



Universidad Michoacana
de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

**Análisis de la acción promotora del
crecimiento vegetal de *Bacillus halotolerans*
AF23 bajo condiciones de estrés salino**

TESIS

Que presenta:

LBT. María Fernanda Valencia Marín

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL**

Director de tesis: D.C. Gustavo Santoyo Pizano

Morelia, Michoacán, septiembre 2023



El presente trabajo de investigación se llevó a cabo bajo la asesoría del D.C. Gustavo Santoyo Pizano, en el Laboratorio de Diversidad Genómica, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en colaboración con el D.C. Edgardo Sepúlveda del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, en el periodo 2021-2023.



DEDICATORIA

*A mis personas incondicionales;
a Salvador,
a mi familia.*

“Pero existe algo que el tiempo no puede, a pesar de su innegable capacidad destructora, anular: y son los buenos recuerdos, los rostros del pasado, las horas en que uno ha sido feliz”.

Julio Cortázar

AGRADECIMIENTOS

Al D.C. Gustavo Santoyo Pizano, por haberme brindado la confianza de pertenecer a su equipo de trabajo, por ser una guía en el camino científico y un ejemplo a seguir.

A los miembros de mi comité sinodal, por todos los aportes a mi trabajo y por contribuir en mi formación profesional.

Al D.C. Edgardo Sepúlveda y a todos sus estudiantes por su tiempo, esfuerzo y ayuda para realizar los experimentos en Ensenada, Baja California.

A Salvador, mi compañero de vida y parte fundamental de este proceso.

A las personas que más quiero, por su comprensión en momentos difíciles.

A mi familia, por apoyarme siempre.

A mis compañeros de laboratorio, por todos los momentos que compartimos.

Al CONAHCYT, muchas gracias por financiar mis estudios.

D. gracias por tanto.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Salinidad del suelo	16
2.2 Efecto de la salinidad en plantas	17
2.3 Importancia del tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	19
2.4 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	23
2.5 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal	24
2.6 Mecanismos directos	24
2.6.1 Fijación de nitrógeno	24
2.6.2 Solubilización de fósforo	25
2.6.3 Hierro	26
2.6.4 Auxinas	27
2.6.5 Citocininas	27
2.6.6 Giberelinas.....	27
2.6.7 Etileno.....	28
2.7 Mecanismos indirectos	29
2.7.1 Producción de antibióticos.....	29
2.7.2 Enzimas hidrolíticas.....	30
2.7.3 Péptidos no ribosomales	31
2.7.4 Competencia por espacio y nutrientes	31
2.8 Mecanismos duales	32
2.8.1 Producción de sideróforos	32
2.8.2 Producción de compuestos orgánicos volátiles.....	33
2.9 Estrategias para la adaptación a salinidad en bacterias	34
2.9.1 Producción de trehalosa	35
2.9.2 Osmoprotectores	36
2.9.3 Enzimas antioxidantes.....	36
2.9.4 Exopolisacáridos.....	37
2.10 PGPB halotolerantes	38
2.11 Incendios subterráneos	44
2.12 <i>Bacillus halotolerans</i> AF23: un modelo de estudio	44
3. JUSTIFICACIÓN	46
4. HIPÓTESIS	47
5. OBJETIVOS	48

5.1 Objetivo general	48
5.2 Objetivos particulares.....	48
6. MATERIALES Y MÉTODOS	49
6.1 Material biológico.....	49
6.2 Árbol filogenético con cepas halotolerantes.....	49
6.3 Evaluación de la tolerancia a salinidad en medio líquido	50
6.4 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal <i>in vitro</i> en condiciones salinas	50
6.4.1 Sideróforos	50
6.4.2 Ácido indol acético.....	50
6.4.3 Solubilización de fosfato	51
6.4.4 Proteasas.....	51
6.4.5 Biofilm	51
6.5 Ensayos de inoculación de plantas de tomate bajo estrés salino (200 mM de NaCl).....	52
6.6 Ensayos de biocontrol de AF12 y AF23 hacia <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate en condiciones de invernadero	53
6.7 Aislamiento y detección de <i>Fusarium</i> en plantas inoculadas	54
6.8 Ensayos de biocontrol de AF12 y AF23 hacia <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate bajo condiciones de salinidad (100 mM de NaCl)	54
6.9 Análisis estadísticos.....	55
6.10 Identificación de genes.....	56
7. RESULTADOS	57
7.1 Árbol filogenético con cepas halotolerantes.....	57
7.2 Evaluación de la tolerancia a salinidad en medio líquido	59
7.3 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal <i>in vitro</i>	60
7.4 Ensayos de inoculación de plantas de tomate bajo estrés salino	62
7.5 Ensayos de biocontrol de AF12 y AF23 hacia <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate en condiciones de invernadero	64
7.6 Aislamiento y detección de <i>Fusarium</i> en plantas inoculadas	66
7.7 Ensayos de biocontrol de AF12 y AF23 hacia <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate bajo condiciones de salinidad (100 mM de NaCl)	67
7.8 Identificación de genes.....	70
8. ANEXO DE TABLAS.....	72
9. DISCUSIÓN	84

10. RESUMEN DE RESULTADOS	94
11. CONCLUSIÓN.....	95
12. PERSPECTIVAS	96
13. REFERENCIAS	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Infección por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en plantas de tomate (<i>S. lycopersicum</i>).....	22
Figura 2. Crecimiento de 48 cepas del género <i>Bacillus</i> en AN suplementado con NaCl al 1.2% (200 mM) y 2.9% (490 mM) (p/v) a las 16 horas de incubación.	57
Figura 3. Crecimiento de <i>B. halotolerans</i> AF23 en AN suplementado con NaCl al 1.2% y 2.9% (p/v) a las 16 horas de incubación.....	58
Figura 4. Árbol filogenético de 49 cepas de <i>Bacillus</i> basado en el gen de ARN16S, utilizando a <i>E. coli</i> ATCC 11775 como grupo externo.	59
Figura 5. Crecimiento de la cepa AF23 a diferentes concentraciones de NaCl, reportado a las 12, 24, 36 y 48 horas.	60
Figura 6. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal <i>in vitro</i> en condiciones salinas.....	61
Figura 7. Efecto de la inoculación de <i>B. velezensis</i> AF12 y <i>B. halotolerans</i> AF23 en plantas de tomate bajo condiciones de estrés salino.	63
Figura 8. Plantas de tomate (<i>S. lycopersicum</i>) inoculadas con las cepas AF12 y AF23 sometidas a estrés salino.....	64
Figura 9. Efecto de biocontrol de las cepas AF12 y AF23 en plantas de tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i>	65
Figura 10. Plantas de tomate (<i>S. lycopersicum</i>) inoculadas con AF12, AF23 y <i>F. oxysporum</i>	66
Figura 11. Síntomas iniciales del marchitamiento por <i>F. oxysporum</i> en tallos de plantas de tomate después de 60 días.	67
Figura 12. Reaislamiento de <i>F. oxysporum</i> de los tallos de tomate	67
Figura 13. Efecto del biocontrol de AF12 y AF23 en plantas de tomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> bajo condiciones de estrés salino.	69

Figura 14. Plantas de tomate (*S. lycopersicum*) inoculadas con AF12, AF23 y *F. oxysporum* bajo estrés salino. 69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacterias halotolerantes que promueven el crecimiento vegetal.....	40
Tabla 2. Cepas halotolerantes y no halotolerantes de acuerdo a su crecimiento a 2.9% de NaCl.....	72
Tabla 3. Genes implicados en la tolerancia al estrés osmótico.....	74
Tabla 4. Genes implicados en la resistencia al estrés por temperatura.....	75
Tabla 5. Genes implicados en la protección contra el estrés oxidativo y nitrosativo.	76
Tabla 6. Genes implicados en el metabolismo del nitrógeno, azufre y fósforo.....	77
Tabla 7. Genes implicados en el transporte de hierro y la producción de sideróforos.	78
Tabla 8. Genes implicados en la producción/modulación de fitohormonas.....	79
Tabla 9. Genes implicados en la producción/degradación de VOC.....	80
Tabla 10. Genes implicados en la quimiotaxis, la motilidad y la formación de biopelículas.....	81
Tabla 11. Genes implicados en el transporte y resistencia a metales pesados. ...	82
Tabla 12. Genes implicados en la formación y germinación de esporas.....	83

RESUMEN

La salinidad del suelo es un factor restrictivo para el crecimiento de los cultivos agrícolas; además, los puede volver susceptibles al ataque por fitopatógenos. Tal es el caso del tomate (*Solanum lycopersicum*), la segunda hortaliza más cultivada del mundo, una especie sensible a la salinidad. También, el marchitamiento por *Fusarium* spp. se considera una de las amenazas más importantes que afecta la producción de tomates en campo y en invernadero. En el presente trabajo se evaluó la tolerancia a salinidad de *Bacillus halotolerans* AF23, así como sus actividades de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal. La cepa AF23 fue aislada de suelos afectados por incendios subterráneos en Michoacán. En nuestros resultados se encontró que esta cepa crece hasta 1 M de NaCl, además de que produce sideróforos, AIA, proteasas y solubiliza fosfato *in vitro* bajo condiciones salinas (200 mM de NaCl). La cepa AF23 mostró también interacciones sinérgicas con *Bacillus velezensis* AF12. La inoculación de AF12 y AF23 de manera individual o en consorcio mejoró el crecimiento de plantas de tomate del cultivar Bonny Best bajo estrés salino (200 mM); incrementó el peso de la parte aérea y raíz, el contenido de clorofila y biomasa total. Además, se evaluó el efecto de biocontrol de AF12 y AF23 en plantas de tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) raza 1, las cepas individualmente o en consorcio generaron un incremento en el peso de la parte aérea, peso fresco de la raíz, el contenido de clorofila y la biomasa total, en condiciones sin salinidad. Además, bajo estrés salino (100 mM), hubo un aumento en el peso fresco de la parte aérea y una disminución del porcentaje de infección en las plantas. Finalmente, se realizó un análisis genómico funcional y se encontró que AF23 posee genes implicados en la tolerancia a estrés salino y en la promoción del crecimiento vegetal. En conclusión, estos resultados destacan el potencial para utilizar a *B. halotolerans* AF23 y *B. velezensis* AF12 como bioinoculante en regiones afectadas por salinidad para mejorar el crecimiento de las plantas y brindar protección contra enfermedades causadas por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Palabras clave: salinidad, *Fusarium*, PGPB, halotolerancia, análisis genómico.

ABSTRACT

Soil salinity is a restrictive factor for the growth of agricultural crops, furthermore, it can make them susceptible to attack by phytopathogens. Such is the case of the tomato (*Solanum lycopersicum*), the second most cultivated vegetable in the world, a salinity sensitive species. Also, wilt by *Fusarium* spp. is considered one of the most important threats affecting tomato production in both field and greenhouse environments. In this study, the tolerance to salinity of *Bacillus halotolerans* AF23 was evaluated, as well its biocontrol and plant growth promotion activities. The AF23 strain was isolated from soils affected by underground fires in Michoacán. In our results, it was found that this strain grows up to 1 M NaCl, and it also produces siderophores, IAA, proteases, and solubilizes phosphate *in vitro* under saline conditions (200 mM NaCl). Strain AF23 also exhibited synergistic interactions with *Bacillus velezensis* AF12. Inoculation of AF12 and AF23 either individually or in consortium improved the growth of tomato plants of the cultivar Bonny Best under saline stress (200 mM); the shoot and root weight, the chlorophyll content and total biomass increased. In addition, the biocontrol effect of AF12 and AF23 was evaluated in tomato plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) race 1. The strains, whether individually or in consortium, generated an increase in shoot weight, fresh root weight, chlorophyll content, and total biomass under non-saline conditions. Additionally, under saline stress (100 mM), there was an increase in shoot fresh weight and a decrease in the infection percentage in the plants. Finally, a functional genomic analysis was carried out, revealing that AF23 possesses genes involved in salt stress tolerance and plant growth promotion. In conclusion, these results highlight the potential use of *B. halotolerans* AF23 and *B. velezensis* AF12 as bioinoculants in regions affected by salinity to enhance plant growth and provide protection against diseases caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Keywords: salinity, *Fusarium*, PGPB, halotolerance, genomic analysis.

1. INTRODUCCIÓN

La población mundial aumenta constantemente, por lo que uno de los principales desafíos para la agricultura será satisfacer la demanda de alimentos para una población en crecimiento, lo que indica una necesidad urgente de elevar la producción agrícola en los próximos años (Jiménez-Mejía et al., 2022). Sin embargo, el rendimiento de los cultivos de interés económico se ven afectados por estrés biótico y abiótico (Kumar et al., 2020).

Entre los factores abióticos, la salinidad se considera un importante factor restrictivo para el crecimiento de los cultivos agrícolas con repercusiones económicas en las regiones áridas y semiáridas del mundo; además, las superficies de tierra cultivable disminuyen continuamente debido a la salinidad del suelo, que puede generarse a través de procesos naturales o por actividades antropogénicas (Etesami y Glick, 2020).

Las altas concentraciones de sales solubles como los cloruros de sodio (NaCl), calcio (CaCl_2) y magnesio (MgCl_2) contribuyen a la alta conductividad eléctrica de los suelos salinos, aunque el NaCl aporta la mayoría de las sales solubles en suelos con problemas de salinidad (Gupta et al., 2022). El suelo se clasifica como salino cuando su conductividad eléctrica en la zona de la raíz (de los 0 a 60 cm de profundidad) es superior a 4 dS m^{-1} (aproximadamente 40 mM de NaCl) (Bonarota et al., 2022).

El estrés salino provoca una serie de respuestas morfológicas y fisiológicas en la planta para adaptarse y sobrevivir. Además, dicho estrés hace que las plantas sean susceptibles al ataque por fitopatógenos. En condiciones de estrés salino las plantas tienen que enfrentar dos tipos de estrés que impiden su crecimiento y desarrollo adecuado, estrés iónico y osmótico; así mismo, en condiciones de alta salinidad aumentan los niveles de etileno, que además estar involucrada en diferentes procesos en plantas, se ha reportado como una fitohormona de respuesta a estrés (Orozco-Mosqueda et al., 2020). La salinidad del suelo afecta a todos los cultivos

de interés económico en el mundo, como es el caso del tomate (*Solanum lycopersicum*), una de las hortalizas más cultivadas y consumidas a nivel mundial (Pérez-Rodríguez et al., 2022).

Por esta razón, se han intentado desarrollar varias estrategias para superar los efectos inhibitorios en el crecimiento de las plantas causados por suelos afectados por la salinidad, incluida la generación de plantas resistentes a la sal mediante modificación genética; sin embargo, debido a los tiempos y costos de generación no suele ser una solución viable. Una alternativa es utilizar microorganismos halotolerantes, como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant growth-promoting bacteria: PGPB) que potencien el crecimiento de cultivos estresados por salinidad (Sunita et al., 2020).

Las PGPB son especies bacterianas que tienen un gran impacto en el crecimiento de las plantas, el rendimiento y la resistencia a las enfermedades (Khatoon et al., 2020) a través de diferentes mecanismos de acción, que pueden ser directos, indirectos y duales (Morales-Cedeño et al., 2021).

En este contexto, el uso de PGPB halotolerantes puede ser una alternativa para disminuir el estrés biótico y abiótico en plantas. El presente trabajo de investigación pretende analizar la acción promotora del crecimiento vegetal de la bacteria termotolerante aislada de suelos afectados por incendios subterráneos *Bacillus halotolerans* AF23 bajo condiciones de estrés salino, *in vitro* y en plantas de tomate, así como también identificar en AF23 los posibles genes involucrados en la tolerancia a salinidad y la promoción del crecimiento vegetal.

2. ANTECEDENTES

2.1 Salinidad del suelo

La seguridad alimentaria es una necesidad fundamental de todas las sociedades, se proyecta que la población mundial alcance los 9,200 millones en 2050. Esto significa que la producción agrícola debe aumentar entre un 60 y 70% con respecto a los niveles actuales para mantener el ritmo de la creciente demanda de alimentos en los próximos 30 años (Gao et al., 2022). Sin embargo, el crecimiento de las plantas, la productividad, el rendimiento y la calidad de los alimentos se ven gravemente afectados por el estrés biótico y abiótico. El primero incluye daños causados por varias plagas y patógenos, mientras que el segundo incluye sequía, temperatura, metales pesados y salinidad (Jiménez-Mejía et al., 2022).

Entre estos últimos, la salinidad del suelo se considera el de mayor relevancia agrícola, debido a que limita la producción de cultivos agrícolas en todo el mundo, especialmente en regiones áridas o semiáridas (Imran et al., 2021), ya que las bajas precipitaciones y las altas temperaturas de estas zonas promueven la salinidad (Etesami y Beattie, 2018). En todo el mundo, alrededor del 20% de las tierras agrícolas se ven afectadas por la salinidad; se estima que para 2050, esta cifra aumente a alrededor del 50% (Mukhopadhyay et al., 2021).

El problema de la salinidad surge cuando la concentración de iones de diferentes sales solubles como sulfato de sodio (Na_2SO_4), nitrato de sodio (NaNO_3), sulfato de magnesio (MgSO_4), cloruro de magnesio (MgCl_2), sulfato de potasio (K_2SO_4), carbonato de calcio (CaCO_3), pero predominantemente el NaCl , se eleva en los suelos más allá del nivel de umbral requerido para la germinación normal, el crecimiento y las actividades fisiológicas de las plantas en las zonas de raíces (Gupta et al., 2022).

La salinidad del suelo es medida a través de la conductividad eléctrica (CE), un suelo con una CE mayor o igual a 4 deciSiemens por metro (dS m^{-1}) (que generalmente equivale a 40 mM de NaCl) a 25°C y $\text{pH} < 8.5$ se considera salino. La

concentración iónica superior a 4 dS m⁻¹ en la rizósfera da como resultado condiciones de estrés que desafían el crecimiento de los cultivos (Majeed y Muhammad, 2019; Mohanavelu et al., 2021).

La salinidad se puede clasificar como primaria y secundaria. La salinidad primaria ocurre en zonas climáticas áridas y semiáridas, en las zonas costeras, depósitos de sal debido condiciones propias y naturales del ambiente; mientras que la salinidad secundaria ocurre directamente como consecuencia de actividades antropogénicas y las malas prácticas agrícolas como la fertilización excesiva y el riego con agua salada (Singh et al., 2022). Las condiciones salinas, reducen la fertilidad, calidad del suelo y hace vulnerables a los cultivos de infecciones causadas por agentes patógenos (Etesami y Glick, 2020).

La salinidad tiene consecuencias severas en las plantas (Majeed y Muhammad, 2019), por lo cual, es importante buscar y aplicar alternativas para lograr una agricultura sostenible como el uso de microorganismos benéficos, que estimulen el crecimiento de las plantas y/o su protección frente a agentes patógenos y factores abióticos como la salinidad (Hernández-Canseco et al., 2022).

2.2 Efecto de la salinidad en plantas

En condiciones de salinidad importantes procesos fisiológicos de las plantas son afectados negativamente. Las plantas enfrentan dos tipos de estrés al estar expuestas a altas concentraciones de sal: el estrés osmótico y el estrés iónico (Gul et al., 2022). Los efectos generales del estrés osmótico se producen como una respuesta inmediata que comienza en la zona de la raíz. El estrés osmótico provoca deshidratación de la planta (Orozco-Mosqueda et al., 2020). El intercambio gaseoso, la tasa de transpiración y la fotosíntesis se ven alterados por la apertura y el cierre inoportunos de los estomas bajo estrés por salinidad. La elongación celular, aparición de hojas nuevas y brotes laterales, el crecimiento vegetativo y reproductivo se regulan de forma negativa, lo cual se refleja directamente en la reducción de biomasa de la planta (Ahmad et al., 2022).

Por otra parte, el estrés iónico es una respuesta más lenta que se produce por la acumulación de iones Na^+ , con la consiguiente salida de iones K^+ , esto inhibe varios procesos fisiológicos como el metabolismo de proteínas y actividades enzimáticas (Maryum et al., 2022). Los iones Na^+ se acumulan en las hojas provocando efectos tóxicos y la senescencia de las hojas (Rasheed et al., 2022). El desequilibrio iónico limita el acceso y el transporte de nutrientes dentro de las plantas debido a la competencia de los iones Na^+ y Cl^- con otros nutrientes como Ca^{2+} , NO_3^- y K^+ (Guo et al., 2022). En consecuencia, las interacciones entre las sales y los nutrientes minerales esenciales pueden dar lugar a importantes deficiencias y desproporción de nutrientes (Behera et al., 2022).

El Na^+ acumulado en el tejido vegetal aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno. Las ROS son neutralizadas por antioxidantes intracelulares en condiciones normales, pero durante el estrés salino, la acumulación excesiva de ROS incita el estrés oxidativo y altera brutalmente el metabolismo normal (Ahmad et al., 2022). Las ROS causan peroxidación de lípidos de membrana, oxidación de proteínas, daño en el ADN, inactivación de enzimas, además de degradación de la clorofila (Bhise y Dandge, 2019).

Para regular su presión osmótica, las plantas generan continuamente solutos compatibles solubles en agua y de bajo peso molecular, como azúcares y algunas proteínas que funcionan como osmoprotectores, por ejemplo, la glicina-betanía, prolina, trehalosa, solo por mencionar algunos (Behera et al., 2022).

Así mismo, para evitar la pérdida de agua, los estomas cierran, con esto se reduce el intercambio de gases, es decir la actividad fotosintética (Franzoni et al., 2022). Para contrarrestar el desequilibrio iónico, las plantas compartimentan el exceso de iones en la vacuola para evadir sus efectos nocivos, sin embargo, estas estrategias no suelen ser suficientes (Shang et al., 2022).

2.3 Importancia del tomate (*Solanum lycopersicum*)

El tomate (*Solanum lycopersicum*), miembro de la familia *Solanaceae*, es una especie mundial presente en una amplia variedad de hábitats asociados con diferentes condiciones climáticas y de suelo. México y Perú son considerados como los posibles centros de origen, diversificación y domesticación de esta especie (Ramírez-Ojeda et al., 2022). Es uno de los cultivos hortícolas más importantes del mundo, con más de 180 millones de toneladas producidas en todo el mundo en 2019 y poco más de 5 millones de hectáreas cosechadas (Chitwood-Brown et al., 2021). Es un fruto altamente apreciado debido a su alto valor nutritivo y la disponibilidad de nutrientes como vitamina C, flavonoides, betacaroteno, incluso, se utiliza en la industria farmacéutica para extraer licopeno, una sustancia antioxidante y anticancerígena (Moghaieb et al., 2021). Además de sus cualidades gustativas, su valor económico reside en las diversas formas de capitalización y la posibilidad de tener fruta fresca todo el año (Maxim et al., 2023).

El tomate (*S. lycopersicum*) es la segunda hortaliza más cultivada en el mundo (después de la papa) y está clasificada como una especie glicófita (planta sensible a la sal) con un umbral de salinidad de 2.5 dS m⁻¹ (Pérez-Rodríguez et al., 2022). El período más sensible a la salinidad es durante la germinación y el desarrollo temprano de la planta; una conductividad en el suelo de 5 dS m⁻¹ ocasiona una disminución en el rendimiento del 50% (FAO, 2022).

Se ha reportado que una salinidad de 100 mM (~10 dS m⁻¹) retrasa el inicio y reduce la tasa y porcentaje final de germinación; la semilla debe generar suficiente potencial osmótico para mejorar el estado hídrico del embrión (es decir, la etapa de imbibición). Durante la etapa vegetativa, el crecimiento de brotes y raíces se ve afectado por el estrés salino debido a las restricciones en la expansión celular, que son el resultado del bajo potencial hídrico del suelo, el desequilibrio de nutrientes y la toxicidad iónica. En la etapa reproductiva, el desarrollo floral es mucho más lento,

el número y tamaño de frutos disminuye significativamente bajo estrés salino. Las hojas se vuelven cloróticas y se reduce el grosor del tallo (Bonarota et al., 2022).

Se han buscado estrategias para mitigar el estrés salino en plantas, creando variedades tolerantes a la sal a través de la ingeniería genética, sin embargo, resulta ser un proceso intensivo, extenso y algunas veces costoso; una alternativa es el uso de microorganismos halotolerantes, como las PGPB que potencien el crecimiento de cultivos estresados por salinidad (Sunita et al., 2020).

Las altas concentraciones de sal tienen un impacto negativo en las plantas sin importar su etapa de crecimiento, además, las vuelve susceptibles al ataque por fitopatógenos (Bhise y Dandge, 2019).

Además de la disminución en el rendimiento por estrés abiótico, el cultivo de tomate puede sufrir pérdidas severas como resultado de la exposición a estrés biótico, como la infección por insectos, bacterias y hongos, que pueden causar una reducción en la producción, independientemente de si se cultivan en campo abierto o en invernaderos. Los tomates son susceptibles a más de 200 enfermedades, pueden ser infectados con varios patógenos fúngicos como algunas especies de *Phytophthora*, *Alternaria*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*, que conducen a muchas enfermedades devastadoras como tizón tardío, tizón temprano, pudrición de raíces y marchitez, respectivamente (Moghaieb et al., 2021). Las enfermedades del marchitamiento por *Fusarium* han sido consideradas como una de las amenazas más importantes que afectan la producción de tomates en campo y en invernadero en todo el mundo, con una pérdida de rendimiento del 10 al 80% (Ma et al., 2023).

F. oxysporum (Snyder y Hansen, 1940) es un hongo del suelo que existe como saprófito debido a su capacidad para degradar la lignina y otros carbohidratos complejos y es una epífita y endófito común de las raíces de las plantas (Chitwood-Brown et al., 2021). Sin embargo, se ha descrito en *F. oxysporum* la existencia de al menos 120 diferentes formas especializadas, denominadas *formae specialis* (f.

sp.) capaces de causar graves pérdidas por enfermedades en diversos cultivos de hortalizas, de campo y de plantación, aunque cada forma está limitada a una gama de huéspedes (Adhikari et al., 2020).

La marchitez por *Fusarium* del tomate, causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), amenaza la producción de este fruto en todo el mundo, tanto para sistemas de procesamiento como de mercado fresco (Chitwood-Brown et al., 2021). Existen tres razas fisiológicas conocidas de Fol (raza 1, 2 y 3) y existen variedades de tomate resistentes a cada una de las razas (Ma et al., 2023).

