



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas

Doctorado en Ciencias en Recursos Naturales y
Medio Ambiente en Zonas Áridas

**Desarrollo de *Carya illinoensis* (W.) K. en interacción con
Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal bajo
condiciones de estrés por salinidad**



APROBADA



TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES
Y MEDIO AMBIENTE EN ZONAS ÁRIDAS

Presenta:

RUBÉN PALACIO RODRÍGUEZ

Bajo la supervisión de: Dr. JESÚS GUADALUPE ARREOLA ÁVILA.

Bermejillo, Durango, México. 2024



iniap
Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, agrícolas y Pecuarias

**Desarrollo de *Carya illinoensis* (W.) K. en interacción con
Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal bajo
condiciones de estrés por salinidad.**

Tesis realizada por Rubén Palacio Rodríguez bajo la supervisión del Comité
Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para
obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE EN
ZONAS ÁRIDAS**

DIRECTOR:



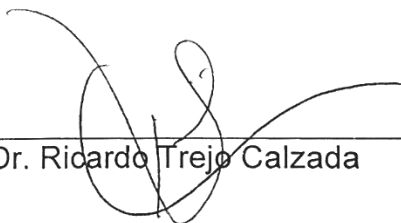
Dr. Jesús Guadalupe Arreola Ávila

CO-DIRECTOR:



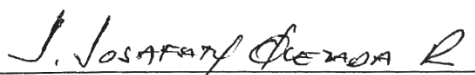
Dr. Jorge Sáenz Mata

ASESOR:



Dr. Ricardo Trejo Calzada

LECTOR EXTERNO:



Dr. Jesús Josafath Quezada Rivera

Contenido

DEDICATORIAS	VIII
AGRADECIMIENTOS	IX
DATOS BIOGRÁFICOS	XI
ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN GENERAL	XV
GENERAL ABSTRACT.....	XVI
CAPÍTULO I	1
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.2 LITERATURA CITADA.....	4
1.3 OBJETIVOS	7
1.3.1 Objetivo general.....	7
1.3.2 Objetivos específicos.....	7
1.4 HIPOTESIS.....	7
CAPÍTULO II	8
2 REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y NUTRICIONAL DE <i>Carya illinoensis</i>	8
2.2 BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE <i>Carya illinoensis</i>	10
2.3 ESTRÉS SALINO EN PLANTAS	11
2.3.1 Definición y Causas del Estrés Salino	11
2.3.2 Efectos del Estrés Salino en Plantas.....	11
2.2.3 Efectos Fisiológicos.....	12
2.3.4 Efectos Bioquímicos	12
2.3.5 Mecanismos de las Plantas para Tolerar la Salinidad	13
2.3.6 Evasión de Sal	13
2.3.7 Exclusión de Sal	14
2.3.8 Ajuste Osmótico	14
2.4 ROL DE LAS PGPR.....	15
2.4.1 ¿Qué son las PGPR?	15
2.4.2 Definición de PGPR.....	15

2.4.3 Clasificación de las PGPR.....	16
2.4.4 Mecanismos de las PGPR	17
2.4.5 Ejemplos de PGPR en la Mejora de la Tolerancia a la Salinidad	19
2.5 RESPUESTA GENÉTICA DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS SALINO	20
2.5.1 Genes Implicados en la Respuesta al Estrés Salino	21
2.5.2 Mecanismos de Modulación por PGPR.....	22
2.6 APLICACIONES AGRONÓMICAS Y SOSTENIBILIDAD	23
2.6.1 Estrategias para Mejorar la Tolerancia al Estrés Salino en Cultivos	23
2.7 IMPORTANCIA DE LAS PGPR EN LA AGRICULTURA SOSTENIBLE.....	24
2.8 LITERATURA CITADA.....	25
CAPÍTULO III	34
3.1 RESUMEN	34
3.2 ABSTRACT	35
3.3 INTRODUCCIÓN	36
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.4.1 Material Vegetal	38
3.4.2 Diseño Experimental	39
3.4.3 Determinación de la Halotolerancia en la Rizobacteria LBEndo1	39
3.4.4 Inoculación Bacteriana	39
3.4.5 Bioestimulación de <i>C. illinoensis</i> por la Rizobacteria LBEndo1.....	40
3.4.6 Extracción y Medición de Prolina.....	40
3.4.7 Extracción y Medición de Clorofila	41
3.4.8 Análisis Estadístico	41
3.5 RESULTADOS	41
3.5.1 Halotolerancia de la Rizobacteria LBEndo1	41
3.5.2 Dinámica del Crecimiento de Plántulas	42
3.5.3 Promoción del Crecimiento bajo Condiciones con y sin Estrés Salino	43
3.5.4 Contenido de prolina.....	45
3.5.5 Contenido de Clorofila y Daño Foliar	47
3.6 DISCUSIÓN.....	49
3.7 CONCLUSIONES	53
3.8 LITERATURA.....	54

Capítulo IV	59
4.1 RESUMEN	59
4.2 ABSTRACT	60
4.3 INTRODUCCIÓN	61
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
4.4.1 Material vegetal	63
4.4.2 Inoculación bacteriana	64
4.4.3 Diseño experimental	64
4.4.4 Medición de exopolisacáridos	65
4.4.5 Acumulación de Na⁺ en hojas tallo y raíz.....	65
4.4.6 Porcentaje de daño en las hojas	66
4.4.7 Expresión génica	66
4.4.8 Análisis bioinformático	67
4.4.9 Análisis Estadístico	68
4.5 RESULTADOS	68
4.5.1 Producción de exopolisacáridos	68
4.5.2 Acumulación de Na⁺ en hojas tallo y raíz.....	69
4.5.2.2 Tallo	70
4.5.2.3 Raíz.....	71
4.5.3 Porcentaje de daño en las hojas	72
4.5.4 Expresión relativa de genes relacionados al estrés salino	73
4.5.5 Relación en la variación de la expresión génica	77
4.6 DISCUSIÓN.....	78
4.7 CONCLUSIONES	81
4.8 LITERATURA.....	83

Índice de Figuras Capítulo 2

Figura 1 Halotolerancia de las bacterias	42
Figura 2 Dinámica de crecimiento	43
Figura 3 Fotografía de las plantas de los diferentes tratamientos	45
Figura 4 Producción de prolina	47
Figura 5 Producción de clorofila	48

Índice de Tablas Capítulo 2

Tabla 1 Datos morfométricos	45
--	----

Índice de Figuras Capítulo 3

Figura 1 Producción de exopolisacáridos.....	69
Figura 2 Acumulación de Na ⁺ en hojas.....	70
Figura 3 Acumulación de Na ⁺ en tallo	71
Figura 4 Acumulación de Na ⁺ en raíz	72
Figura 5 Daño foliar.....	73
Figura 6 Expresión relativa en condiciones sin sal.....	76
Figura 7 Expresión relativa en condiciones con sal.....	76
Figura 8 Heat map de la expresión relativa	77

Índice de Tablas Capítulo 3

Tabla 1 Primers de los genes utilizados	67
Tabla 2 Funciones de genes seleccionados y sus locus ID correspondientes.....	67

La ciencia es la progresiva aproximación del hombre al mundo real.

Max Planck

DEDICATORIAS

Para mi esposa Viri: Tu amor y compañía durante nuestro tiempo juntos han sido importante para mí crecimiento personal. Cada momento compartido ha sido maravilloso y esencial en mi camino hacia este logro. Gracias por ser parte de quien soy hoy.

Para mi hija Lilith: Tu llegada ha llenado nuestras vidas de una nueva luz y propósito. Este logro es un paso hacia el futuro que deseamos construir para ti.

Para mis padres Rubén y Praxedis: Ahora, al convertirme en padre, entiendo la profundidad de su amor y sacrificio. Este logro es también suyo, gracias por apoyarme siempre.

AGRADECIMIENTOS

En este momento de culminación y reflexión, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a aquellas instituciones y personas cuya participación ha sido fundamental en el desarrollo de mi tesis doctoral.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por su indispensable apoyo económico y confianza en mi proyecto, permitiéndome dedicarme plenamente a mi investigación.

Al **Posgrado en Recursos Naturales y Medio Ambiente en Zonas Áridas**, por brindarme la confianza, una plataforma académica de excelencia y los recursos necesarios para el desarrollo de mi proyecto.

A la **Facultad de Ciencias Biológicas de la UJED**, por brindarme el espacio, las instalaciones y el para desarrollar la parte práctica de mis experimentos.

Al **Dr. Jesús G. Arreola Ávila**, cuyo asesoramiento fue una guía invaluable en cada etapa de mi trabajo. Su paciencia y confianza en mí, han sido esenciales para superar los retos que se presentaron en el camino.

Al **Dr. Jorge Sáenz Mata**, por su apoyo constante, consejos prácticos y por impulsarme a explorar nuevas perspectivas y metodologías en mi investigación. Su

entusiasmo y compromiso con la excelencia han sido una fuente de inspiración constante.

Al **Dr. Ricardo Trejo Calzada**, por su análisis crítico y constructivo de mi trabajo, ayudándome a afinar mis argumentos y a presentar mis hallazgos de manera más clara y efectiva. Su apoyo ha sido fundamental para alcanzar los estándares de calidad que este proyecto requería.

A todos los profesores que me impartieron clase, por su dedicación y compromiso en la transmisión de su conocimiento y experiencia. Su guía ha sido esencial en mi formación académica, proporcionándome las herramientas necesarias para enfrentar y superar los desafíos intelectuales de mi investigación.

Cada uno de ustedes ha dejado una huella indeleble en mi formación académica y personal, contribuyendo no solo al éxito de esta tesis, sino también al crecimiento del conocimiento en nuestro campo. Mi gratitud hacia ustedes es inmensa y perdurará en el tiempo. Gracias por su inestimable aporte a mi desarrollo profesional y por creer en la importancia de mi investigación.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Rubén Palacio Rodríguez

Fecha de nacimiento: 7 de mayo de 1986

Lugar de nacimiento: Antonio Amaro Durango.

CURP: PARR860507HDGLDB03

Profesión: Biólogo



Desarrollo académico

Preparatoria: Especialidad en Ciencias Biológicas por el Instituto 18 de marzo (2007-2010).

Licenciatura: Biólogo por la Facultad de Ciencias Biológicas (2009-2014).
Cédula profesional: 11888115.

