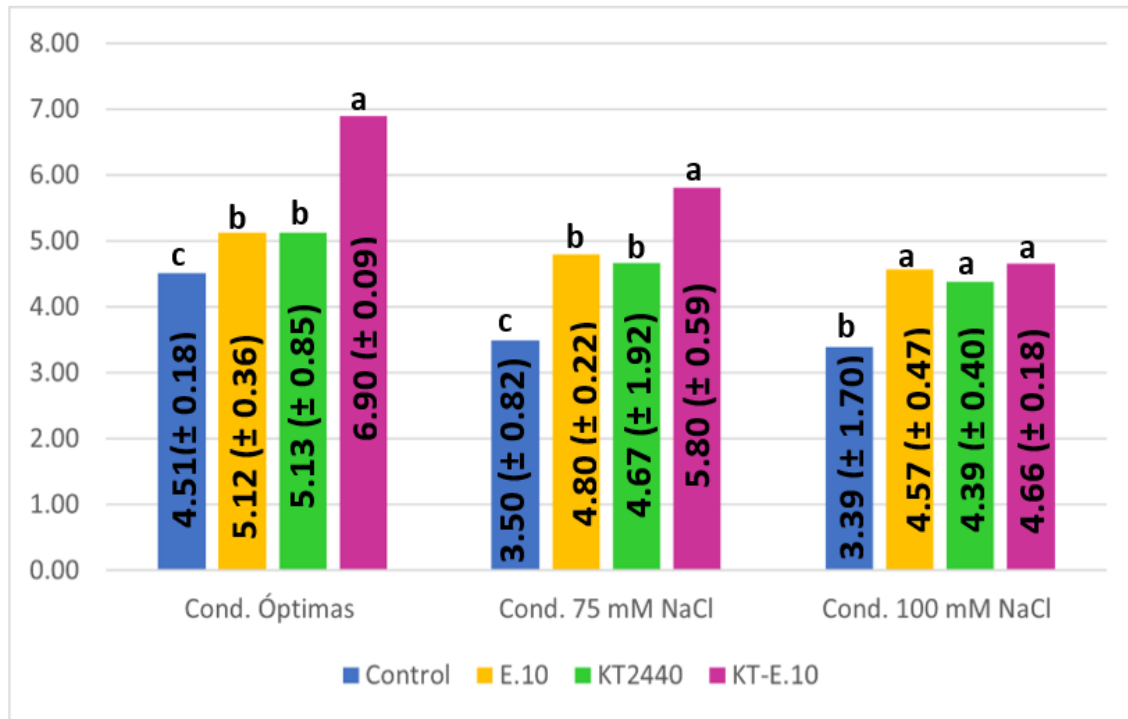


Figura 34. Colonización de la raíz de *Raphanus sativus* L. en condiciones óptimas, de estrés salino a 75 mM y 100 mM a los 60 días después de la siembra inoculadas con PGPR: Control: Sin inoculación; E.10: inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10; KT2440: inoculación con *P. putida*

KT2440 y KT-E.10: Co-inoculación. Medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas. ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis)

DISCUSIÓN

La salinidad es un factor que actúa de manera crítica en las comunidades microbianas en sistemas naturales, afectándolas de forma negativa (Song *et al.*, 2022), sin embargo, existen cepas capaces de sobrevivir a este fenómeno. Como se mostró en este trabajo *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 son bacterias capaces de sobrevivir a distintas concentraciones de NaCl: 1% (0.86mM), 2% (1.7mM) y 4% (3.4mM), similar a lo reportado en el trabajo de Fan y colaboradores (2024), en donde la cepa *P. putida* KT2440 mostró una tolerancia máxima de 4% de NaCl y también creció la bacteria al 5% de NaCl, sin embargo, en esta concentración el crecimiento se retardó hasta las 48 horas (Fan *et al.*, 2024), esto se podría explicar por la capacidad metabólica de esta bacteria que le permite adaptarse a diversas condiciones ambientales, incluyendo al estrés salino (Sánchez-Carrillo y Guerra-Ramírez, 2022). De acuerdo a lo anterior, se podría decir que *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 puedan ser consideradas como posibles bacterias halotolerantes (HT), por lo que en este trabajo se realizó una mono-inoculación y co-inoculación de estas cepas en *R. sativus* L., se encontró que en ambos tipos de inoculación las cepas son capaces de aumentar diversos parámetros morfológicos como el peso seco de la parte aérea, longitud total, número de hojas y la longitud del bulbo tanto en condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino a 75 mM, sin embargo, se encontró que en condiciones óptimas la mono-inoculación con *P. putida* KT2440 actuaba de manera desfavorable en la longitud total de la raíz, el peso fresco y seco de la raíz y el diámetro del bulbo,. Estos resultados son similares a los presentados por Flores-Calvo y colaboradores (2023), en donde se inocularon a las cepas *Pseudomonas* sp. 03 (MW604823), *Pseudomonas* sp. 13 (MW604824) y la cepa *Bordetella* sp. 31 (MW604826) en *R. sativus* L., demostraron que estas cepas pueden promover el crecimiento de las plantas en suelos con concentraciones de NaCl ($CE=6.89 \text{ dSm}^{-1}$), aumentando de manera significativa el número de hojas, raíces y el peso total de la biomasa, no obstante, al analizar el número de raíces y peso de la biomasa se encontró que la

cepa *Bordetella* sp. 31 (MW604826) causó un efecto negativo en la raíz y el peso de la biomasa en el suelo que no tenía concentraciones de NaCl.

Como se mencionó anteriormente, la inoculación con la cepa *P. putida* KT2440 en condiciones óptimas afectaba ciertos parámetros, sin embargo, en condiciones de estrés salino a 75 mM incrementó la longitud total de la raíz y la longitud total de la planta, a diferencia de las plantas inoculadas con esta cepa en condiciones óptimas que presentaron una disminución de estos parámetros. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Costa-Gutierrez y colaboradores (2020), en donde la inoculación con *P. putida* KT2440 mejoró de manera significativa la germinación de las semillas soja y maíz, así como la longitud de la raíz y el tallo de las plantas en condiciones de estrés salino, en comparación a las plantas que se cultivaron en condiciones óptimas, esto fortalece que *P. putida* KT2440 es una gran candidata para utilizarse en suelos afectados por la salinidad y así aumentar la producción agrícola. Lo anterior se podría sustentar por la capacidad de *P. putida* KT2440 para producir compuestos indólicos, sintetizar sideróforos y solubilizar fosfato (Costa-Gutierrez *et al.*, 2020). Por otro lado, *Pseudomonas* sp. EpiPf10 mostró que tanto en condiciones óptimas y de estrés salino a 75 mM puede promover el crecimiento vegetal en casi todos los parámetros morfológicos evaluados en este trabajo, esto podría deberse a que de manera general la cepa es capaz de producir algún agente protector contra la salinidad como la producción de fitohormonas (Flores-Calvo *et al.*, 2023), la fijación de nitrógeno o la solubilización de fosfato (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2022).