F. oxysporum f. sp. *lycopersici* se describió por primera vez en Inglaterra en 1895 y desde entonces se ha encontrado en más de 40 países. El hongo penetra en las raíces de las plantas antes de colonizar el tejido vascular. Los síntomas iniciales de la enfermedad comienzan como una clorosis pronunciada y marchitez de las hojas basales inferiores que progresa de forma acrópeta hacia las hojas superiores (Figura 1). Estos síntomas suelen ser asimétricos, restringidos a una o dos ramas de la planta o incluso a un lado de una hoja. A medida que los síntomas progresan, el marchitamiento puede ocurrir en toda la planta o en una región localizada. Comúnmente se observa un pardeamiento en el tejido vascular de los tallos a medida que el patógeno coloniza el tejido vascular que después se convierte en necrosis (Figura 1). Eventualmente, la enfermedad conduce a un rápido declive de la planta, maduración acelerada de la fruta y muerte de la planta (Chitwood-Brown et al., 2021).



Figura 1. Infección por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate (*S. lycopersicum*). A) Síntomas de la enfermedad en una planta de tomate susceptible cultivada hasta la madurez en condiciones de campo; B) Pardeamiento vascular en el tallo (Chitwood-Brown et al., 2021).

Se ha demostrado que *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* puede formar conidios en la superficie de tallos de tomates infectados. Los conidios pueden transportarse por aire y provocar la propagación del patógeno en el suelo (Katan et al., 1997). El patógeno puede sobrevivir en el suelo hasta por 10 años; para superar la enfermedad del marchitamiento por Fol en los tomates, se han implementado muchos métodos, como el uso de prácticas agrícolas (la rotación de cultivos, suspender los cultivos en campo durante un período de tiempo), el uso y creación de variedades de tomate resistentes y la aplicación de fungicidas sintéticos; sin embargo, la rotación de cultivos y suspender la producción no es redituable, además, los fungicidas tienen efectos negativos en los seres vivos y en el medio ambiente circundante, asimismo, pueden desarrollarse cepas resistentes (Moghaieb et al., 2021).

Una alternativa prometedora es el uso de agentes de control biológico, por ejemplo, los hongos: *Aspergillus* spp., *Chaetomium* spp., *Glomus* spp., *Fusarium* spp. (que no son patógenos), *Trichoderma* spp. y *Penicillium* spp.; y bacterias como: *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Streptomyces* spp., y *Bacillus* spp. (Ma et al., 2023).

2.4 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

El término “bacterias promotoras del crecimiento vegetal”, define específicamente a las especies bacterianas que tienen un gran impacto en el crecimiento de las plantas, el rendimiento y la resistencia a las enfermedades a través de diferentes mecanismos de acción (Khatoon et al., 2020). Las PGPB se encuentran principalmente en el suelo que rodea las raíces de las plantas, el microecosistema conocido como rizósfera (denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: PGPR), así como en los tejidos vegetales (presentes en la endósfera y denominadas endófitas) y en las superficies aéreas de hojas o tallos (filósfera) (Orozco-Mosqueda et al., 2020). Sin embargo, también pueden ser aisladas de otros tipos de entornos, que no precisamente están relacionados con las plantas (Pranaw et al., 2020).

Las PGPB utilizan una variedad de mecanismos para impactar positivamente el crecimiento de las plantas, por ejemplo el aumento de biomasa de la planta, el contenido de nutrientes como nitrógeno, fósforo, potasio, hierro, la longitud de la raíz, la longitud de la parte aérea, la germinación de la semilla, la fotosíntesis, la resistencia a los efectos inhibidores de los fitopatógenos, la capacidad de proliferar en presencia de varios estresores ambientales y la producción vegetal de metabolitos secundarios útiles (Mohanty et al., 2021).

Es importante tener en cuenta que diferentes PGPB utilizan varios mecanismos para promover el crecimiento de las plantas. Además, una cepa específica de PGPB puede usar cualquiera de los múltiples mecanismos disponibles, ya sea directo o

indirecto o una combinación de los dos, independientemente del género y la especie (Gong et al., 2020; Khan et al., 2022; Khumairah et al., 2022).

Diferentes especies de plantas, de distintas etapas de desarrollo, cultivadas en diferentes ambientes y distintos cultivares de una especie de planta, a menudo responden de manera única a una cepa específica de PGPB y sus mecanismos; esto puede reflejar variaciones en la fisiología y/o bioquímica de la planta. Estas diferencias en respuesta a una cepa particular de PGPB también pueden ser consecuencia de la edad de la planta y las condiciones de crecimiento, incluida la composición del suelo, la temperatura de crecimiento de la planta y la presencia o ausencia de compuestos estresantes y/o fitopatógenos en el suelo (Stegelmeier et al., 2022).

2.5 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

Los mecanismos empleados por las bacterias para facilitar el crecimiento de las plantas se denominan directos, indirectos y duales (Santoyo et al., 2016).

2.6 Mecanismos directos

La promoción directa del crecimiento de las plantas ocurre cuando las PGPB facilitan la adquisición de recursos del medio ambiente, incluidos nitrógeno, fósforo y hierro; o modulan el crecimiento de las plantas proporcionando o regulando diversas hormonas vegetales, incluidas auxina, citoquinina o etileno (Morales-Cedeño, Orozco-Mosqueda, et al., 2021). La adquisición de nutrientes es importante en condiciones de salinidad, ya que al incrementar los iones Na^+ y Cl^- , ocurre una competencia con otros nutrientes importantes como el Ca^{2+} , NO_3^- y K^+ y, en consecuencia, reduce la concentración de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , nitrógeno y fósforo en las hojas y raíces (Maryum et al., 2022).

2.6.1 Fijación de nitrógeno

El nitrógeno (N), es un componente esencial en las proteínas y nucleótidos, además, es indispensable para la fotosíntesis al formar parte de la clorofila (Moreau et al.,

2019). En los cultivos agrícolas, este elemento suele ser suministrado en forma de fertilizantes, ya que a pesar su abundancia en la atmósfera terrestre (alrededor del 78%) está en forma de nitrógeno gaseoso N_2 . El nitrógeno requiere ser reducido para poder ser utilizado por plantas u otros organismos; no existe un mecanismo directo por las plantas para convertir el nitrógeno en amonio, resultando imposible su captación inmediata (Mehmood et al., 2018). El nitrógeno inerte se puede convertir en nitratos (NO_3^-), amoniaco (NH_3) y amonio (NH_4^+), formas asimilables por las plantas a través de microorganismos que tengan la maquinaria metabólica requerida. Existen rizobacterias que fijan el nitrógeno atmosférico en compuestos como el amoníaco o nitrato a través de un complejo sistema de enzimas llamado nitrogenasa basados en los genes *nif* (Manoj et al., 2020).

2.6.2 Solubilización de fósforo

El fósforo (P) es el segundo elemento más importante después del nitrógeno necesario para el desarrollo y crecimiento de las plantas; constituye alrededor del 0.2% del peso seco de una planta (Alori et al., 2017). A pesar de que la cantidad de P en el suelo es generalmente bastante alta (entre 400 y 1,200 $mg\ kg^{-1}$ de suelo), la mayor parte es insoluble y, por lo tanto, no está disponible para apoyar el crecimiento de las plantas (Glick, 2012; Kumar et al., 2020b). Las plantas solo pueden asimilar P en sus formas solubles, es decir, ortofosfatos (HPO_4^{2-} , $H_2PO_4^-$), que representan sólo del 0.1 al 0.5% del P total del suelo (Mahdi et al., 2020).

Algunas PGPB participan en la nutrición de las plantas al convertir los fosfatos insolubles orgánicos e inorgánicos a formas asimilables (Rodríguez et al., 2006), las estrategias que utilizan son la secreción de fosfonatos, fosfatasa y liasas, así como ácidos orgánicos como el ácido cítrico, ácido láctico, ácido glucónico que producen cambios en el pH rizosférico, convirtiendo el fósforo inorgánico en forma móvil para que sea aprovechable por las plantas (Manoj et al., 2020). Los microorganismos del suelo tolerantes a la sal o halófilos que también muestran la capacidad de solubilizar el fósforo insoluble facilitan el desarrollo de la agricultura basada en suelos salinos y alcalinos (Alori et al., 2017).

2.6.3 Hierro

El hierro (Fe) es uno de los minerales más abundantes de la tierra; sin embargo, no está disponible en el suelo para que las bacterias lo asimilen directamente (Glick, 2020). Es un elemento vital para todas las formas de vida, tiene un papel fundamental en el transporte de electrones, reacciones de oxidación-reducción, desintoxicación de radicales de oxígeno, síntesis de precursores de ADN y en muchos otros procesos bioquímicos. Debido a las condiciones ambientales aeróbicas, el hierro está presente en su forma oxidada (Fe^{3+} , insoluble a pH neutro) en lugar de su forma reducida (Fe^{2+} , soluble a pH neutro), esta última la que puede ser absorbida por las plantas. Para tomar el hierro, muchos hongos y bacterias tienen una adaptación inusual para producir sideróforos, que son un grupo de compuestos de bajo peso molecular (<10 kDa) que tienen una inmensa afinidad por los iones Fe^{3+} (Khan et al., 2019). Los sideróforos producidos por bacterias se clasifican en cuatro clases: catecolatos, hidroxamatos, salicilatos y carboxilatos; los géneros comunes de bacterias productoras de sideróforos son *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Ghazy y El-Nahrawy, 2021).

Cuando las plantas se cultivan en suelos afectados por sal con un pH alto (superior a 6) y una alta concentración de Na^+ , la disponibilidad de nutrientes metálicos para las plantas, en particular, el hierro se reduce drásticamente (Sultana et al., 2021). Las bacterias secretan el sideróforo para superar la limitación de hierro y proporcionar Fe a las plantas, mejorando su crecimiento directamente al aumentar la disponibilidad de hierro en el suelo que rodea las raíces. Las plantas absorben hierro cuando son capaces de reconocer el complejo férrico-sideróforo bacteriano. Aunque esto no solo sucede con el hierro, los sideróforos también forman complejos estables con otros metales pesados que son de interés ambiental, como el cadmio, el cobre, el plomo y el zinc (Jeyanthi y Kanimozhi, 2018). También, se han empleado a las PGPB productoras de sideróforos como posibles agentes de biocontrol, ya que estos compuestos quelantes de hierro han estado involucrados en la acción

antifúngica al limitar la disponibilidad de este importante elemento a los patógenos vegetales (Khatoon et al., 2020).

2.6.4 Auxinas

Las auxinas son una de las fitohormonas más importantes en plantas ya que intervienen en distintos procesos fisiológicos, como la división celular, la germinación de semillas, la formación de vasos xilemáticos, el alargamiento y proliferación de células vegetales, ramificación de raíces (raíces laterales y adventicias), fototropismo, geotropismo, fotosíntesis, florecencia y fructificación, así como a la tolerancia a condiciones estresantes, entre ellas la salinidad (Venieraki et al., 2021). El ácido indol-3-acético (AIA) es el tipo de auxina que las PGPB producen principalmente. Se han encontrado siete vías para biosíntesis bacteriana de AIA, cinco de estas vías dependen del L-triptófano como precursor. De manera general, el triptófano es producido por la planta como exudado radicular, mientras que las bacterias producen auxinas como metabolito secundario para liberar el exceso de triptófano (Gamalero y Glick, 2022).

2.6.5 Citocininas

Las citocininas (CK) influyen en varios rasgos del crecimiento, desarrollo y fisiología de las plantas, como la germinación de semillas, dominancia apical, desarrollo de flores y frutos, senescencia de hojas e interacciones planta-patógeno e inhibición de la senescencia foliar (Akhtar et al., 2020). Además, la apertura y cierre de estomas está influenciado por las CK en condiciones de estrés (Fadiji et al., 2022). Se ha reportado que las altas concentraciones de sal no afectan la capacidad de las PGPB para generar las CK (Kumawat et al., 2023).

2.6.6 Giberelinas

Las giberelinas (GA) participan en la latencia de las semillas, la promoción del crecimiento de tallos y hojas, la estimulación de la floración y el desarrollo de frutos y el retraso del envejecimiento de las plantas (Bhat et al., 2020). Las GA son diterpenoides tetracíclicos formados por cuatro unidades isoprenoides. Son

estructuras de 19 o 20 carbonos. Las tres giberelinas biológicamente activas más comunes son GA1, GA3 (ácido giberélico) y GA4 (Kalra y Bhatla, 2018). Se ha documentado que el ácido giberélico, tiene un impacto positivo en los cultivos afectados por salinidad, en plantas de tomate tratadas con ácido giberélico cultivadas en condiciones salinas, se observó una mayor absorción de agua por la planta, además, induce una absorción iones dentro del sistema de la planta, lo que conduce a un mayor crecimiento y mantiene el metabolismo de las plantas en condiciones normales y de estrés (Egamberdieva et al., 2017). Las PGPB productoras de giberelinas promueven el crecimiento de diferentes plantas, por ejemplo, *Bacillus aryabhatai* SRB02 confiere tolerancia a cultivos de soja bajo estrés biótico, esto probablemente se deba a la producción enzimas antioxidantes, así como de GA4 y GA7 (Park et al., 2017).

2.6.7 Etileno

El etileno es una hormona vegetal gaseosa que puede movilizarse rápidamente a través de los tejidos vegetales por difusión pasiva, sin necesidad de transportadores específicos. En concentraciones óptimas (10 g L⁻¹), el etileno induce la germinación de semillas, el alargamiento de las raíces de las plantas, la formación de primordios de hojas y raíces en tallos y raíces, y el inicio de la floración. En frutas y verduras, el etileno puede inducir la maduración del producto, incluso puede estar involucrado en la producción de compuestos orgánicos volátiles que son importantes para el aroma de los frutos (Orozco-Mosqueda et al., 2020). Sin embargo, a mayor concentración (25 g L⁻¹), induce defoliación, senescencia foliar, abscisión foliar, destrucción de clorofila; también inhibe la elongación de raíces, la nodulación en leguminosas, provoca epinastia y afecta negativamente la germinación de semillas (Sarkar et al., 2018).

La producción de etileno en las plantas incrementa de forma significativa ante condiciones de estrés, por ejemplo, la salinidad. La biosíntesis del etileno comienza con la enzima ACC sintasa que convierte la S-adenosilmetionina (SAM) en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y 5' - metiltioadenosina (MTA), la última de

las cuales se recicla en L-metionina. El siguiente paso es la conversión de ACC a etileno por la enzima ACC oxidasa (Singh et al., 2015).

Uno de los mecanismos utilizados por las PGPB para reducir el estrés, incluye la producción de la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa (Chen et al., 2022). La ACC desaminasa degrada el ACC y genera α -cetobutirato y amoníaco (a través de la hidrólisis del grupo amino) que posteriormente son aprovechados como fuentes de carbono y nitrógeno (Mishra et al., 2021).

La presencia de ACC desaminasa, codificada por el gen *acdS* (que tiene 325 a 345 residuos de aminoácidos) se ha encontrado en los tres dominios de la vida: eucaria, arquea y bacteria. Las PGPB con más de 20 nmol de α -cetobutirato/h/mg de actividad ACC desaminasa promueven el crecimiento de las plantas al reducir significativamente el estrés por etileno en plantas estresadas (Bomle et al., 2021).

2.7 Mecanismos indirectos

La promoción indirecta del crecimiento de las plantas por PGPB ocurre cuando una bacteria limita o previene el daño a las plantas que de otro modo podría ser causado por varios agentes patógenos, incluidas bacterias, hongos y nematodos; por ejemplo: incluida la producción de antibióticos, enzimas que degradan la pared celular, reducción de los niveles de etileno de las plantas, competencia por espacio y nutrientes y la síntesis de compuestos volátiles inhibidores de patógenos (Khalil y Shinwari, 2022).

2.7.1 Producción de antibióticos

Los antibióticos son sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular; una vez liberados por las PGPB, pueden prevenir el crecimiento o las actividades metabólicas de otros microorganismos. Pueden suprimir enfermedades al inhibir la síntesis de las paredes celulares de los patógenos, influir en las estructuras de la membrana e inhibir la formación de complejos de iniciación en la subunidad

pequeña del ribosoma (Jiao et al., 2021). Existen seis clases de compuestos antibióticos: fenazinas, floroglucinoles, pioluteorina, pirrolnitrina, lipopéptidos cíclicos y cianuro de hidrógeno (HCN) (Meena et al., 2020).

Las fenazinas bloquean el transporte de electrones en los microorganismos fitopatógenos; el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) producido por *Pseudomonas*, causa daño a la membrana; la pirrolnitrina inhibe el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias al reaccionar con los fosfolípidos, lo que provoca la rotura de la membrana celular (Premachandra et al., 2016).

Entre los agentes antimicrobianos, muchos estudios han informado que el HCN es un rasgo clave de biocontrol. Generalmente se considera como un metabolito secundario producido al final de la fase exponencial y al comienzo de la fase estacionaria. El HCN es un fuerte inhibidor de la citocromo C oxidasa y otras metaloenzimas y, por lo tanto, es una molécula tóxica para todos los organismos aeróbicos (Anand et al., 2020). Muchos géneros bacterianos tienen la capacidad de producir HCN, incluido *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., se ha encontrado que un alto porcentaje de estas cepas (30-90%) son positivas para la producción de HCN (Khatoun et al., 2020).

2.7.2 Enzimas hidrolíticas

Las PGPB reducen el estrés biótico en plantas a través del control de agentes fitopatógenos. Un mecanismo utilizado es la producción de enzimas hidrolíticas. Los principales componentes de la pared celular fúngica están formados por quitina y β -glucano, por lo que las bacterias productoras de quitinasas y β -1,3-glucanasas, pueden inhibir el crecimiento fúngico (Vejan et al., 2016). Otras enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas, quitosanasas y celulasas producidas por PGPB son responsables de la lisis de las paredes celulares de los patógenos (Triantafyllou et al., 2023). De hecho, en las bacterias que promueven el crecimiento vegetal, se correlaciona su actividad antagonista y la capacidad para producir enzimas hidrolíticas (Lastochkina et al., 2019).

2.7.3 Péptidos no ribosomales

Se conoce que las PGPB producen compuestos con actividad antimicrobiana que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, además de los mencionados anteriormente, también producen péptidos no ribosómicos (NRP non ribosomal peptides) que son sintetizados por enzimas llamadas péptidos sintetasas no ribosomales (NRPS) y son producidos por ciertas bacterias, por ejemplo, *Bacillus* y *Pseudomonas*, que son significativamente útiles para el control biológico de enfermedades de las plantas. Algunos ejemplos notables de los NRP son iturina, surfactina y fengicina (Ranjan et al., 2023).

El modo de acción de la iturina implica su interacción con las membranas celulares, lo que lleva a la interrupción y posterior muerte celular. La actividad de alteración de la membrana de la iturina se atribuye principalmente a su capacidad para interactuar con el ergosterol, un esteroles que se encuentra en las membranas celulares de los hongos, o con otros componentes de la membrana de las bacterias. La surfactina actúa como un antibiótico de amplio espectro con actividad similar a la de un detergente, aumentando la permeabilidad de las membranas celulares en las bacterias (Chen et al., 2020; Ranjan et al., 2023). La fengicina interrumpe la integridad de las membranas de las células fúngicas, lo que lleva a su lisis y posterior muerte. Es efectivo contra varios géneros de hongos, incluidos *Botrytis*, *Alternaria* y *Fusarium* que son conocidos por causar enfermedades devastadoras en los cultivos (Bai et al., 2022). La bacilibactina es un sideróforo quelante del hierro sintetizado por péptidos sintetasas no ribosomales, presenta alta afinidad para unirse competitivamente a los hierros solubles que son requeridos para el crecimiento y desarrollo de los patógenos, además de a la par contribuir en la nutrición de las plantas (Thomludi et al., 2021a).

2.7.4 Competencia por espacio y nutrientes

El suelo es un ecosistema complejo en el que interactúan diferentes microorganismos. La rizósfera es un ambiente rico en nutrientes, debido a los

exudados de las plantas como como aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, sacáridos, etc. Los microorganismos con capacidades metabólicas y competitivas eficientes accederán a los mejores “sitios” donde existan los recursos (Guzmán-Guzmán et al., 2023). Las PGPB pueden competir por nutrientes o nichos con patógenos, a través de la producción de compuestos que limitan el crecimiento de estos. Es importante señalar que la eficacia de las PGPB depende de su versatilidad y adaptación a nuevos nichos, así como de su capacidad para colonizar y competir con otros miembros del microbioma vegetal (Peng et al., 2023). La capacidad de utilizar más fuentes de carbono o nitrógeno le dará a las PGPB una ventaja sobre los patógenos, y esto eventualmente reducirá la infección en la planta (Srivastava et al., 2021).

2.8 Mecanismos duales

Los mecanismos duales incluyen la producción de sideróforos y de compuestos orgánicos volátiles (Santoyo et al., 2016).

2.8.1 Producción de sideróforos

Se ha demostrado que las PGPB previenen la proliferación de fitopatógenos y, por lo tanto, facilitan el crecimiento de las plantas al sintetizar sideróforos. Las PGPB evitan que los patógenos fúngicos y bacterianos en las inmediaciones de las raíces de la planta hospedante, obtengan suficiente hierro para su crecimiento y actividades metabólicas, de modo que no puedan proliferar y actuar como patógenos debido a la falta de hierro (Di Francesco y Baraldi, 2021).

Mientras que los patógenos fúngicos y bacterianos producen sus propios sideróforos, los sideróforos que producen normalmente tienen una afinidad mucho menor por el hierro que los sideróforos de PGPB de control biológico. De esta manera, las PGPB de biocontrol superan eficazmente a los fitopatógenos fúngicos y bacterianos por el hierro disponible (Glick, 2020). Se ha reportado que si se restringe la disponibilidad de hierro, la tasa de germinación de esporas y el

crecimiento del micelio de hongos fitopatógenos disminuirá (Roca-Couso et al., 2021).

2.8.2 Producción de compuestos orgánicos volátiles

Uno de los mecanismos más importantes utilizados por PGPB para promover el crecimiento de las plantas sin contacto físico con las raíces es a través de la liberación de compuestos orgánicos volátiles (VOC Volatile organic compounds por sus siglas en inglés). La emisión de VOC por parte de los microorganismos del suelo ha estado involucrada en la promoción del crecimiento de las plantas y resistencia a las enfermedades en condiciones normales o estresantes (Bavaresco et al., 2020).

Los VOC son subproductos del metabolismo microbiano con masas moleculares bajas (<300 kDa), alta presión de vapor, bajo punto de ebullición y de naturaleza lipofílica, pertenecen a diferentes clases químicas que incluyen aldehídos, alcoholes, cetonas, ésteres, fenoles, benzenoides, terpenoides, compuestos que contienen nitrógeno, azufre y algunos tipos de hidrocarburos como los alquenos (Ghazala et al., 2022)

Las PGPB emiten VOC como factores de biocontrol o un elemento disuasorio contra hongos patógenos de plantas y otras especies de bacterias competidoras para proteger la planta huésped. También podrían actuar como autoinductores para mejorar la proliferación de otros microbios beneficiosos (Choub et al., 2022). También pueden modular la formación de biopelículas y la motilidad de las PGPB, además, benefician a las plantas sirviendo como fuente directa de nutrientes, modulando las vías de fitohormonas (como la auxina y la citoquinina), aumentando la absorción de nutrientes, regulando las actividades enzimáticas o incluso aumentando la tolerancia contra los factores estresantes bióticos y abióticos (Almeida et al., 2023).

La acetoína, el 2,3-butanodiol y el el dimetil disulfuro (DMSD Dimethyl disulfide por sus siglas en inglés) sintetizados por diversos géneros, incluidos *Serratia*,

Arthrobacter, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* y *Bacillus* son los compuestos más conocidos y son responsables de mejoras significativas en el crecimiento de las plantas (Vejan et al., 2016).

2.9 Estrategias para la adaptación a salinidad en bacterias

Las bacterias que pueden crecer en altas concentraciones de salinidad (1.2% y 2.9% p/v de NaCl), se consideran halotolerantes, aunque no necesitan forzosamente la sal para crecer e incluso algunas toleran concentraciones mucho más altas de NaCl (Merino et al., 2019).

Las bacterias halotolerantes tienen mecanismos que les permiten crecer y sobrevivir en ambientes salinos. Estos mecanismos incluyen: a) la composición específica de sus membranas o paredes celulares (las variaciones estructurales en la membrana celular a través del cambio de proteínas, glucanos, composición de ácidos grasos, cadenas de acilo y polisacáridos) que impiden la entrada de altas concentraciones de sal; b) regulación de la concentración iónica intracelular mediante el bombeo de iones fuera de la célula por un antiportador de Na^+/H^+ o el uso de transportadores de iones K^+/Na^+ , para la adaptación osmótica; c) acumulación de solutos compatibles (p. ej., sacarosa, trehalosa, trehalosa-6-fosfato, ectoínas, polioles, glicina betaína y glicosil glicerol) mediante biosíntesis endógena y regular positivamente la síntesis de aminoácidos indispensables (ácido glutámico, alanina, ácido aspártico, treonina, lisina y prolina); y d) la producción de EPS (exopolisacáridos) que ayudan a la expansión de biopelículas y limitan la entrada de alto contenido de sal en la célula (Etesami y Glick, 2020). También la producción de enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, peroxidasa, etc.) para superar los efectos tóxicos de las ROS (Yin et al., 2015).

Como se mencionó anteriormente, las bacterias emplean mecanismos de adaptación a la salinidad y a su vez confieren tolerancia al estrés salino a diversos cultivos, ya sea mediante la producción de enzimas, metabolitos, compuestos

orgánicos, etc., o bien induciendo la expresión de genes en la planta para generar un mejor efecto de protección bajo condiciones de salinidad. Algunos de estos mecanismos se describen a continuación.

2.9.1 Producción de trehalosa

Una respuesta común de los organismos a diferentes tipos de estrés abiótico, entre ellos salinidad, es la acumulación de azúcares y otros solutos compatibles que se conocen como osmoprotectores. Uno de estos compuestos es la trehalosa (Tre), un disacárido no reductor que consta de dos unidades de glucosa (α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosido) (Abdallah et al., 2016). Este disacárido se encuentra comúnmente en invertebrados, hongos, bacterias y algunas plantas en muy bajas cantidades (Mohsin et al., 2022).

La trehalosa es fundamental para mantener el equilibrio osmótico en plantas expuestas a estrés salino, se ha demostrado que la trehalosa preserva la integridad de la membrana, elimina las ROS al aumentar la actividad antioxidante, interactúa directamente con la membrana, al sustituir los grupos polares del enlace de hidrógeno en las moléculas de agua, la trehalosa inhibe la desnaturalización de las proteínas y la fusión de las membranas (Luo et al., 2022; Sarkar y Sadhukhan, 2022; Yang et al., 2022). También protege las estructuras biológicas al daño durante la desecación (Mostofa et al., 2015).

La trehalosa se considera de mayor relevancia en condiciones de estrés en comparación a otros azúcares, debido a sus propiedades físicas y químicas. La trehalosa es muy estable a temperatura, pH y es resistente a la degradación por la α -glucosidasa. También debido a su estructura, favorece a la estabilización de proteínas (Jiang et al., 2018; Liu et al., 2019).