Maestría: Maestro en Ciencias en Biodiversidad y Ecología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UJED (2015-2017). Cédula profesional: 14053823.

Desarrollo científico

Mi línea de investigación se centra principalmente en las interacciones entre microorganismos y plantas en condiciones de esteres abiótico, aplicando diversas técnicas de análisis morfométrico, molecular y bioquímico. Este campo de estudio es esencial para comprender los mecanismos de estos organismos para el desarrollo de estrategias sostenibles en el ámbito agrícola.

A lo largo de mi desarrollo como estudiante de licenciatura y posgrado, se ha aportado al conocimiento científico mediante publicaciones en revistas especializadas, capítulos de libros y presentaciones en congresos nacionales e internacionales. Entre las contribuciones más notables se incluye la investigación

sobre las rizobacterias halófilas y su potencial para promover el crecimiento y mejorar la tolerancia a la sal en *Carya illinoensis*, un tema importante para la agricultura sostenible.

La participación activa en congresos y foros científicos, reflejan el compromiso con la investigación dentro del ámbito científico. Estas actividades también subrayan el interés por colaborar y compartir conocimientos.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
μg	Microgramos
$\mu\text{g/mL}$	Microgramos por mililitro
μL	Microlitro
$\mu\text{mol g}^{-1}$	Micromoles por gramo
ABA	Ácido Abscísico
ACC	Aminociclopropano-1-carboxilato
ANOVA	Análisis de Varianza
APX	Ascorbato peroxidasa
ATP	Adenosín trifosfato
Ca^{2+}	Ión Calcio
CAT	Catalasa
cDNA	DNA complementario
Cl^-	Cloro
<i>coda</i>	Gen involucrado en la síntesis de glicina betaína
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMF	N, N-dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa1	Desoxirribonucleasa 1
$\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$	Decisiemens por metro
EPS	Exopolisacaridos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GST	Glutación S-transferasa
H^+	Ión hidrógeno.
<i>hkt1</i>	Gen que codifica un transportador de sodio/potasio
K^+	Ión Potasio
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
M -	Molar
Mg^{2+}	Magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol/gDW	milimoles por gramo de peso seco
Na^+	Ión sodio.
NAC1	Factor de transcripción de respuesta al estrés en plantas
NaCl	Cloruro de Sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NHX1	Antiportador de Na^+/H^+
nm	Nanómetro
O_2	Oxígeno
P5CS	Delta ¹ -pirroline-5-carboxilato sintasa

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGPR	Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal
PI4Kb1	Fosfatidilinositol 4-quinasa tipo b1
POD	Peroxidasas
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico.
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
rpm	Revoluciones por Minuto
SOD	Superóxido dismutasa
TM	Tempertura de alineamiento
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por Mililitro

RESUMEN GENERAL

Desarrollo de *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch en interacción con Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal bajo condiciones de estrés por salinidad.

La salinidad es un problema que representa un desafío para el sector agrícola, comprometiendo la fisiología y el metabolismo vegetal, lo que conduce a un desequilibrio iónico y estrés osmótico. En este contexto, las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) pueden ser una alternativa para contrarrestar el problema. Este estudio se enfoca en evaluar la capacidad de la rizobacteria *Bacillus paralicheniformis* LBEndo1 para aumentar la biomasa de las plántulas, así como mejorar la resistencia al estrés salino en el nogal pecanero (*Carya illinoensis*), bajo condiciones de estrés por salinidad. Para el desarrollo de la investigación se tomaron en cuenta dos variables, la presencia de estrés salino (50 mM de NaCl) y la inoculación de las plántulas con la cepa LBEndo1, dando como resultado cuatro tratamientos. La inoculación se llevó a cabo aplicando 10 ml de solución bacteriana a una concentración de 1×10^8 UFC/ml directamente en la base del tallo de las plántulas, posteriormente se regaron cada tercer día con una solución salina. Los resultados del estudio revelaron que la inoculación con la rizobacteria LBEndo1 mejoró el desarrollo de las plántulas de nogal en ambas condiciones (con estrés y sin estrés). Este efecto se manifestó en un incremento en la biomasa de las plantas, evidenciado por un aumento en el peso seco de las hojas, tallo y raíces, así como en el diámetro y altura del tallo. Asimismo, las plántulas que interactuaron con la PGPR presentaron un aumento en la concentración de clorofila y prolina, indicativo de una mejor adaptación al estrés salino. Además, se observó una reducción en el daño foliar, demostrando así la eficacia de la rizobacteria en mitigar los efectos de la salinidad. La inoculación bacteriana también indujo la regulación de genes clave involucrados en la respuesta al estrés salino, lo que sugiere un mecanismo por el cual LBEndo1 mejora la tolerancia a la salinidad. Este conjunto de resultados muestra no solo la capacidad de LBEndo1 para promover el crecimiento vegetal en condiciones de estrés, sino también su papel en la modulación de la respuesta génica de las plantas al estrés salino, ofreciendo nuevas perspectivas para el manejo de la salinidad en la agricultura.

Palabras clave: Nogal pecanero, bioestimulación, expresión génica, PGPR

GENERAL ABSTRACT

Development of *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch in interaction with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria under salinity stress conditions.

Salinity poses a significant challenge to the agricultural sector, compromising plant physiology and metabolism, leading to ionic imbalance and osmotic stress. In this context, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) can offer an alternative to mitigate this problem. This study focuses on evaluating the capacity of the rhizobacterium *Bacillus paralicheniformis* LBEndo1 to enhance seedling biomass and improve resistance to salt stress in pecan (*Carya illinoensis*) under salinity stress conditions. For the development of the research, two variables were considered: the presence of salt stress (50 mM NaCl) and the inoculation of seedlings with the LBEndo1 strain, resulting in four treatments. The inoculation was carried out by applying 10 ml of bacterial solution at a concentration of 1×10^8 CFU/ml directly to the base of the seedling stems, followed by watering every third day with a saline solution. The study results revealed that inoculation with the LBEndo1 rhizobacterium improved the development of pecan seedlings under both stressed and non-stressed conditions. This effect was manifested by an increase in plant biomass, evidenced by an increase in the dry weight of leaves, stems, and roots, as well as in stem diameter and height. Additionally, the seedlings interacting with the PGPR showed an increase in chlorophyll and proline concentration, indicative of better adaptation to salt stress. A reduction in foliar damage was also observed, demonstrating the efficacy of the rhizobacterium in mitigating the effects of salinity. Bacterial inoculation also induced the regulation of key genes involved in the response to salt stress, suggesting a mechanism by which LBEndo1 enhances salt tolerance. This set of results demonstrates not only the ability of LBEndo1 to promote plant growth under stress conditions but also its role in modulating the genetic response of plants to salt stress, offering new perspectives for salinity management in agriculture

Keywords: Pecan, biostimulation, gene expression, PGPR

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El nogal pecanero (*Carya illinoensis*), valorado tanto por su importancia económica como por sus beneficios nutricionales, se ha establecido firmemente en el escenario agrícola global como un cultivo comercialmente valioso. Originaria del sur de Estados Unidos y norte de México, esta especie arbórea de la familia Juglandaceae, destaca en la producción mundial de frutos secos (Rani et al., 2017). Actualmente, México se ha posicionado como el principal productor mundial de nuez pecanera, reportando una superficie de cultivo de 146,239 hectáreas y una producción de 136,947 toneladas en el año 2021, de acuerdo con Sierra-Zurita et al. (2023).

En particular, la Comarca Lagunera de México, con sus condiciones climáticas óptimas, se ha convertido en un sitio estratégico para el desarrollo del nogal pecanero, aportando de manera significativa a la economía local y la creación de empleos (Sánchez-Ledesma et al., 2023). La adopción de plántulas de nueces de polinización libre como portainjertos en huertos injertados es una práctica común en estas áreas de cultivo, lo que refleja la adaptación de las técnicas agronómicas a las particularidades del nogal pecanero (Casales et al., 2018).

Este cultivo prefiere naturalmente los entornos cercanos a cuerpos de agua, como arroyos o ríos, favoreciendo los suelos aluviales que son ricos, profundos, bien drenados y capaces de retener adecuadamente la humedad (Miyamoto et al., 1986). Sin embargo, su susceptibilidad a la salinidad es notable, tolerando rangos de conductividad eléctrica de aproximadamente 2 a 3 dS·m⁻¹. La exposición a niveles superiores puede resultar en un detrimento grave del crecimiento y desarrollo, pudiendo incluso ser letal para la planta, lo que muestra la importancia de un manejo cuidadoso del agua y el suelo en las regiones productoras (Miyamoto, 2010; Miyamoto y Nesbitt, 2011).

El estrés salino representa uno de los mayores desafíos abióticos en la agricultura, impactando severamente la fisiología y el metabolismo de cultivos como el nogal pecanero (Liu et al., 2022). Esta condición adversa induce un desequilibrio iónico y estrés osmótico, afectando críticamente la homeostasis hídrica y la distribución de iones. Así como en el nogal pecanero como en el resto de las plantas, la salinidad compromete la producción de hojas, el diámetro del tallo, el peso de los brotes y el crecimiento de la raíz, resultando en una reducción significativa de la biomasa y, por ende, en una menor producción de frutos (Ojeda-Barrios et al., 2021). Además, altas concentraciones de sal impactan negativamente en funciones fisiológicas clave como la conductancia estomática y la capacidad fotosintética, provocando estrés osmótico, dificultando la capacidad de la planta para absorber agua (Campos-Villarreal et al., 2017). Esta situación no solo limita el crecimiento de la planta, sino que también restringe su capacidad para contrarrestar las especies reactivas de oxígeno, subrayando la necesidad de desarrollar estrategias efectivas para mejorar la tolerancia a la salinidad (Farooq et al., 2019).

Frente a este desafío, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Rizobacteria, PGPR, por sus siglas en inglés) se perfilan como una solución innovadora y eficaz. Estos microorganismos benéficos al establecerse en la rizósfera, desencadenan una serie de mecanismos que potencian la resistencia de las plantas a condiciones adversas, incluida la salinidad (Bhattacharyya & Jha, 2012). Las PGPR facilitan este proceso a través de la producción de fitohormonas que estimulan el crecimiento, la solubilización de fosfatos y la fijación de nitrógeno, mejorando así la nutrición vegetal (Shultana et al., 2022).