Es importante mencionar que en este trabajo la co-inoculación de las cepas *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 aumentaron de manera significativa la altura total, altura de la parte foliar y el peso seco de la biomasa del bulbo en condiciones óptimas, lo cual demuestra que la co-inoculación puede resultar beneficiosa debido a que se potencian las capacidades metabólicas de la planta, como se muestra en el trabajo presentado por Pellegrini y colaboradores (2021), en donde la inoculación en consorcio de las cepas *Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* y *Burkholderia ambifaria* en *Allium cepa* L.(cebolla), mostraron una mayor altura total, biomasa

seca de la parte aérea y del bulbo respecto al grupo control, indicando que la inoculación en consorcio puede beneficiar en el crecimiento y desarrollo de las plantas, esto podría deberse a que las cepas son capaces de producir ácido indolacético en diferentes concentraciones y fijar nitrógeno (Wahyudi *et al.*, 2019), al mismo tiempo que puede aumentar la absorción de macro y micronutrientes tales como el fósforo y los compuestos fenólicos (Pellegrini *et al.*, 2021), otorgándole mayores recursos a la planta y por ende una mejora en su estructura morfológica. Por otro lado, Kumawat y colaboradores (2021), encontraron que la co-inoculación de *Rhizobium* sp. LSMR-32 y *Enterococcus mundtii* LSMRS-3 mejora de manera significativa la altura total de la planta, el peso seco de la raíz y el peso seco de la parte aérea en el frijol mungo de primavera en condiciones de estrés salino (CE= 8 dS m⁻¹), a diferencia de la mono-inoculación de las cepas antes mencionadas y del grupo control, estos resultados demuestran que la co-inoculación genera mayores beneficios a la planta en comparación a la mono-inoculación, como observamos en este trabajo, en donde la co-inoculación de las cepas *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 en condiciones de estrés salino a 75 mM aumentó el peso seco de las hojas, la altura total de la planta y el peso seco de la raíz, en condiciones de 100 mM solo aumentó la longitud total de las plantas. Nuestros resultados mostraron que la co-inoculación de *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 pueden favorecer de manera significativa la sobrevivencia y el crecimiento de *R. sativus* L., en condiciones de estrés salino a 75 mM, sin embargo, en condiciones de estrés salino a 100 mM se observa una disminución en la gran mayoría de los parámetros morfométricos (exceptuando la longitud del bulbo, la longitud total de la raíz, el número de hojas, la longitud total de la planta y de la parte aérea), esto podría deberse a que de manera convencional *R. sativus* L. es una planta que no tolera altas concentraciones de sal (Acevedo, 2007).

La clorofila es un componente esencial que está estrechamente relacionado con la fotosíntesis (Wang *et al.*, 2015), ya que captura la energía de la luz para poder impulsar este proceso, su contenido puede afectar la actividad fotosintética, y por lo tanto el rendimiento del cultivo (Jin *et al.*, 2023).

En este trabajo, al evaluar la actividad fotosintética (Clorofila A, B y Total) en *R. sativus* L., se reportó una tendencia similar en las condiciones óptimas y en condiciones de estrés salino a 75 mM, siendo el tratamiento control el que presentaba una mayor concentración de clorofila A, B y Total. En el caso de las condiciones de estrés salino a 100 mM se observó un aumento en la clorofila B en el tratamiento de la co-inoculación.

Negi y colaboradores, (2022), reportaron que la inoculación en consorcio de las cepas *Rahnella* sp. EU-A3SNfb, *Bacillus tropicus* EU-ARP-44 y *B. megaterium* EU-ARK-23 en *Aegilops kotschy* y el trigo, aumentaron el contenido de la clorofila en ambas plantas con respecto al control, así mismo, Pellegrini y colaboradores, (2021), mostraron que la inoculación en consorcio de las cepas *Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* y *Burkholderia ambifaria*, en *Allium cepa* L., aumentó de manera significativa el contenido de clorofila en comparación con el control. Es importante mencionar que ambos experimentos se llevaron a cabo en condiciones óptimas, es decir, las plantas utilizadas para cada experimento no fueron sometidas a ningún tipo de estrés. Estos resultados, sugieren que la inoculación en consorcio de distintas cepas aumenta el contenido de clorofila de la planta, sin embargo, al compararlos con nuestros resultados observamos una discrepancia.

Por otro lado, Khan y colaboradores (2022), reportaron que la inoculación en consorcio de las cepas *Ensifer adhaerens* BK.30, *Pseudomonas fluorescens* SN5 y *Bacillus megaterium* SN15 en el trigo, aumentó la concentración de clorofila total en función del incremento de la salinidad (2.1, 6. 12 y 18 dSm⁻¹), estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo, pues se observó que en las condiciones de estrés salino a 100 mM, el contenido de la clorofila B fue mayor en la co-inoculación, y el contenido de la clorofila A y Total, fue similar para todos los tratamientos, a diferencia de las condiciones óptimas y condiciones de estrés salino a 75 mM, que como ya se describió anteriormente, fue el grupo control quien presentó mayor contenido de clorofila. Esto podría deberse a que la planta al estar en un ambiente de estrés envía todos los recursos a las hojas, afectando así a las demás partes de la planta, en este caso al bulbo, ya que al comparar el número de

hojas y la longitud foliar en cada una de las condiciones (óptimas y de estrés salino a 75 y 100 mM) observamos diferencias mínimas para cada tratamiento en cada condición, sin embargo, al evaluar el diámetro del bulbo, se observa que al aumentar la concentración de NaCl hay una disminución en este parámetro, así como en el peso fresco y seco de esta.