Sin embargo, en plantas la trehalosa se presenta en muy bajas cantidades y no es suficiente para mitigar los efectos adversos causados por estrés, por lo que las

PGPB productoras de trehalosa podrían brindar protección a las plantas ante situaciones adversas como la salinidad (Zhou et al., 2022).

2.9.2 Osmoprotectores

En respuesta a condiciones de estrés salino, la acumulación de compuestos orgánicos de bajo peso molecular dentro del citoplasma es una parte importante para mantener la presión osmótica dentro de la célula y la eliminación de radicales libres. Se trata de solutos compatibles (que no interfieren con el metabolismo normal de las células) son denominados osmoprotectores (Xiao et al., 2022). Se clasifican en (1) aminoácidos y sus derivados: prolina, glutamato, glicina betaína; (2) azúcares: fructosa, glucosa, sacarosa, trehalosa; y (3) alcoholes: manitol, sorbitol, solo por mencionar algunos. En plantas, estos solutos pueden sintetizarse *de novo* dentro de la célula en bajas cantidades o incorporarse a partir del medio exógeno a través de la producción de PGPB y almacenarse en grandes cantidades sin comprometer la fisiología celular (debido a esto se denominan “compatibles”). Las principales funciones de los osmoprotectores es aumentar la fluidez de la membrana celular y estabilizar las proteínas al unirse a su superficie y prevenir la desnaturalización relacionada con el estrés (Hernández-Canseco et al., 2022).

La captación y la síntesis de solutos compatibles en *Bacillus subtilis* 168 están mediadas por cinco sistemas de captación de osmoprotectores (OpuA a OpuE). Las enzimas alcohol deshidrogenasa y betaína aldehído deshidrogenasa, codificadas por los genes *gbsB* y *gbsA*, respectivamente, participan en la síntesis de glicina betaína utilizando como precursor la colina (Rath et al., 2020). La prolina es el principal soluto osmoprotector producido por *B. subtilis*, se sintetiza a través de una vía específica de respuesta a estrés osmótico y comprende al menos tres genes: *proJ*, *proH* y *proA* (Hahne et al., 2010).

2.9.3 Enzimas antioxidantes

Por otra parte, la acumulación excesiva de iones de sodio (Na⁺) y cloruro (Cl⁻) durante el estrés salino, causa toxicidad iónica y conduce a la generación de ROS.

Estos incluyen superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH), singlet oxygen (O^2), etc., que en cantidades excesivas generan estrés oxidativo (Hasanuzzaman et al., 2022). Las ROS pueden comprometer el metabolismo normal a través del daño oxidativo a los pigmentos fotosintéticos, lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, de hecho, la peroxidación de lípidos de la membrana y la pérdida de la integridad de la membrana debido a los ROS son los efectos prominentes de la toxicidad de la sal en las plantas (Mostofa et al., 2015). Para superar los efectos del estrés oxidativo, las plantas producen enzimas antioxidantes como peroxidasa (POD), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), principalmente (Punia et al., 2021).

Las PGPB pueden disminuir el estrés oxidativo en las plantas, ya sea mediante la producción de enzimas antioxidantes o mediante la regulación de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de enzimas antioxidantes de las plantas (Mishra et al., 2021).

2.9.4 Exopolisacáridos

En situaciones estresantes, como la salinidad, algunas PGPB tienen la capacidad para secretar sustancias poliméricas extracelulares o exopolisacáridos (EPS) que desempeñan diversas funciones, por ejemplo, actúan como una barrera física que impide la entrada de un alto contenido de sal a la bacteria, facilitan la adhesión a la superficie de las raíces de las plantas, mejoran la retención de agua, aumentan el potencial hídrico y la absorción de nutrientes por parte de las plantas y reduce la accesibilidad de Na^+ en el entorno de la planta (Morcillo y Manzanera, 2021).

Los EPS microbianos se componen en su mayoría de glucosa, ramnosa, fructosa; además, los principales grupos funcionales son hidroxilo, carboxilo, fosfato y sulfhídrilo, grupos funcionales con carga negativa, esto explica por qué los EPS compuestos pueden quelar Na^+ en condiciones de suelo salino, evitando así la absorción de iones a través de las raíces de las plantas y preservar el equilibrio K^+/Na^+ (Shultana et al., 2022).

La composición de los EPS es diferente entre especies bacterianas y su producción puede variar ante las condiciones ambientales, por ejemplo, un aumento en la concentración de NaCl modera la composición del azúcar, que puede estar relacionado con una mayor tolerancia a la salinidad y la pérdida de agua. Además, el aumento de la síntesis de EPS bajo estrés salino provoca la formación de biopelículas (las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo), que protegen a las bacterias y a sus huéspedes vegetales de la sal al retener el agua alrededor de las células (Dutta et al., 2022).

La presencia de cepas productoras de EPS influye en el crecimiento de las plantas y, por lo tanto, estas bacterias son candidatos bioestimulantes prometedores para las estrategias de manejo del estrés para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Bhagat et al., 2021).

Las estrategias anteriormente mencionadas son las herramientas comúnmente utilizadas por las bacterias halotolerantes para adaptarse a entornos salinos y, además, proteger a las plantas del estrés biótico y abiótico.

2.10 PGPB halotolerantes

La adaptación de las plantas al estrés por salinidad se mejora al cohabitar con diversos microbios del suelo salino conocidos como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas halotolerantes (HT-PGPB) que no solo permiten que las plantas persistan en el hábitat salino, sino que también mejoran su crecimiento y las propiedades relacionadas con el suelo (Priyan Ramasamy y Mahawar, 2023).

La halotolerancia es la capacidad de los organismos vivos para mantener su crecimiento en salinidad, y estos organismos pueden crecer en condiciones salinas, mientras que los halófilos viven en ambientes altamente salinos y requieren condiciones salinas para su crecimiento adecuado. Estos microbios han

desarrollado características particulares que los hacen candidatos para su uso en agricultura ante condiciones estresantes, así como para su uso comercial y en procesos biotecnológicos (Zahir et al., 2019).

Se ha informado que bacterias de los géneros *Agrobacterium*, *Arhrobacter*, *Ochromobacter*, *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Bacillus*, pueden ser halotolerantes que mejoran los cultivos ante estrés biótico y abiótico (Sagar et al., 2022), de hecho, algunas tienen la capacidad de sobrevivir a una concentración de sal de hasta 3.5 M o 20% (Priyan Ramasamy y Mahawar, 2023).

Diferentes especies de *Bacillus* han sido ampliamente reportadas como PGPB, por ejemplo, *B. halotolerans* Hil4 con capacidad de producir AIA, quelar hierro, solubilizar fosfato y enzimas líticas como quitinasas, celulasas y proteasas. Promueve el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* y reduce la incidencia de la enfermedad en uvas inoculadas con *B. cinerea* (Thomloudi et al., 2021b). Las cepas endofíticas *B. safensis* y *B. haynesii* produjeron ácido giberélico, AIA, cianuro de hidrógeno, amoníaco, ACC desaminasa, exopolisacáridos, proteasas, quitinasas, amilasas, celulasas y solubilizaron minerales como fósforo, zinc y potasio, ambas cepas mostraron propiedades significativas de promoción del crecimiento de las plantas en condiciones *in vitro* y promovieron el crecimiento de las plántulas de *Amaranthus viridis* en condiciones de salinidad (Patel et al., 2023).

En los últimos años *B. velezensis* ha ganado popularidad como agente de biocontrol, ya que exhibe actividad antifúngica hacia *Botrytis*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, sumado a eso, es capaz de promover el crecimiento vegetal de diversas formas (Rabbee et al., 2023). *B. velezensis* RC116, *in vitro* produce proteasas, amilasas, lipasas, sideróforos y AIA; en experimentos en maceta promovió significativamente el crecimiento de las plántulas de tomate (Dong et al., 2023).

En la Tabla 1, se muestran reportes de HT-PGPB, su fuente de aislamiento, la concentración de NaCl a la que pueden crecer, el cultivo que mejoran y sus mecanismos para promover el crecimiento de las plantas.

Tabla 1. Bacterias halotolerantes que promueven el crecimiento vegetal

Cepa bacteriana	Fuente de aislamiento	Tolerancia NaCl (mM)	Cultivo	Mecanismo de acción	Referencia
<i>Bacillus</i> sp. Se5R	Endófito de planta halófito (<i>Salicornia europaea</i> L.)	1,700	Chía	AIA, fijación de nitrógeno, celulasas, proteasas, antagonismo <i>in vitro</i> hacia <i>F. oxysporum</i> , <i>R. solani</i>	(Chebotar et al., 2022)
<i>Bacillus</i> sp. NMTD17	Rizosfera de plantas de cebada	2,700	Arroz	Producción de biopelículas, disminución de estrés oxidativo en plantas bajo estrés	(Q. Ali et al., 2022)
<i>Bacillus altitudinis</i> WR10	Endófito de trigo	2,000	Trigo	AIA, ACC desaminasa, solubilización de fosfato, producción de biopelículas, reduce la acumulación de Na ⁺ y mejora la absorción de K ⁺ , P y Ca ²⁺ en plantas estresadas por sal	(Yue et al., 2022)
<i>Enterobacter ludwigii</i> B30	<i>Paspalum vaginatum</i>	500	Bermuda grass (<i>Cynodon dactylon</i>)	Incrementa el contenido de clorofila, AIA y la actividad antioxidante en plantas estresadas por sal	(Wei et al., 2022)
<i>Bacillus thuringiensis</i> PM25	-	3,000	Maíz	AIA, sideróforos, ACC desaminasa, producción de	(B. Ali et al., 2022)

<i>Bacillus subtilis</i> HG-15	Rizoplano de trigo	5,000	Trigo	biopelículas, incremento en clorofila y actividad antioxidante en plantas estresadas por sal AIA, ACC desaminasa, solubilización de potasio, producción de sideróforos, VOC, mejora el crecimiento de plantas de trigo en estrés salino	(Ji et al., 2022)
<i>Bacillus halotolerans</i> DGL6	Endófito de <i>Nitraria tangutorum</i>	1,800	Arroz	Antagonismo <i>in vitro</i> hacia <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>F. graminearum</i> , supresión de la enfermedad tizón de la hoja en arroz	(Wu et al., 2019)
<i>Bacillus halotolerans</i> KKD1	Rizosfera de <i>Androsace umbellata</i>	2,200	Trigo	Producción de AIA, giberelinas, incrementa la actividad antioxidante, favorece la extrusión de Na ⁺ y la acumulación de betaína en plantas de trigo bajo estrés salino	(Wu et al., 2022)
<i>Bacillus halotolerans</i> QTH8	Rizosfera de <i>Cotinus coggygria</i>	1,700	Trigo	Producción de iturina, surfactina y fengicina, antagonismo <i>in vitro</i> hacia <i>B. cinerea</i> , <i>F. graminearum</i> . Reducción del índice de enfermedad de la pudrición de la corona del trigo	(Li et al., 2022)

<i>Bacillus halotolerans</i> LBG-1-13	Endófito de <i>Lilium davidii</i> var. <i>unicolor</i>	1,700	Variedad de <i>Lilium</i> : Tresaor y Bright Diamond,	AIA, ACC desaminasa, producción de sideróforos, solubilización de fosfato, antagonismo <i>in vitro</i> hacia <i>B. cinerea</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>Botryosphaeria dothidea</i>	(Gao et al., 2022)
<i>Bacillus subtilis</i> RH5	Campos agrícolas salinos	2,000	Arroz	AIA, producción de sideróforos, HCN, proteasas, quitinasas, solubilización de P, Zn y K. Antagonismo <i>in vitro</i> hacia <i>R. solani</i> .	(Jamali et al., 2019)
<i>Bacillus circulans</i> PK3-109	Endófito de planta del desierto <i>Panicum antidotale</i>	1,500	<i>A. thaliana</i>	AIA, antagonismo <i>in vitro</i> hacia <i>B. cinerea</i> y <i>Pseudomonas syringae</i>	(Bokhari et al., 2019)
<i>Bacillus altitudinis</i> KP-14	Suelo contaminado por metales	2,000	<i>Miscanthus × giganteus</i> (Mxg),	AIA, ACC desaminasa, producción de sideróforos, HCN, antagonismo <i>in vitro</i> hacia <i>F. culmorum</i> y <i>B. cinerea</i>	(Pranaw et al., 2020)
<i>Bacillus velezensis</i> ZF2	Tallo de pepino sano	1,700	Pepino	AIA, citoquininas, producción de proteasas, celulasas, antagonismo <i>in vitro</i>	(Xu et al., 2020)
<i>Bacillus</i> sp. E25	Endófito de planta de tomate	200	Tomate	Producción de sideróforos, auxinas, proteasas, biofilm, antagonismo <i>in vitro</i>	(Rojas-Solis et al., 2020)

De manera interesante, dos o más cepas pueden interactuar de forma sinérgica para promover el crecimiento de las plantas. La coinoculación de dos cepas de *B. halotolerans* genéticamente distintas (Cal.l.30, Cal.f.4) mejoró el crecimiento de plantas de *A. thaliana* y tomate, además estas cepas inhibieron de forma efectiva del ataque y desarrollo de *B. cinerea* en hojas de tomate. Este estudio destaca el potencial de las cepas de *B. halotolerans*, al combinar la estimulación del crecimiento de las plantas y la actividad antifúngica directa contra patógenos de relevancia económica (Tsalgatidou et al., 2023).

Se observó una mejora en la longitud de la raíz, la altura de la planta y el peso fresco y seco en plantas de trigo cuando fueron coinoculadas con tres tipos de bacterias: *Brevibacterium frigoritolerans*, *B. thuringiensis* y *B. velezensis*, en condiciones de salinidad (hasta 400 mM de NaCl). La combinación de las tres cepas juntas tuvo un mejor efecto en las plantas que cuando se aplicaron individualmente. Además, estas bacterias también ayudaron a reducir el estrés osmótico, el estrés oxidativo y el estrés por etileno en el trigo (Huang et al., 2022).

Una triple inoculación de microorganismos: *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. mojavensis*, incrementó el peso fresco y seco de plantas de tomate, en comparación con plantas sin inocular (He et al., 2019). En otro estudio, *B. licheniformis* NX-3 y *B. subtilis* NX-4, cepas que pueden tolerar una concentración de NaCl de 2,000 mM, incrementaron el contenido de clorofila en un 24% y el peso fresco en un 60% en plantas de pepino estresadas por sal (100 mM NaCl) (Qi et al., 2021).

En los reportes mencionados en la Tabla 1, se observa que la mayoría de HT-PGPB fueron aislados de ambientes relacionados a plantas, como la rizósfera o como endófitos; sin embargo, es interesante que algunos otros han sido aislados de ambientes extremos como plantas del desierto, suelos salinos y suelos contaminados por metales (Bokhari et al., 2019; Jamali et al., 2019; Pranaw et al., 2020). Además de este tipo de ambientes extremos existen otros que pueden ser un lugar de aislamiento de microorganismos interesantes, como lo son los suelos afectados por incendios subterráneos.

2.11 Incendios subterráneos

Los incendios subterráneos se relacionan con una combustión lenta, de baja temperatura y sin llama. Investigaciones previas han vinculado el inicio de incendios subterráneos con el autocalentamiento durante los períodos de sequía y las actividades de quema relacionadas con la agricultura (Roy et al., 2014).

Las bacterias que habitan en estos suelos pueden haber adoptado estrategias de supervivencia para lograr ventajas competitivas, lo que podría representar una fuente inexplorada como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos, que además promuevan el crecimiento vegetal a través de distintos mecanismos de acción, donde los cultivos agrícolas se enfrentan a diferentes tipos de estrés en zonas áridas o semi-áridas (Khatoon et al., 2020).

2.12 *B. halotolerans* AF23: un modelo de estudio

La cepa AF23 fue aislada de los suelos afectados por incendios subterráneos en la comunidad de Pueblo Viejo, municipio de Venustiano Carranza, Michoacán. Dadas las características propias de la fuente de aislamiento, se evaluó el crecimiento de AF23 a altas temperaturas y se encontró que puede crecer hasta 50°C (Flores-Piña, 2021) por lo que se denomina termotolerante (Merino et al., 2019).

También se evaluó el antagonismo *in vitro* de AF23 hacia hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* 62BCV y *Geotrichum candidum* FRB, hongos aislados de frutos en descomposición en etapa poscosecha (Morales-Cedeño, et al., 2021). En los ensayos de confrontación directa bacteria-hongo, AF23 inhibió el crecimiento micelial de *B. cinerea* y *G. candidum* en un 42 y 33%, respectivamente.

El genoma de AF23 fue comparado con genomas completos de otras cepas utilizando la identidad de nucleótidos promedio (ANI), la calculadora de distancia de genoma a genoma (GGDC) y la secuencia del gen rARN, la cepa AF23 se identificó como *B. halotolerans* con una similitud en dichos parámetros del 98.9%, 97.92% y

100%, respectivamente. El genoma de AF23 (tamaño de aproximadamente 4.2 Mb) consta de 68 contigs, (número de acceso en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information): [NZ_JAJHVVY000000000.1](#)). El genoma tiene un contenido de guanina-citosina (G-C) de 43.5%. El análisis *in silico*, reveló que el genoma de la cepa AF23 posee grupos de genes con una alta similitud (mayor al 80%) a aquellos que codifican a enzimas involucradas en la síntesis de distintos compuestos antimicrobianos por ejemplo, fengicina, bacilisina, bacillaene y también bacilibactina que es un tipo de sideróforo (Valencia-Marín, 2021).

Con los ensayos realizados, se encontró que AF23 posee antagonismo *in vitro* y los análisis *in silico* muestran que tiene potencial como HT-PGPB; sin embargo, se desconoce cómo interactúa a nivel planta y en consorcio con otras bacterias, específicamente con *B. velezensis* AF12, una cepa previamente identificada en el grupo de trabajo, con destacada actividad de biocontrol y otros rasgos PGP (Chávez-Avila, 2021). Por lo tanto es de interés evaluar otros mecanismos de promoción del crecimiento vegetal para elucidar su papel protector de cultivos ante estrés salino.

3. JUSTIFICACIÓN

La salinidad del suelo es un factor abiótico importante que causa daño en los cultivos agrícolas, provocando pérdidas económicas. Los microorganismos tolerantes a la sal han surgido como un complemento prometedor en los enfoques de protección de cultivos afectados por salinidad. Por lo tanto, resulta de interés realizar una búsqueda de las actividades y genes potencialmente involucrados en el biocontrol de patógenos y la promoción de crecimiento vegetal en la bacteria *B. halotolerans* AF23 bajo estrés salino, en plantas de interés económico, como el tomate (*S. lycopersicum*). Lo anterior tiene la finalidad de obtener una bacteria halotolerante con capacidades benéficas como bioinoculante, y que pueda ser aplicada en aquellas regiones donde las condiciones de producción agrícola son adversas.

4. HIPÓTESIS

La bacteria *B. halotolerans* AF23 muestra actividades promotoras del crecimiento vegetal y de biocontrol en condiciones de salinidad.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Realizar una búsqueda de las actividades promotoras del crecimiento vegetal y biocontrol en *B. halotolerans* AF23 bajo estrés salino.

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la tolerancia de la cepa AF23 en diferentes condiciones de salinidad (25, 50, 100, 200, 500 mM y 1M de NaCl).
2. Analizar el efecto de la inoculación de *B. halotolerans* AF23 (y su interacción con *B. velezensis* AF12) en plantas de *Solanum lycopersicum* bajo estrés salino (200 mM de NaCl) en invernadero.
3. Determinar la función de AF23 (y su interacción con *B. velezensis* AF12) en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate en invernadero.
4. Realizar la minería del genoma de AF23 para detectar los genes potencialmente involucrados en el biocontrol de patógenos y la promoción del crecimiento vegetal bajo estrés.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Bacillus velezensis AF12 y *B. halotolerans* AF23 fueron aisladas de suelos afectados por incendios subterráneos en la comunidad de Pueblo Viejo, en el municipio de Venustiano Carranza, Michoacán de Ocampo (Flores-Piña, 2021). Las cepas fueron cultivadas a 30°C durante 18-24 horas en medio de cultivo agar nutritivo (AN) y se conservaron a 4°C para su uso rutinario en el laboratorio. Adicionalmente, para su uso a largo plazo, las cepas se almacenaron en una solución de glicerol al 30% (v/v) a -20°C.

Las semillas de tomate (*S. lycopersicum*) del cultivar Bonny Best fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.

En este proyecto se trabajó con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 (también referido en secciones posteriores como “Fol”), el cual fue proporcionado por el laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. El hongo se cultivó en agar papa dextrosa y se incubó a 28°C durante 4 días y se conservó a 4°C para su uso rutinario.

6.2 Árbol filogenético con cepas halotolerantes

Se realizó un árbol filogenético con 48 cepas del género *Bacillus* aisladas de suelos afectados por incendios subterráneos (Flores-Piña, 2021). en su mayoría identificadas previamente (Chávez-Avila, 2021; Valencia-Marín, 2021). Se utilizó la secuencia del gen de ARN ribosomal 16S, con la cepa *Escherichia coli* ATCC 1177 como grupo externo. El árbol se construyó utilizando el software MEGA versión 7.9, mediante el método de máxima verosimilitud, con un soporte de arranque de 1000 repeticiones (Kumar et al., 2016).

Para determinar la halotolerancia, las 48 cepas de *Bacillus* se sembraron en AN suplementado con NaCl al 1.2% y al 2.9% p/v (200 mM y 490 mM, respectivamente),

concentraciones de NaCl que corresponden al rango de crecimiento de microorganismos halotolerantes (Merino et al., 2019). La concentración más alta se tomó como criterio para clasificar las cepas como halotolerantes o no halotolerantes. En cada caja Petri (100 x 15 mm), se sembraron cuatro bacterias con estriado simple, se incubaron a 30°C durante 16 horas y posteriormente se reportó el crecimiento de las cepas.

6.3 Evaluación de la tolerancia a salinidad en medio líquido

La tolerancia a salinidad de *B. halotolerans* AF23 se midió a las 12, 24, 36 y 48 horas de crecimiento en medio mínimo M9 salts (5x) adicionado con glucosa al 20%, MgSO₄ (1 M), CaCl₂ (1 M) y las diferentes concentraciones de NaCl (25, 50, 100 y 200, 500 y 1000 mM). Se partió de preinóculos bacterianos incubados en agitación a 150 rpm y a 30°C durante 12 horas en medio M9 salts (5x) sin NaCl. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica de 0.1 (A_{590nm}), se inocularon 500 mL en el medio de cultivo (adicionado con NaCl) en un volumen final de 5 mL y se incubaron a 30°C a 150 rpm. Cada tratamiento se realizó por triplicado y se utilizó medio M9 salts (5x) sin inocular como blanco, se midió la absorbancia en cada intervalo de tiempo a 590 nm (Orozco-Mosqueda et al., 2019).

6.4 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* en condiciones salinas

6.4.1 Sideróforos

La producción de sideróforos se evaluó en placas de agar Cromo Azurol S (CAS) (Schwyn y Neilands, 1987), con NaCl a 25, 50, 100 y 200 mM. La bacteria se inoculó al centro de la caja Petri y se incubó a 30°C durante 48 horas. El cambio de color en el medio de azul a naranja indicó un resultado positivo.

6.4.2 Ácido indol acético

Para determinar la producción de ácido indol acético, las células fueron cultivadas en caldo nutritivo adicionado con triptófano al 1% y con NaCl (0, 25, 50, 200 y 200

mM) durante 24 horas a 30°C a 150 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 1 (A_{590nm}). Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 min, se tomaron 350 mL del sobrenadante y se le añadieron 700 mL del reactivo de Salkowski. Después de incubar por 30 minutos en oscuridad, se midió la absorbancia a 530 nm. Las mediciones se compararon con el gráfico de calibración que se construyó utilizando diluciones de una solución estándar de indol total (Fluka, Suiza) y el medio sin inocular con el reactivo de Salkowski como control (Rojas-Solis et al., 2020).

6.4.3 Solubilización de fosfato

La solubilización de fosfato se realizó mediante la inoculación de la cepa bacteriana en placas de agar Pikovskaya (Djuuna et al., 2022), adicionadas con las diferentes concentraciones de NaCl, utilizando púrpura de bromocresol como colorante en el medio. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas. El cambio de color en el medio de púrpura a amarillo indicó un resultado positivo.

6.4.4 Proteasas

Se preparó el medio de cultivo agar Skim milk para evaluar la producción de proteasas (Abbasi et al., 2019), se añadieron las concentraciones de NaCl previamente mencionadas. La caja Petri fue inoculada al centro, con incubación a 30°C, durante 48 horas. Una zona clara alrededor de la bacteria da como resultado una reacción positiva.

6.4.5 Biofilm

La producción de biofilm se evaluó siguiendo el protocolo de (Wei y Zhang, 2006) con ligeras modificaciones. Las células se cultivaron en caldo nutritivo (adicionado con NaCl) durante 24 horas a 30°C a 150 rpm hasta alcanzar densidad óptica de 1 (A_{570nm}). Posteriormente se realizó una dilución de las células cultivadas 1:100 con agua destilada estéril. Se transfirieron 500 mL de la dilución a un tubo Eppendorf y se incubaron a 30°C sin agitación durante 24, 48 y 72 horas. El biofilm fue cuantificado en cada intervalo de tiempo. Se añadieron 500 mL de cristal violeta al 0.1% (p/v) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, el colorante

se decantó y las células se lavaron con agua destilada estéril para eliminar el tinte residual y las células no adheridas. Se utilizó etanol al 95% para solubilizar el colorante de las células del biofilm. Se midió la absorbancia del colorante solubilizado ($A_{570\text{nm}}$) y se utilizó etanol al 95% como blanco.

En el caso de la producción de sideróforos, proteasas y solubilización de fosfato, se reportó el diámetro del halo de las reacciones positivas al finalizar el tiempo de incubación.

6.5 Ensayos de inoculación de plantas de tomate bajo estrés salino (200 mM de NaCl)

Los experimentos en plantas de tomate se realizaron siguiendo la metodología de (Delgado-Ramírez et al., 2021). Las semillas de tomate del cultivar Bonny Best, fueron esterilizadas por inmersión en soluciones de etanol al 70% (v/v) durante 3 minutos y NaOCl al 2% (v/v) durante 2 min, posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua estéril. Las semillas se colocaron en placas con agar al 1.5%, una vez germinadas se transfirieron a charolas de germinación con sustrato Cosmopeat se mantuvieron en cámara de crecimiento a 26°C con periodos de luz y oscuridad de 16 y 8 horas, respectivamente, durante dos semanas. Finalmente, se seleccionaron plántulas con una altura promedio de 5 cm con la presencia de hoja verdadera.