Además, producen enzimas específicas como la ACC desaminasa, la cual reduce los niveles de etileno inducido por estrés en las plantas (Moon & Ali, 2022). Esta enzima, ha demostrado su capacidad para mitigar el impacto del estrés salino en cultivos como el tomate, aliviando el estrés abiótico y aumentando la producción de biomasa (Orozco-Mosqueda et al., 2019). Tal efecto sugiere un amplio potencial para aplicaciones en cultivos sensibles a la salinidad, como el nogal pecanero,

abriendo nuevas vías para mejorar su resistencia y productividad bajo condiciones de estrés salino (Gupta et al., 2021). Esta aproximación biotecnológica no solo ofrece un método sostenible para contrarrestar los efectos adversos de la salinidad en la agricultura, sino que también muestra la importancia de las interacciones planta-microorganismo en el desarrollo de estrategias de manejo agrícola más resilientes y eficientes (Ji et al., 2020).

La respuesta genética de las plantas al estrés salino incorpora tanto mecanismos propios como los mecanismos relacionados con la interacción con PGPR, que modulan esta respuesta a nivel molecular (Khan et al., 2020). Las PGPR, como ciertas cepas de *Bacillus*, influyen en la expresión génica de las plantas para mejorar su tolerancia al estrés salino (Khan et al., 2021). Estas bacterias pueden incrementar la expresión de genes responsables de la síntesis de osmoprotectores, tales como la prolina, y activar la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes, contribuyendo a una mejor adaptación de las plantas a ambientes salinos (Shavalikohshori et al., 2020; Ghosh & Mohapatra 2017). Un ejemplo específico es la capacidad de *Bacillus oryzicola* para aumentar los niveles de expresión del gen SOS en *Arabidopsis thaliana*, lo que resulta en una mejor regulación del transporte de sodio y potasio, esencial para el mantenimiento de la homeostasis iónica bajo estrés por sal (Baek et al., 2020).

En este contexto, este estudio se enfoca en los efectos de la rizobacteria *Bacillus paralicheniformis* LBEndo1 en plántulas de nogal pecanero bajo estrés salino. A través de un análisis que incluye aspectos morfométricos, bioquímicos y genéticos, se busca evaluar cómo la inoculación con PGPR mejora la tolerancia al estrés salino. Este enfoque integral pretende desarrollar estrategias de mitigación del estrés salino más efectivas, contribuyendo a la sostenibilidad y productividad del cultivo frente a desafíos ambientales como la salinidad.

Este estudio no solo resalta el papel crucial de las PGPR en enfrentar desafíos ambientales, sino que también subraya la importancia de la investigación científica para descubrir soluciones innovadoras que permitan a los cultivos como el nogal pecanero prosperar en condiciones adversas.

1.2 LITERATURA CITADA

- Baek, D., Rokibuzzaman, M., Khan, A., Kim, M. C., Park, H. J., Yun, D. J., & Chung, Y. R. (2020). Plant-growth promoting *Bacillus oryzicola* YC7007 modulates stress-response gene expression and provides protection from salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 10, 497302.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Campos-Villarreal, A. G., Arreola-Avila, J. G., Chávez-Simental, J. A., Trejo Calzada, R., Borja de la Rosa, A., Lopez Santos, A., & Hernandez Salgado, J. R. (2017). Physiological response, ion accumulation and dry weight of pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch) rootstocks grown under saline stress conditions. *Interciencia*, 42(11), 744-749.
- Casales, F. G., van der Watt, E., & Coetzer, G. M. (2018). Propagation of pecan (*Carya illinoensis*): A review. *African Journal of Biotechnology*, 17, 586–605.
- Farooq, M. A., Niazi, A. K., Akhtar, J., Farooq, M., Souiri, Z., Karimi, N., & Rengel, Z. (2019). Acquiring control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 353-369.
- Ghosh, D., Sen, S., & Mohapatra, S. (2017). Modulation of proline metabolic gene expression in *Arabidopsis thaliana* under water-stressed conditions by a drought-mitigating *Pseudomonas putida* strain. *Annals of Microbiology*, 67, 655-668.
- Gupta, A., Bano, A., Rai, S., Kumar, M., Ali, J., Sharma, S., & Pathak, N. (2021). ACC deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in *Pisum sativum*. *3 Biotech*, 11(12), 514.
- Ji, J., Yuan, D., Jin, C., Wang, G., Li, X., & Guan, C. (2020). Enhancement of growth and salt tolerance of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by regulating ethylene production with a novel halotolerant PGPR strain *Glutamicibacter* sp. YD01 containing ACC deaminase activity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42, 1-17.
- Khan, M. A., Hamayun, M., Asaf, S., Khan, M., Yun, B. W., Kang, S. M., & Lee, I. J. (2021). Rhizospheric *Bacillus spp.* rescues plant growth under salinity stress via regulating gene expression, endogenous hormones, and antioxidant system of *Oryza sativa* L. *Frontiers in Plant Science*, 12, 665590.

- Khan, N., Bano, A., Ali, S., & Babar, M. A. (2020). Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 90, 189-203.
- Liu, J., Ma, J. Y., Zhang, J. C., Ma, S. L., Wang, Y. H., Nie, H., & Cao, P. X. (2022). Effects of different soil improvement measures on the growth of *Carya illinoensis* in saline soil in northern Jiangsu Province.
- Miyamoto, S. (2010). Supplement of Diagnosis and Management of Salinity Problems in Irrigated Pecan Production: Salt Leaching; Technical Report N° 387A. *Texas Water Resources Institute: College Station, TX, USA*.
- Miyamoto, S., & Nesbitt, M. (2011). Effectiveness of soil salinity management practices in basin-irrigated pecan orchards. *HortTechnology*, 21, 569–576.
- Miyamoto, S., Riley, T., Gobran, G., & Petticrew, J. (1986). Effects of saline water irrigation on soil salinity, pecan tree growth and nut production. *Irrigation Science*, 7, 83–95.
- Moon, Y. S., & Ali, S. (2022). Possible mechanisms for the equilibrium of ACC and role of ACC deaminase-producing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(3), 877-887.
- Ojeda-Barrios, D., Benavides-Mendoza, A., Hernández-Rodríguez, A., Orozco-Meléndez, L. R., & Sanchez, E. (2021). Causes, effects, and management of salinity problems in pecan production in North Mexico. In *Saline and Alkaline Soils in Latin America: Natural Resources, Management and Productive Alternatives* (pp. 177-187).
- Orozco-Mosqueda, M. D. C., Duan, J., DiBernardo, M., Zetter, E., Campos-García, J., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2019). The production of ACC deaminase and trehalose by the plant growth promoting bacterium *Pseudomonas sp.* UW4 synergistically protect tomato plants against salt stress. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1392.
- Rani, S., Sharma, A., Wali, V. K., Kour, K., Sharma, M., & Sharma, M. (2017). Evaluation of genetic diversity of pecan nut (*Carya illinoensis* (Wang) K. Koch.) in Jammu region. *Indian Journal of Horticulture*, 74(4), 601-603.
- Sánchez-Ledesma, J. A., Garibay-Orijel, R., Guevara-Guerrero, G., Ávila-Rodríguez, V., & Arreola-Ávila, J. G. (2023). Macromicetos asociados con *Carya illinoensis* en La Comarca Lagunera, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 94.

- Shavalikohshori, O., Zalaghi, R., Sorkheh, K., & Enaytizamir, N. (2020). The expression of proline production/degradation genes under salinity and cadmium stresses in *Triticum aestivum* inoculated with *Pseudomonas* sp. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17, 2233-2242.
- Shultana, R., Zuan, A. T. K., Naher, U. A., Islam, A. M., Rana, M. M., Rashid, M. H., ... & Hasan, A. K. (2022). The PGPR mechanisms of salt stress adaptation and plant growth promotion. *Agronomy*, 12(10), 2266.
- Sierra-Zurita, D., Santana-Espinoza, S., Rosales-Serna, R., Ríos-Saucedo, J. C., & Carrillo-Parra, A. (2023). Productivity and Characterization of Biomass Obtained from Pruning of Walnut Orchards in México. *Energies*, 16(14), 2243.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar los efectos de *Bacillus paralicheniformis* LBEndo1 sobre *Carya illinoensis* en condiciones de salinidad a nivel morfológico, bioquímico y genético.

1.3.2 Objetivos específicos

- Analizar el crecimiento de *Carya illinoensis* en condiciones de salinidad y su interacción con rizobacterias (respuesta morfológica).
- Analizar la producción de prolina, clorofila, contenido de Na⁺ y Cl⁻ en hojas de *Carya illinoensis* (respuesta bioquímica).
- Analizar la expresión de genes relacionados con el estrés salino en *Carya illinoensis* (respuesta génica).

1.4 HIPOTESIS

La inoculación de *Carya illinoensis* (nogal pecanero) con la rizobacteria *Bacillus paralicheniformis* LBEndo1 mejora la resistencia al estrés salino y promueve un mayor crecimiento y desarrollo de las plantas, a través de modificaciones morfológicas, incremento en la producción de compuestos bioquímicos como la prolina y la clorofila, y la modulación de genes relacionados con la respuesta al estrés salino.

CAPÍTULO II

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y NUTRICIONAL DE *Carya illinoensis*

Carya illinoensis, comúnmente conocido como nogal pecanero, es un árbol nativo de América del Norte y se ha convertido en uno de los cultivos más valiosos a nivel mundial, tanto por su importancia económica como por sus beneficios nutricionales (Oliveira et al., 2021). La nuez pecanera es apreciada por su rico contenido nutricional, incluyendo proteínas, grasas saludables, especialmente ácidos grasos omega-3, vitaminas y minerales esenciales como zinc, magnesio y potasio (Atanasov et al., 2018). Estas propiedades nutricionales hacen de la nuez pecanera un alimento altamente recomendable para una dieta saludable (Flores-Córdova et al., 2016).