En este trabajo se observó una diferencia significativa en la actividad enzimática de la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), en la actividad de la CAT se obtuvo una mayor actividad enzimática en las plantas co-inoculadas con respecto a las plantas control y a los tratamientos con mono-inoculación en la condición de 100 mM, similar a lo obtenido por Kumawat y colaboradores (2021), en donde la co-inoculación de *Rhizobium* sp. LSMR-32 y *Enterococcus mundtii* LSMRS-3 en el frijol mungo de primavera en condiciones de estrés salino ($CE=8dSm^{-1}$) aumentó de manera significativa la actividad enzimática de la CAT a diferencia de las inoculaciones individuales del frijol mungo de primavera. En contraste, la co-inoculación en el frijol mungo de primavera aumento la actividad enzimática de la SOD, este resultado es diferente en comparación a lo que observamos en este trabajo, en donde la mono-inoculación con *Pseudomonas* sp. EpiPf10 presentó la mayor actividad enzimática de la SOD a diferencia de la co-inoculación, de la misma manera, se encontró que la co-inoculación de las cepas *Klebsiella* sp. 8LJA y *Klebsiella* 27IJA en *Parastrephia quadrangularis* aumentó la actividad enzimática de la SOD en hojas y raíces en diferentes concentraciones de NaCl (0.25 M y 0.45 M), sin embargo, en condiciones de estrés salino a 0.45 M la mono-inoculación con *Klebsiella* 8LJA presentó una mayor actividad enzimática de la SOD respecto a la co-inoculación, similar a lo obtenido en este trabajo, en donde la inoculación de una sola cepa (*Pseudomonas* sp. EpiPf10) aumentó la SOD a diferencia de la co-inoculación.

Por otro lado, Abulfaraj y colaboradores (2021), mostraron que la mono-inoculación de la cepa *Pseudomonas fluorescens* (M1) aumentó la actividad enzimática de la CAT en el cultivar Crawford de soja (*Glycine max* L.) a medida que se aumentaba la concentración de NaCl (200 mM y 400 mM), a diferencia de los otros aislados (*Pseudomonas putida* (M2) y *Bacillus subtilis* (M3)).

Al evaluar en este trabajo la colonización de la raíz en *R. sativus* L. se encontró que al aumentar la concentración de NaCl la interacción de las bacterias a la raíz de la hortaliza disminuyó, similar a lo reportado por Zheng y colaboradores (2024), en donde la inoculación con *Pseudomonas frederiksbergensis* YE1 y *Pseudomonas stutzeri* XN05-1 en la soja silvestre (*Glycine soja*) presentó una población bacteriana similar en ambas concentraciones 100 y 200 mM de NaCl, sin embargo, al someter a la soja silvestre a una concentración de 300 mM de NaCl hubo una notable disminución, esto podría deberse a que al aumentar la concentración de NaCl se ve limitado el reclutamiento de las especies microbianas (Zheng *et al.*, 2024). De la misma manera Yang y colaboradores (2020) reportaron que la inoculación de *Burkholderia phytofirmans* PsJN en la quinoa mostró una menor colonización en la raíz al estar expuesta a una concentración de NaCl a 400 mM, siendo 2.3 veces menor a el grupo control.

De acuerdo a lo anterior y a los resultados obtenidos en este trabajo, la capacidad de colonización de las bacterias a la raíz está ligado a la promoción de crecimiento de la planta, es decir, al aumentar la concentración de NaCl hay una disminución de la colonización de las bacterias en la raíz y por ende hay una disminución en los parámetros morfométricos de la planta.

Con base a los resultados obtenidos en este trabajo, la co-inoculación de las cepas *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y *P. putida* KT2440 en *R. sativus* L. en condiciones de crecimiento óptimo y en un ambiente de estrés salino a 75 mM, son una alternativa para proteger a la planta de la salinidad y promover el crecimiento de esta hortaliza.

CONCLUSIÓN

Las cepas *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 se les puede considerar como HT-PGPR en co-inoculación en *Raphanus sativus* L. ya que promovieron el crecimiento vegetal y a su vez propiciaron la tolerancia de la planta al estrés salino a una concentración de 75 mM.

Se observó que la inoculación independiente de *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 en *R. sativus* L. incrementaron el crecimiento vegetal en condiciones

salinas (75 mM), a diferencia de la inoculación de estas cepas en las plantas cultivadas en condiciones óptimas.

La mono-inoculación de *Pseudomonas* sp. EpiPf10 y en consorcio estimulan la tolerancia de la planta en un ambiente salino, mediante el incremento de las enzimas antioxidantes.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la resistencia de *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 frente a otros tipos de estrés como la presencia de metales pesados y la sequía.
- Identificar las enzimas y metabolitos que utiliza *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 para tolerar el estrés salino.
- Identificar los genes de *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. EpiPf10 que se expresan en estrés salino.
- Identificar que factores intervienen en el aumento de la clorofila al aumentar la concentración de NaCl.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abulfaraj, A. A., & Jalal, R. S. (2021). Use of plant growth-promoting bacteria to enhance salinity stress in soybean (*Glycine max* L.) plants. *Saudi journal of biological sciences*, 28(7), 3823–3834. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.053>
2. Acevedo, E. (2007). Salinidad. Laboratorio de relación suelo-planta-agua (SAP). Chile.
3. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*. 105, 121-126.
4. Aguado-Santacruz, Gerardo A., Moreno-Gómez, Blanca, Jiménez-Francisco, Betzaida, García-Moya, Edmundo, & Preciado-Ortiz, Ricardo E.. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), 9-21
5. Alcántara-Cortés, Johan Steven, Acero Godoy, Jovanna, Alcántara Cortés, Jonathan David, & Sánchez Mora, Ruth Melida. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nueva*, 17 (32), 109-129. Recuperado el 22 de agosto de 2024, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109&lng=en&tlng=es.
6. Ali, B., Wang, X., Saleem, M. H., Sumaira, Hafeez, A., Afridi, M. S., Khan, S., Zaib-Un-Nisa, Ullah, I., Amaral Júnior, A. T. D., Alatawi, A., & Ali, S. (2022). PGPR-Mediated Salt Tolerance in Maize by Modulating Plant Physiology, Antioxidant Defense, Compatible Solutes Accumulation and Bio-Surfactant Producing Genes. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(3), 345. <https://doi.org/10.3390/plants11030345>
7. Arora, A., Sairam, R. K., & Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82(10), 1227–1238. <http://www.jstor.org/stable/24107045>