Para preparar el inóculo bacteriano, se colocó una colonia aislada de cada una de las cepas (*B. velezensis* AF12 y *B. halotolerans* AF23 por separado) en 25 mL de medio de cultivo LB (lysogeny broth) y se incubaron a 30°C a 110 rpm durante 18 horas. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica de 0.5 ($A_{590\text{nm}}$), se utilizaron para inocular medio de cultivo LB a una concentración de $\sim 2 \times 10^8$ UFC/mL en un volumen final de 50 mL.

Las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 6 pulgadas e inoculadas cerca del tallo con 5 mL de solución bacteriana a una concentración de $\sim 2 \times 10^8$ UFC/mL.

Para el consorcio de AF12 y AF23 se inoculó con 2.5 mL de cada bacteria. Las plantas control (no inoculadas) recibieron 5 mL de medio LB estéril. Ocho días después de la primera inoculación de las plántulas, se realizó una inoculación de refuerzo con 5 mL de solución bacteriana a una concentración de $\sim 2 \times 10^8$ UFC/mL aplicada cerca del tallo de las plantas. Al segundo día después de la inoculación, se comenzó con el riego de agua salina (NaCl a 200 mM), el cual se llevó a cabo de manera inicial cada dos días y posteriormente fue riego a demanda hasta finalizar el experimento.

Se realizaron 8 tratamientos los cuales consistieron en: 1) plantas sin bacteria y sin NaCl; 2) plantas inoculadas con AF12; 3) plantas inoculadas con AF23; 4) plantas inoculadas con el consorcio AF12 y AF23; 5) plantas NaCl; 6) plantas inoculadas con AF12 y NaCl; 7) plantas inoculadas con AF23 y NaCl; y 8) plantas inoculadas con el consorcio AF12 y AF23 y NaCl. Se prepararon ocho repeticiones para cada tratamiento y las macetas se dispusieron en el invernadero del departamento de Microbiología del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, en un diseño completamente al azar a una temperatura promedio de 24°C en el día y 20°C en la noche. 50 días después del trasplante a maceta, las plantas fueron cosechadas y se midieron diferentes parámetros fisiológicos, como la longitud, peso fresco y seco de la parte aérea y de la raíz y el contenido de clorofila en las hojas.

6.6 Ensayos de biocontrol de AF12 y AF23 hacia *F. oxysporum* en plantas de tomate en condiciones de invernadero

Se siguió la metodología descrita anteriormente (Delgado-Ramírez et al., 2021) con algunas modificaciones. Las semillas fueron desinfectadas y germinadas como se mencionó anteriormente.

En la evaluación del biocontrol de las cepas AF12 y AF23, al día uno después del trasplante a maceta las plantas se inocularon cerca del tallo con 5 mL de solución bacteriana a una concentración de $\sim 2 \times 10^8$ UFC/mL, para el consorcio de AF12 y

AF23 se inoculó con 2.5 mL de cada bacteria. Las plantas control (no inoculadas) recibieron 5 mL de medio LB estéril. Ocho días después se aplicó una inoculación de refuerzo y 15 días después *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 fue inoculado dentro del tallo a una concentración de $\sim 2 \times 10^6$ esporas/mL totales por planta.

Inicialmente, las plantas fueron regadas cada tercer día y posteriormente el riego fue a demanda. Se realizaron 5 tratamientos los cuales consistieron en: 1) plantas sin bacteria y *Fusarium*; 2) plantas inoculadas con *Fusarium*; 3) plantas inoculadas con *Fusarium* y AF12; 4) plantas inoculadas con *Fusarium* y AF23; y 5) plantas inoculadas con *Fusarium* y el consorcio AF12 y AF23. Se prepararon ocho repeticiones para cada tratamiento y se mantuvieron en invernadero en un diseño completamente al azar como se describió previamente. 60 días después del trasplante a maceta, las plantas fueron cosechadas, se midieron diferentes parámetros fisiológicos, como la longitud, peso fresco y seco de la parte aérea y de la raíz y el contenido de clorofila en las hojas.

6.7 Aislamiento y detección de *Fusarium* en plantas inoculadas

Los tallos fueron examinados a través de un corte vertical para observar la presencia del patógeno. Se tomaron 3 cm de la parte basal del tallo de las plantas y se esterilizaron superficialmente con llama, posteriormente se realizó un corte longitudinal en los tallos, se colocaron en cajas Petri con medio PDA y se incubaron durante 5 días a 28°C.

6.8 Ensayos de biocontrol de AF12 y AF23 hacia *F. oxysporum* en plantas de tomate bajo condiciones de salinidad (100 mM de NaCl)

Las semillas se esterilizaron y se germinaron como se mencionó anteriormente (Delgado-Ramírez et al., 2021). Plántulas con una altura de 5 cm y presencia de hoja verdadera fueron trasplantadas a macetas de 4 pulgadas y se inocularon en la base del tallo con 5 mL de una suspensión bacteriana a una concentración de 2.5×10^6 UFC/ml. Para el consorcio de AF12 y AF23 se inoculó con 2.5 mL de cada bacteria. A continuación, las macetas fueron acomodadas de manera aleatorizada

en la cámara de crecimiento a 26°C con periodos de luz y oscuridad de 16 y 8 horas. 8 días más tarde se realizó una inoculación de refuerzo. Tres días después, las plantas se dispusieron en condiciones de invernadero en un diseño completamente al azar y se infectaron con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1.

Antes del trasplante a macetas las plántulas se regaron con agua purificada, se utilizó un atomizador para mantener el sustrato húmedo. Posterior al trasplante a maceta, las plantas se regaron cada tercer día con 50 mL de agua durante cuatro semanas, después se aumentó el volumen a 100 mL. El riego fue alternado con agua sin sal y agua salina a una concentración de 100 mM (NaCl). Se realizaron 8 tratamientos los cuales consistieron en: 1) plantas sin bacteria, sin *Fusarium* y sin NaCl; 2) plantas inoculadas con AF12 y NaCl; 3) plantas inoculadas con AF23 y NaCl; 4) plantas inoculadas con el consorcio AF12, AF23 y NaCl; 5) plantas inoculadas con *Fusarium* y NaCl; 6) plantas inoculadas con *Fusarium*, AF12 y NaCl; 7) plantas inoculadas con *Fusarium*, AF23 y NaCl; y 8) plantas inoculadas con *Fusarium*, el consorcio AF12, AF23 y NaCl. Se prepararon diez repeticiones para cada tratamiento. 45 días después de la infección, las plantas fueron cosechadas y se midieron diferentes parámetros fisiológicos. Los tallos fueron examinados a través de un corte vertical para observar la presencia del patógeno.

La preparación del inóculo fúngico se realizó de la siguiente manera: se inocularon tres discos de micelio de un cultivo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 en un frasco de cristal con 50 g de arroz estéril. Los cultivos se incubaron por 14 días a 28°C. Para la infección de las plantas, se removió el sustrato de la superficie, en seguida se colocaron 0.5 g del inóculo fúngico (2.5×10^4 esporas totales por planta) y se mezcló con el sustrato.

6.9 Análisis estadísticos

Los experimentos se realizaron al menos tres veces y los resultados se analizaron con el software Statistica 8.0 mediante un ANOVA de una vía y comparación de medias a través de la prueba Duncan ($p \leq 0.05$).

6.10 Identificación de genes

Se identificaron los genes involucrados en la resistencia a estrés y en la promoción del crecimiento vegetal de *B. halotolerans* AF23 de acuerdo a genes bacterianos reportados anteriormente con estas funciones (Nascimento et al., 2020; Yin et al., 2022). La búsqueda de los genes se realizó con la anotación generada por la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) con el número de acceso JAJHVVY000000000.1.

7. RESULTADOS

7.1 Árbol filogenético con cepas halotolerantes

En una primera evaluación se realizó una búsqueda de bacterias halotolerantes de la colección de cepas aisladas de Pueblo Viejo, donde ocurren incendios subterráneos de forma recurrente. De las 48 cepas evaluadas, 6 no mostraron crecimiento a 2.9% de NaCl y una de estas tampoco fue capaz de crecer a 1.2% (Tabla 2), por lo tanto, se clasificaron como no halotolerantes. El resto de las cepas tuvieron un crecimiento óptimo en ambas concentraciones, incluyendo AF23 y AF12 (Figura 2-3).

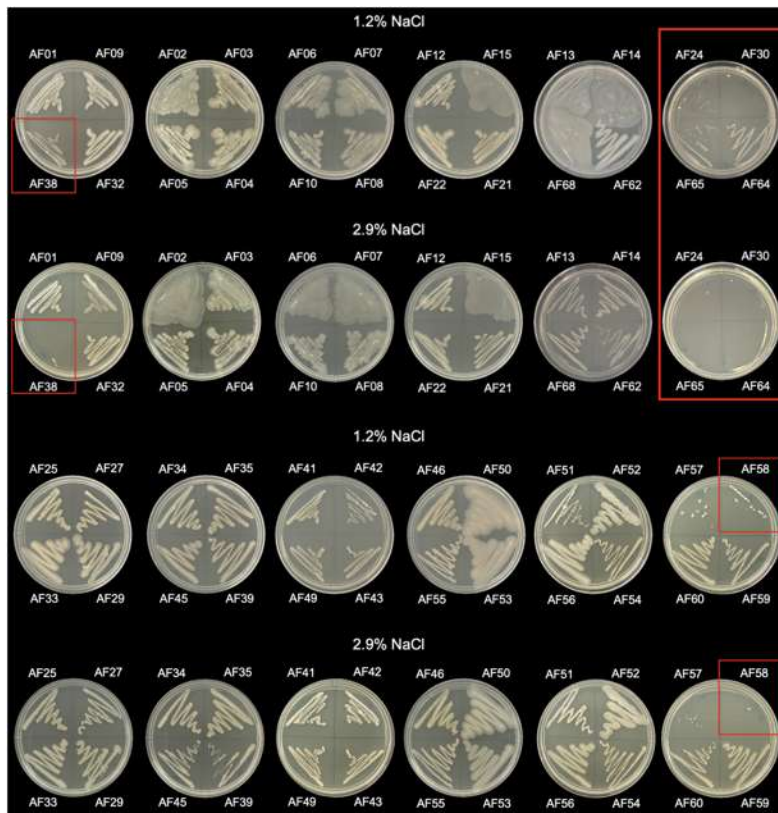


Figura 2. Crecimiento de 48 cepas del género *Bacillus* en AN suplementado con NaCl al 1.2% (200 mM) y 2.9% (490 mM) (p/v) a las 16 horas de incubación. Los recuadros en rojo indican las diferencias en el crecimiento de las bacterias de acuerdo a la concentración de NaCl.

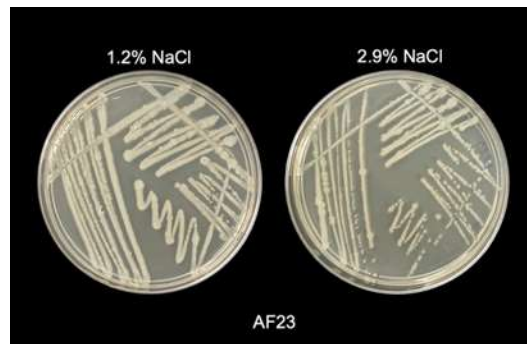


Figura 3. Crecimiento de *B. halotolerans* AF23 en AN suplementado con NaCl al 1.2% y 2.9% (p/v) a las 16 horas de incubación.

En el árbol filogenético, no se observó una agrupación de las 6 bacterias no halotolerantes; si no que estas se distribuyeron en diferentes ramas del árbol. De manera interesante, las cepas AF64 y AF65, no halotolerantes y únicamente identificadas a nivel género, se posicionan más cerca de la cepa utilizada como grupo externo. En el árbol filogenético se observó una agrupación de cepas de acuerdo a su especie. La cepa AF23 tiene una relación filogenética más estrecha con *B. halotolerans* AF29 y curiosamente estas dos bacterias fueron las únicas que no se agruparon con las demás cepas de la misma especie (Figura 4).

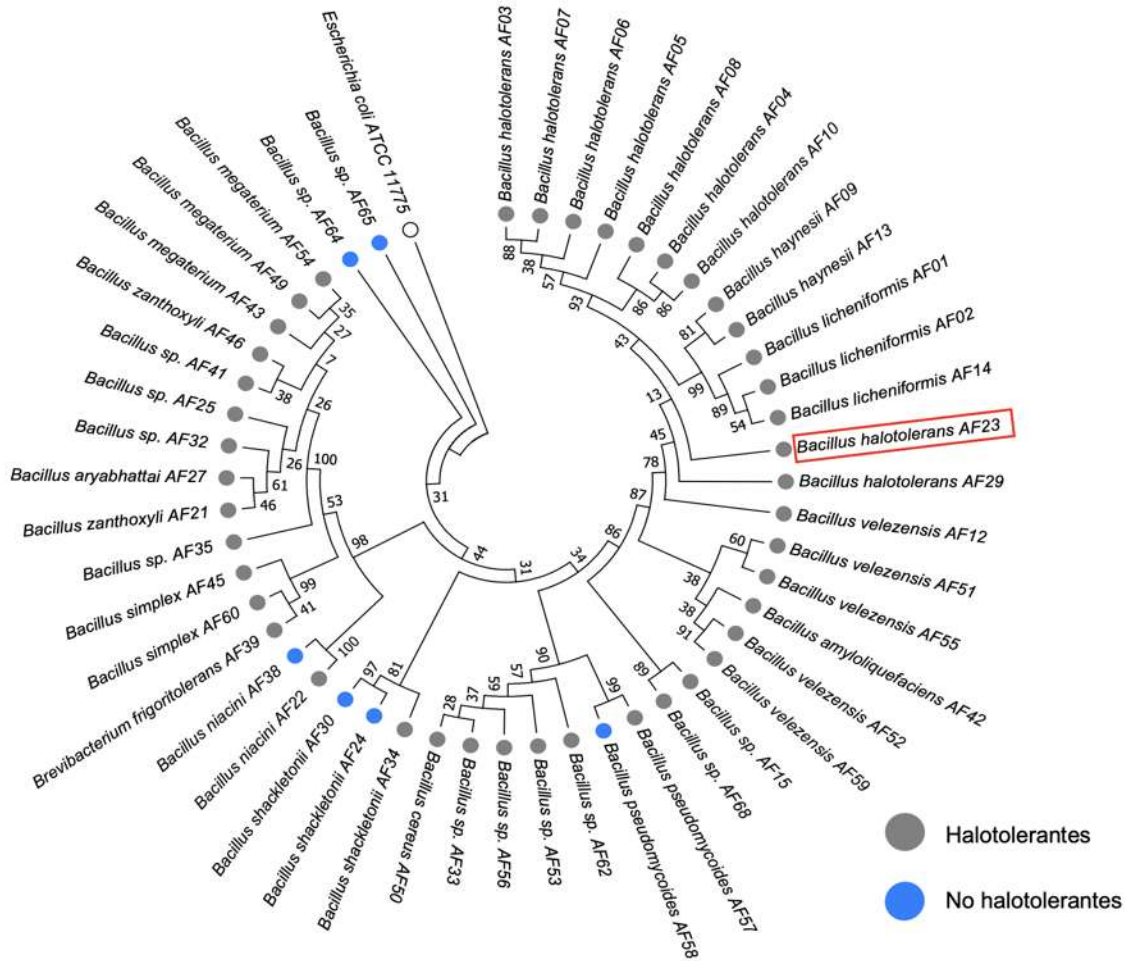


Figura 4. Árbol filogenético de 49 cepas de *Bacillus* basado en el gen de ARN16S, utilizando a *E. coli* ATCC 11775 como grupo externo. El árbol fue construido usando el método de Máxima Verosimilitud y soporte de arranque de 1000 repeticiones. *B. halotolerans* AF23 se resalta en un recuadro rojo, los círculos en gris representan las bacterias halotolerantes y los círculos azules las no halotolerantes.

7.2 Evaluación de la tolerancia a salinidad en medio líquido

La tolerancia de la cepa *B. halotolerans* AF23 se evaluó mediante la adición de 0, 25, 50, 100, 200, 500 y 1000 mM de NaCl al medio de cultivo líquido M9 salts (5x). Los resultados mostraron que posterior a las 12 h de incubación hay una disminución estadísticamente significativa en el crecimiento del medio adicionado con 200, 500 y 1000 mM de NaCl, respecto al control (0 mM). A las 24 horas de

incubación aumentó el crecimiento de la cepa AF23 a todas las concentraciones de NaCl evaluadas con respecto al control, a excepción del cultivo a 1000 mM. Por otra parte, posterior a las 36 y 48 h se observó un mayor crecimiento a todas las concentraciones de NaCl, respecto al control, siendo 500 y 1000 mM donde se presentó el mayor crecimiento (Figura 5).

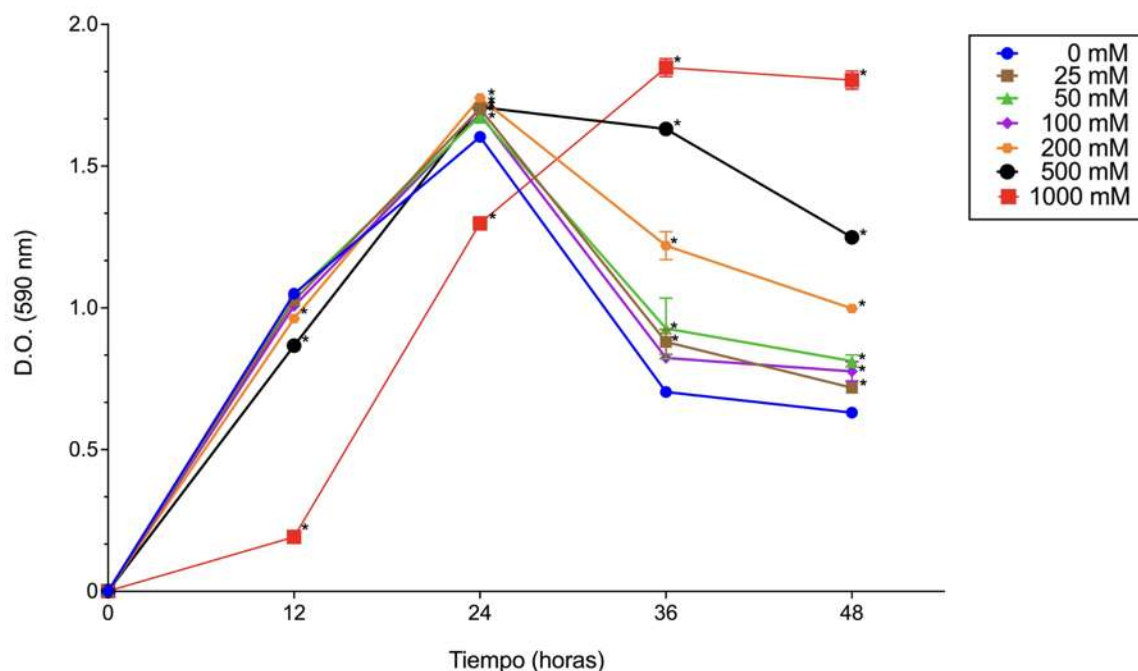


Figura 5. Crecimiento de la cepa AF23 a diferentes concentraciones de NaCl, reportado a las 12, 24, 36 y 48 horas. Los datos se refieren a los valores de absorbancia (D.O. 590 nm) de los cultivos a los tiempos indicados y se presentan como la media \pm error estándar. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto a la concentración de 0 mM en cada intervalo de tiempo evaluado, prueba Duncan ($p \leq 0.05$).

7.3 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*

Se evaluó la producción de sideróforos de *B. halotolerans* AF23 mediante la generación de un halo, reflejo de la producción de dichas moléculas en los medios de cultivo sólido, no se observaron diferencias significativas a excepción de 25 y 200 mM de NaCl, donde el diámetro del halo incrementó y disminuyó de tamaño,

respectivamente, a comparación del control (0 mM) (Figura 6a). La cepa AF23 produjo ácido indol acético en condiciones de salinidad; sin embargo, la producción disminuyó a 200 mM de NaCl (Figura 6b). En la solubilización de fosfato hubo diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de 25, 50 y 200 mM de NaCl, el halo de solubilización aumentó respecto al control (Figura 6c). La producción de proteasas se mantuvo constante a excepción de la concentración de 200 mM de NaCl (Figura 6d). No se observó producción de biofilm en los experimentos realizados en presencia y ausencia de NaCl.

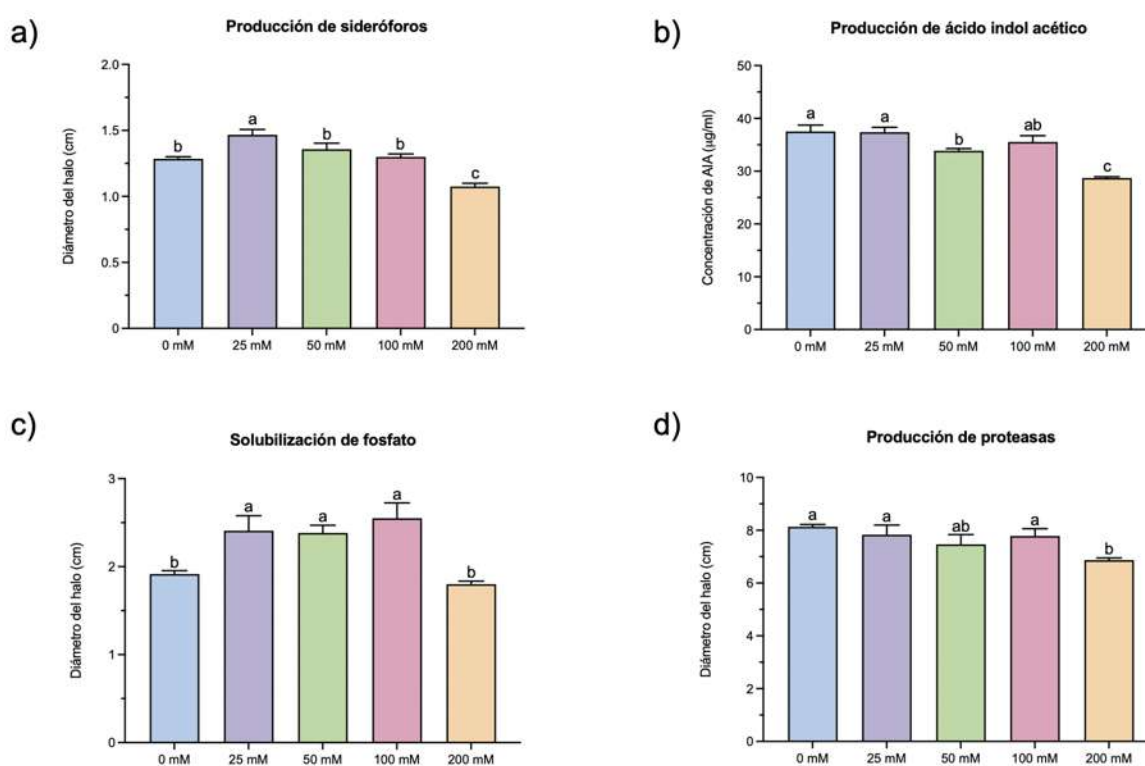


Figura 6. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* en condiciones salinas. a) Producción de sideróforos; b) ácido indol acético; c) solubilización de fosfato; d) producción de proteasas. Las barras representan la media \pm error estándar por cada tratamiento. Las letras sobre las barras indican una diferencia significativa, prueba Duncan ($p \leq 0.05$).

7.4 Ensayos de inoculación de plantas de tomate bajo estrés salino

Los resultados de los experimentos *in vitro* sugieren que *B. halotolerans* AF23 puede actuar como una bacteria promotora del crecimiento vegetal. Por lo tanto, se realizaron experimentos de inoculación en plantas de tomate en condiciones de invernadero. Para someter las plantas a estrés salino, estas fueron regadas con una concentración de 200 mM de NaCl; además, se realizó la inoculación de *B. velezensis* AF12 en las plantas de tomate para evaluar la promoción del crecimiento vegetal en interacción con esta cepa.

En condiciones no salinas, AF12 aumentó el contenido de clorofila en un 64% respecto a las plantas control; la inoculación de AF23 y el consorcio bacteriano provocaron un aumento en este parámetro en un 39 y 40%, respectivamente. El NaCl provocó una disminución de la clorofila en las plantas, sin embargo, este efecto inhibitorio se contrarrestó al inocular AF12 (Figura 7a). La longitud de la parte aérea disminuyó en las plantas con sal en comparación a las plantas sin sal; sin embargo, en las plantas con NaCl hay un incremento estadísticamente significativo del 17% cuando se inoculó el consorcio de AF12 y AF23, respecto a las plantas sin sal (Figura 7b).

El peso fresco de la parte aérea se mantuvo similar en las plantas sin sal. Por otra parte, en las plantas estresadas por sal, se observó un incremento significativo del 48% con AF12; mientras que con AF23 y ambas cepas juntas, aumentó en un 34 y 24%, respectivamente, en comparación con las plantas control (Figura 7c). Lo anterior se vio reflejado en el peso seco de la parte aérea, de igual forma AF12 incrementó de manera significativa este parámetro (69%), al mismo tiempo que AF23 y el consorcio mejoraron el peso seco en un 57 y 51%, respectivamente, en comparación con el control (Figura 7d). La longitud de la raíz se mantuvo sin cambios estadísticamente significativos entre tratamientos a excepción de las plantas sin sal, ya que AF12 incrementó la longitud de la raíz en un 19% y se observó una mejora del 3% al inocular el consorcio (Figura 7e). El peso fresco de la

raíz se mantuvo similar en las plantas sin NaCl. Por otra parte, disminuyó de forma estadísticamente significativa en las plantas con sal; no obstante, AF12 y el consorcio de bacterias incrementaron el peso seco de la raíz en un 35 y 34%, respectivamente comparado con el control (Figura 7f). El peso seco de la raíz incrementó en un 41% con AF12 en plantas sin sal. Como se esperaba, disminuyó en plantas con NaCl y de manera interesante, cuando se inocularon las cepas en conjunto, el peso seco aumentó un 17% (Figura 7g). La biomasa total se mantuvo similar en las plantas sin sal. Por otra parte, AF12 incrementó en un 53% la biomasa en las plantas con NaCl respecto al control, además al inocular AF23 y ambas cepas juntas, también hubo un incremento en la biomasa de las plantas del 38 y 41%, respectivamente (Figura 7h). Los resultados sugieren que AF12 y AF23 promueven diferencialmente el crecimiento de tomate bajo condiciones normales y estrés salino.