Desde una perspectiva económica, el nogal pecanero ha mostrado un crecimiento impresionante en términos de producción y demanda global (Cambareri et al., 2023). Según Sierra-Zurita et al. (2023), México se ha posicionado como el líder mundial en la producción de nueces pecaneras, con un área de cultivo de aproximadamente 146,239 hectáreas y una producción de 136,947 toneladas en 2021. Esta expansión en la producción se debe, en parte, a la creciente demanda internacional de nueces pecaneras, impulsada tanto por sus beneficios nutricionales como por su versatilidad en la cocina y la industria alimentaria (Maciel et al., 2020).

La producción de nueces pecaneras contribuye significativamente a la economía local en las regiones productoras, especialmente en el norte de México y el sur de los Estados Unidos, donde las condiciones climáticas son óptimas para su cultivo (Casales et al., 2018). La industria no solo genera empleo directo en las áreas de cultivo, sino que también impulsa la economía a través de la cadena de valor, incluyendo procesamiento, comercialización y exportación (Tarango-Rivero, 2004). Además, la adopción de prácticas agronómicas innovadoras ha mejorado la

eficiencia en la producción y calidad del fruto, reflejando la adaptación de la industria a los desafíos del mercado global (Pineda Argandar, 2019).

En la Comarca Lagunera de México, una región situada entre los estados de Coahuila y Durango, la producción de nuez pecanera se ha consolidado como una actividad agrícola de notable importancia económica y social (Sánchez-Ledesma et al., 2023). Esta área se distingue por sus condiciones climáticas idóneas, como la precipitación anual, así como la disponibilidad de agua de riego proveniente del río Nazas y las temperaturas que van desde los -7 °C en invierno hasta los 45 °C en verano, condiciones que favorecen el desarrollo y la calidad del nogal pecanero, haciendo de la Comarca Lagunera uno de los principales núcleos de producción de nuez en México (Cervantes-Vázquez et al., 2018).

El cultivo del nogal en la Comarca Lagunera no solo contribuye significativamente al volumen total de la producción nacional, colocando a México en una posición líder a nivel mundial en la producción de nueces pecaneras (Sierra-Zurita et al., 2023), sino que también impulsa el desarrollo económico local a través de la creación de empleos y la generación de ingresos para miles de familias (Sánchez-Ledesma et al., 2023).

No obstante, la industria del nogal pecanero enfrenta desafíos significativos, especialmente relacionados con el estrés abiótico como la salinidad del suelo, que puede afectar negativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas, reduciendo la productividad y la calidad de la nuez (Campos-Villarreal et al., 2017). En este contexto, la investigación y aplicación de tecnologías agrícolas avanzadas, incluyendo el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, emerge como una estrategia prometedora para mejorar la tolerancia al estrés salino y asegurar la sostenibilidad de la producción de nuez pecanera (Shi et al., 2022; Palacio-Rodríguez et al., 2023).

2.2 BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE *Carya illinoensis*

Carya illinoensis, comúnmente conocido como nogal pecanero, es miembro de la familia Juglandaceae. Este árbol, es originario del sur de Estados Unidos y norte de México, se ha adaptado exitosamente a diversas condiciones climáticas en varias partes del mundo (Grauke & Mendoza-Herrera, 2011). Este éxito se refleja en su expansión global, con cultivos establecidos en regiones tan variadas como China, Australia, Brasil y Sudáfrica, lo cual evidencia su notable capacidad de adaptación (FAO, 2023).

Desde una perspectiva taxonómica, el nogal pecanero se clasifica en el Reino Plantae, perteneciendo a la Clase Magnoliopsida, Orden Juglandales, Familia, Juglandaceae y género, *Carya*. Capaz de alcanzar alturas que van entre 30 y 55 metros, el nogal pecanero se caracteriza por un dosel expansivo de más de 2 metros de diámetro (Casales et al., 2018). La planta es monoica, presentando flores masculinas y femeninas en el mismo árbol, lo que facilita una polinización eficiente por el viento. Sus hojas, caducifolias y compuestas, son imparipinnadas y presentan variaciones en longitud y color según el cultivar, subrayando la diversidad biológica dentro de la especie (Urrea y Urzúa, 2016).

El entorno preferido del nogal pecanero incluye proximidades a cuerpos de agua, donde los suelos aluviales, ricos y bien drenados, ofrecen las condiciones ideales para su desarrollo. Esta afinidad por suelos fértiles y bien drenados destaca la importancia de una gestión del agua cuidadosa para maximizar el rendimiento del cultivo (Miyamoto et al., 1986). La robustez de esta especie ante diferentes condiciones ambientales subraya su potencial para la expansión agrícola, siempre y cuando se mantengan prácticas de manejo adecuadas que respeten sus necesidades ecológicas (McCarthy & Quinn, 1990).

El ciclo de vida del nogal pecanero es un proceso fenológico complejo que inicia con el endoletargo, un estado de dormancia que precede a la brotación en marzo. La floración sigue en primavera, marcando un periodo crucial para la polinización y la formación de frutos. El riego, que se inicia en junio, marca el comienzo de la

formación del fruto, culminando con la maduración y cosecha de la nuez entre octubre y diciembre (Casales et al., 2018). Este ciclo detallado es fundamental para el manejo agronómico del cultivo, ya que permite a los agricultores sincronizar las prácticas de manejo con las etapas de desarrollo de la planta, optimizando así el rendimiento y la calidad de la cosecha (Godoy et al., 2000).

La comprensión profunda del ciclo de vida y la fenología de *Carya illinoensis* es crucial para enfrentar los retos del cambio climático y garantizar una producción sostenible. Los productores deben adaptar sus prácticas de manejo a las necesidades específicas de cada etapa fenológica, asegurando así la resiliencia y productividad del cultivo en un contexto de variabilidad climática (Grageda et al., 2016; Wang, 2022).

2.3 ESTRÉS SALINO EN PLANTAS

2.3.1 Definición y Causas del Estrés Salino

El estrés salino es un problema agrícola significativo que afecta a la productividad de los cultivos en muchas regiones del mundo. Se define como la condición adversa provocada por la concentración elevada de sales solubles en el suelo, la cual impide el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Mushtaq, 2020). Las causas del estrés salino pueden variar e incluyen tanto factores naturales como antropogénicos. Naturalmente, puede originarse por la acumulación de sales a través de la evaporación del agua superficial en climas áridos y semiáridos. El riego excesivo con agua de mala calidad, la mala gestión del drenaje y la utilización de fertilizantes sintéticos pueden incrementar la salinidad del suelo (Hao et al., 2021).

2.3.2 Efectos del Estrés Salino en Plantas

El estrés salino ejerce un impacto profundo en la fisiología y bioquímica de las plantas, alterando desde la absorción de agua y nutrientes hasta la integridad celular y el equilibrio osmótico (Zhao et al., 2021).

2.2.3 Efectos Fisiológicos

- **Limitación en la Absorción de Agua:** La presencia de altas concentraciones de sales en el suelo crea un gradiente de potencial hídrico desfavorable, dificultando la absorción de agua por las raíces. Esta condición osmótica adversa provoca una reducción en la turgencia de las células, afectando el crecimiento celular y, por consiguiente, el desarrollo de la planta (Shahid et al., 2020).
- **Toxicidad Iónica:** Más allá de los efectos osmóticos, la salinidad induce toxicidad iónica, principalmente debido a iones específicos como Na^+ y Cl^- . Estos iones pueden acumularse en concentraciones tóxicas en las hojas, interfiriendo con la fotosíntesis y otros procesos celulares esenciales. La toxicidad iónica puede resultar en necrosis foliar, senescencia anticipada y, en casos extremos, la muerte de la planta (Arif et al., 2020).
- **Alteración en la Nutrición Mineral:** La salinidad compite con la absorción de nutrientes esenciales, como el potasio (K^+), el calcio (Ca^{2+}) y el magnesio (Mg^{2+}), desequilibrando el estado nutricional de la planta. Este antagonismo en la absorción de iones afecta varios procesos metabólicos y puede conducir a deficiencias nutricionales específicas (Loudari et al., 2020).

2.3.4 Efectos Bioquímicos

- **Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS):** Bajo estrés salino, las plantas experimentan un aumento en la producción de ROS, tales como el oxígeno (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$). Estas moléculas altamente reactivas pueden dañar las membranas celulares, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, conduciendo al estrés oxidativo (Shahid et al., 2020).
- **Modificaciones en el Metabolismo de Lípidos:** La integridad de las membranas celulares se ve comprometida bajo estrés salino, en parte debido a la peroxidación de lípidos inducida por las ROS. Estos cambios en la composición lipídica afectan la fluidez y la funcionalidad de las membranas,

impactando procesos vitales como el transporte de iones y el metabolismo energético (Kesawat et al., 2023).

- **Inducción de Respuestas Antioxidantes:** Como mecanismo de defensa, las plantas activan sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, para mitigar el daño causado por las ROS. Enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasas (POD), junto con moléculas antioxidantes como glutatión y ácido ascórbico, juegan roles cruciales en la detoxificación de las ROS (Chaudhry et al., 2021).
- **Ajustes en Metabolitos Secundarios:** Bajo condiciones de estrés salino, se observa un incremento en la síntesis de metabolitos secundarios, como los fenoles y flavonoides, que contribuyen a la protección contra el estrés oxidativo y mejoran la tolerancia a la salinidad. Estos compuestos tienen propiedades antioxidantes y pueden actuar como osmoprotectores o agentes de detoxificación (Rodríguez-Salinas et al., 2022).

2.3.5 Mecanismos de las Plantas para Tolerar la Salinidad

Los mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas son fundamentales para su supervivencia y productividad en ambientes salinos. Estos mecanismos no solo permiten a las plantas sobrevivir en condiciones adversas sino también completar su ciclo de vida. Profundicemos en cada uno de estos mecanismos de tolerancia: la evasión de sal, la exclusión de sal y el ajuste osmótico (Mushtaq et al., 2020).

2.3.6 Evasión de Sal

La evasión de sal es un mecanismo mediante el cual las plantas minimizan el contacto con las sales tóxicas presentes en el suelo (Acosta-Motos et al., 2017). Este mecanismo implica una serie de estrategias adaptativas, incluyendo:

- **Modificaciones Morfológicas:** Cambios en la arquitectura de la raíz, como el crecimiento de raíces más profundas o en direcciones que evitan áreas de alta concentración de sal, permiten a la planta acceder a fuentes de agua menos salinas (Acosta-Motos et al., 2017).