8. Asada K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology*, 141(2), 391–396. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>
9. Balogh, B., Jones J.B., Iriarte, F., Momol, M. (2010) Phage therapy for plant disease control. *Curr Pharm Biotechnol* 11:48–57
10. Banihani S. A. (2017). Radish (*Raphanus sativus*) and Diabetes. *Nutrients*, 9(9), 1014. <https://doi.org/10.3390/nu9091014>
11. Bashir, K., Matsui, A., Rasheed, S., & Seki, M. (2019). Recent advances in the characterization of plant transcriptomes in response to drought, salinity, heat, and cold stress. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-658. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18424.1>
12. Belimov A.A., Safronova V.I., Sergeyeva T.A., Egorova T.N., Matveyeva V.A., & Tsyganov V.E. (2001). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase.
13. Beltrán, P. E. M. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113.
14. Birch, P.R.J. and Kamoun, S. (2000) Studying interaction transcriptomes: analyses of gene expression during plant–microorganisms interactions. Trends in Plant Science. Supplement: Life Science Research in the 21st Century: a Trends Guide. pp. 77–82.
15. Bittner, A., Cieřla, A., Gruden, K., Lukan, T., Mahmud, S., Teige, M., Vothknecht, U. C., & Wurzing, B. (2022). Organelles and phytohormones: a network of interactions in plant stress responses. *Journal of experimental botany*, 73(21), 7165–7181. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac384>
16. Bottini, R., Cassán, F., & Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(5), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1696-1>
17. Boyd, E. S., & Peters, J. W. (2013). New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Frontiers in microbiology*, 4, 201. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00201>
18. Boyd, P & Ellwood, M. (2010). The biogeochemical cycle of iron in the ocean. *Nature Geosci* 3, 675–682. <https://doi.org/10.1038/ngeo964>
19. Brennerova, M. V., Josefiowa, J., Brenner, V., Pieper, D. H., & Junca, H. (2009). Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. *Environmental microbiology*, 11(9), 2216–2227. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01943.x>
20. Calvo, J. & Martínez-Martínez. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos
21. Casanova-Sáez, R., Mateo-Bonmatí, E., & Ljung, K. (2021). Auxin Metabolism in Plants. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 13(3), a039867. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039867>
22. Corral-Lugo, A., Morales-García, Y., Pazos-Rojas, L.A., Ramírez-Valverde, A., Contreras, R. & Muñoz-Rojas, J. (2012). Quantification of cultivable bacteria by the “Massive Stamping Drop Plate” method. *Revista Colombiana de Biotecnología*. XIV. 147-156.
23. Costa-Gutierrez, S. B., Lami, M. J., Santo, M. C. C., Zenoff, A. M., Vincent, P. A., Molina-Henares, M. A., Espinosa-Urgel, M., & de Cristóbal, R. E. (2020). Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: role of *eptA*. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(10), 4577–4592. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10516-z>
24. Cui, G., Xiao, X., Zhang, W., Lang, D., Li, Z., & Zhang, X. (2021). Exogenous silicon relieve drought stress and salt stress of *Glycyrrhiza uralensis* seedlings by regulating

- proline metabolism and nitrogen assimilation. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 96(6), 728–737. <https://doi.org/10.1080/14620316.2021.1921624>
25. Des Marais D.L & Juenger, T.L. (2010) Pleiotropy, plasticity, and the evolution of plant abiotic stress tolerance.
 26. Diacono, M., and Montemurro, F. (2015). Effectiveness of organic wastes as fertilizers and amendments in salt-affected soils. *Agriculture* 5, 221–230. doi: 10.3390/agriculture5020221
 27. Egamberdieva, D., Jabborova, D., & Hashem, A. (2015). *Pseudomonas* induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. *Saudi journal of biological sciences*, 22(6), 773–779. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.019>
 28. Egamberdieva, D., Wirth, S., Alqarawi, A. A., & Abd Allah, E. F. (2015). Salt tolerant *Methylobacterium mesophilicum* showed viable colonization abilities in the plant rhizosphere. *Saudi journal of biological sciences*, 22(5), 585–590. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.029>
 29. 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02791>
 30. Elhaissofi, W., Khourchi, S., Ibnyasser, A., Ghoulam, C., Rchiad, Z., Zeroual, Y., Lyamlouli, K., & Bargaz, A. (2020). Phosphate Solubilizing Rhizobacteria Could Have a Stronger Influence on Wheat Root Traits and Aboveground Physiology Than Rhizosphere P Solubilization. *Frontiers in plant science*, 11, 979. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00979>
 31. Elshafei, A. M. (2020). When oxygen can be toxic? A mini review. *Journal of Applied Life Sciences International*, 15, 1-9.
 32. Emerson, D., Roden, E., & Twining, B. S. (2012). The microbial ferrous wheel: iron cycling in terrestrial, freshwater, and marine environments. *Frontiers in microbiology*, 3, 383. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00383>
 33. Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R. y Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3), 251-258.
 34. Fan D., Schwinghamer T., & Smith DL. (2018) Isolation and diversity of culturable rhizobacteria associated with economically important crops and uncultivated plants in Québec, Canada. *Syst Appl Microbiol*.
 35. Fan, M., Tan, S., Wang, W., & Zhang, X. (2024). Improvement in Salt Tolerance Ability of *Pseudomonas putida* KT2440. *Biology*, 13(6), 404. <https://doi.org/10.3390/biology13060404>
 36. Flores-Clavo, R., Valladolid-Suyón, E., Reinoza-Farroñan, K., Asmat Ortega, C., Riboldi Monteiro, P. H., Apaza-Castillo, G. A., Zuñiga-Valdera, G., Fantinatti Garboggini, F., Iglesias-Osores, S., & Carreño-Farfán, C. R. (2023). Rhizobacterial Isolates from *Prosopis limensis* Promote the Growth of *Raphanus sativus* L. Under Salt Stress. *Current microbiology*, 80(8), 269. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03379-w>
 37. Frampton, R.A., Pitman, A.R., Fineran P.C. (2012). Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *Int J Microbiol*.
 38. Fridovich I. (1975). Superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, 44, 147–159. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.44.070175.001051>
 39. Fukami, J., de la Osa, C., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2018). Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Functional plant biology: FPB*, 45(3), 328–339. <https://doi.org/10.1071/FP17167>