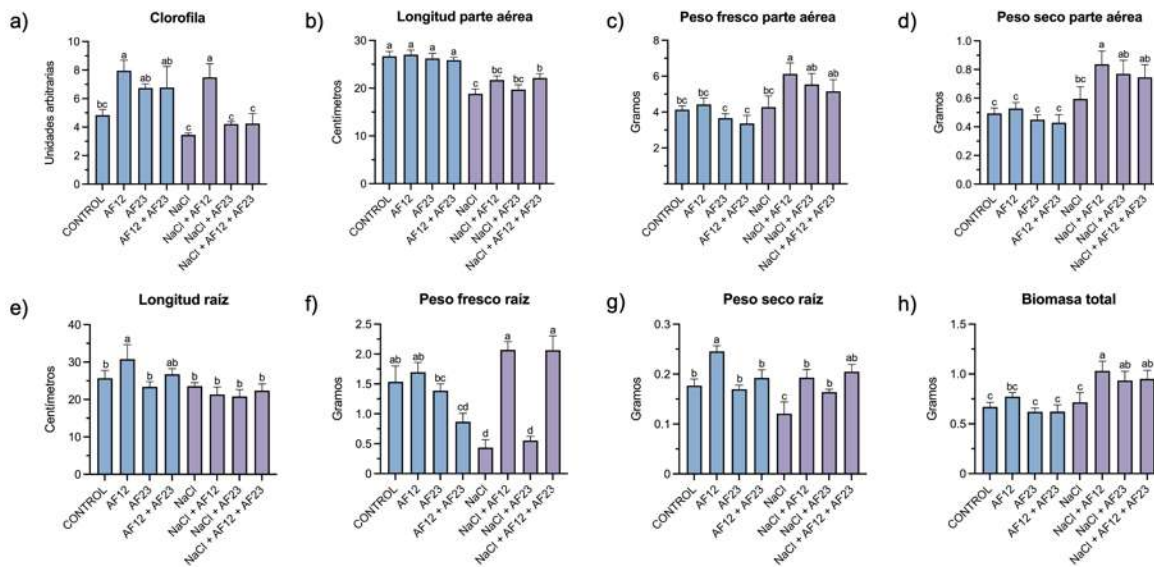


Figura 7. Efecto de la inoculación de *B. velezensis* AF12 y *B. halotolerans* AF23 en plantas de tomate bajo condiciones de estrés salino. a) contenido de clorofila; b) longitud parte aérea; c) peso fresco parte aérea; d) peso seco parte aérea; e) longitud de la raíz; f) peso fresco raíz; g) peso seco raíz; h) biomasa total. Las barras representan la media de las plantas \pm error estándar por cada tratamiento.

Las letras sobre las barras indican una diferencia significativa, prueba Duncan ($p \leq 0.05$).



Figura 8. Plantas de tomate (*S. lycopersicum*) inoculadas con las cepas AF12 y AF23 sometidas a estrés salino. Imágenes representativas de las plantas de cada tratamiento al día 50 después del trasplante a maceta. Las plantas control no fueron inoculadas ni regadas con NaCl.

7.5 Ensayos de biocontrol de AF12 y AF23 hacia *F. oxysporum* en plantas de tomate en condiciones de invernadero

El contenido de clorofila disminuyó en las plantas con *F. oxysporum* y no hubo diferencias estadísticamente significativas con la inoculación de AF12 y el consorcio bacteriano, respecto a las plantas control (Figura 9a). La longitud de la parte aérea se mantuvo sin diferencias significativas entre tratamientos (Figura 9b). AF12 incrementó en un 36% el peso fresco de la parte aérea y AF23 un 27% (Figura 9c). De igual forma, AF12 incrementó un 40% el peso seco de la parte aérea con respecto al control, así como también, AF23 un 37%, mientras que el consorcio un 30% (Figura 9d). No hubo diferencias en la longitud de la raíz de las plantas (Figura 9e). AF12 incrementó en un 39% el peso fresco de la raíz, respecto a las plantas control (Figura 9f). El peso seco se mantuvo sin diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Figura 9g). En la Figura 9h se muestra el efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en la biomasa total de plantas infectadas

con *F. oxysporum*. AF12, AF23 y el consorcio bacteriano incrementaron la biomasa total en un 34, 28 y 24%, respectivamente, en comparación a las plantas sin el patógeno fúngico.

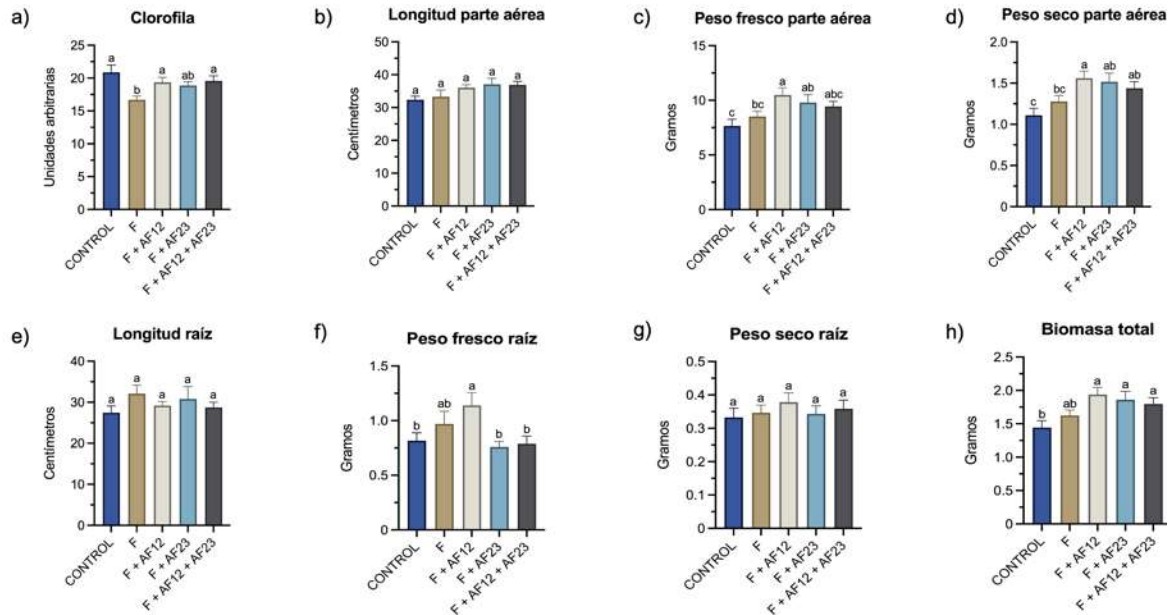


Figura 9. Efecto de biocontrol de las cepas AF12 y AF23 en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum*. a) contenido de clorofila; b) longitud parte aérea; c) peso fresco parte aérea; d) peso seco parte aérea; e) longitud de la raíz; f) peso fresco raíz; g) peso seco raíz; h) biomasa total. Las barras representan la media de las plantas \pm error estándar por cada tratamiento. Las letras sobre las barras indican una diferencia significativa, prueba Duncan ($p \leq 0.05$).



Figura 10. Plantas de tomate (*S. lycopersicum*) inoculadas con AF12, AF23 y *F. oxysporum*. Imágenes representativas de las plantas de cada tratamiento al día 60 después del trasplante a maceta. Las plantas control no fueron inoculadas.

7.6 Aislamiento y detección de *Fusarium* en plantas inoculadas

En el tallo de las plantas infectadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se observó una línea de color marrón oscuro, lo que corresponde a los primeros síntomas del marchitamiento vascular, esto no se observó en las plantas control (Figura 11).

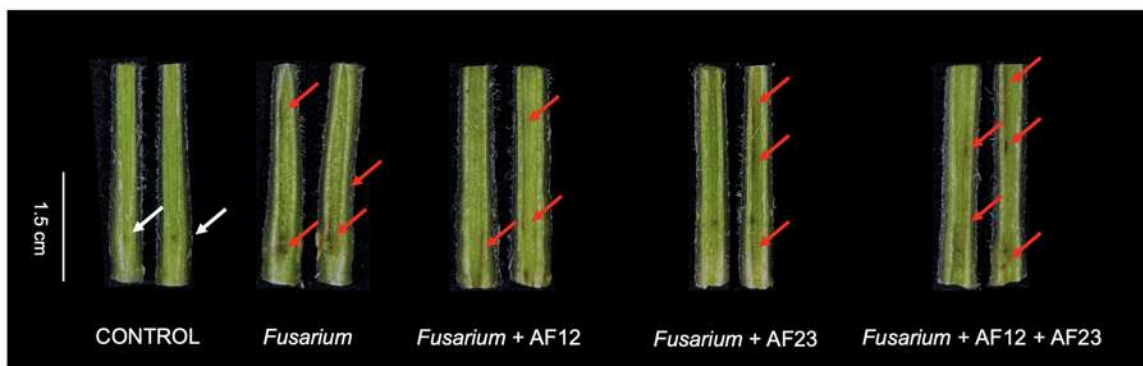


Figura 11. Síntomas iniciales del marchitamiento por *F. oxysporum* en tallos de plantas de tomate después de 60 días. El control no fue infectado con el patógeno, las flechas blancas indican el sitio de inoculación y las flechas rojas señalan las líneas de color marrón oscuro, síntomas iniciales de la marchitez vascular.

El patógeno fue re-aislado de los tallos de las plantas de tomate infectadas una vez que estos fueron colocados en medio PDA (Figura 12). El crecimiento macroscópico del hongo coincidió con el crecimiento rutinario de Fol raza 1. Con lo anterior, se detectó la presencia del hongo en los tallos de las plantas infectadas.



Figura 12. Reaislamiento de *F. oxysporum* de los tallos de tomate.

7.7 Ensayos de biocontrol de AF12 y AF23 hacia *F. oxysporum* en plantas de tomate bajo condiciones de salinidad (100 mM de NaCl)

En los ensayos realizados para evaluar el de biocontrol de las cepas AF12 y AF23 hacia *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* bajo condiciones de estrés salino, todas plantas fueron regadas con agua salina a una concentración de 100 mM de NaCl. La longitud de la parte aérea en las plantas sin el patógeno disminuyó con la coinoculación de ambas cepas, respecto al control; los demás tratamientos se mantuvieron similares entre sí (Figura 13a). El peso fresco de la parte aérea aumentó con la inoculación de las cepas AF12 y AF23 de forma individual y en consorcio en plantas sin *Fusarium* (17, 16 y 12%, respectivamente); además, al estar presente el patógeno, la inoculación del consorcio bacteriano incrementó un 14%, respecto al control (Figura 13b). De manera interesante, AF23 incrementó el

peso seco de la parte aérea (39%) y la inoculación del consorcio bacteriano incrementó un 31% este parámetro en plantas no infectadas, respecto al control. No existen diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos cuando el patógeno está presente (Figura 13c). Se observó un aumento en la biomasa total con la inoculación de AF23 y el consorcio bacteriano del 32 y 28%, respectivamente en plantas sin *F. oxysporum* (Figura 13d). La longitud de la raíz incrementó de forma estadísticamente significativa en un 28% con el consorcio de bacterias sin patógeno, respecto a las plantas control; los tratamientos de plantas infectadas permanecieron sin cambios (Figura 13e). La cepa AF12 incrementó el peso fresco de la raíz (44%) y se observó un aumento del 23% en la coinoculación de ambas cepas, respecto a las plantas control, en plantas sin *Fusarium*. Cuando AF12 fue inoculada en plantas infectadas con el patógeno, se observó una recuperación en el peso fresco de la raíz, ya que fue similar a las plantas sin infectar (Figura 13f). El peso seco de la raíz incrementó de forma estadísticamente significativa en un 27% en plantas inoculadas con AF12 sin *Fusarium*, respecto a las plantas control (Figura 13g).

Es importante mencionar que al examinar los tallos de las plantas infectadas con Fol, no en todas se observaron lesiones causadas por el patógeno; es decir, la inoculación de *B. velezensis* AF12 y *B. halotolerans* AF23 redujo de manera notable la infección en las plantas. Con AF12, solo el 40% de las plantas fueron infectadas, mientras que con AF23 un 80%; no obstante, con la coinoculación de ambas cepas, el porcentaje de infección fue del 20% (Figura 13h). Estos resultados posicionan a AF12 y AF23 como agentes de biocontrol en plantas afectadas por estrés salino.

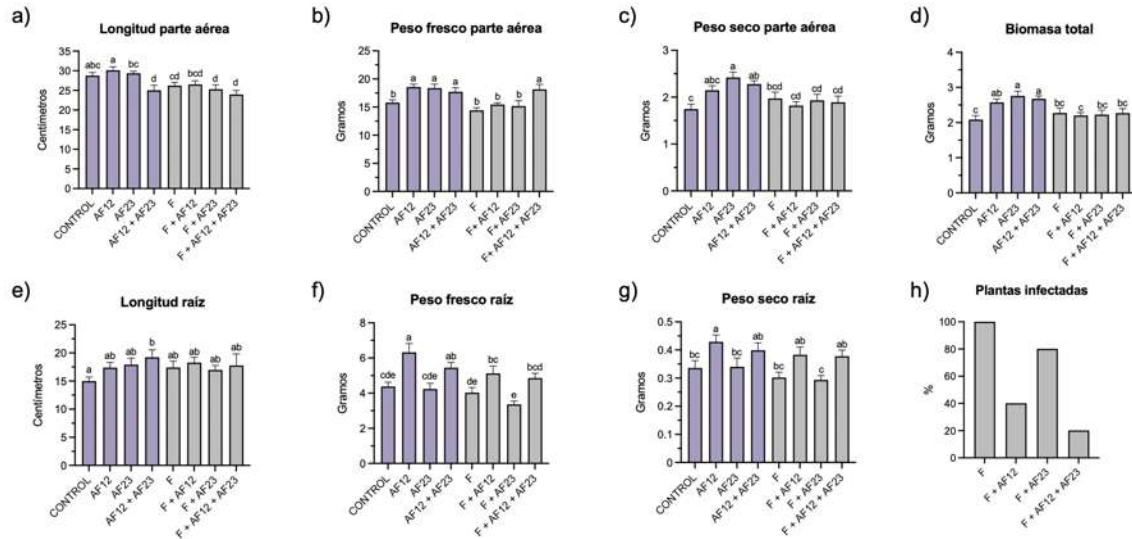


Figura 13. Efecto del biocontrol de AF12 y AF23 en plantas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* bajo condiciones de estrés salino. a) longitud parte aérea; b) peso fresco parte aérea; c) peso seco parte aérea; d) biomasa total; e) longitud raíz; f) peso fresco raíz; g) peso seco raíz; h) porcentaje de plantas infectadas. Las barras representan la media de las plantas \pm error estándar por cada tratamiento. Las letras sobre las barras indican una diferencia significativa, prueba Duncan ($p \leq 0.05$).

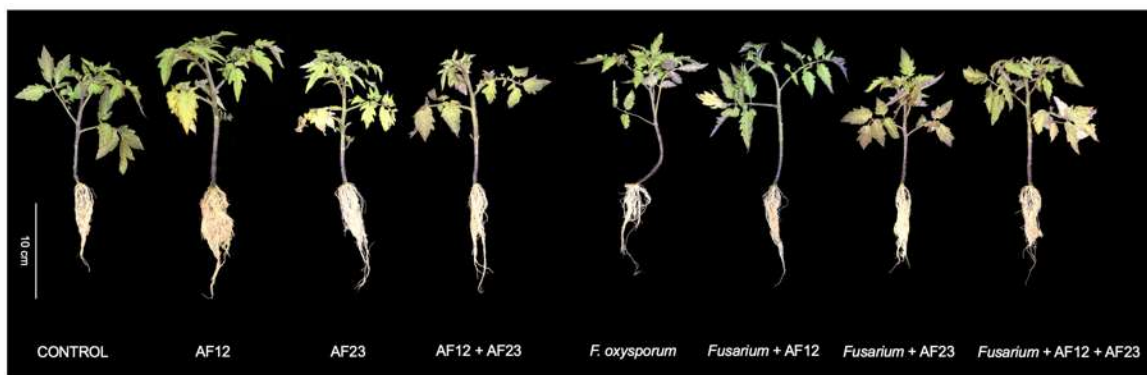


Figura 14. Plantas de tomate (*S. lycopersicum*) inoculadas con AF12, AF23 y *F. oxysporum* bajo estrés salino. Imágenes representativas de las plantas de cada tratamiento al día 45 después del trasplante a maceta. Las plantas control no fueron inoculadas ni regadas con sal.

7.8 Identificación de genes

En el genoma de *B. halotolerans* AF23 se encontraron genes con funciones predichas en adaptación a alta salinidad. Por ejemplo, relacionados a la síntesis de compuestos osmoprotectores como la prolina (*proA*, *proB* y *proC*) y la síntesis y transporte de glicina betaína/prolina (*betB*, *opuA*, *opuAB*, *opuE*). También genes que codifican a antiportadores de Na^+/H^+ (*nhaC*) y transportadores de Na^+ (*natA*), así como transportadores de K^+ (*ktrD* y *ktrC*) (Tabla 3).

Dado que esta cepa fue aislada de suelos afectados por incendios subterráneos y además es termotolerante, AF23 contiene diversos genes involucrados en la resistencia al estrés por temperatura, por ejemplo, *dnaJ*, *dnaK* y *groES*, codifican para proteínas de tipo chaperonas; además, se encontraron tres genes relacionados a choque de frío *cspB*, *cspC* y *cspD* (Tabla 4).

Genes implicados en la protección contra estrés oxidativo y nitrosativo están presentes: el gen *sodA* cuyo producto es la enzima superóxido dismutasa SodA participa en la degradación de radicales aniónicos superóxidos; también hay otros que se encargan de la degradación de peróxido de hidrógeno (*ahpC*, *efeB*, etc.) y un represor transcripcional sensible al óxido nítrico (*nsrR*) (Tabla 5).

En la Tabla 5 se muestran los genes encontrados en AF23 implicados en el metabolismo de nitrógeno, azufre y fósforo. El gen *nirB* el cual es necesario para la reducción de nitritos; la fosfatasa alcalina PhoA codificada por el gen *phoA*, la cual es importante en la solubilización de fosfato orgánico; genes involucrados en el transporte de sulfato (*cysK*), solo por mencionar algunos.

B. halotolerans AF23 tiene genes como *besA* cuyo producto es una ferri-bacillibactin esterasa BesA y *dhbC* que codifica a una isocorismato sintasa DhbC, ambos implicados en la producción de sideróforos, mecanismo importante en la promoción del crecimiento vegetal (Tabla 7).

Un aspecto relevante en plantas, es la producción y modulación de hormonas por PGPB. AF23 cuenta con genes que participan en la síntesis de AIA y de citocininas. El gen *trpB* codifica a la subunidad beta de la triptófano sintasa, su función es de suma importancia ya que se encarga de la síntesis de L-triptófano a partir de indol y L-serina (principal precursor del AIA), también está presente el gen *dhaS* que cataliza la conversión de indol-3-acetaldehído a AIA (Tabla 8).

La Tabla 9 muestra los genes relacionados en la producción/degradación de VOC. En la síntesis de acetoina participa el gen *alsS* y en la degradación del butanodiol el gen *bdhA*. En el genoma de AF23 se encontraron genes que se relacionan con la quimiotaxis (*cheA, cheB, cheD, cheR, cheV, cheY, cheW, motA*), con la biosíntesis de flagelos (*flgB, flgC, flgK, flhA*), con la formación de biopelículas (*tasA* y *Efp*) (Tabla 10). Genes implicados en el transporte y resistencia a metales pesados como el zinc, cobre y arseniato (Tabla 11) y genes relacionados en la formación de esporas (*yabP, yjcZ, yjcD, ytfJ, yunB, gerD, yutH, cotJC*) (Tabla 12).

La presencia de estos genes indica que AF23 contiene la maquinaria genética para hacer frente a diferentes tipos de estrés y promover el crecimiento vegetal a través de diversos mecanismos.

8. ANEXO DE TABLAS

Tabla 2. Cepas halotolerantes y no halotolerantes de acuerdo a su crecimiento a 2.9% de NaCl.

Cepa	Especie de referencia	Halotolerante	No halotolerante
AF01	<i>Bacillus licheniformis</i> strain DSM 13	x	
AF02	<i>Bacillus licheniformis</i> strain DSM 13	x	
AF03	<i>Bacillus halotolerans</i> strain LMG 22477	x	
AF04	<i>Bacillus halotolerans</i> strain LMG 22477	x	
AF05	<i>Bacillus halotolerans</i> strain LMG 22477	x	
AF06	<i>Bacillus halotolerans</i> strain LMG 22477	x	
AF07	<i>Bacillus halotolerans</i> strain LMG 22477	x	
AF08	<i>Bacillus halotolerans</i> strain LMG 22477	x	
AF09	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	x	
AF10	<i>Bacillus halotolerans</i> strain LMG 22477	x	
AF12	<i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	x	
AF13	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327	x	
AF14	<i>Bacillus licheniformis</i> strain DMS 13	x	
AF15	<i>Bacillus</i> sp.	x	
AF21	<i>Bacillus zanthoxyli</i> strain 1433	x	
AF22	<i>Bacillus niacini</i> strain NBRC 15566	x	
AF23	<i>Bacillus halotolerans</i> strain LMG 22477	x	
AF24	<i>Bacillus shackletonii</i> strain LMG 18435		x
AF25	<i>Bacillus</i> sp.	x	
AF27	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain B8W22	x	
AF29	<i>Bacillus halotolerans</i> strain LMG 22477	x	
AF30	<i>Bacillus shackletonii</i> strain LMG 18435		x
AF32	<i>Bacillus</i> sp.	x	
AF33	<i>Bacillus</i> sp.	x	
AF34	<i>Bacillus shackletonii</i> strain LMG 18435	x	
AF35	<i>Bacillus</i> sp.	x	
AF38	<i>Bacillus niacini</i> strain NBRC 15566		x
AF39	<i>[Brevibacterium] frigitolerans</i> strain DSM 8801	x	
AF41	<i>Bacillus</i> sp.	x	
AF42	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain MPA 1034	x	
AF43	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581	x	
AF45	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 = DSM 1321	x	
AF46	<i>Bacillus zanthoxyli</i> strain 1433	x	
AF49	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581	x	

AF50	Bacillus cereus ATCC 14579	x	
AF51	Bacillus velezensis strain CBMB205	x	
AF52	Bacillus velezensis strain FZB42	x	
AF53	Bacillus sp.	x	
AF54	Bacillus megaterium strain ATCC 14581	x	
AF55	Bacillus velezensis strain FZB42	x	
AF56	Bacillus sp.	x	
AF57	Bacillus pseudomycooides strain NBRC 101232	x	
AF58	Bacillus pseudomycooides strain NBRC 101232		x
AF59	Bacillus velezensis strain CBMB205	x	
AF60	Bacillus simplex NBRC 15720 = DSM 1321	x	
AF62	Bacillus sp.	x	
AF64	Bacillus sp.		x
AF65	Bacillus sp.		x
AF68	Bacillus sp.	x	

Tabla 3. Genes implicados en la tolerancia al estrés osmótico.

Gen	Locus	CDS	Producto	Vía / función
<i>betB</i>	LNN34_15855	6367..7839	Betaina-aldehído deshidrogenasa	Biosíntesis de glicina betaina
<i>proA</i>	LNN34_08980	50993..52240	Glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa	Biosíntesis de prolina
<i>proB</i>	LNN34_08985	52252..53349	Glutamato 5-quinasa	
<i>proS</i>	LNN34_07220	395627..397321	Prolina-ARNi ligasa	
<i>gltB</i>	LNN34_06120	94917..99479	Glutamato sintasa (NADPH/NADH) cadena grande	Biosíntesis de glutamato
<i>gltD</i>	LNN34_06125	99496..100977	Glutamato sintasa (NADPH/NADH) cadena pequeña	
<i>glnA</i>	LNN34_06730	236207..237541	Glutamina sintetasa	
<i>opuBC</i>	LNN34_17295	36403..37323	Sistema transportador de captación de osmoprotector OpuB componente C	Sistema de transporte osmoprotector
<i>opuAB</i>	LNN34_14735	211113..211961	Sistema de transporte osmoprotector ATP-binding	
<i>gltP</i>	LNN34_15095	283654..284898	Glutamato-aspartato/simportador de protones GltP	Transporte de glutamato
<i>natA</i>	LNN34_14880	241244..241984	Sistema de transporte de sodio Proteína de unión a ATP	Transportadores de sodio y cloruro
<i>mnhG</i>	LNN34_16185	74178..74552	Catión monovalente/H ⁺ antiportador subunidad G	
<i>nhaC</i>	LNN34_11290	456181..457542	Na ⁺ /H ⁺ antiportador NhaC	
<i>trkH</i>	LNN34_15875	10390..11727	Sistema Trk transportador de potasio TrkH	Transportador de potasio
<i>treC</i>	LNN34_12310	93207..94895	Alfa, alfa-fosfotrehalasa	Metabolismo de la trehalosa
<i>treR</i>	LNN34_12305	92470..93186	Represor de operón trehalosa	

Tabla 4. Genes implicados en la resistencia al estrés por temperatura.

Gen	Locus	CDS	Producto	Vía / función
<i>smpB</i>	LNN34_17240	27145..27615	Proteína de unión a SsrA	Proteínas de choque térmico
<i>dnaJ</i>	LNN34_02475	70576..71703	Chaperona molecular DnaJ	
<i>dnaK</i>	LNN34_02470	68544..70379	Chaperona molecular DnaK	
<i>groES</i>	LNN34_13215	97348..97632	Chaperona GroES	
<i>clpC</i>	LNN34_15795	55147..57579	Proteasa Clp dependiente de ATP Subunidad de unión a ATP ClpC	
<i>clpE</i>	LNN34_08675	139813..141912	Proteasa dependiente de ATP Subunidad de unión a ATP ClpE	
<i>clpX</i>	LNN34_01430	127910..129172	Proteasa Clp dependiente de ATP Subunidad de unión a ATP ClpX	
<i>lepA</i>	LNN34_02450	63742..65577	Factor de elongación de traducción 4	
<i>grpE</i>	LNN34_02465	67957..68520	Factor de intercambio de nucleótidos GrpE	
<i>cspB</i>	LNN34_11610	523490..523693	Proteína similar al choque frío CspB	Proteína de choque frío
<i>cspC</i>	LNN34_13605	20582..20785	Proteína de choque frío CspC	
<i>cspD</i>	LNN34_04305	128115..128315	Proteína de choque frío CspD	

Tabla 5. Genes implicados en la protección contra el estrés oxidativo y nitrosativo.