- **Ciclo de Vida Acelerado:** Algunas especies de plantas pueden acelerar su ciclo de vida para completar su desarrollo antes de que la acumulación de sal alcance niveles críticos. Este mecanismo es particularmente observable en plantas anuales en ambientes salinos (Zhang et al., 2016).

2.3.7 Exclusión de Sal

La exclusión de sal implica el control activo de la absorción y el transporte de iones, evitando la acumulación de iones tóxicos, especialmente Na^+ y Cl^- , en los tejidos sensibles como las hojas jóvenes y los meristemos (Wu & Li, 2019). Este mecanismo se basa en varios procesos:

- **Barreras Radiculares a la Entrada de Sal:** Las raíces pueden actuar como barreras efectivas, limitando la cantidad de iones de sal que ingresan a la planta. Esto se logra mediante la selección activa de iones en las membranas celulares de las raíces (Cheng et al., 2020).
- **Transporte de Sal hacia Órganos de Almacenamiento:** Las plantas pueden transportar activamente los iones de sal desde las raíces hacia órganos de almacenamiento como las hojas viejas o estructuras especializadas, donde la sal puede acumularse sin afectar las funciones vitales. Eventualmente, estas partes de la planta pueden ser descartadas, eliminando así la sal acumulada (Hameed et al., 2021).

2.3.8 Ajuste Osmótico

El ajuste osmótico es un mecanismo que permite a las células de las plantas mantener su turgencia y funcionamiento celular bajo estrés salino (Liao et al., 2022). Esto implica:

- **Acumulación de Solutos Compatibles:** Las plantas sintetizan o acumulan solutos compatibles, como prolina, glicina betaína, azúcares solubles y polioles, que no interfieren con las reacciones bioquímicas celulares. Estos compuestos bajan el potencial osmótico dentro de las células, permitiendo la absorción de agua incluso bajo condiciones salinas (Liao et al., 2022).

- **Regulación de iones:** Además de acumular solutos orgánicos, las plantas regulan los niveles de iones específicos dentro de sus células, equilibrando la presión osmótica sin causar toxicidad. El potasio (K^+) juega un papel crucial en este equilibrio, reemplazando a los iones Na^+ en las células (Choudhary et al., 2023).

2.4 ROL DE LAS PGPR

2.4.1 ¿Qué son las PGPR?

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) son esenciales para la salud y el crecimiento de las plantas, ofreciendo una alternativa sostenible a los fertilizantes sintéticos y pesticidas químicos. Estos microorganismos, que colonizan tanto la rizósfera como los tejidos internos de las plantas, principalmente la raíz, juegan roles clave en la mejora de la nutrición vegetal, la síntesis de fitohormonas, la solubilización de minerales esenciales y la protección contra patógenos y diversos tipos de estreses ambientales (Jha & Saraf, 2015). Al favorecer el desarrollo vegetal y la resiliencia a condiciones de estrés tanto biótico como abiótico mediante una gran variedad de mecanismos naturales, las PGPR destacan por su potencial en prácticas agrícolas sostenibles, marcando un camino hacia una agricultura más ecológica y eficiente, promoviendo un futuro donde la producción agrícola, se logra de manera más armoniosa con el planeta (Nazari & Smith, 2020).

2.4.2 Definición de PGPR

Las PGPR son un grupo diverso de bacterias que se encuentran asociadas con la zona de la raíz de las plantas, donde ejercen efectos benéficos sobre el crecimiento y desarrollo vegetal (Bhattacharyya & Jha 2012). Su capacidad para promover el crecimiento en las plantas, radica en su habilidad para realizar funciones biológicas que afectan positivamente la nutrición vegetal, la salud de las plantas y su resistencia a los estreses ambientales. Estas bacterias actúan a través de múltiples mecanismos, que van desde la mejora de la disponibilidad de nutrientes en el suelo hasta la inducción de resistencia contra patógenos y estrés abiótico (Mushtaq et al.,

2020). Estos microorganismos pueden provenir de una amplia gama de géneros bacterianos, incluidos, pero no limitados a, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, y *Azotobacter* (Widawati, 2015).

2.4.3 Clasificación de las PGPR

La clasificación de las PGPR se fundamenta en su localización específica en relación con la planta huésped, lo cual es esencial para entender sus mecanismos de acción y los beneficios que aportan al crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta clasificación divide a las PGPR en dos categorías principales: rizosféricas y endofíticas, cada una ofreciendo ventajas a través de sus interacciones específicas con la planta.

- **Bacterias Rizosféricas**

Las bacterias rizosféricas habitan la rizósfera, que es la región del suelo influenciada por las raíces de las plantas. Esta zona es particularmente rica en exudados radiculares, que incluyen una variedad de compuestos orgánicos como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, y otros, los cuales sirven como fuentes de nutrientes para las bacterias (Khan, 2020). Las PGPR rizosféricas promueven el crecimiento de las plantas principalmente a través de la mejora de la disponibilidad de nutrientes, la producción de hormonas vegetales, la solubilización de minerales y la protección contra patógenos del suelo (Gupta et al., 2021).

- **Bacterias Endofíticas**

Las bacterias endofíticas residen dentro de los tejidos de las plantas sin causar daño o síntomas de enfermedad. Pueden colonizar una variedad de tejidos vegetales, incluyendo raíces, tallos, hojas y semillas (Santoyo et al., 2021; Adeleke et al., 2021). La relación entre las bacterias endofíticas y sus plantas hospederas es más íntima que la observada con las bacterias rizosféricas, lo que a menudo resulta en una influencia más directa sobre el crecimiento y la salud de la planta (Bhat et al., 2023). Estas bacterias pueden promover el crecimiento vegetal mediante mecanismos como la fijación de nitrógeno, la síntesis de hormonas vegetales, la mejora de la absorción de

nutrientes y la inducción de resistencia sistémica contra enfermedades y estrés ambiental (Khan, 2020).

2.4.4 Mecanismos de las PGPR

Las PGPR promueven el crecimiento de las plantas y mitigación del estrés a través de varios mecanismos, que incluyen:

- **Fijación de Nitrógeno:** Algunas PGPR son capaces de fijar el nitrógeno gaseoso (N_2) atmosférico en amonio (NH_4), una forma de nitrógeno que las plantas pueden absorber y utilizar para sintetizar proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos orgánicos vitales para su crecimiento y desarrollo. Este proceso es crucial para el crecimiento vegetal, especialmente en suelos con deficiencia de nitrógeno (Singh et al., 2023). Las PGPR fijadoras de nitrógeno, como ciertas cepas de los géneros *Rhizobium*, *Azospirillum*, y *Azotobacter*, establecen una asociación simbiótica con las raíces de las plantas (Aasfar et al., 2021). En el caso de *Rhizobium*, esta asociación implica la formación de nódulos en las raíces de leguminosas, donde el nitrógeno atmosférico es convertido en amonio en un ambiente protegido y de baja concentración de oxígeno, que es crítico para la actividad de la nitrogenasa, (Lindström & Mousavi, 2020). *Azospirillum* y *Azotobacter*, por otro lado, pueden ejercer su efecto fijador de nitrógeno sin formar estructuras nodulares, beneficiando así a una gama más amplia de especies vegetales (Prusty et al., 2023).
- **Solubilización de Fosfatos:** El fósforo es un nutriente esencial para las plantas, crucial para procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la transferencia de energía y la síntesis de ácidos nucleicos. Sin embargo, la mayor parte del fósforo en el suelo se encuentra en forma de fosfatos inorgánicos insolubles, no disponibles para las plantas. Las PGPR solubilizan estos fosfatos mediante la producción de ácidos orgánicos, que acidifican el entorno del suelo y convierten el fósforo a formas solubles y asimilables por las plantas. Este proceso mejora la eficiencia de uso del fósforo en los cultivos y puede reducir la dependencia de los fertilizantes fosfatados

sintéticos, con el consiguiente beneficio ambiental y económico (Yazdani et al., 2009).

- **Producción de Sideróforos:** El hierro es otro elemento crucial para las plantas, necesario para procesos como la síntesis de clorofila y la función de las enzimas en rutas metabólicas esenciales. A pesar de ser abundante en la corteza terrestre, el hierro a menudo está en formas oxidadas que no son fácilmente accesibles para las plantas. Las PGPR producen sideróforos, moléculas especializadas en la quelación de hierro, que se unen fuertemente al hierro disponible en el suelo y forman complejos que las plantas pueden absorber. Este mecanismo no solo mejora la nutrición de hierro de las plantas, sino que también puede suprimir el crecimiento de patógenos al limitar su acceso al hierro, teniendo también un efecto de biocontrol. (Timofeeva et al., 2023).
- **Producción de Hormonas Vegetales:** La producción de hormonas vegetales por las PGPR es un aspecto fundamental de su capacidad para influir en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Entre las hormonas más importantes que sintetizan las PGPR se encuentran las auxinas, citoquininas, y giberelinas, cada una con roles específicos que promueven el crecimiento vegetal a través de la estimulación de procesos como la expansión de las raíces, el aumento de la absorción de agua y nutrientes, y la mejora de la resistencia a condiciones adversas (Hussain et al., 2023).

En el caso de las auxinas, particularmente el ácido indol-3-acético (IAA), son cruciales para el desarrollo de las raíces y la diferenciación celular. El IAA producido por las PGPR estimula la elongación de las células radiculares y la formación de raíces laterales y pelos radiculares, aumentando significativamente la superficie de absorción de la planta (Dashti et al., 2021).

Por otro lado, las citoquininas juegan un papel esencial en la división celular, el crecimiento y la diferenciación de los tejidos, y la senescencia de las plantas. La producción de citoquininas por las PGPR puede ayudar a equilibrar el efecto de las auxinas, promoviendo un crecimiento armonioso de la planta. Las citoquininas también están implicadas en la respuesta de la

planta a factores ambientales, ayudando a mitigar los efectos del estrés y potenciando la salud y la vitalidad de las plantas (Liu et al., 2013).

Las giberelinas son importantes para la germinación de semillas, el alargamiento de tallos, y la floración. Las PGPR que producen giberelinas pueden mejorar estos procesos, facilitando un crecimiento más rápido y eficiente de las plantas. La presencia de giberelinas puede ser especialmente benéfica en la superación de condiciones de estrés, que pueden inhibir la germinación y el crecimiento (Kang et al., 2012).