40. Ghimire, S., Adhikari, B., Pandey, S., Belbase, K., Lamichhane, S., & Pathak, R. (2020). Effect of different organic manure on growth and yield of radish in Deukhuri, Dang, Nepal. *Acta Sci. Agric*, 4, 1-5.
41. Glick B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
42. Gomes, G. L. B., & Scortecci, K. C. (2021). Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 23(6), 894–904. <https://doi.org/10.1111/plb.13303>
43. Govindasamy, C., Arulpriya, M., Ruban, P., Francisca, J.L. and Ilayaraja, A. (2011) Concentration of Heavy Metals in Seagrasses Tissue of the Palk Strait, Bay of Bengal. *International Journal of Environmental Sciences*, 2, 145-153. <https://doi.org/10.11594/jtls.02.01.01>
44. Goyal, M. M., & Basak, A. (2010). Human catalase: looking for complete identity. *Protein & cell*, 1(10), 888–897. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0113-z>
45. Groß, F., Durner, J., & Gaupels, F. (2013). Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in plant science*, 4, 419. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00419>
46. Gupta A., Meyer J. M., Goel R. (2002). Development of heavy metal-resistant mutants of phosphate solubilizing *Pseudomonas* sp. NBRI 4014 and their characterization. *Curr. Microbiol.* 45, 323–327. [10.1007/s00284-002-3762-1](https://doi.org/10.1007/s00284-002-3762-1)
47. Gupta, S., Pandey, S., Kotra, V., & Kumar, A. (2023). Assessing the role of ACC deaminase-producing bacteria in alleviating salinity stress and enhancing zinc uptake in plants by altering the root architecture of French bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Planta*, 258(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04159-3>
48. Gutiérrez, R. M., & Perez, R. L. (2004). *Raphanus sativus* (Radish): their chemistry and biology. *TheScientificWorldJournal*, 4, 811–837. <https://doi.org/10.1100/tsw.2004.131>
49. Hara M., Torazawa D., Asai T., Takahashi I. (2011). Variations in the soluble sugar and organic acid contents in radish (*Raphanus sativus* L.) cultivars. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46, 2387–2392. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02761.x
50. Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>
51. Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Parvin, K., Bhuiyan, T. F., Anee, T. I., Nahar, K., Hossen, M. S., Zulfiqar, F., Alam, M. M., & Fujita, M. (2020). Regulation of ROS Metabolism in Plants under Environmental Stress: A Review of Recent Experimental Evidence. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8695. <https://doi.org/10.3390/ijms21228695>
52. Hernández J. A. (2019). Salinity Tolerance in Plants: Trends and Perspectives. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2408. <https://doi.org/10.3390/ijms20102408>
53. Hernández-Villaseñor, R. (2024). Cultivo de Rábano: Guía Práctica de Siembra
54. Hiscox JD. & Israelstam, GF. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany* 57: 1332-1334
55. Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S. M., Qian, P., Xin, W., Li, H. Y., Burritt, D. J., Fujita, M., & Tran, L. S. (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in plant science*, 6, 420. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00420>
56. Infoagro. (2018). En 2017, México exportó 37 mil 571 toneladas de rábano. <https://mexico.infoagro.com/en-2017-mexico-exporto-37-mil-571-toneladas-de-rabano/>

57. Iqbal, M. y Ashraf, M. (2013). Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: Growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis. *Environmental and Experimental Botany*, 86, 76-85.
58. Javed, M. & Athar, H.R. (2021). Photosynthetic acclamatory response of *Panicum antidotale* Retz. populations to root zone desiccation stress. *Brazilian Journal of Biology*.
59. Jha, B., Gontia, I. & Hartmann, A. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. *Plant Soil* 356, 265–277 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0877-9>
60. Jin, Y., Li, D., Liu, M., Cui, Z., Sun, D., Li, C., Zhang, A., Cao, H., & Ruan, Y. (2023). Genome-Wide Association Study Identified Novel SNPs Associated with Chlorophyll Content in Maize. *Genes*, 14(5), 1010. <https://doi.org/10.3390/genes14051010>
61. Kang, S. M., Shahzad, R., Bilal, S., Khan, A. L., Park, Y. G., Lee, K. E., Asaf, S., Khan, M. A., & Lee, I. J. (2019). Indole-3-acetic-acid and ACC deaminase producing *Leclercia adecarboxylata* MO1 improves *Solanum lycopersicum* L. growth and salinity stress tolerance by endogenous secondary metabolites regulation. *BMC microbiology*, 19(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1450-6>
62. Keswani, C., Singh, S. P., Cueto, L., García-Estrada, C., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., Singh, S. P., Blázquez, M. A., & Sansinenea, E. (2020). Auxins of microbial origin and their use in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(20), 8549–8565. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10890-8>
63. Khan, M. Y., Nadeem, S. M., Sohaib, M., Waqas, M. R., Alotaibi, F., Ali, L., Zahir, Z. A., & Al-Barakah, F. N. I. (2022). Potential of plant growth promoting bacterial consortium for improving the growth and yield of wheat under saline conditions. *Frontiers in microbiology*, 13, 958522. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.958522>
64. Khattak K.F. (2011). Nutrient composition, phenolic content and free radical scavenging activity of some uncommon vegetables of Pakistan. *Pak. J. Pharm.*
65. Kim K., Jang Y. J., Lee S. M., Oh B. T., Chae J. C., Lee K. J. (2014). Alleviation of salt stress by *Enterobacter* sp. EJ01 in tomato and *Arabidopsis* is accompanied by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants. *Mol. Cells* 37, 109. [10.14348/molcells.2014.2239](https://doi.org/10.14348/molcells.2014.2239)
66. Kramer, J., Özkaya, Ö., & Kümmerli, R. (2020). Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 18(3), 152–163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>
67. Kumar, V., Raghuvanshi, N., Pandey, A.K., Kumar, A., Thoday-Kennedy, E. & Kant, S. (2023). "Role of Halotolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Mitigating Salinity Stress: Recent Advances and Possibilities" *Agriculture* 13, no. 1: 168. <https://doi.org/10.3390/agriculture13010168>
68. Kumawat, K. C., Sharma, P., Nagpal, S., Gupta, R. K., Sirari, A., Nair, R. M., Bindumadhava, H., & Singh, S. (2021). Dual Microbial Inoculation, a Game Changer? - Bacterial Biostimulants With Multifunctional Growth Promoting Traits to Mitigate Salinity Stress in Spring Mungbean. *Frontiers in microbiology*, 11, 600576. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.600576>
69. Lamz-Piedra, A. & González-Cepero, M.C. (2013). La salinidad como problema en la agricultura: la mejora vegetal una solución inmediata. *Cultivos Tropicales*, 34(4), 31-42.
70. Lang D, Yu X, Jia X, Li Z, Zhang X. (2020). Methyl jasmonate improves metabolism and growth of NaCl-stressed *Glycyrrhiza uralensis* seedlings. *Sci Horti*; 266:109287. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109287.
71. Leyser O. (2018). Auxin Signaling. *Plant physiology*, 176(1), 465–479. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00765>
72. Li, Z., Lee, H. W., Liang, X., Liang, D., Wang, Q., Huang, D., & Ong, C. N. (2018). Profiling of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of 12 Cruciferous