Gen	Locus	CDS	Producto	Vía / función
<i>sodA</i>	LNN34_02690	109422..110030	Superóxido dismutasa SodA	Degradación de radicales aniónicos superóxidos
<i>perR</i>	LNN34_11860	3349..3786	Represor transcripcional sensible al peróxido PerR	
<i>tpx</i>	LNN34_00830	4566..5069	Tiol peroxidasa	Degradación de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos
<i>bcp</i>	LNN34_11865	3921..4394	Tiol-peroxidasa dependiente de tiorredoxina	
<i>ahpC</i>	LNN34_20705	272845..273408	Alquilo hidroperóxido reductasa subunidad C	
<i>ahpF</i>	LNN34_20710	273422..274951	Subunidad F de la hidroperóxido de alquilo reductasa	
<i>efeB</i>	LNN34_19705	72871..74121	Deferroquelatasa/peroxidasa	
<i>nsrR</i>	LNN34_11445	489174..489614	Represor transcripcional sensible al óxido nítrico NsrR	Estrés nitrosativo

Tabla 6. Genes implicados en el metabolismo del nitrógeno, azufre y fósforo.

Gen	Locus	CDS	Producto	Vía / función
<i>nirB</i>	LNN34_14570	171064..173382	Subunidad grande de nitrato reductasa NirB	Reducción de nitratos disimilatoria
<i>nirD</i>	LNN34_14585	178091..178411	Subunidad pequeña de nitrato reductasa (NADH)	
<i>amtB</i>	LNN34_18775	42601..43815	Transportador de amonio AmtB	Transporte de amoniaco
<i>ureC</i>	LNN34_18835	51640..53349	Subunidad alfa de la ureasa	Degradación y transporte de urea
<i>ureB</i>	LNN34_18840	53346..53720	Subunidad de ureasa beta	
<i>ureA</i>	LNN34_18845	53717..54034	Subunidad gamma de ureasa	
<i>urtC</i>	LNN34_18860	55555..56625	Proteína permeasa del sistema de transporte de urea	
<i>urtD</i>	LNN34_18855	54831..55580	Sistema de transporte de urea proteína de unión a ATP	
<i>urtE</i>	LNN34_18850	54133..54834	Sistema de transporte de urea Proteína de unión a ATP	
<i>phoA</i>	LNN34_11430	484550..485926	Fosfatasa alcalina PhoA	Solubilización de fosfato orgánico
<i>pstC</i>	LNN34_02710	114822..115751	Proteína permeasa del sistema de transporte de fosfato	Transporte de fosfato
<i>pstA</i>	LNN34_02715	115751..116635	Proteína permeasa del sistema de transporte de fosfato	
<i>pstB</i>	LNN34_02720	116656..117465	Proteína permeasa del sistema de transporte de fosfato	
<i>phoP</i>	LNN34_00960	33072..33794	Proteína reguladora transcripcional de la síntesis de fosfatasa alcalina	Asimilación de fosfatos
<i>phoB</i>	LNN34_13355	13494..14882	Fosfatasa alcalina PhoB	Asimilación de fosfatos
<i>phoD</i>	LNN34_14945	252771..254522	Fosfatasa alcalina D	
<i>cysI</i>	LNN34_17130	2345..4066	Subunidad de hemoproteína asimilatoria de sulfito reductasa (NADPH)	Reducción de sulfato
<i>cysC</i>	LNN34_07710	488726..489319	Adenil-sulfato quinasa	
<i>cysK</i>	LNN34_21675	46495..47421	Cisteína sintasa A	Transporte de sulfato
<i>ssuD</i>	LNN34_11735	542801..543937	Alcanosulfonato monooxigenasa	Transporte y degradación de sulfonatos

Tabla 7. Genes implicados en el transporte de hierro y la producción de sideróforos.

Gen	Locus	CDS	Producto	Via / función
<i>fbpB</i>	LNN34_13890	22285..22431	Proteína permeasa del sistema de transporte de hierro (III)	Transporte de hierro (III)
<i>fbpC</i>	LNN34_04245	119853..119942	Sistema de transporte de hierro (III) Proteína de unión a ATP	
<i>efeB</i>	LNN34_19705	72871..74121	Deferroquelatasa/peroxidasa EfeB	Transporte de hierro (II)
<i>besA</i>	LNN34_16350	114450..115313	ferri-bacillibactin esterasa BesA	Producción de sideróforos
<i>dhbC</i>	LNN34_16340	112255..113451	Isocorismato sintasa DhbC	

Tabla 8. Genes implicados en la producción/modulación de fitohormonas.

Gen	Locus	CDS	Producto	Vía / función
<i>trpA</i>	LNN34_03925	63075..63878	Subunidad alfa de la triptófano sintasa	Síntesis AIA
<i>trpB</i>	LNN34_03920	61880..63082	Subunidad beta de la triptófano sintasa	
<i>trpC</i>	LNN34_03910	60489..61241	Indol-3-glicerol fosfato sintasa TrpC	
<i>trpD</i>	LNN34_03905	59480..60496	Antranilato fosforribosiltransferasa	
<i>dhaS</i>	LNN34_05685	13425..14912	Aldehído deshidrogenasa DhaS	
<i>trpS</i>	LNN34_10390	280404..281396	Triptófano-ARNt ligasa	
<i>gabT</i>	LNN34_14235	88283..89596	4-aminobutirato aminotransferasa	Degradación de GABA
<i>gabD</i>	LNN34_14230	86824..88212	Succinato-semialdehído deshidrogenasa	
<i>miaA</i>	LNN34_06805	250837..251781	ARNt dimetilaliltransferasa	Biosíntesis de citocininas
<i>miaB</i>	LNN34_07010	348242..349771	ARNt-2-metilicio-N6-dimetilaliladenosina sintasa	

Tabla 9. Genes implicados en la producción/degradación de VOC.

Gen	Locus	CDS	Producto	Vía / función
<i>alsS</i>	LNN34_18495	12139..13851	Acetolactato sintasa AlsS	Biosíntesis de acetoína
<i>ilvB</i>	LNN34_01385	116978..118702	Subunidad grande de acetolactato sintasa	
<i>acuA</i>	LNN34_00610	122845..123477	Proteína de utilización de acetoína	Catabolismo de acetoína
<i>bdhA</i>	LNN34_13155	81254..82294	2, 3-butanodiol deshidrogenasa	Degradación de butanodiol

Tabla 10. Genes implicados en la quimiotaxis, la motilidad y la formación de biopelículas.

Gen	Locus	CDS	Producto	Vía / función
<i>cheA</i>	LNN34_07290	407834..409849	Sistema de dos componentes, sensor quinasa CheA	Quimiotaxis
<i>cheB</i>	LNN34_07295	409855..410922	Proteína-glutamato O-metilesterasa CheB	
<i>cheD</i>	LNN34_07275	406197..406697	Quimiorreceptor glutamina desamidasa CheD	
<i>cheR</i>	LNN34_03880	54258..55028	Proteína-glutamato O-metiltransferasa CheR	
<i>cheV</i>	LNN34_08510	105147..106058	Sistema de dos componentes, proteína quimiotaxis CheV	
<i>cheY</i>	LNN34_07340	418459..418821	Sistema de dos componentes, proteína de quimiotaxis CheY	
<i>cheW</i>	LNN34_07285	407342..407812	Proteína de quimiotaxis de unión a purina CheW	
<i>motA</i>	LNN34_08680	142274..143089	Proteína de quimiotaxis MotA	
<i>motB</i>	LNN34_08685	143061..143846	Proteína de quimiotaxis MotB	
<i>mcpA</i>	LNN34_15950	27620..29605	Proteína de quimiotaxis aceptora de metilo	
<i>flhA</i>	LNN34_07310	412908..414977	Proteína de biosíntesis flagelar FlhA	
<i>flhB</i>	LNN34_07315	414974..416056	Proteína biosintética flagelar FlhB	
<i>flgB</i>	LNN34_07420	430995..431384	Proteína de bastón del cuerpo basal flagelar FlgB	
<i>flgC</i>	LNN34_07415	430543..430995	Proteína de bastón del cuerpo basal flagelar FlgC	
<i>fliF</i>	LNN34_07405	428556..430166	Proteína de anillo M del cuerpo basal flagelar FliF	
<i>fliG</i>	LNN34_07400	427527..428543	Proteína del interruptor motor flagelar FliG	
<i>fliM</i>	LNN34_07350	419974..420972	Proteína del interruptor motor flagelar FliM	
<i>fliP</i>	LNN34_07330	417127..417792	Proteína biosintética flagelar FliP	
<i>fliQ</i>	LNN34_07325	416843..417112	Proteína de biosíntesis flagelar FliQ	
<i>fliR</i>	LNN34_07320	416056..416835	Proteína biosintética flagelar FliR	
<i>fliS</i>	LNN34_18135	25188..25589	Chaperona de secreción flagelar FliS	
<i>flhA</i>	LNN34_07310	412908..414977	Biosíntesis flagelar de la proteína FlhA	
<i>bsiB</i>	LNN34_19460	26036..26500	Proteína de la capa superficial del biofilm BsiB	Formación de biopelículas
<i>tasA</i>	LNN34_02900	142057..142842	Proteína de matriz de biofilm TasA	
<i>Efp</i>	LNN34_02985	6778..7335	Factor de elongación P	

Tabla 11. Genes implicados en el transporte y resistencia a metales pesados.

Gen	Locus	CDS	Producto	Vía / función
<i>yabP</i>	LNN34_21600	32937..33239	Proteína de esporulación YabP	Formación y germinación de esporas
<i>yqfC</i>	LNN34_02525	79556..79837	Proteína de esporulación YqfC	
<i>ytfJ</i>	LNN34_00825	4001..4456	Proteína de esporulación YqfJ	
<i>yunB</i>	LNN34_16510	142899..143666	Proteína de esporulación YunB	
<i>yhbH</i>	LNN34_11665	531584..532762	Proteína de esporulación YhbH	
<i>sigH</i>	LNN34_15735	43880..44536	ARN polimerasa esporulación factor sigma SigH	
<i>sigG</i>	LNN34_07845	516294..517076	ARN polimerasa esporulación factor sigma SigG	
<i>sigE</i>	LNN34_07850	517216..517935	ARN polimerasa esporulación factor sigma SigE	
<i>sigF</i>	LNN34_03520	102006..102773	ARN polimerasa esporulación factor sigma SigF	
<i>gerD</i>	LNN34_15445	1784..2341	Proteína de germinación de esporas GerD	
<i>gerPE</i>	LNN34_10775	350589..350990	Proteína de germinación de esporas GerPE	
<i>gerPD</i>	LNN34_10770	350414..350596	Proteína de germinación de esporas GerPD	
<i>cotJC</i>	LNN34_12720	185166..185735	Proteína de cubierta de esporas CotJC	
<i>cotJB</i>	LNN34_12725	185750..186013	Proteína de cubierta de esporas CotJB	
<i>cotE</i>	LNN34_07000	347008..347553	Proteína de la cubierta externa de la espora CotE	
<i>spo0A</i>	LNN34_03100	26614..27417	Factor de transcripción de esporulación Spo0A	
<i>spo0F</i>	LNN34_19110	98450..98824	Iniciación de la esporulación fosfotransferasa Spo0F	

Tabla 12. Genes implicados en la formación y germinación de esporas.

Gen	Locus	CDS	Producto	Vía / función
<i>yabP</i>	LNN34_21600	32937..33239	Proteína de esporulación YabP	Formación y germinación de esporas
<i>yqfC</i>	LNN34_02525	79556..79837	Proteína de esporulación YqfC	
<i>ytfJ</i>	LNN34_00825	4001..4456	Proteína de esporulación YqfJ	
<i>yunB</i>	LNN34_16510	142899..143666	Proteína de esporulación YunB	
<i>yhbH</i>	LNN34_11665	531584..532762	Proteína de esporulación YhbH	
<i>sigH</i>	LNN34_15735	43880..44536	ARN polimerasa esporulación factor sigma SigH	
<i>sigG</i>	LNN34_07845	516294..517076	ARN polimerasa esporulación factor sigma SigG	
<i>sigE</i>	LNN34_07850	517216..517935	ARN polimerasa esporulación factor sigma SigE	
<i>sigF</i>	LNN34_03520	102006..102773	ARN polimerasa esporulación factor sigma SigF	
<i>gerD</i>	LNN34_15445	1784..2341	Proteína de germinación de esporas GerD	
<i>gerPE</i>	LNN34_10775	350589..350990	Proteína de germinación de esporas GerPE	
<i>gerPD</i>	LNN34_10770	350414..350596	Proteína de germinación de esporas GerPD	
<i>cotJC</i>	LNN34_12720	185166..185735	Proteína de cubierta de esporas CotJC	
<i>cotJB</i>	LNN34_12725	185750..186013	Proteína de cubierta de esporas CotJB	
<i>cotE</i>	LNN34_07000	347008..347553	Proteína de la cubierta externa de la espora CotE	
<i>spo0A</i>	LNN34_03100	26614..27417	Factor de transcripción de esporulación Spo0A	
<i>spo0F</i>	LNN34_19110	98450..98824	Iniciación de la esporulación fosfotransferasa Spo0F	

9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se evaluó la acción promotora del crecimiento vegetal de la cepa AF23 bajo condiciones de salinidad. Esta bacteria fue identificada previamente y sus mecanismos de biocontrol *in vitro* hacia fitopatógenos fueron analizados (Valencia-Marín, 2021). Dado que AF23 fue aislada de un ambiente no convencional (suelos afectados por incendios subterráneos) y existen reportes de bacterias que promueven el crecimiento vegetal de forma exitosa, cuyas fuentes de aislamiento son extremas también (Bokhari et al., 2019; Jamali et al., 2019; Pranaw et al., 2020), se decidió evaluar el efecto de AF23 *in vitro* y a nivel planta.

En un estudio previo, la cepa AF23 se identificó como *Bacillus halotolerans* a través de los análisis de identidad de nucleótidos promedio (ANI), calculadora de distancia de genoma a genoma (GGDC) y una filogenia con base en la secuencia del gen rARN 16s, obteniendo 98.9%, 97.92% y 100%, respectivamente (Valencia-Marín, 2021). Con la identificación de la bacteria a nivel especie, la primera suposición fue que se trataba de una bacteria tolerante a la sal, así que se evaluó el crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl (25, 50, 100, 200, 500 y 1000 mM) en distintos intervalos de tiempo. El crecimiento de AF23 a 500 y 1000 mM durante las primeras 24 h se dio de forma lenta; sin embargo, a las 36 y 48 h se observó un mayor crecimiento respecto a la concentración de 0 mM, lo que indicó que esta cepa tiene la capacidad de crecer en condiciones de alta salinidad.

Al comparar el crecimiento de AF23 con el de la cepa *B. subtilis* 168 en experimentos de halotolerancia, el crecimiento de *B. subtilis* 168 fue mínimo (datos no mostrados), tal como fue reportado previamente (bajo condiciones de estrés por NaCl) (Rath et al., 2020). Mientras que el crecimiento de AF23 está dentro del rango de NaCl designado para microorganismos denominados halotolerantes (Merino et al., 2019; Reang et al., 2022).

Uno de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal es la facilitación de nutrientes como el hierro a través de la producción de sideróforos (Khan et al., 2019). AF23 produce sideróforos en condiciones salinas, siendo 200 mM la concentración más alta de NaCl evaluada. Existen reportes de cepas de *Bacillus* que también producen sideróforos en salinidad, por ejemplo, *B. aryabhatai* MS3, una cepa tolerante a la sal que produce sideróforos a 100 y 200 mM (Sultana et al., 2021). La producción de compuestos quelantes de hierro por parte de AF23 puede explicarse desde el punto de vista genómico, ya que cuenta con grupos de genes con 100% de similitud a aquellos que codifican al sideróforo bacillibactina, algunos genes que forman parte de este grupo son: *besA* y *dhbC*, este último codifica a una isocorismato sintasa (Tabla 7), estos genes se han encontrado en otras especies como *B. megaterium* STB1 (Nascimento et al., 2020). La producción de sideróforos al ser un mecanismo dual para promover el crecimiento vegetal, no solo facilita la toma de hierro, sino que también limita el crecimiento de patógenos de plantas (Di Francesco y Baraldi, 2021). La producción de bacillibactina por parte de AF23 puede asociarse a su capacidad para antagonizar patógenos fúngicos, ya que este tipo de sideróforo ha sido relacionado con actividad de biocontrol (Dimopoulou et al., 2021).

En los ensayos *in vitro*, AF23 produjo AIA en todas las concentraciones evaluadas (25, 50, 100 y 200 mM), con una ligera disminución a 200 mM. La síntesis de AIA por parte de PGPB es un rasgo destacado en situaciones de estrés causado por la salinidad. *B. halotolerans* AF23 posee genes involucrados en la síntesis de AIA (Tabla 8). La mayoría de los aspectos del crecimiento de las plantas como división celular, el alargamiento, el desarrollo de frutos y la estimulación de la formación de pelos radiculares, pueden ser regulados por el AIA; esta fitohormona puede aumentar la longitud de la raíz primaria y el número de raíces laterales, lo que se relaciona positivamente con la absorción de agua y nutrientes por parte de las plantas (Luo et al., 2022).

Asimismo, en los experimentos *in vitro* se observó que AF23 produce proteasas en condiciones salinas con una disminución en 200 mM en comparación a las

condiciones sin sal. Esta actividad no solo se ha reportado en *B. halotolerans*, por ejemplo, Na y colaboradores (2022), informaron que la cepa DMB06 de *B. velezensis* produce proteasas bajo salinidad.

Las PGPB pueden reducir el estrés salino en plantas al proporcionar nutrientes como el fósforo (Gao et al., 2022). AF23 solubilizó fosfato y se observa un incremento en el halo de solubilización en las concentraciones de 25, 50 y 100 mM de NaCl, respecto a 0 mM. Una manera de comprender esta actividad es a través del análisis genómico realizado, ya que AF23 contiene varios genes implicados en este mecanismo (Tabla 6). Los resultados en la solubilización de fosfato con AF23 difieren de los obtenidos con la cepa halotolerante *B. pumilus* JPVS1, ya que esta última cepa, a medida que aumenta la concentración de sal, disminuye la solubilización de fosfato; no obstante, JPVS1 mostró una mejora significativa en los atributos de crecimiento de las plantas de arroz bajo estrés por sal (Kumar et al., 2021).

Los resultados positivos en los experimentos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* fueron un punto de partida para evaluar la cepa AF23 en plantas de tomate, bajo diferentes condiciones: 1) estrés salino (200 mM); 2) infección con Fol y; 3) estrés salino (100 mM) e infección con Fol. La primera concentración de NaCl evaluada en las plantas (200 mM), fue designada al tomar en cuenta dos aspectos; el primero fue que el crecimiento de la cepa AF23 se dio de forma óptima y el segundo fue de acuerdo a informes publicados previamente (Abdelshafy Mohamad et al., 2020; Sultana et al., 2021). La segunda concentración de salinidad evaluada en las plantas infectadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (raza 1), se asignó conforme al crecimiento óptimo del patógeno en estas condiciones de NaCl (100 mM).

En los experimentos en plantas, se decidió evaluar de forma individual y en consorcio el efecto de la inoculación de *B. velezensis* AF12 y *B. halotolerans* AF23 en tomate bajo estrés de tipo biótico y abiótico, debido a los antecedentes previos

del grupo de trabajo (Chávez-Avila, 2021; Valencia-Marín, 2021); y de igual manera, los reportes publicados en los que estas especies promovieron el crecimiento de plantas como el tomate y mostraron actividad antagónica hacia hongos fitopatógenos como *F. oxysporum* (Dong et al., 2023; Huang et al., 2022; Rabbee et al., 2023; Tsalgatidou et al., 2023).

La salinidad tuvo un efecto negativo en el contenido de clorofila en las plantas de tomate (Figura 7a). AF12 (datos no mostrados) y AF23 tienen la capacidad de producir sideróforos, así consiguen convertir el hierro a una forma asimilable, esta habilidad puede relacionarse con el incremento del contenido de clorofila en plantas de tomate, ya que el Fe desempeña una función importante en la biosíntesis de clorofila (Sultana et al., 2021).

La inoculación de AF12 y AF23, individualmente o en consorcio tuvo mejoras significativas en las plantas de tomate afectadas por sal (200 mM); el peso seco de la parte aérea incrementó respecto a las plantas control en un 50 al 69% (Figura 7d), lo cual se vio reflejado en la biomasa total con incrementos del 38 al 53% (Figura 7h). En las plantas sin NaCl, no existieron variaciones sustanciales entre tratamientos a excepción del peso seco de la raíz, con la inoculación de AF12 incrementó en un 41%, comparado con las plantas sin inocular (Figura 7g).

De manera similar, Saleem y colaboradores (2021) demostraron que el estrés salino (200 mM de NaCl) afecta significativamente los parámetros de crecimiento vegetativo de las plantas de algodón, como el porcentaje de germinación, la longitud de las raíces, los brotes y el peso seco en comparación con la condición no salina. La inoculación de las plantas con *Bacillus* spp. incrementaron (en menor medida a comparación de los resultados de este proyecto) la longitud de las raíces, la longitud de la parte aérea y el contenido de clorofila en un 31, 29 y 34%, respectivamente, aunado a lo anterior, disminuyó la absorción de Na⁺ (58%) del suelo en las plantas bajo estrés salino en comparación con el control.

Es interesante que los cambios más notables a través de la inoculación de las cepas se dieron en condiciones salinas, lo que probablemente esté relacionado a un aspecto genómico, ya que, en condiciones no salinas, los demás incrementos con la inoculación o coinoculación de las cepas fueron de forma sutil. Diferentes autores han reportado resultados similares, por ejemplo, la inoculación de la cepa halotolerante *B. licheniformis* NJ04 en plantas de tomate (*S. lycopersicum*) sin estrés por sal, mostró un aumento en la longitud de la raíz (16.29%) y la longitud de la parte aérea (9.66%) en comparación con las plantas de control (James et al., 2023).

El tomate es un componente vital de la alimentación diaria y la salinidad no es el único factor que afecta a este cultivo. La marchitez del tomate es una de las principales enfermedades causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, la enfermedad se identifica morfológicamente por plantas marchitas que tienen hojas de color amarillo con un rendimiento mínimo o nulo (Srinivas et al., 2019).

Una característica de las especies pertenecientes al género *Bacillus* es su actividad de biocontrol. La cepa endofítica *B. halotolerans* Cal.I.30 aislada de la planta medicinal *Calendula officinalis*, redujo significativamente el índice de gravedad y la incidencia de la enfermedad en frutos de uva y tomate Cherry inoculados con *B. cinerea*. Sumado a eso, mostró antagonismo *in vitro* hacia *B. cinerea*, *Rhizoctonia solani* y *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Tsalgatidou et al., 2022). *B. velezensis* AP-3 redujo la severidad del marchitamiento por *Fusarium* en tomate en un 50% en comparación con el control (Medeiros y Bettioli, 2021).

En el presente estudio se evaluó el efecto de la inoculación de *B. velezensis* AF12 y *B. halotolerans* AF23 en el biocontrol de *F. oxysporum* en condiciones de invernadero. Después de 60 días, el contenido de clorofila disminuyó en plantas infectadas por *Fusarium* (Figura 9a), no se observaron cambios significativos en la longitud de la parte aérea, raíz y en el peso seco de la raíz. Sin embargo, el peso seco de la parte aérea incrementó con la inoculación de AF12 en un 40%, seguido

de AF23 con un 37% (Figura 9c). De igual forma, la biomasa total aumentó de manera significativa en un 34 y 28%, con la inoculación de AF12 y AF23, respectivamente (Figura 9h).

Algunas bacterias pueden no mostrar características que promueven el crecimiento de las plantas *in vitro* como el caso de *B. safensis* LBM4 o incluso a nivel planta presentar incrementos en los parámetros de forma sutil (Patani et al., 2023), tal como sucede con AF23 en el ensayo de biocontrol con *F. oxysporum*, en contraste con AF12.

De manera natural estrés biótico y abiótico pueden existir de forma simultánea en las plantas, en este trabajo se evaluó el efecto de la inoculación de AF12 y AF23 en plantas de tomate infectadas por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 1 en condiciones de salinidad. Todas las plantas estuvieron expuestas a 100 mM de NaCl.

La infección por *Fusarium* en salinidad no solo afecta a plantas de tomate, se ha documentado que el estrés salino altera el comportamiento del patógeno *Fusarium*, una alta concentración de NaCl tuvo una influencia negativa en la germinación y el crecimiento de las semillas de garbanzo, mientras que influyó positivamente en el crecimiento del micelio y la esporulación en *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Maharshi et al., 2021).

En este trabajo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las plantas únicamente expuestas a estrés salino (100 mM), con incrementos en el peso fresco y seco de la parte aérea y raíz, la longitud de la raíz y la biomasa total. Tan solo el peso fresco de la parte aérea incrementó en un 14% con la inoculación del consorcio bacteriano en presencia del patógeno, respecto a las plantas control (Figura 13). Un resultado destacable fue, que bajo condiciones salinas, AF23 aumentó el peso seco de la parte aérea en un 39% y el consorcio de ambas cepas en un 31%, comparado con las plantas control (Figura 13c). Algo similar ocurrió con

la biomasa total, que incrementó en un 32% con la inoculación de AF23 (condiciones con NaCl sin *Fusarium*).

Medeiros y Bettioli (2021), seleccionaron cepas halotolerantes de *Bacillus* que produjeron sideróforos, AIA, solubilizaron fosfato y con actividad de catalasa en presencia de 100 mM de NaCl. Al igual que en el presente estudio, el estrés salino redujo el crecimiento de las plantas; sin embargo, la inoculación con *Bacillus* spp. aumentó la altura total de la planta y el peso seco de la raíz y parte aérea, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos de inoculación de plantas de tomate bajo la misma concentración de sal (100 mM).

Aunque las plantas tratadas con AF12 y AF23 e infectadas con *F. oxysporum* en condiciones salinas, no tuvieron cambios notables respecto a las plantas control, un resultado relevante fue que la inoculación de las cepas redujo el porcentaje de plantas infectadas. Con *B. velezensis* AF12, *B. halotolerans* AF23 y ambas cepas en consorcio, el porcentaje de plantas infectadas fue del 40, 80 y 20%, respectivamente (Figura 13h). Este fenómeno también ha sido encontrado por otros autores, *B. sonorensis* EGY05, *B. tequilensis* EGY21 y *B. mojavensis* EGY25 promovieron significativamente el crecimiento de las plantas de tomate en condiciones salinas bajo varias concentraciones de NaCl (50–200 mM), en comparación con los controles no inoculados. Asimismo, se seleccionaron estas cepas basándose en su actividad antagónica *in vitro* de *F. oxysporum* para experimentos en macetas bajo estrés salino. Después de 8 semanas en condiciones de invernadero, se encontró que todas las cepas redujeron el índice de gravedad de la enfermedad de las plantas de tomate en las concentraciones de sal probadas (Abdelshafy Mohamad et al., 2020).