- **Inducción de Resistencia Sistémica:** Las PGPR desempeñan un papel crucial en la inducción de resistencia sistémica en las plantas, protegiéndolas contra una amplia variedad de patógenos y condiciones de estrés abiótico, como la salinidad, mediante la activación de rutas de señalización defensivas. Este mecanismo, involucra la producción de moléculas señalizadoras por las PGPR, incluyendo fitohormonas como el ácido salicílico, el ácido jasmónico y etileno que son percibidas por la planta, desencadenando una cascada de reacciones bioquímicas que activan genes relacionados con la defensa. Esta inducción de resistencia no solo refuerza las barreras físicas y químicas de la planta contra ataques externos, sino que también establece una "memoria inmunitaria", permitiendo una respuesta más rápida y eficaz ante futuros ataques o estrés (Meena et al., 2020).

2.4.5 Ejemplos de PGPR en la Mejora de la Tolerancia a la Salinidad

El uso de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR) para mejorar la tolerancia a la salinidad en cultivos ha mostrado resultados prometedores en diversas investigaciones. Por ejemplo, la co-inoculación de trigo con *Bacillus subtilis* y *Arthrobacter sp.* ha demostrado una capacidad notable para tolerar concentraciones de hasta el 8% de NaCl. Estas cepas mejoraron la biomasa seca, los azúcares solubles totales y el contenido de prolina del trigo bajo varios regímenes de salinidad, además de reducir significativamente el contenido de sodio comparado con las inoculaciones individuales y los controles. Este efecto es particularmente notable dado que la actividad de las enzimas antioxidantes, como

la catalasa, se redujo bajo condiciones de estrés salino, lo que sugiere un potencial considerable para el uso de estas PGPR en la mitigación del estrés en las plantas de trigo (Upadhyay et al., 2012).

En el caso del tomate, *Pseudomonas putida* UW4, que produce la enzima ACC deaminasa, ha sido efectiva en reducir los niveles de etileno relacionados con el estrés, facilitando así un mayor crecimiento. En estudios realizados, esta bacteria no solo mejoró la longitud de los brotes, la masa fresca y seca y la concentración de clorofila de las plántulas de tomate, sino que también indujo la expresión de genes Toc GTPasa en el aparato de importación de proteínas del cloroplasto, lo que es crucial para facilitar la importación de proteínas involucradas en la respuesta al estrés. Estos resultados indican una ruta clara a través de la cual *Pseudomonas putida* puede mitigar los efectos adversos de la salinidad en las plantas de tomate (Yan et al., 2014).

Por otro lado, *Bacillus megaterium* ha mostrado mejorar la respuesta al estrés salino en maíz, afectando el crecimiento de las raíces, el área de hojas necróticas, y el contenido relativo de agua en las hojas. Se encontró que las plantas inoculadas mantenían mayores valores de L bajo condiciones de control y estrés salino que las no inoculadas, lo cual se correlacionó con una mayor cantidad de la proteína PIP2 en sus raíces bajo condiciones salinas. Este estudio sugiere que la modificación en la expresión y abundancia de las acuaporinas PIP por parte de la inoculación con *Bacillus megaterium* podría ser una de las causas de la mejora en la respuesta de las plantas a la sal (Marulanda et al., 2010).

2.5 RESPUESTA GENÉTICA DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS SALINO

La respuesta genética de las plantas al estrés salino es una adaptación crítica que permite la supervivencia en ambientes adversos, mediante la activación de genes específicos que regulan procesos desde la retención de agua hasta el equilibrio iónico y el metabolismo antioxidante (Li et al., 2020). Esta respuesta se ve notablemente influenciada por la asociación con rizobacterias promotoras del

crecimiento vegetal (PGPR), las cuales juegan un papel fundamental en la modulación de la expresión génica de la planta bajo estrés, a través de mecanismos que incluyen la inducción de genes relacionados con hormonas vegetales, la potenciación de la eliminación de especies reactivas de oxígeno y la activación de vías de respuesta al estrés y transcripción (Gururani et al., 2013).

2.5.1 Genes Implicados en la Respuesta al Estrés Salino

- **Modulación de la Expresión Génica por PGPR en Condiciones de Estrés:** La modulación de la expresión génica por las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en condiciones de estrés salino destaca el papel significativo de estos microorganismos en la adaptación de las plantas a ambientes hostiles. Este proceso de modulación implica una serie de interacciones moleculares complejas que facilitan no solo la supervivencia de las plantas sino también su crecimiento y desarrollo óptimos bajo estrés (Oleńska et al., 2020).
- **Antiportadores Na^+/H^+ y Canales de K^+ :** Los antiportadores Na^+/H^+ , como *NHX1*, son esenciales para la tolerancia al estrés salino, ya que facilitan el secuestro de iones Na^+ en las vacuolas, reduciendo su toxicidad en el citosol. Esta acción permite a las plantas mantener concentraciones de Na^+ en el citoplasma a niveles no letales, mientras se promueve la acumulación de K^+ , vital para numerosas funciones celulares. Por otro lado, los canales de K^+ , como *HKT1*, son fundamentales para la retención y correcta distribución de K^+ , compensando la interferencia de Na^+ en la absorción de K^+ y asegurando la estabilidad osmótica y la funcionalidad enzimática (Bhat et al., 2020).
- **Síntesis de Osmolitos:** La biosíntesis de osmolitos compatibles como la prolina y la glicina betaína, mediada por genes como *P5CS* y *CODA* respectivamente, representa otra estrategia vital de las plantas para combatir el estrés salino. Estos compuestos osmoprotectores ayudan a las células a mantener la turgencia, protegen las estructuras celulares y las enzimas del estrés osmótico y facilitan la disminución de ROS. La prolina, además, actúa como un estabilizador de membranas y proteínas y como un agente de

señalización que puede inducir la expresión de genes de respuesta al estrés (Pattnaik et al., 2021).

- **Genes Antioxidantes:** La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es un efecto secundario común del estrés salino. Genes que codifican enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (*SOD*), catalasa (*CAT*), y peroxidasa (*POD*) son inducidos bajo condiciones de estrés salino para desintoxicar estos ROS. La actividad de estas enzimas es crucial para prevenir el daño oxidativo a lípidos de membrana, proteínas, y ácidos nucleicos, contribuyendo significativamente a la tolerancia al estrés salino (Batoool et al., 2020).

2.5.2 Mecanismos de Modulación por PGPR

- **Biosíntesis de Etileno y Señalización Hormonal:** La inoculación con PGPR puede alterar la dinámica hormonal de las plantas, particularmente afectando la biosíntesis y señalización del etileno, un regulador clave del estrés salino. Los genes *ACS* (sintasa de ACC) y *ACO* (oxidasa de ACC), que participan en la síntesis de etileno, pueden ser sobreexpresados en presencia de PGPR, modulando así la respuesta de la planta al estrés. Además, las PGPR pueden influir en la señalización de jasmonato y ácido salicílico, hormonas implicadas en la respuesta de defensa de la planta, optimizando la resistencia a múltiples estreses (Brunetti et al., 2021).
- **Activación de Genes Antioxidantes:** Las PGPR pueden inducir la activación de genes antioxidantes como *APX* (ascorbato peroxidasa), *CAT* (catalasa) y *GST* (glutación S-transferasa). La expresión aumentada de estos genes ayuda a las plantas a combatir el daño oxidativo inducido por el estrés salino, al eliminar las especies reactivas de oxígeno y minimizar el daño celular (Hasanuzzaman et al., 2022).
- **Factores de Transcripción y Respuesta al Estrés:** Los factores de transcripción como *DREB1A* y *NAC1*, que juegan roles esenciales en la regulación de la expresión génica en respuesta al estrés, son también modulados por la acción de PGPR. Estos factores pueden activar una red de

genes de respuesta al estrés, mejorando así la capacidad de las plantas para adaptarse y sobrevivir bajo condiciones salinas (Tiwari et al., 2016).

2.6 APLICACIONES AGRONÓMICAS Y SOSTENIBILIDAD

Las aplicaciones agronómicas dirigidas hacia la sostenibilidad han ganado relevancia en el contexto del cambio climático y la creciente salinización de suelos. Entre estas, las estrategias de manejo para mejorar la tolerancia al estrés salino y el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) destacan por su potencial para aumentar la resiliencia de cultivos como *Carya illinoensis* y otros de importancia económica (Shi et al., 2022).

2.6.1 Estrategias para Mejorar la Tolerancia al Estrés Salino en Cultivos

La gestión eficiente del estrés salino en los cultivos es un reto multidimensional que requiere una combinación de enfoques agronómicos y biotecnológicos. Entre estas estrategias, la selección y mejora genética de variedades resistentes a la salinidad constituye un pilar crucial (Mushtaq et al., 2020). Esta se complementa con la implementación de diversas técnicas moleculares, para desarrollar cultivos que puedan prosperar en condiciones adversas. La optimización en la gestión del agua y el suelo, a través de prácticas como el riego eficiente y la aplicación de enmiendas para mejorar las condiciones fisicoquímicas del suelo, juega un rol vital en la reducción del impacto negativo de la salinidad (Farooq, 2017).

En este contexto, el uso de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) emerge como una estrategia innovadora y sostenible para mitigar los efectos negativos de la salinidad y otros tipos de estrés en plantas (Ha-Tran et al., 2021). Las PGPR pueden ejercer una influencia positiva en el crecimiento de las plantas bajo condiciones de estrés salino mediante varios mecanismos, incluyendo la mejora de la absorción de agua y nutrientes, la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfatos, y la fijación de nitrógeno atmosférico. Estos mecanismos facilitan un mejor desarrollo radicular y una mayor eficiencia en el uso del agua, contribuyendo a la tolerancia al estrés salino (Kadmiri et al., 2018).

Las PGPR también pueden alterar directamente la respuesta de las plantas al estrés mediante la inducción de sistemas antioxidantes y la acumulación de osmolitos compatibles, como la prolina, que protegen a las células del daño osmótico y oxidativo (Barnawal et al., 2019). Además, algunas PGPR son capaces de producir exopolisacáridos que modifican la estructura del suelo, mejorando su capacidad de retención de agua y reduciendo la salinidad en la rizosfera (Dar et al., 2021).