- Vegetables. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(5), 1139. <https://doi.org/10.3390/molecules23051139>
73. Lim J. H., Kim S. D. (2013). Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper. *Plant Pathol. J.* 29, 201. 10.5423/PPJ.SI.02.2013.0021
 74. Liu, G., Greenshields, D. L., Sammynaiken, R., Hirji, R. N., Selvaraj, G., Wei, Y. 2007. Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses. *Journal of Cell Science*, 120(4), 596-605. doi: 10.1242/jcs.001362
 75. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275.
 76. Lu, T., Ke, M., Lavoie, M., Jin, Y., Fan, X., Zhang, Z., Fu, Z., Sun, L., Gillings, M., Peñuelas, J., Qian, H., & Zhu, Y. G. (2018). Rhizosphere microorganisms can influence the timing of plant flowering. *Microbiome*, 6(1), 231. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0615-0>
 77. Mahaseth, T., & Kuzminov, A. (2017). Potentiation of hydrogen peroxide toxicity: From catalase inhibition to stable DNA-iron complexes. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 773, 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.08.006>
 78. Medić, A. B., & Karadžić, I. M. (2022). Pseudomonas in environmental bioremediation of hydrocarbons and phenolic compounds- key catabolic degradation enzymes and new analytical platforms for comprehensive investigation. *World journal of microbiology & biotechnology*, 38(10), 165. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03349-7>
 79. Mező, E., Hartmann-Balogh, F., Madarász né Horváth, I., Bufa, A., Marosvölgyi, T., Kocsis, B., & Makszin, L. (2022). Effect of Culture Conditions on Fatty Acid Profiles of Bacteria and Lipopolysaccharides of the Genus *Pseudomonas*-GC-MS Analysis on Ionic Liquid-Based Column. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(20), 6930. <https://doi.org/10.3390/molecules27206930>
 80. Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of experimental botany*, 61(15), 4197–4220. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq282>
 81. Mielko, K. A., Jabłoński, S. J., Milczewska, J., Sands, D., Łukaszewicz, M., & Młynarz, P. (2019). Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World journal of microbiology & biotechnology*, 35(11), 178. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2739-1>
 82. Minami, M. & Yoshikawa, H. (1979). A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use.
 83. Mishra, P., Mishra, J., & Arora, N. K. (2021). Plant growth promoting bacteria for combating salinity stress in plants - Recent developments and prospects: A review. *Microbiological research*, 252, 126861. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126861>
 84. Molina-Romero D, Baez A, QuinteroHernández V, Castañeda-Lucio M, Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales MdR, et al. (2017) Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. *PLoS ONE* 12(11).
 85. Moreno Reséndez, A., Carda Mendoza, V., Reyes Carrillo, J.L., Vásquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20 (1), 68-83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
 86. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111736>

87. Nadarajah K. K. (2020). ROS Homeostasis in Abiotic Stress Tolerance in Plants. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5208. <https://doi.org/10.3390/ijms21155208>
88. Narrillos Rodríguez, E. (2014). Estudio de sideróforos procedentes de bacterias patógenas de peces de acuicultura. Tesis de licenciatura en Química. Universidade da Coruña. 76 pp
89. Nascimento, F. X., Urón, P., Glick, B. R., Giachini, A., & Rossi, M. J. (2021). Genomic Analysis of the 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase-Producing *Pseudomonas thivervalensis* SC5 Reveals Its Multifaceted Roles in Soil and in Beneficial Interactions With Plants. *Frontiers in microbiology*, 12, 752288. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.752288>
90. Negi, R., Kaur, T., Devi, R., Kour, D., & Yadav, A. N. (2022). Assessment of nitrogen-fixing endophytic and mineral solubilizing rhizospheric bacteria as multifunctional microbial consortium for growth promotion of wheat and wild wheat relative *Aegilops kotschy*. *Heliyon*, 8(12), e12579. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12579>
91. Niu D. D., Liu H. X., Jiang C. H., Wang Y. P., Wang Q. Y., Jin H. L., et al.. (2011). The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate-and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 533–542. 10.1094/MPMI-09-10-0213
92. Oh, S. J., Moon, K. H., Song, E. Y., Wi, S. H., & Koh, S. C. (2019). Photosynthesis, Productivity, and Mineral Content of Winter Radishes by Soil Type on Jeju Island. *Horticultural Science and Technology*, 37(2), 167-177. doi:10.12972/kjhst.20190017
93. Oliva, G., Di Stasio, L., Vigliotta, G., Guarino, F., Cikatelli, A., & Castiglione, S. (2023). Exploring the Potential of Four Novel Halotolerant Bacterial Strains as Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) under Saline Conditions. *Applied Sciences*, 13(7), 4320. <https://doi.org/10.3390/app13074320>
94. Orozco-Mosqueda, M. D. C., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2020). ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological research*, 235, 126439. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126439>
95. Pan, L., Luo, Y., Wang, J., Li, X., Tang, B., Yang, H., Hou, X., Liu, F., & Zou, X. (2022). Evolution and functional diversification of catalase genes in the green lineage. *BMC genomics*, 23(1), 411. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08621-6>
96. Papi, A., Orlandi, M., Bartolini, G., Barillari, J., Iori, R., Paolini, M., Ferroni, F., Grazia Fumo, M., Pedulli, G. F., & Valgimigli, L. (2008). Cytotoxic and antioxidant activity of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from *Raphanus sativus* L. (Kaiware Daikon) sprouts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(3), 875–883. <https://doi.org/10.1021/jf073123c>
97. Pastor, N., Masciarelli, O., Fischer, S., Luna, V., & Rovera, M. (2016). Potential of *Pseudomonas putida* PCI2 for the Protection of Tomato Plants Against Fungal Pathogens. *Current microbiology*, 73(3), 346–353. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1068-y>
98. Pellegrini, M., Spera, D. M., Ercole, C., & Del Gallo, M. (2021). *Allium cepa* L. Inoculation with a Consortium of Plant Growth-Promoting Bacteria: Effects on Plants, Soil, and the Autochthonous Microbial Community. *Microorganisms*, 9(3), 639. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030639>
99. Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2008). Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(5), 904-910.