Este proyecto se centra en el estudio de *B. halotolerans* AF23, sus mecanismos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*, su interacción a nivel planta con otras PGPB, en particular con *B. velezensis* AF12 y finalmente, el estudio de la base

genómica de las características fenotípicas, como la tolerancia a la sal y la capacidad para estimular el crecimiento de las plantas.

Diversas investigaciones respaldan el potencial de cepas como *B. velezensis* AF12 para mejorar el crecimiento de las plantas, desde el estudio de genomas completos y la búsqueda y expresión de genes involucrados en mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (Chen et al., 2018; Mullins et al., 2020; Nifakos et al., 2021; Xu et al., 2020).

En un estudio previo, la secuenciación del genoma de AF23 se utilizó para identificar la cepa a nivel especie. En esta investigación se estudió el genoma completo de AF23 y se hizo un escrutinio de genes. Los resultados revelaron que esta cepa puede sintetizar proteínas involucradas en respuesta al estrés biótico y abiótico y para estimular el crecimiento de las plantas.

Se sabe que los genes presentes en el genoma de AF23 como *betB*, *proA*, *proB*, *gltB*, *opuAB*, *opuBC* (relacionados al estrés osmótico, Tabla 3), *sodA*, *perR*, *tpx*, *bcp*, *ahpC*, *ahpF* (relacionados al estrés oxidativo, Tabla 5), previamente reportadas en la literatura tienen un papel importante en la tolerancia al estrés abiótico (salinidad) (Dif et al., 2021).

Ayaz y colaboradores (2022), realizaron un cribado genético y un análisis de expresión de genes implicados en la resistencia a estrés por salinidad, se encontró que la expresión del gen *sodA* y algunos que codifican para compuestos osmoprotectores estaban regulados al alza cuando las cepas halotolerantes *Bacillus sp.* NMCN1, *Bacillus sp.* LLCG23 y *B. velezensis* FZB42 crecían en diferentes concentraciones de salinidad, lo que indica que estas cepas tienen alto potencial para regular el estrés oxidativo con el fin de sobrevivir bajo condiciones de estrés salino; este mecanismo de regulación podría participar activamente también en AF23.

PerR es una proteína reguladora clave para la respuesta al estrés oxidativo, la presencia de los genes reguladores de ROS ayuda a las cepas de *Bacillus* a reducir los efectos adversos del estrés oxidativo inducido después del estrés salino (Zhao et al., 2020).

Interesantemente, las proteínas de choque térmico (HSP) o chaperonas (algunas incluidas en la Tabla 4) como: DnaK, DnaJ, ClpX, GroES, además de estar involucradas a la resistencia al estrés por temperatura, también se ha informado que aumentan con el estrés osmótico. El papel principal de las chaperonas es controlar el proceso de plegamiento y replegamiento de las proteínas afectadas por el estrés (Zamanzadeh-Nasrabadi et al., 2023).

En la búsqueda de genes, se encontró que en el genoma de AF23 están presentes genes implicados en la síntesis de un tipo de VOC: la acetoína (Tabla 9). En estudios realizados con *B. amyloliquefaciens* la acetoína mostró notables efectos de promoción en el crecimiento de las plantas (Luo et al., 2022).

La Tabla 10 muestra numerosos genes implicados en la quimiotaxis y motilidad a través de la biosíntesis de flagelar. La quimiotaxis es un mecanismo por el cual las bacterias responden de manera eficiente y rápida a los cambios en la composición química de su entorno, acercándose a entornos químicamente favorables y evitando los desfavorables. Este comportamiento se logra integrando señales recibidas de receptores que detectan el entorno y modulando la dirección de rotación flagelar en consecuencia (Mahajan et al., 2020). Bajo condiciones de salinidad estos mecanismos podrían ser útiles para las bacterias, junto con los descritos anteriormente.

En la Tabla 11 se muestran los genes que participan en el transporte y la resistencia a metales pesados. Las cepas que contienen genes funcionales podrían ser utilizados como estrategia de biorremediación en suelos agrícolas contaminados con metales como el arsénico, tal es el caso de *B. paralicheniformis* ZAP17 y *B. altitudinis* ZAP62 (Flores et al., 2022).

También se encontraron genes implicados en la formación y germinación de esporas (Tabla 12). El género *Bacillus* se distingue por su capacidad de adaptarse a diversos entornos, incluyendo suelo, agua y aire, e incluso ambientes extremos (Miljaković et al., 2020). Su habilidad para formar esporas es la clave de su supervivencia en condiciones adversas y estresantes, como altos niveles de salinidad (Ibarra-Villarreal et al., 2021). En términos generales, son preferidos los bioinoculantes a base de bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, debido a su capacidad para formar esporas, ya que les confiere una mayor viabilidad a largo plazo y una mayor vida útil para su almacenamiento (Orozco-Mosqueda et al., 2021).

El análisis genómico funcional realizado sugiere que *B. halotolerans* AF23 contiene varias características genéticas que le permiten sobrevivir en ambientes salinos y promover el crecimiento de las plantas bajo estas mismas circunstancias. La detección de los genes asociados a estos procesos podría servir como base para potenciar las funciones que fomentan el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés salino.

10. RESUMEN DE RESULTADOS

- *B. halotolerans* AF23 tiene la capacidad de crecer a una concentración de hasta 1000 mM de NaCl y mantiene sus mecanismos de promoción del crecimiento vegetal bajo condiciones de salinidad.
- La inoculación de *B. velezensis* AF12 y *B. halotolerans* AF23 (individual o en consorcio) mejoró el crecimiento de plantas de tomate bajo estrés salino, incluyendo el peso de la parte aérea y raíz, el contenido de clorofila y la biomasa total.
- En plantas de tomate infectadas con *F. oxysporum*, la inoculación de AF12 y AF23 (individual o en consorcio) aumentó el peso de la parte aérea, peso fresco de la raíz, el contenido de clorofila y la biomasa total.
- La inoculación de ambas cepas (AF12 y AF23) en plantas de tomate infectadas con *F. oxysporum* bajo condiciones de salinidad, aumentaron su peso fresco en la parte aérea; además de disminuir significativamente el porcentaje de infección.
- Se encontraron en el genoma de AF23 genes involucrados en el biocontrol, la promoción del crecimiento vegetal y tolerancia al estrés salino.

11. CONCLUSIÓN

Bacillus halotolerans AF23 promueve el crecimiento vegetal y tiene actividad de biocontrol en condiciones de salinidad.

12. PERSPECTIVAS

- Evaluar el transcriptoma de *B. velezensis* AF12 y *B. halotolerans* AF23 en condiciones salinas.
- Analizar la interacción de *B. velezensis* AF12 y *B. halotolerans* AF23 con *Trichoderma* spp. y su potencial de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal en condiciones normales y de salinidad.
- Evaluar la acumulación de iones Na^+ en las hojas de plantas de tomate en presencia y ausencia de *B. velezensis* AF12 y *B. halotolerans* AF23.
- Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno en presencia y ausencia de *B. velezensis* AF12 y *B. halotolerans* AF23.

13. REFERENCIAS

- Abbasi, S., Safaie, N., Sadeghi, A., y Shamsbakhsh, M. (2019). Streptomyces Strains Induce Resistance to Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici Race 3 in Tomato through Different Molecular Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 10(1505), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01505>
- Abdallah, M. M. S., Abdelgawad, Z. A., y El-Bassiouny, H. M. S. (2016). Alleviation of the adverse effects of salinity stress using trehalose in two rice varieties. *South African Journal of Botany*, 103, 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.09.019>
- Abdelshafy Mohamad, O. A., Ma, J. B., Liu, Y. H., Zhang, D., Hua, S., Bhute, S., Hedlund, B. P., Li, W. J., y Li, L. (2020). Beneficial Endophytic Bacterial Populations Associated With Medicinal Plant *Thymus vulgaris* Alleviate Salt Stress and Confer Resistance to *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science*, 11(47), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00047>
- Adhikari, T. B., Gao, A., Ingram, T., y Louws, F. J. (2020). Pathogenomics Characterization of an Emerging Fungal Pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici in Greenhouse Tomato Production Systems. *Frontiers in Microbiology*, 11(1995), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01995>
- Ahmad, A., Blasco, B., y Martos, V. (2022). Combating Salinity Through Natural Plant Extracts Based Biostimulants: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 13(862034), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.862034>
- Akhtar, S. S., Mekureyaw, M. F., Pandey, C., y Roitsch, T. (2020). Role of Cytokinins for Interactions of Plants With Microbial Pathogens and Pest Insects. *Frontiers in Plant Science*, 10(1777), 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01777>
- Ali, B., Hafeez, A., Ahmad, S., Afridi, M., Dawoud, T., Marc, R., Alkhalifah, D., y Selim, S. (2022). *Bacillus thuringiensis* PM25 ameliorates oxidative damage of salinity stress in maize via regulating growth, leaf pigments, antioxidant defense system, and stress responsive gene expression.
- Ali, Q., Ayaz, M., Mu, G., Hussain, A., Yuanyuan, Q., Yu, C., Xu, Y., Manghwar, H., Gu, Q., Wu, H., y Gao, X. (2022). Revealing plant growth-promoting mechanisms of *Bacillus* strains in elevating rice growth and its interaction with

- salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.994902>
- Almeida, O. A. C., de Araujo, N. O., Mulato, A. T. N., Persinoti, G. F., Sforça, M. L., Calderan-Rodrigues, M. J., y Oliveira, J. V. de C. (2023). Bacterial volatile organic compounds (VOCs) promote growth and induce metabolic changes in rice. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1056082>
- Alori, E. T., Glick, B. R., y Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8(971), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Anand, A., Chinchilla, D., Tan, C., Mène-Saffrané, L., L'haridon, F., y Weisskopf, L. (2020). Contribution of hydrogen cyanide to the antagonistic activity of pseudomonas strains against phytophthora infestans. *Microorganisms*, 8(1144), 1–10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081144>
- Ayaz, M., Ali, Q., Jiang, Q., Wang, R., Wang, Z., Mu, G., Khan, S. A., Khan, A. R., Manghwar, H., Wu, H., Gao, X., y Gu, Q. (2022). Salt Tolerant Bacillus Strains Improve Plant Growth Traits and Regulation of Phytohormones in Wheat under Salinity Stress. *Plants*, 11(2760), 1–22. <https://doi.org/10.3390/plants11202769>
- Bai, N., He, Y., Zhang, H., Zheng, X., Zeng, R., Li, Y., Li, S., y Lv, W. (2022). γ -Polyglutamic Acid Production, Biocontrol, and Stress Tolerance: Multifunction of *Bacillus subtilis* A-5 and the Complete Genome Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(13). <https://doi.org/10.3390/ijerph19137630>
- Bavaresco, L. G., Osco, L. P., Araujo, A. S. F., Mendes, L. W., Bonifacio, A., y Araújo, F. F. (2020). *Bacillus subtilis* can modulate the growth and root architecture in soybean through volatile organic compounds. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 32(2), 99–108. <https://doi.org/10.1007/s40626-020-00173-y>
- Behera, T. K., Krishna, R., Ansari, W. A., Aamir, M., Kumar, P., Kashyap, S. P., Pandey, S., y Kole, C. (2022). Approaches Involved in the Vegetable Crops Salt

- Stress Tolerance Improvement: Present Status and Way Ahead. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.787292>
- Bhagat, N., Raghav, M., Dubey, S., y Bedi, N. (2021). Bacterial exopolysaccharides: Insight into their role in plant abiotic stress tolerance. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 1045–1059. <https://doi.org/10.4014/jmb.2105.05009>
- Bhat, M. A., Kumar, V., Bhat, M. A., Wani, I. A., Dar, F. L., Farooq, I., Bhatti, F., Koser, R., Rahman, S., y Jan, A. T. (2020). Mechanistic Insights of the Interaction of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) With Plant Roots Toward Enhancing Plant Productivity by Alleviating Salinity Stress. *Frontiers in Microbiology*, 11(1952), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01952>
- Bhise, K. K., y Dandge, P. B. (2019). Mitigation of salinity stress in plants using plant growth promoting bacteria. *Symbiosis*, 79(3), 191–204. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00638-y>
- Bokhari, A., Essack, M., Lafi, F. F., Andres-Barrao, C., Jalal, R., Alamoudi, S., Razali, R., Alzubaidy, H., Shah, K. H., Siddique, S., Bajic, V. B., Hirt, H., y Saad, M. M. (2019). Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance. *Scientific Reports*, 9(18154), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54685-y>
- Bomle, D. V., Kiran, A., Kumar, J. K., Nagaraj, L. S., Pradeep, C. K., Ansari, M. A., Alghamdi, S., Kabrah, A., Assaggaf, H., Dabool, A. S., Murali, M., Amruthesh, K. N., Udayashankar, A. C., y Niranjana, S. R. (2021). Plants saline environment in perception with rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11461), 1–35. <https://doi.org/10.3390/ijms222111461>
- Bonarota, M. S., Kosma, D. K., y Barrios-Masias, F. H. (2022). Salt tolerance mechanisms in the *Lycopersicon* clade and their trade-offs. *AoB PLANTS*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plab072>
- Chávez-Avila, S. (2021). *Evaluación de la actividad antifúngica de las bacterias aisladas de suelos afectados por incendios subterráneos e inferencias genómicas de la cepa termotolerante Bacillus sp. AF12* [Tesis de Licenciatura]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

- Chebotar, V. K., Chizhevskaya, E. P., Baganova, M. E., Keleinikova, O. V., Yuzikhin, O. S., Zaplatkin, A. N., Khonina, O. V., Kostitsin, R. D., y Lapenko, N. G. (2022). Endophytes from Halotolerant Plants Aimed to Overcome Salinity and Draught. *Plants*, 11(2992), 1–21. <https://doi.org/10.3390/plants11212992>
- Chen, M., Wang, J., Liu, B., Zhu, Y., Xiao, R., Yang, W., Ge, C., y Chen, Z. (2020). Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and its lipopeptides. *BMC Microbiology*, 20(160), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01851-2>
- Chen, Z., Zhou, W., Sui, X., Xu, N., Zhao, T., Guo, Z., Niu, J., y Wang, Q. (2022). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria With ACC Deaminase Activity Enhance Maternal Lateral Root and Seedling Growth in Switchgrass. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.800783>
- Chitwood-Brown, J., Vallad, G. E., Lee, T. G., y Hutton, S. F. (2021). Breeding for resistance to fusarium wilt of tomato: A review. *Genes*, 12(1673), 1–16. <https://doi.org/10.3390/genes12111673>
- Choub, V., Won, S. J., Ajuna, H. B., Moon, J. H., Choi, S. I., Lim, H. I., y Ahn, Y. S. (2022). Antifungal Activity of Volatile Organic Compounds from *Bacillus velezensis* CE 100 against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Horticulturae*, 8(557), 1–13. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8060557>
- Delgado-Ramírez, C. S., Hernández-Martínez, R., y Sepúlveda, E. (2021). Rhizobacteria associated with a native solanaceae promote plant growth and decrease the effects of fusarium oxysporum in tomato. *Agronomy*, 11(579), 1–17. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030579>
- Di Francesco, A., y Baraldi, E. (2021). How siderophore production can influence the biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* against *Monilinia laxa* on peaches. *Biological Control*, 152(104456). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104456>
- Dif, G., Belaouni, H. A., Yekkour, A., Goudjal, Y., Djemouai, N., Peňázová, E., Čechová, J., Berraf-Tebbal, A., Eichmeier, A., y Zitouni, A. (2021). Performance of halotolerant bacteria associated with Sahara-inhabiting halophytes *Atriplex halimus* L. and *Lygeum spartum* L. ameliorate tomato plant growth and

- tolerance to saline stress: from selective isolation to genomic analysis of potential determinants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(16). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03203-2>
- Dimopoulou, A., Theologidis, I., Benaki, D., Koukounia, M., Zervakou, A., Tzima, A., Diallinas, G., Hatzinikolaou, D. G., y Skandalis, N. (2021). Direct Antibiotic Activity of Bacillibactin Broadens the Biocontrol Range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. *MSphere*, 6, 1–15. <https://doi.org/10.1128/msphere.00376-21>
- Djuuna, I., Prabawardani, S., y Massora, M. (2022). Population Distribution of Phosphate-solubilizing Microorganisms in Agricultural Soil. *Microbes and Enviroments*, 37(1), 1–8.
- Dong, H., Gao, R., Dong, Y., Yao, Q., y Zhu, H. (2023). *Bacillus velezensis* RC116 Inhibits the Pathogens of Bacterial Wilt and Fusarium Wilt in Tomato with Multiple Biocontrol Traits. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8527), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms24108527>
- Dutta, A., Banerjee, S., Dinda, S., Chowdhury, I., Haldar, S., y Bandyopadhyay, S. (2022). A critical analysis on the roles of exopolysaccharides and ACC deaminase in salinity stress tolerance in crop plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102372>
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd-Allah, E. F., y Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, 8(2104), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>
- Etesami, H., y Beattie, G. A. (2018). Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue 148, pp. 1–20). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00148>
- Etesami, H., y Glick, B. R. (2020). Halotolerant plant growth–promoting bacteria: Prospects for alleviating salinity stress in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 178(104124), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104124>

- Fadiji, A. E., Santoyo, G., Yadav, A. N., y Babalola, O. O. (2022). Efforts towards overcoming drought stress in crops: Revisiting the mechanisms employed by plant growth-promoting bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962427>
- FAO. (2022). Tomato. Food and Agriculture Organization.
- Flores, A., Valencia-Marín, M. F., Chávez-Avila, S., Ramírez-Díaz, M. I., de los Santos-Villalobos, S., Meza-Carmen, V., Orozco-Mosqueda, M. del C., y Santoyo, G. (2022). Genome mining, phylogenetic, and functional analysis of arsenic (As) resistance operons in Bacillus strains, isolated from As-rich hot spring microbial mats. *Microbiological Research*, 264, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127158>
- Flores-Piña, A. I. (2021). *Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades microbianas en suelo a través de un gradiente de temperatura* [Tesis de Maestría]. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Gamalero, E., y Glick, B. R. (2022). Recent Advances in Bacterial Amelioration of Plant Drought and Salt Stress. *Biology*, 11(437), 1–26. <https://doi.org/10.3390/biology11030437>
- Gao, J. L., Khan, M. S., Sun, Y. C., Xue, J., Du, Y., Yang, C., Chebotar, V. K., Tikunov, V. S., Rubanov, I. N., Chen, X., y Zhang, X. (2022). Characterization of an Endophytic Antagonistic Bacterial Strain Bacillus halotolerans LBG-1-13 with Multiple Plant Growth-Promoting Traits, Stress Tolerance, and Its Effects on Lily Growth. *BioMed Research International*, 2022, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2022/5960004>
- Gao, Y., Zou, H., Wang, B., y Yuan, F. (2022). Progress and Applications of Plant Growth-Promoting Bacteria in Salt Tolerance of Crops. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7036), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms23137036>
- Ghazala, I., Chiab, N., Saidi, M. N., y Gargouri-Bouzid, R. (2022). Volatile organic compounds from Bacillus mojavenis I4 promote plant growth and inhibit phytopathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 121(101887). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101887>

- Ghazy, N., y El-Nahrawy, S. (2021). Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. *Archives of Microbiology*, 203(3), 1195–1209. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02113-5>
- Glick, B. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 1–15. <https://doi.org/doi:10.6064/2012/963401>.
- Glick, B. (2020). *Beneficial Plant-Bacterial Interactions: Vol. Second edition (2°)*. Springer.
- Gong, Y., Chen, L. J., Pan, S. Y., Li, X. W., Xu, M. J., Zhang, C. M., Xing, K., y Qin, S. (2020). Antifungal potential evaluation and alleviation of salt stress in tomato seedlings by a halotolerant plant growth-promoting actinomycete *Streptomyces* sp. KLBMP5084. *Rhizosphere*, 16, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100262>
- Gul, Z., Tang, Z. H., Arif, M., y Ye, Z. (2022). An Insight into Abiotic Stress and Influx Tolerance Mechanisms in Plants to Cope in Saline Environments. *Biology*, 11(597), 1–24. <https://doi.org/10.3390/biology11040597>
- Guo, M., Wang, X. S., Guo, H. D., Bai, S. Y., Khan, A., Wang, X. M., Gao, Y. M., y Li, J. S. (2022). Tomato salt tolerance mechanisms and their potential applications for fighting salinity: A review. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–26. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.949541>
- Gupta, A., Mishra, R., Rai, S., Bano, A., Pathak, N., Fujita, M., Kumar, M., y Hasanuzzaman, M. (2022). Mechanistic Insights of Plant Growth Promoting Bacteria Mediated Drought and Salt Stress Tolerance in Plants for Sustainable Agriculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3741), 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms23073741>
- Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. del C., Fadiji, A. E., Hyder, S., Babalola, O. O., y Santoyo, G. (2023). Trichoderma Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases—A Review. *Plants*, 12(432), 1–35. <https://doi.org/10.3390/plants12030432>

- Hahne, H., Mäder, U., Otto, A., Bonn, F., Steil, L., Bremer, E., Hecker, M., y Becher, D. (2010). A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation. *Journal of Bacteriology*, 192(3), 870–882. <https://doi.org/10.1128/JB.01106-09>
- Hasanuzzaman, M., Raihan, M. R. H., Nowroz, F., y Fujita, M. (2022). Insight into the Mechanism of Salt-Induced Oxidative Stress Tolerance in Soybean by the Application of *Bacillus subtilis*: Coordinated Actions of Osmoregulation, Ion Homeostasis, Antioxidant Defense, and Methylglyoxal Detoxification. *Antioxidants*, 11(1856), 1–22. <https://doi.org/10.3390/antiox11101856>
- He, Y., Pantigoso, H. A., Wu, Z., y Vivanco, J. M. (2019). Co-inoculation of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato. *Journal of Applied Microbiology*, 127(1), 196–207. <https://doi.org/10.1111/jam.14273>
- Hernández-Canseco, J., Bautista-Cruz, A., Sánchez-Mendoza, S., Aquino-Bolaños, T., y Sánchez-Medina, P. S. (2022). Plant Growth-Promoting Halobacteria and Their Ability to Protect Crops from Abiotic Stress: An Eco-Friendly Alternative for Saline Soils. *Agronomy*, 12(804), 1–22. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040804>
- Huang, Z., Wang, C., Feng, Q., Liou, R. M., Lin, Y. F., Qiao, J., Lu, Y., y Chang, Y. (2022). The Mechanisms of Sodium Chloride Stress Mitigation by Salt-Tolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Wheat. *Agronomy*, 12(543), 1–14. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030543>
- Ibarra-Villarreal, A. L., Gándara-Ledezma, A., Godoy-Flores, A. D., Herrera-Sepúlveda, A., Díaz-Rodríguez, A. M., Parra-Cota, F. I., y de los Santos-Villalobos, S. (2021). Salt-tolerant *Bacillus* species as a promising strategy to mitigate the salinity stress in wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*). *Journal of Arid Environments*, 186, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104399>
- Imran, Q. M., Falak, N., Hussain, A., Mun, B. G., y Yun, B. W. (2021). Abiotic stress in plants, stress perception to molecular response and role of biotechnological tools in stress resistance. *Agronomy*, 11(1579), 1–20. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081579>

- Jamali, H., Sharma, A., Roohi, y Srivastava, A. K. (2019). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* RH5 against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Basic Microbiology*, 60(3), 1–13. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900347>
- James, N., Umesh, M., Sarojini, S., Shanmugam, S., Nasif, O., Alharbi, S. A., Lan Chi, N. T., y Brindhadevi, K. (2023). Unravelling the potential plant growth activity of halotolerant *Bacillus licheniformis* NJ04 isolated from soil and its possible use as a green bioinoculant on *Solanum lycopersicum* L. *Environmental Research*, 216(2). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114620>
- Jeyanthi, V., y Kanimozhi, S. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)-prospective and mechanisms: A review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(2), 733–749. <https://doi.org/10.22207/JPAM.12.2.34>
- Ji, C., Tian, H., Wang, X., Song, X., Ju, R., Li, H., Gao, Q., Li, C., Zhang, P., Li, J., Hao, L., Wang, C., Zhou, Y., Xu, R., Liu, Y., Du, J., y Liu, X. (2022). *Bacillus subtilis* HG-15, a Halotolerant Rhizoplane Bacterium, Promotes Growth and Salinity Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum*). *BioMed Research International*, 2022, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2022/9506227>
- Jiang, X. R., Lin, Y. F., y Chen, P. T. (2018). Trehalose production via merged secretion, purification, and immobilization of trehalose synthase in *Bacillus subtilis*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 82, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.11.001>
- Jiao, X., Takishita, Y., Zhou, G., y Smith, D. L. (2021). Plant Associated Rhizobacteria for Biocontrol and Plant Growth Enhancement. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634796>
- Jiménez-Mejía, R., Medina-Estrada, R. I., Carballar-Hernández, S., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Santoyo, G., y Loeza-Lara, P. D. (2022). Teamwork to Survive in Hostile Soils: Use of Plant Growth-Promoting Bacteria to Ameliorate Soil Salinity Stress in Crops. *Microorganisms*, 10(150), 1–20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010150>

- Kalra, G., y Bhatla, S. C. (2018). Cytokinins. In *Plant Physiology, Development and Metabolism* (pp. 603–615). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1_16
- Katan, T., Shlevin, E., y Katan, J. (1997). Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on Stem Surfaces of Tomato Plants and Aerial Dissemination of Inoculum. *Phytopathology*, *87*(7), 712–717.
- Khalil, A. T., y Shinwari, Z. K. (2022). Utilization of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) Against Phytopathogens. In R. Z. Sayyed, A. Singh, y N. Ilyas (Eds.), *Antifungal Metabolites of Rhizobacteria for Sustainable Agriculture* (pp. 53–63). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-04805-0_3
- Khan, A. R., Mustafa, A., Hyder, S., Valipour, M., Rizvi, Z. F., Gondal, A. S., Yousuf, Z., Iqbal, R., y Daraz, U. (2022). *Bacillus* spp. as Bioagents: Uses and Application for Sustainable Agriculture. *Biology*, *11*(1763), 1–21. <https://doi.org/10.3390/biology11121763>
- Khan, A., Singh, J., Upadhyay, V. K., Singh, A. V., y Shah, S. (2019). Microbial Biofortification: A Green Technology Through Plant Growth Promoting Microorganisms. In S. Shah, V. Venkatramanan, y R. Prasad (Eds.), *Sustainable Green Technologies for Environmental Management* (pp. 255–269). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2772-8_13
- Khatoun, Z., Huang, S., Rafique, M., Fakhar, A., Kamran, M. A., y Santoyo, G. (2020). Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems. *Journal of Environmental Management*, *273*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111118>
- Khumairah, F. H., Setiawati, M. R., Fitriatin, B. N., Simarmata, T., Alfaraj, S., Ansari, M. J., Enshasy, H. A. E., Sayyed, R. Z., y Najafi, S. (2022). Halotolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated From Saline Soil Improve Nitrogen Fixation and Alleviate Salt Stress in Rice Plants. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.905210>
- Kumar, A., Singh, S., Gaurav, A. K., Srivastava, S., y Verma, J. P. (2020a). Plant Growth-Promoting Bacteria: Biological Tools for the Mitigation of Salinity Stress