A medida que avanzamos, es fundamental investigar y desarrollar formulaciones de PGPR específicamente diseñadas para condiciones salinas, así como estudiar su interacción con cultivos de importancia económica bajo diversos escenarios de estrés abiótico (Ilangumaran et al., 2021). La aplicación de PGPR en sistemas de cultivo afectados por la salinidad podría no solo mejorar la resistencia de las plantas sino también potenciar la sostenibilidad de las prácticas agrícolas al reducir la dependencia de insumos químicos (Kumar et al., 2019).

2.7 IMPORTANCIA DE LAS PGPR EN LA AGRICULTURA SOSTENIBLE

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) constituyen un componente esencial en el paradigma de la agricultura sostenible, dada su capacidad para fortalecer el crecimiento de las plantas y aumentar su resistencia ante diversos tipos de estrés abióticos, incluida la salinidad. A través de la inducción de cambios fisiológicos beneficiosos en las plantas, las PGPR mejoran la eficiencia en la retención de agua y la absorción de nutrientes, además de estimular la producción de compuestos antioxidantes (Prasad et al., 2019). Este conjunto de acciones facilita el desarrollo óptimo de las plantas en ambientes desafiantes, como los suelos afectados por la salinidad, subrayando el valor de las PGPR en el manejo sostenible de recursos agrícolas (Mohanty et al., 2021).

Además de sus efectos directos sobre el crecimiento vegetal, las PGPR juegan un papel significativo en la promoción de la salud del suelo. Al funcionar como biofertilizantes, estas bacterias contribuyen a la biodisponibilidad de nutrientes

esenciales para las plantas, como el nitrógeno, fósforo y potasio, a través de procesos biológicos como la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfatos (Vessey, 2003). Este mecanismo reduce la necesidad de fertilizantes químicos sintéticos, cuya sobreutilización puede tener efectos adversos a largo plazo sobre la estructura del suelo y la biodiversidad microbiana (Bhattacharyya & Jha, 2012).

2.8 LITERATURA CITADA

- Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., & Meftah Kadmiri, I. (2021). Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontiers in microbiology*, 12, 628379.
- Acosta-Motos, J. R., Ortuño, M. F., Bernal-Vicente, A., Díaz-Vivancos, P., Sánchez-Blanco, M. J., & Hernández, J. A. (2017). Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy*, 7(1), 18.
- Adeleke, B. S., Babalola, O. O., & Glick, B. R. (2021). Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes. *Rhizosphere*, 20, 100433.
- Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A., & Hayat, S. (2020). Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 64-77.
- Atanasov, A. G., Sabharanjak, S. M., Zengin, G., Mollica, A., Szostak, A., Simirgiotis, M., Huminiecki, Ł., Horbanczuk, O. K., Nabavi, S. M., & Mocan, A. (2018). Pecan nuts: A review of reported bioactivities and health effects. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 246-257.
- Barnawal, D., Singh, R., & Singh, R. P. (2019). Role of plant growth promoting rhizobacteria in drought tolerance: regulating growth hormones and osmolytes. In *PGPR amelioration in sustainable agriculture* (pp. 107-128). Woodhead Publishing.
- Batool, T., Ali, S., Seleiman, M. F., Naveed, N. H., Ali, A., Ahmed, K., Abid, M., Rizwan, M., Shahid, M. R., Alotaibi, M., Al-Ashkar, I., & Mubushar, M. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports*, 10(1), 16975.
- Bhat, M. A., Kumar, V., Bhat, M. A., Wani, I. A., Dar, F. L., Rahman, S., & 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, 557441.

Bhat, M. A., Mishra, A. K., Jan, S., Bhat, M. A., Kamal, M. A., Rahman, S., Shah, A. A., & Jan, T. A. (2023). Plant growth promoting rhizobacteria in plant health: a perspective study of the underground interaction. *Plants*, 12(3), 629.

Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327-1350.

Brunetti, C., Saleem, A. R., Della Rocca, G., Emiliani, G., De Carlo, A., Balestrini, R., Khalid, A., Mahmood, T., & Centritto, M. (2021). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria strains producing ACC deaminase on photosynthesis, isoprene emission, ethylene formation and growth of *Mucuna pruriens* (L.) DC. in response to water deficit. *Journal of Biotechnology*, 331, 53-62.

Cambareri, G., Frusso, E. A., Herrera-Aguirre, E., Zoppolo, R., Leite, F. F. G. D., Beltrán, M., ... & Mendoza, C. (2023). Contribution of pecan (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) to sustainable development Goal 2 under the dual perspective of carbon storage and human nutrition. *Frontiers in Soil Science*, 3, 1092003.

Campos-Villarreal, A. G., Arreola-Avila, J. G., Chávez-Simental, J. A., Trejo Calzada, R., Borja de la Rosa, A., Lopez Santos, A., & Hernandez Salgado, J. R. (2017). Physiological response, ion accumulation and dry weight of pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch) rootstocks grown under saline stress conditions. *Interciencia*, 42(11), 744-749.

Casales, F.G., van der Watt, E., & Coetzer, G.M. (2018). Propagation of Pecan (*Carya illinoensis*): A review. *African Journal of Biotechnology*, 17, 586–605.

Cervantes-Vázquez, M. G., Orona Castillo, I., Vázquez Vázquez, C., Fortis Hernández, M., & Espinoza Arellano, J. D. J. (2018). Análisis comparativo de huertos de nuez pecanera (*Carya illinoensis* Koch en la Comarca Lagunera. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(1), 25-35.

Chaudhry, U. K., Gökçe, Z. N. Ö., & Gökçe, A. F. (2021). Drought and salt stress effects on biochemical changes and gene expression of photosystem II and catalase genes in selected onion cultivars. *Biologia*, 76(10), 3107-3121.

Cheng, H., Inyang, A., Li, C. D., Fei, J., Zhou, Y. W., & Wang, Y. S. (2020). Salt tolerance and exclusion in the mangrove plant *Avicennia marina* in relation to root apoplastic barriers. *Ecotoxicology*, 29, 676-683.

- Choudhary, S., Wani, K. I., Naeem, M., Khan, M. M. A., & Aftab, T. (2023). Cellular responses, osmotic adjustments, and role of osmolytes in providing salt stress resilience in higher plants: Polyamines and nitric oxide crosstalk. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(2), 539-553.
- Dar, A., Zahir, Z. A., Iqbal, M., Mehmood, A., Javed, A., Hussain, A., Bushra, & Ahmad, M. (2021). Efficacy of rhizobacterial exopolysaccharides in improving plant growth, physiology, and soil properties. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193, 1-15.
- Dashti, N., Al-Sarraf, N. Y. A., Cherian, V. M., & Montasser, M. S. (2021). Isolation and characterization of novel plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) isolates from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) rhizospheric soil: A novel IAA producing bacteria. *Kuwait Journal of Science*, 48(2).
- FAO. (2023). Top 20 Countries Production of Nueces de nogal con cáscara 2021. FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Consultado en: https://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity
- Farooq, M., Gogoi, N., Hussain, M., Barthakur, S., Paul, S., Bharadwaj, N., Migdadi, H. M., Alghamdi, S. S., & Siddique, K. H. M. (2017). Effects, tolerance mechanisms and management of salt stress in grain legumes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 199-217.
- Flores-Córdova, M. A., Sánchez Chávez, E., Chávez-Mendoza, C., García-Hernández, J. L., & Preciado-Rangel, P. (2016). Bioactive compounds and phytonutrients in edible part and nutshell of pecan (*Carya illinoensis*). *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1262936.
- Godoy A., C., Reyes J., I., Torres E., C. A., Huitrón R., M. V., Cristian C., J. y Morales V., J. (2000). Tecnología de riego en nogal pecanero. Etapas y periodos fenológicos del nogal y sus requerimientos de agua. CELALA, CIRNOC, INIFAP. Matamoros, Coahuila.
- Grageda Grageda, J., Ruíz Corral, J. A., García Romero, G. E., Núñez Moreno, J. H., Valenzuela Lagarda, J., Ruiz Álvarez, O., & Jiménez Lagunes, A. (2016). Effect of climate change on the accumulation of cold hours in the pecan region from Hermosillo, Sonora. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(SPE13), 2487-2495.
- Grauke, L. J., & Mendoza-Herrera, M. A. (2011). Population structure in the genus *Carya*. In I International Symposium on Wild Relatives of Subtropical and Temperate Fruit and Nut Crops 948 (pp. 143-158).

- Gupta, A., Bano, A., Rai, S., Dubey, P., Khan, F., Pathak, N., & Sharma, S. (2021). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A sustainable agriculture to rescue the vegetation from the effect of biotic stress: A Review. *Lett. Appl. NanoBiosci*, 10, 2459-2465.
- Gururani, M. A., Upadhyaya, C. P., Baskar, V., Venkatesh, J., Nookaraju, A., & Park, S. W. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of plant growth regulation*, 32, 245-258.
- Hameed, A., Ahmed, M. Z., Hussain, T., Aziz, I., Ahmad, N., Gul, B., & Nielsen, B. L. (2021). Effects of salinity stress on chloroplast structure and function. *Cells*, 10(8), 2023.
- Hao, S., Wang, Y., Yan, Y., Liu, Y., Wang, J., & Chen, S. (2021). A review on plant responses to salt stress and their mechanisms of salt resistance. *Horticulturae*, 7(6), 132.
- Hasanuzzaman, M., Raihan, M. R. H., Nowroz, F., & 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(10), 1856.
- Ha-Tran, D. M., Nguyen, T. T. M., Hung, S. H., Huang, E., & Huang, C. C. (2021). Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3154.
- Hussain, A., Shah, M., Hamayun, M., Iqbal, A., Qadir, M., Alataway, A., Dewidar, A. Z., Elansary, H. O., & Lee, I. J. (2023). Phytohormones producing rhizobacteria alleviate heavy metals stress in soybean through multilayered response. *Microbiological Research*, 266, 127237.
- Ilangumaran, G., & Smith, D. L. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria in amelioration of salinity stress: a systems biology perspective. *Frontiers in plant science*, 8, 275185.
- Jha, C. K., & Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of Agricultural Research and Development*, 5(2), 108-119.
- Kadmiri, I. M., Chaouqui, L., Azaroual, S. E., Sijilmassi, B., Yaakoubi, K., & Wahby, I. (2018). Phosphate-solubilizing and auxin-producing rhizobacteria promote plant growth under saline conditions. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43, 3403-3415.