100. Pérez-Rodríguez, M. M., Pontin, M., Piccoli, P., Lobato Ureche, M. A., Gordillo, M. G., Funes-Pinter, I., & Cohen, A. C. (2022). Halotolerant native bacteria *Enterobacter* 64S1 and *Pseudomonas* 42P4 alleviate saline stress in tomato plants. *Physiologia plantarum*, 174(4), e13742. <https://doi.org/10.1111/ppl.13742>
101. Prasannakumar S. P., Gowtham H. G., Hariprasad P., Shivaprasad K., Niranjana S. R. (2015). Delftiatsuruhatensis WGR-UOM-BT1, a novel rhizobacterium with PGPR properties from *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz also suppresses fungal phytopathogens by producing a new antibiotic—AMTM. *Lett. Appl. Microbiol.* 61, 460–468. 10.1111/lam.12479
102. Ramírez-Pisco, R. & Pérez-Arenas, M. I. (2006). Evaluación del potencial de los biosólidos procedentes del tratamiento de aguas residuales para uso agrícola y su efecto sobre el cultivo de Rábano rojo (*Raphanus sativus* L.). *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 59 (2).
103. Ramos Solano, B., Barriuso, J. and Gutiérrez Mañero, F.J. (2008). Physiological and Molecular Mechanisms of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). In *Plant-Bacteria Interactions*. <https://doi.org/10.1002/9783527621989.ch3>
104. Ricaño-Rodríguez, J., Ricaño-Rodríguez, C., Luis-Yong, D., & Guzmán-López, O. (2023). Primera evidencia de actividad enzimática nitrilasa en *Xylaria* sp., y su relación con la biosíntesis de ácido indol-3-acético [First evidence of nitrilase enzymatic activity of *Xylaria* sp. and its relationship with the biosynthesis of indole-3-acetic acid]. *Revista Argentina de microbiología*, 55(3), 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.01.008>
105. Richardson Alan E. (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology* 28, 897-906.
106. Sakakibara H. (2021). Cytokinin biosynthesis and transport for systemic nitrogen signaling. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 105(2), 421–430. <https://doi.org/10.1111/tpj.15011>
107. Sakhno, L. O., & Slyvets, M. S. (2014). Superoxide dismutase activity in transgenic canola. *TSitologija i genetika*, 48(3), 12–17.
108. Salazar, I & Blanco, H. (2004). Indicadores bacterianos no habituales de la calidad de agua en piscinas. Venezuela. Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, San Juan, 22-27.
109. Sánchez Carrillo, R. and Guerra Ramírez, P. (2022). *Pseudomonas* spp. benéficas en la agricultura. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 13(4), 715-725. Epub 22 de agosto de 2022. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i4.2799>
110. Sanchez-Gonzalez, M. E., Mora-Herrera, M. E., Wong-Villarreal, A., De La Portilla-López, N., Sanchez-Paz, L., Lugo, J., Vaca-Paulín, R., Del Aguila, P., & Yañez-Ocampo, G. (2022). Effect of pH and Carbon Source on Phosphate Solubilization by Bacterial Strains in Pikovskaya Medium. *Microorganisms*, 11(1), 49. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010049>
111. Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere Colonization Determinants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Biology*, 10(6), 475. <https://doi.org/10.3390/biology10060475>
112. Sarabia, O. M., Madrigal, P., Martínez, T. & Carreón, A. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1), 65-71.
113. Sarker, P. K., Karmoker, D., Shohan, M. U. S., Saha, A. K., Rima, F. S., Begum, R. A., Islam, M. R., & Seraj, Z. I. (2023). Effects of multiple halotolerant rhizobacteria on the tolerance, growth, and yield of rice plants under salt stress. *Folia microbiologica*, 68(1), 55–72. <https://doi.org/10.1007/s12223-022-00997-y>
114. Sciarappa, W. J., Simon, J., Govindasamy, R., Kelley, K., Mangan, F., Zhang, S., ... & Orellana, R. (2016). Asian crops overview: Consumer preference and cultivar growth on the east coast of the United States. *HortScience*, 51(11), 1344-1350.

115. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2017). El rábano, aliado de tu hígado y vesícula. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/el-rabano-aliado-de-tu-higado-y-vesicula>
116. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2020). Rábano. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/726314/Rabano.pdf>
117. Senthil Kumar, C. M., Jacob, T. K., Devasahayam, S., Thomas, S., & Geethu, C. (2018). Multifarious plant growth promotion by an entomopathogenic fungus *Lecanicillium psalliotae*. *Microbiological research*, 207, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.01>
118. Seo M.-S., Chung J.-H., Park B.-S., Kim J.S. (2018). Analysis of Sugars Content by Genotypes in 82 Radish (*Raphanus sativus* L.) *Korean J. Plant*
119. Shenoy, V. V., & Kalagudi, G. M. (2005). Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnology advances*, 23(7-8), 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.004>
120. Shetty, P., Gitau, M. M., & Maróti, G. (2019). Salinity Stress Responses Adaptation Mechanisms in Eukaryotic Green Microalgae. *Cells*, 8(12), 1657.
121. Shiraya, T., Mori, T., Maruyama, T., Sasaki, M., Takamatsu, T., Oikawa, K., Itoh, K., Kaneko, K., Ichikawa, H., & Mitsui, T. (2015). Golgi/plastid-type manganese superoxide dismutase involved in heat-stress tolerance during grain filling of rice. *Plant biotechnology journal*, 13(9), 1251–1263. <https://doi.org/10.1111/pbi.12314>
122. Singh 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02791>
123. Singh, R., Parihar, P., Singh, S., Mishra, R. K., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2017). Reactive oxygen species signaling and stomatal movement: Current updates and future perspectives. *Redox biology*, 11, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.006>
124. Sitaraman R. (2015). *Pseudomonas* spp. as models for plant-microbe interactions. *Frontiers in plant science*, 6, 787. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00787>
125. Song, T., Liang, Q., Du, Z., Wang, X., Chen, G., Du, Z., & Mu, D. (2022). Salinity Gradient Controls Microbial Community Structure and Assembly in Coastal Solar Salterns. *Genes*, 13(2), 385. <https://doi.org/10.3390/genes13020385>
126. Stokstad E. The nitrogen fix. *Science*. 2016;353:1225–1227. doi: 10.1126/science.353.6305.1225.
127. Sunita, K., Mishra, I., Mishra, J., Prakash, J., & Arora, N. K. (2020). Secondary Metabolites From Halotolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Ameliorating Salinity Stress in Plants. *Frontiers in microbiology*, 11, 567768. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.567768>
128. Takehara, S., Ueguchi-Tanaka, M. (2018). Gibberellin. In: Hejálko, J., Hakoshima, T. (eds) *Plant Structural Biology: Hormonal Regulations*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91352-0_6
129. Tank, N. and Saraf, M. (2010). Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants. *Journal of Plant Interactions*. 5(1):51-58
130. Thorpe, G. W., Reodica, M., Davies, M. J., Heeren, G., Jarolim, S., Pillay, B., Breitenbach, M., Higgins, V. J., & Dawes, I. W. (2013). Superoxide radicals have a protective role during H₂O₂ stress. *Molecular biology of the cell*, 24(18), 2876–2884. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-01-0052>
131. Van De Velde, K., Ruelens, P., Geuten, K., Rohde, A., & Van Der Straeten, D. (2017). Exploiting DELLA Signaling in Cereals. *Trends in plant science*, 22(10), 880–893. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.07.010>