- in Plants. *Frontiers in Microbiology*, 11(1216), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01216>
- Kumar, A., Singh, S., Gaurav, A. K., Srivastava, S., y Verma, J. P. (2020b). Plant Growth-Promoting Bacteria: Biological Tools for the Mitigation of Salinity Stress in Plants. *Frontiers in Microbiology*, 11(1216). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01216>
- Kumar, A., Singh, S., Mukherjee, A., Rastogi, R. P., y Verma, J. P. (2021). Salt-tolerant plant growth-promoting *Bacillus pumilus* strain JPVS11 to enhance plant growth attributes of rice and improve soil health under salinity stress. *Microbiological Research*, 242, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126616>
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets* Downloaded from. <http://mbe.oxfordjournals.org/>
- Kumawat, K. C., Sharma, B., Nagpal, S., Kumar, A., Tiwari, S., y Nair, R. M. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria: Salt stress alleviators to improve crop productivity for sustainable agriculture development. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–27. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1101862>
- Lastochkina, O., Seifikalhor, M., Aliniaefard, S., Baymiev, A., Pusenkova, L., Garipova, S., Kulabuhova, D., y Maksimov, I. (2019). *Bacillus* spp.: Efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plants*, 8(97), 1–24. <https://doi.org/10.3390/plants8040097>
- Li, S., Xu, J., Fu, L., Xu, G., Lin, X., Qiao, J., y Xia, Y. (2022). Biocontrol of Wheat Crown Rot Using *Bacillus halotolerans* QTH8. *Pathogens*, 11(595), 1–15. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050595>
- Liu, H., Wang, X., Yang, S., Wang, R., y Wang, T. (2019). Saturation mutagenesis and self-inducible expression of trehalose synthase in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*, 35(4), 1–12. <https://doi.org/10.1002/btpr.2826>
- Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A., y Yin, C. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview

- for its mechanisms. *Microbiological Research*, 259, 10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127016>
- Luo, Y., Wang, Y., Xie, Y., Gao, Y., Li, W., y Lang, S. (2022). Transcriptomic and Metabolomic Analyses of the Effects of Exogenous Trehalose on Heat Tolerance in Wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5194), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms23095194>
- Ma, M., Taylor, P. W. J., Chen, D., Vaghefi, N., y He, J. Z. (2023). Major Soilborne Pathogens of Field Processing Tomatoes and Management Strategies. *Microorganisms*, 11(263), 1–29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020263>
- Mahajan, S. G., Nandre, V. S., Salunkhe, R. C., Shouche, Y. S., y Kulkarni, M. V. (2020). Chemotaxis and physiological adaptation of an indigenous abiotic stress tolerant plant growth promoting *Pseudomonas stutzeri*: Amelioration of salt stress to *Cicer arietinum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101652>
- Maharshi, A., Rashid, M. M., Teli, B., Yadav, S. K., Singh, D. P., y Sarma, B. K. (2021). Salt stress alters pathogenic behaviour of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and contributes to severity in chickpea wilt incidence. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 113, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101602>
- Mahdi, I., Fahsi, N., Hafidi, M., Allaoui, A., y Biskri, L. (2020). Plant growth enhancement using rhizospheric halotolerant phosphate solubilizing bacterium *Bacillus licheniformis* qa1 and *Enterobacter asburiae* qf11 isolated from *Chenopodium quinoa* Willd. *Microorganisms*, 8(948), 1–21. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060948>
- Majeed, A., y Muhammad, Z. (2019). Salinity: A major agricultural problem-causes, impacts on crop productivity and management strategies. In *Plant Abiotic Stress Tolerance: Agronomic, Molecular and Biotechnological Approaches* (pp. 83–99). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-06118-0_3

- Manoj, S. R., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P. I., Shanmugasundaram, T., Bruno, B., y Rajkumar, M. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of Environmental Management*, 254. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109779>
- Maryum, Z., Luqman, T., Nadeem, S., Khan, S. M. U. D., Wang, B., Ditta, A., y Khan, M. K. R. (2022). An overview of salinity stress, mechanism of salinity tolerance and strategies for its management in cotton. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.907937>
- Maxim, A., Albu, V. C., Vodnar, D. C., Mihăiescu, T., Mang, Ștefania M., Camele, I., Trotta, V., Bonomo, M. G., Mihalescu, L., Sandor, M., Ranga, F., y Borsai, O. (2023). Assessment of Tomato (*Solanum lycopersicum*) Landraces for Their Agronomic, Biochemical Characteristics and Resistance to Phytophthora infestans. *Agronomy*, 13(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010021>
- Medeiros, C. A. A., y Bettiol, W. (2021). Multifaceted intervention of *Bacillus* spp. against salinity stress and *Fusarium* wilt in tomato. *Journal of Applied Microbiology*, 131(5), 2387–2401. <https://doi.org/10.1111/jam.15095>
- Meena, M., Swapnil, P., Divyanshu, K., Kumar, S., Harish, Tripathi, Y. N., Zehra, A., Marwal, A., y Upadhyay, R. S. (2020). PGPR-mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives. *Journal of Basic Microbiology*, 60(10), 1–86134. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000370>
- Mehmood, U., Inam-UI-Haq, M., Saeed, M., Altaf, A., Azam, F., y Hayat, S. (2018). *Plant Protection A BRIEF REVIEW ON PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA (PGPR): A KEY ROLE IN PLANT GROWTH PROMOTION*. <http://esciencepress.net/journals/PP>
- Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., Feyhl-Buska, J., Wong, M. L., Zhang, S., y Giovannelli, D. (2019). Living at the extremes: Extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Frontiers in Microbiology*, 10(7680), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>

- Miljaković, D., Marinković, J., y Balešević-Tubić, S. (2020). The significance of bacillus spp. In disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, 8(1037), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
- Mishra, P., Mishra, J., y Arora, N. K. (2021). Plant growth promoting bacteria for combating salinity stress in plants – Recent developments and prospects: A review. *Microbiological Research*, 252, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126861>
- Moghaieb, R. E. A., Ahmed, D. S., Gaber, A., y Abdelhadi, A. A. (2021). Overexpression of bacterial katE gene improves the resistance of modified tomato plant against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *GM Crops and Food*, 12(1), 315–327. <https://doi.org/10.1080/21645698.2021.1903374>
- Mohanavelu, A., Raghavendra Naganna, S., y Al-Ansari, N. (2021). Irrigation Induced Salinity and Sodicy Hazard on Soil and Groundwater: An Overview of Its Causes, Impacts and Mitigation Strategies. *Agriculture*, 11(983), 1–17. <https://doi.org/10.3390/agriculture>
- Mohanty, P., Singh, P. K., Chakraborty, D., Mishra, S., y Pattnaik, R. (2021). Insight Into the Role of PGPR in Sustainable Agriculture and Environment. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.667150>
- Mohsin, S. M., Fardus, J., Nagata, A., Tamano, N., Mitani, H., y Fujita, M. (2022). Comparative Study of Trehalose and Trehalose 6-Phosphate to Improve Antioxidant Defense Mechanisms in Wheat and Mustard Seedlings under Salt and Water Deficit Stresses. *Stresses*, 2, 336–354. <https://doi.org/10.3390/stresses2030024>
- Morales-Cedeño, L. R., de los Santos-Villalobos, S., y Santoyo, G. (2021). Functional and Genomic Analysis of *Rouxiella badensis* SER3 as a Novel Biocontrol Agent of Fungal Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 12(709855), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709855>
- Morales-Cedeño, L. R., Orozco-Mosqueda, M. del C., Loeza-Lara, P. D., Parra-Cota, F. I., de los Santos-Villalobos, S., y Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases:

- Fundamentals, methods of application and future perspectives. In *Microbiological Research* (Vol. 242, pp. 1–12). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126612>
- Morcillo, R. J. L., y Manzanera, M. (2021). The effects of plant-associated bacterial exopolysaccharides on plant abiotic stress tolerance. *Metabolites*, *11*(337), 1–19. <https://doi.org/10.3390/metabo11060337>
- Moreau, D., Bardgett, R. D., Finlay, R. D., Jones, D. L., y Philippot, L. (2019). A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. In *Functional Ecology* (Vol. 33, Issue 4, pp. 540–552). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13303>
- Mostofa, M. G., Hossain, M. A., y Fujita, M. (2015). Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems. *Protoplasma*, *252*, 461–475. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0691-3>
- Mukhopadhyay, R., Sarkar, B., Jat, H. S., Sharma, P. C., y Bolan, N. S. (2021). Soil salinity under climate change: Challenges for sustainable agriculture and food security. *Journal of Environmental Management*, *280*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111736>
- Mullins, A. J., Li, Y., Qin, L., Hu, X., Xie, L., Gu, C., Mahenthiralingam, E., Liao, X., y Webster, G. (2020). Reclassification of the biocontrol agents bacillus subtilis by-2 and tu-100 as bacillus velezensis and insights into the genomic and specialized metabolite diversity of the species. *Microbiology (United Kingdom)*, *166*(12), 1121–1128. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000986>
- Na, H. E., Heo, S., Kim, Y. S., Kim, T., Lee, G., Lee, J. H., y Jeong, D. W. (2022). The safety and technological properties of *Bacillus velezensis* DMB06 used as a starter candidate were evaluated by genome analysis. *LWT*, *161*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113398>
- Nascimento, F. X., Hernández, A. G., Glick, B. R., y Rossi, M. J. (2020). Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. *Biotechnology Reports*, *25*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00406>

- Orozco-Mosqueda, M. D. C., Duan, J., DiBernardo, M., Zetter, E., Campos-García, J., Glick, B. R., y Santoyo, G. (2019). The production of ACC deaminase and trehalose by the plant growth promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4 synergistically protect tomato plants against salt stress. *Frontiers in Microbiology*, *10*(1392), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01392>
- Orozco-Mosqueda, M. del C., Flores, A., Rojas-Sánchez, B., Urtis-Flores, C. A., Morales-Cedeño, L. R., Valencia-Marin, M. F., Chávez-Avila, S., Rojas-Solis, D., y Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: Attributes and challenges for sustainable crop improvement. *Agronomy*, *11*(1167), 1–15. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061167>
- Orozco-Mosqueda, M. del C., Glick, B. R., y Santoyo, G. (2020). ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research*, *235*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126439>
- Park, Y. G., Mun, B. G., Kang, S. M., Hussain, A., Shahzad, R., Seo, C. W., Kim, A. Y., Lee, S. U., Oh, K. Y., Lee, D. Y., Lee, I. J., y Yun, B. W. (2017). *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS ONE*, *12*(3), 28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173203>
- Patani, A., Prajapati, D., Ali, D., Kalasariya, H., Yadav, V. K., Tank, J., Bagatharia, S., Joshi, M., y Patel, A. (2023). Evaluation of the growth-inducing efficacy of various *Bacillus* species on the salt-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1168155>
- Patel, M., Vurukonda, S. S. K. P., y Patel, A. (2023). Multi-trait Halotolerant Plant Growth-promoting Bacteria Mitigate Induced Salt Stress and Enhance Growth of *Amaranthus Viridis*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *23*, 1860–1883. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01143-4>
- Peng, M., Jiang, Z., Zhou, F., y Wang, Z. (2023). From salty to thriving: plant growth promoting bacteria as nature's allies in overcoming salinity stress in plants.

- Frontiers in Microbiology*, *14*, 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1169809>
- Pérez-Rodríguez, M. M., Pontin, M., Piccoli, P., Lobato Ureche, M. A., Gordillo, M. G., Funes-Pinter, I., y Cohen, A. C. (2022). Halotolerant native bacteria *Enterobacter* 64S1 and *Pseudomonas* 42P4 alleviate saline stress in tomato plants. *Physiologia Plantarum*, *174*(4). <https://doi.org/10.1111/ppl.13742>
- Pranaw, K., Pidlisnyuk, V., Trögl, J., y Malinská, H. (2020). Bioprospecting of a Novel Plant Growth-Promoting Bacterium *Bacillus altitudinis* KP-14 for Enhancing *Miscanthus × giganteus* Growth in Metals Contaminated Soil. *Biology*, *9*(305), 1–25. <https://doi.org/10.3390/biology9090305>
- Premachandra, D., Hudek, L., y Brau, L. (2016). Bacterial Modes of Action for Enhancing of Plant Growth. *Journal of Biotechnology y Biomaterials*, *6*(3), 1–8. <https://doi.org/10.4172/2155-952x.1000236>
- Priyan Ramasamy, K., y Mahawar, L. (2023). Coping with salt stress-interaction of halotolerant bacteria in crop plants: A mini review. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1–7.
- Punia, H., Tokas, J., Malik, A., Bajguz, A., El-Sheikh, M. A., y Ahmad, P. (2021). Ascorbate–glutathione oxidant scavengers, metabolome analysis and adaptation mechanisms of ion exclusion in sorghum under salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(13249), 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms222413249>
- Qi, R., Lin, W., Gong, K., Han, Z., Ma, H., Zhang, M., Zhang, Q., Gao, Y., Li, J., y Zhang, X. (2021). *Bacillus* co-inoculation alleviated salt stress in seedlings cucumber. *Agronomy*, *11*(966), 1–15. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050966>
- Rabbee, M. F., Hwang, B. S., y Baek, K. H. (2023). *Bacillus velezensis*: A Beneficial Biocontrol Agent or Facultative Phytopathogen for Sustainable Agriculture. *Agronomy*, *13*(840), 1–14. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030840>
- Ramírez-Ojeda, G., Rodríguez-Pérez, J. E., Rodríguez-Guzmán, E., Sahagún-Castellanos, J., Chávez-Servia, J. L., Peralta, I. E., y Barrera-Guzmán, L. Á. (2022). Distribution and Climatic Adaptation of Wild Tomato (*Solanum*

- lycopersicum L.) Populations in Mexico. *Plants*, 11, 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants11152007>
- Ranjan, A., Rajput, V. D., Prazdnova, E. V., Gurnani, M., Bhardwaj, P., Sharma, S., Sushkova, S., Mandzhieva, S. S., Minkina, T., Sudan, J., Zargar, S. M., Chauhan, A., y Jindal, T. (2023). Nature's Antimicrobial Arsenal: Non-Ribosomal Peptides from PGPB for Plant Pathogen Biocontrol. *Fermentation*, 9(597), 1–26. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070597>
- Rasheed, A., Li, H., Nawaz, M., Mahmood, A., Hassan, M. U., Shah, A. N., Hussain, F., Azmat, S., Gillani, S. F. A., Majeed, Y., Qari, S. H., y Wu, Z. (2022). Molecular tools, potential frontiers for enhancing salinity tolerance in rice: A critical review and future prospective. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.966749>
- Rath, H., Sappa, P. K., Hoffmann, T., Gesell Salazar, M., Reder, A., Steil, L., Hecker, M., Bremer, E., Mäder, U., y Völker, U. (2020). Impact of high salinity and the compatible solute glycine betaine on gene expression of *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology*, 22(8), 3266–3286. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15087>
- Reang, L., Bhatt, S., Tomar, R. S., Joshi, K., Padhiyar, S., Vyas, U. M., y Kheni, J. K. (2022). Plant growth promoting characteristics of halophilic and halotolerant bacteria isolated from coastal regions of Saurashtra Gujarat. *Scientific Reports*, 12(4699), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08151-x>
- Roca-Couso, R., Flores-Félix, J. D., y Rivas, R. (2021). Mechanisms of action of microbial biocontrol agents against botrytis cinerea. *Journal of Fungi*, 7(1045), 1–26. <https://doi.org/10.3390/jof7121045>
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., y Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. In *Plant and Soil* (Vol. 287, Issues 1–2, pp. 15–21). <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9>
- Rojas-Solis, D., Vences-Guzmán, M. Á., Sohlenkamp, C., y Santoyo, G. (2020). Antifungal and Plant Growth–Promoting *Bacillus* under Saline Stress Modify

- their Membrane Composition. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20(3), 1549–1559. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00246-6>
- Roy, P. D., Rivero-Navarrete, A., Luis Sánchez-Zavala, J., y López-Balbiaux, N. (2014). Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana VoluMen 66. *Boletín de La Sociedad Geológica Mexicana*, 66(3), 553–557.
- Sagar, A., Rai, S., Ilyas, N., Sayyed, R. Z., Al-Turki, A. I., El Enshasy, H. A., y Simarmata, T. (2022). Halotolerant Rhizobacteria for Salinity-Stress Mitigation: Diversity, Mechanisms and Molecular Approaches. *Sustainability (Switzerland)*, 14(490), 1–26. <https://doi.org/10.3390/su14010490>
- Saleem, S., Iqbal, A., Ahmed, F., y Ahmad, M. (2021). Phytobeneficial and salt stress mitigating efficacy of IAA producing salt tolerant strains in *Gossypium hirsutum*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(9), 5317–5324. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.056>
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., y Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Sarkar, A. K., y Sadhukhan, S. (2022). Imperative role of trehalose metabolism and trehalose-6-phosphate signaling on salt stress responses in plants. *Physiologia Plantarum*, 174, 1–18. <https://doi.org/10.1111/ppl.13647>
- Schwyn, B., y Neilands, B. B. (1987). Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores'. *Analytical Biochemistry*, 160, 47–56.
- Shang, J. X., Li, X., Li, C., y Zhao, L. (2022). The Role of Nitric Oxide in Plant Responses to Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6167), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms23116167>
- Shultana, R., Zuan, A. T. K., Naher, U. A., Islam, A. K. M. M., Rana, M. M., Rashid, M. H., Irin, I. J., Islam, S. S., Rim, A. A., y Hasan, A. K. (2022). The PGPR Mechanisms of Salt Stress Adaptation and Plant Growth Promotion. *Agronomy*, 12(2266), 1–18. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102266>
- Singh, P., Choudhary, K. K., Chaudhary, N., Gupta, S., Sahu, M., Tejaswini, B., y Sarkar, S. (2022). Salt stress resilience in plants mediated through osmolyte accumulation and its crosstalk mechanism with phytohormones. In *Frontiers in*

- Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1006617>
- Singh, R. P., Shelke, G. M., Kumar, A., y Jha, P. N. (2015). Biochemistry and genetics of ACC deaminase: A weapon to “stress ethylene” produced in plants. *Frontiers in Microbiology*, 6(937), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00937>
- Snyder, W. C., y Hansen, H. N. (1940). The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 27(2), 64–67.
- Srinivas, C., Nirmala Devi, D., Narasimha Murthy, K., Mohan, C. D., Lakshmeesha, T. R., Singh, B. P., Kalagatur, N. K., Niranjana, S. R., Hashem, A., Alqarawi, A. A., Tabassum, B., Abd_Allah, E. F., y Chandra Nayaka, S. (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1315–1324. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002>
- Srivastava, D. A., Harris, R., Breuer, G., y Levy, M. (2021). Secretion-based modes of action of biocontrol agents with a focus on *Pseudozyma aphidis*. *Plants*, 10(210), 1–16. <https://doi.org/10.3390/plants10020210>
- Stegelmeier, A. A., Rose, D. M., Joris, B. R., y Glick, B. R. (2022). The Use of PGPB to Promote Plant Hydroponic Growth. *Plants*, 11(2783), 1–28. <https://doi.org/10.3390/plants11202783>
- Sultana, S., Alam, S., y Karim, M. M. (2021). Screening of siderophore-producing salt-tolerant rhizobacteria suitable for supporting plant growth in saline soils with iron limitation. *Journal of Agriculture and Food Research*, 4, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100150>
- Sunita, K., Mishra, I., Mishra, J., Prakash, J., y Arora, N. K. (2020). Secondary Metabolites From Halotolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Ameliorating Salinity Stress in Plants. *Frontiers in Microbiology*, 11, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.567768>
- Thomludi, E. E., Tsalgaidou, P. C., Baira, E., Papadimitriou, K., Venieraki, A., y Katinakis, P. (2021a). Genomic and metabolomic insights into secondary metabolites of the novel *Bacillus halotolerans* hil4, an endophyte with promising

- antagonistic activity against gray mold and plant growth promoting potential. *Microorganisms*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122508>
- Thomloudi, E. E., Tsalgatidou, P. C., Baira, E., Papadimitriou, K., Venieraki, A., y Katinakis, P. (2021b). Genomic and metabolomic insights into secondary metabolites of the novel *Bacillus halotolerans* Hil4, an endophyte with promising antagonistic activity against gray mold and plant growth promoting potential. *Microorganisms*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122508>
- Triantafyllou, A., Kamou, N., Papadopoulou, A., Leontidou, K., Mellidou, I., y Karamanoli, K. (2023). Evaluation of the biocontrol potential of PGPB strains isolated from drought-tolerant tomatoes against fungal pathogens. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01422-0>
- Tsalgatidou, P. C., Thomloudi, E. E., Baira, E., Papadimitriou, K., Skagia, A., Venieraki, A., y Katinakis, P. (2022). Integrated Genomic and Metabolomic Analysis Illuminates Key Secreted Metabolites Produced by the Novel Endophyte *Bacillus halotolerans* Cal.l.30 Involved in Diverse Biological Control Activities. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020399>
- Tsalgatidou, P. C., Thomloudi, E.-E., Delis, C., Nifakos, K., Zambounis, A., Venieraki, A., y Katinakis, P. (2023). Compatible Consortium of Endophytic *Bacillus halotolerans* Strains Cal.l.30 and Cal.f.4 Promotes Plant Growth and Induces Systemic Resistance against *Botrytis cinerea*. *Biology*, 12(779), 1–19. <https://doi.org/10.3390/biology12060779>
- Valencia-Marín, M. F. (2021). *Evaluación del efecto antagonista de bacterias termotolerantes hacia los fitopatógenos Botrytis cinerea 62BCV y Geotrichum candidum F.R.B.* [Tesis de Licenciatura]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., y Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. *Molecules*, 21(573), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Venieraki, A., Chorianopoulou, S. N., Katinakis, P., y Bouranis, D. L. (2021). Multi-trait wheat rhizobacteria from calcareous soil with biocontrol activity promote

- plant growth and mitigate salinity stress. *Microorganisms*, 9(1588), 1–22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081588>
- Wei, H., He, W., Li, Z., Ge, L., Zhang, J., y Liu, T. (2022). Salt-tolerant endophytic bacterium *Enterobacter ludwigii* B30 enhance bermudagrass growth under salt stress by modulating plant physiology and changing rhizosphere and root bacterial community. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.959427>
- Wei, H. L., y Zhang, L. Q. (2006). Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89, 267–280. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-9028-8>
- Wu, H., Gu, Q., Xie, Y., Lou, Z., Xue, P., Fang, L., Yu, C., Jia, D., Huang, G., Zhu, B., Schneider, A., Blom, J., Lasch, P., Borriss, R., y Gao, X. (2019). Cold-adapted Bacilli isolated from the Qinghai–Tibetan Plateau are able to promote plant growth in extreme environments. *Environmental Microbiology*, 21(9), 3505–3526. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14722>
- Wu, X., Fan, Y., Wang, R., Zhao, Q., Ali, Q., Wu, H., Gu, Q., Borriss, R., Xie, Y., y Gao, X. (2022). *Bacillus halotolerans* KKD1 induces physiological, metabolic and molecular reprogramming in wheat under saline condition. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.978066>
- Xiao, X., Wang, Q., Ma, X., Lang, D., Guo, Z., y Zhang, X. (2022). Physiological Biochemistry-Combined Transcriptomic Analysis Reveals Mechanism of *Bacillus cereus* G2 Improved Salt-Stress Tolerance of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. Seedlings by Balancing Carbohydrate Metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.712363>
- Xu, S., Xie, X., Zhao, Y., Shi, Y., Chai, A., Li, L., y Li, B. (2020). Whole-genome analysis of *Bacillus velezensis* ZF2, a biocontrol agent that protects *Cucumis sativus* against *Corynespora* leaf spot diseases. *3 Biotech*, 10(186), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2165-y>
- Yang, Y., Xie, J., Li, J., Zhang, J., Zhang, X., Yao, Y., Wang, C., Niu, T., y Bakpa, E. P. (2022). Trehalose alleviates salt tolerance by improving photosynthetic

- performance and maintaining mineral ion homeostasis in tomato plants. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.974507>
- Yin, L., Xue, Y., y Ma, Y. (2015). Global microarray analysis of alkaliphilic halotolerant bacterium *Bacillus* sp. N16-5 salt stress adaptation. *PLoS ONE*, 10(6), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128649>
- Yin, Z., Wang, X., Hu, Y., Zhang, J., Li, H., Cui, Y., Zhao, D., Dong, X., Zhang, X., Liu, K., Du, B., Ding, Y., y Wang, C. (2022). *Metabacillus dongyingensis* sp. nov. Is Represented by the Plant Growth-Promoting Bacterium BY2G20 Isolated from Saline-Alkaline Soil and Enhances the Growth of *Zea mays* L. under Salt Stress . *MSystems*, 7(2), 1–16. <https://doi.org/10.1128/msystems.01426-21>
- Yue, Z., Chen, Y., Wang, Y., Zheng, L., Zhang, Q., Liu, Y., Hu, C., Chen, C., Ma, K., y Sun, Z. (2022). Halotolerant *Bacillus altitudinis* WR10 improves salt tolerance in wheat via a multi-level mechanism. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.941388>
- Zahir, Z. A., Nadeem, S. M., Khan, M. Y., Binyamin, R., y Waqas, M. R. (2019). Role of Halotolerant Microbes in Plant Growth Promotion Under Salt Stress Conditions. In *Saline Soil-based Agriculture by Halotolerant Microorganisms* (pp. 209–253). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8335-9_10
- Zamanzadeh-Nasrabadi, S. M., Mohammadiapanah, F., Hosseini-Mazinani, M., y Sarikhan, S. (2023). Salinity stress endurance of the plants with the aid of bacterial genes. *Frontiers in Genetics*, 14, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1049608>
- Zhao, L., Zhou, Y., Li, J., Xia, Y., Wang, W., Luo, X., Yin, J., y Zhong, J. (2020). Transcriptional response of *Bacillus megaterium* FDU301 to PEG200-mediated arid stress. *BMC Microbiology*, 20(351), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02039-4>
- Zhou, B., Fang, Y., Xiao, X., Yang, J., Qi, J., Qi, Q., Fan, Y., y Tang, C. (2022). Trehalose 6-Phosphate/SnRK1 Signaling Participates in Harvesting-Stimulated Rubber Production in the Hevea Tree. *Plants*, 11(2879), 1–18. <https://doi.org/10.3390/plants1121287>