132. van Zelm, E., Zhang, Y., & Testerink, C. (2020). Salt Tolerance Mechanisms of Plants. *Annual review of plant biology*, 71, 403–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100005>
133. Vester, B. and Douthwaite, S. (2001). Minireview. Macrolide resistance Conferred by Base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother*. 45(1):1-12.
134. Wahyudi, A. T., Priyanto, J. A., Afrista, R., Kurniati, D., Astuti, R. I., & Akhdiya, A. (2019). Plant growth promoting activity of actinomycetes isolated from soybean rhizosphere. *Online J. Biol. Sci*, 19, 1-8.
135. Wang, Q. J., Sun, H., Dong, Q. L., Sun, T. Y., Jin, Z. X., Hao, Y. J., & Yao, Y. X. (2016). The enhancement of tolerance to salt and cold stresses by modifying the redox state and salicylic acid content via the cytosolic malate dehydrogenase gene in transgenic apple plants. *Plant biotechnology journal*, 14(10), 1986–1997. <https://doi.org/10.1111/pbi.12556>
136. Wang, Q., Xie, W., Xing, H., Yan, J., Meng, X., Li, X., Fu, X., Xu, J., Lian, X., Yu, S., Xing, Y., & Wang, G. (2015). Genetic Architecture of Natural Variation in Rice Chlorophyll Content Revealed by a Genome-Wide Association Study. *Molecular plant*, 8(6), 946–957. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.02.014>
137. Wang, W., Xia, M. X., Chen, J., Yuan, R., Deng, F. N., & Shen, F. F. (2016). Gene Expression Characteristics and Regulation Mechanisms of Superoxide Dismutase and Its Physiological Roles in Plants under Stress. *Biochemistry. Biokhimiia*, 81(5), 465–480. <https://doi.org/10.1134/S0006297916050047>
138. Willey .J, Sherwood & Woolverton C.J. (2013). Prescott's Microbiology. ISBN: 978-0073402406
139. Xie, X., He, Z., Chen, N., Tang, Z., Wang, Q., & Cai, Y. (2019). The Roles of Environmental Factors in Regulation of Oxidative Stress in Plant. *BioMed research international*, 2019, 9732325. <https://doi.org/10.1155/2019/9732325>
140. Yang, A., Akhtar, S. S., Fu, Q., Naveed, M., Iqbal, S., Roitsch, T., & Jacobsen, S. E. (2020). *Burkholderia Phytofirmans* PsJN Stimulate Growth and Yield of Quinoa under Salinity Stress. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(6), 672. <https://doi.org/10.3390/plants9060672>
141. Yong, J. W., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(12), 5144–5164. <https://doi.org/10.3390/molecules14125144>
142. Zahra, S. T., Tariq, M., Abdullah, M., Ullah, M. K., Rafiq, A. R., Siddique, A., Shahid, M. S., Ahmed, T., & Jamil, I. (2024). Salt-Tolerant Plant Growth-Promoting Bacteria (ST-PGPB): An Effective Strategy for Sustainable Food Production. *Current microbiology*, 81(10), 304. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03830-6>
143. Zamocky, M., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants & redox signaling*, 10(9), 1527–1548. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2046>
144. Zhang, P., Jin, T., Kumar Sahu, S., Xu, J., Shi, Q., Liu, H., & Wang, Y. (2019). The Distribution of Tryptophan-Dependent Indole-3-Acetic Acid Synthesis Pathways in Bacteria Unraveled by Large-Scale Genomic Analysis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(7), 1411. <https://doi.org/10.3390/molecules24071411>
145. Zhang, W., Chen, Y., Huang, K., Wang, F., & Mei, Z. (2023). Molecular Mechanism and Agricultural Application of the NifA-NifL System for Nitrogen Fixation. *International journal of molecular sciences*, 24(2), 907. <https://doi.org/10.3390/ijms24020907>

146. Zhao, S., Zhang, Q., Liu, M., Zhou, H., Ma, C., & Wang, P. (2021). Regulation of Plant Responses to Salt Stress. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4609. <https://doi.org/10.3390/ijms22094609>
147. Zheng, Y., Cao, X., Zhou, Y., Ma, S., Wang, Y., Li, Z., Zhao, D., Yang, Y., Zhang, H., Meng, C., Xie, Z., Sui, X., Xu, K., Li, Y., & Zhang, C. S. (2024). Purines enrich root-associated *Pseudomonas* and improve wild soybean growth under salt stress. *Nature communications*, 15(1), 3520. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47773>
148. Zhou, J. J., & Luo, J. (2018). The PIN-FORMED Auxin Efflux Carriers in Plants. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2759. <https://doi.org/10.3390/ijms19092759>
149. Zhu J. K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, 167(2), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>
150. Zörb, C., Geilfus, C.-M., and Dietz, K.-J. (2019). Salinity and crop yield. *Plant. Biol.* 21, 31–38. doi: 10.1111/plb.12884