- Kang, S. M., Khan, A. L., Hamayun, M., Hussain, J., Joo, G. J., You, Y. H., ... & Lee, I. J. (2012). Gibberellin-producing *Promicromonospora* sp. SE188 improves *Solanum lycopersicum* plant growth and influences endogenous plant hormones. *Journal of microbiology*, 50, 902-909.
- Kesawat, M. S., Satheesh, N., Kherawat, B. S., Kumar, A., Kim, H. U., Chung, S. M., & Kumar, M. (2023). Regulation of reactive oxygen species during salt stress in plants and their crosstalk with other signaling molecules—Current perspectives and future directions. *Plants*, 12(4), 864.
- Khan, N., Ali, S., Zandi, P., Mehmood, A., Ullah, S., Ikram, M., ... & Babar, M. A. (2020). Role of sugars, amino acids and organic acids in improving plant abiotic stress tolerance. *Pak. J. Bot*, 52(2), 355-363.
- Kumar, A., Patel, J. S., Meena, V. S., & Srivastava, R. (2019). Recent advances of PGPR based approaches for stress tolerance in plants for sustainable agriculture. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 20, 101271.
- Li, X., Sun, P., Zhang, Y., Jin, C., & Guan, C. (2020). A novel PGPR strain *Kocuria rhizophila* Y1 enhances salt stress tolerance in maize by regulating phytohormone levels, nutrient acquisition, redox potential, ion homeostasis, photosynthetic capacity and stress-responsive genes expression. *Environmental and Experimental Botany*, 174, 104023.
- Liao, Q., Gu, S., Kang, S., Du, T., Tong, L., Wood, J. D., & Ding, R. (2022). Mild water and salt stress improve water use efficiency by decreasing stomatal conductance via osmotic adjustment in field maize. *Science of the Total Environment*, 805, 150364.
- Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z., & Ma, B. (2013). Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 9155-9164.
- Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial biotechnology*, 13(5), 1314-1335.
- Loudari, A., Benadis, C., Naciri, R., Soulaïmani, A., Zeroual, Y., Gharous, M. E., ... & Oukarroum, A. (2020). Salt stress affects mineral nutrition in shoots and roots and chlorophyll a fluorescence of tomato plants grown in hydroponic culture. *Journal of Plant Interactions*, 15(1), 398-405.
- Maciel, L. G., Ribeiro, F. L., Teixeira, G. L., Molognoni, L., Dos Santos, J. N., Nunes, I. L., & Block, J. M. (2020). The potential of the pecan nut cake as an ingredient for the food industry. *Food Research International*, 127, 108718.

- Marulanda, A., Azcón, R., Chaumont, F., Ruiz-Lozano, J. M., & Aroca, R. (2010). Regulation of plasma membrane aquaporins by inoculation with a *Bacillus megaterium* strain in maize (*Zea mays* L.) plants under unstressed and salt-stressed conditions. *Planta*, 232, 533-543.
- McCarthy, B. C., & Quinn, J. A. (1990). Reproductive ecology of *Carya* (Juglandaceae): phenology, pollination, and breeding system of two sympatric tree species. *American Journal of Botany*, 77(2), 261-273.
- Meena, M., Swapnil, P., Divyanshu, K., Kumar, S., Harish, Tripathi, Y. N., Zehra, A., Marwal, A., & 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), 828-861.
- Miyamoto, S., Riley, T., Gobran, G., & Petticrew, J. (1986). Effects of saline water irrigation on soil salinity, pecan tree growth and nut production. *Irrigation Science*, 7, 83–95.
- Mohanty, P., Singh, P. K., Chakraborty, D., Mishra, S., & Pattnaik, R. (2021). Insight into the role of PGPR in sustainable agriculture and environment. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 667150.
- Mushtaq, Z., Faizan, S., & Gulzar, B. (2020). Salt stress, its impacts on plants and the strategies plants are employing against it: A review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 8(3), 81-91.
- Mushtaq, Z., Faizan, S., & Gulzar, B. (2020). Salt stress, its impacts on plants and the strategies plants are employing against it: A review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 8(3), 81-91.
- Nazari, M., & Smith, D. L. (2020). A PGPR-produced bacteriocin for sustainable agriculture: a review of thuricin 17 characteristics and applications. *Frontiers in plant science*, 11, 547681.
- Oleńska, E., Małek, W., Wójcik, M., Swiecicka, I., Thijs, S., & Vangronsveld, J. (2020). Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. *Science of the Total Environment*, 743, 140682.
- Oliveira de Oliveira, L., Carlos Beise, D., Damian Dos Santos, D., Caroline Nagel, J., Poletto, T., Poletto, I., & Stefenon, V. M. (2021). Molecular markers in *Carya illinoensis* (Juglandaceae): from genetic characterization to molecular breeding. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 96(5), 560-569.

- Palacio-Rodríguez, R., Sáenz-Mata, J., Trejo-Calzada, R., Ochoa-García, P. P., & Arreola-Ávila, J. G. (2023). Halotolerant Rhizobacteria Promote Plant Growth and Decrease Salt Stress in *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. *Agronomy*, 13(12), 3045.
- Pattnaik, D., Dash, D., Mishra, A., Padhiary, A. K., Dey, P., & Dash, G. K. (2021). Emerging roles of osmoprotectants in alleviating abiotic stress response under changing climatic conditions. *Climate impacts on sustainable natural resource management*, 303-324.
- Pineda Argandar, C. A. (2019). Prácticas Agroecológicas en el Manejo del Nogal Pecanero [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Kosh].
- Prasad, M., Srinivasan, R., Chaudhary, M., Choudhary, M., & Jat, L. K. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture: perspectives and challenges. *PGPR amelioration in sustainable agriculture*, 129-157.
- Prusty, S., Sahoo, R. K., Sharaya, R., Tuteja, N., & Gill, S. S. (2023). Unraveling the potential of native *Azotobacter* and *Azospirillum spp.* formulations for sustainable crop production of rice (*Oryza sativa* L. var. Khandagiri). *South African Journal of Botany*, 162, 10-19.
- Rodríguez-Salinas, P. A., Carballo-Méndez, F. D. J., Rodríguez-Ortiz, J. C., Niño-Medina, G., Olivares-Saénz, E., & Garza-Alonso, C. A. (2022). Iodine increases the concentration of phenolic compounds and photosynthetic pigments in three cultivars of *Ficus carica* L. subjected to salt stress. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 13(SPE28), 309-318.
- Sánchez-Ledesma, J. A., Garibay-Orijel, R., Guevara-Guerrero, G., Ávila-Rodríguez, V., & Arreola-Ávila, J. G. (2023). Macromicetos asociados con *Carya illinoensis* en La Comarca Lagunera, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 94.
- Santoyo, G., Urtis-Flores, C. A., Loeza-Lara, P. D., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021). Rhizosphere colonization determinants by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Biology*, 10(6), 475.
- Shahid, M. A., Sarkhosh, A., Khan, N., Balal, R. M., Ali, S., Rossi, L., Gómez, C., Mattson, N., Nasim, W., & Garcia-Sánchez, F. (2020). Insights into the physiological and biochemical impacts of salt stress on plant growth and development. *Agronomy*, 10(7), 938.
- Shi, J. W., Lu, L. X., Shi, H. M., & Ye, J. R. (2022). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth and soil microbial community of *Carya illinoensis*. *Current Microbiology*, 79(11), 352.

- Sierra-Zurita, D., Santana-Espinoza, S., Rosales-Serna, R., Ríos-Saucedo, J.C., & Carrillo-Parra, A. (2023). Productivity and Characterization of Biomass Obtained from Pruning of Walnut Orchards in México. *Energies*, 16, 2243.
- Singh, P., Singh, R. K., Li, H. B., Guo, D. J., Sharma, A., Verma, K. K., Solanki, M. K., Upadhyay, S. K., Lakshmanan, P., Yang, L.-T., & Li, Y. R. (2023). Nitrogen fixation and phytohormone stimulation of sugarcane plant through plant growth promoting diazotrophic *Pseudomonas*. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1-21.
- Tarango-Rivero S. H., Olivas Tarango A. L., Rodríguez-Peña C., Longoria-Garza G. A., Santos-Moreno O. O., González-Rojas L. E. y Reyes-Vázquez N del C. (2019). Problemáticas y acciones en el cultivo del nogal. En: Reyes-Vázquez N del C. y Morales-Landa J. L. (2019). Agronomía sustentable y aprovechamiento alternativo de la nuez. México: CIATEJ.
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2023). Plant growth-promoting soil bacteria: Nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore production, and other biological activities. *Plants*, 12(24), 4074.
- Tiwari, S., Lata, C., Chauhan, P. S., & Nautiyal, C. S. (2016). *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*, 99, 108-117.
- Upadhyay, S. K., Singh, J. S., Saxena, A. K., & Singh, D. P. (2012). Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14(4), 605-611.
- Urrea L., R. y Urzúa E., E. (2016). Retos y oportunidades en la producción de nuez pecanera en México. Cap. 1. pp. 1-53. En Reyes V., N. C. y Urrea L., R. 2016. Retos y Oportunidades para el aprovechamiento de la Nuez pecanera en México. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ). Guadalajara, Jalisco.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255, 571-586.
- Wang, F., Zhang, R., Lin, J., Zheng, J., Hänninen, H., & Wu, J. (2022). High autumn temperatures increase the depth of bud dormancy in the subtropical *Torreya grandis* and *Carya illinoensis* and delay leaf senescence in the deciduous *Carya*. *Trees*, 36(3), 1053-1065.
- Widawati, S. (2015). Isolasi dan aktivitas plant growth promoting rhizobacteria (*Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*) dari tanah perkebunan karet, Lampung. *Berita Biologi*, 14(1), 77-88.

- Wu, H., & Li, Z. (2019). The importance of Cl⁻ exclusion and vacuolar Cl⁻ sequestration: Revisiting the role of Cl⁻ transport in plant salt tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 10, 482468.
- Yan, J., Smith, M. D., Glick, B. R., & Liang, Y. (2014). Effects of ACC deaminase containing rhizobacteria on plant growth and expression of Toc GTPases in tomato (*Solanum lycopersicum*) under salt stress. *Botany*, 92(11), 775-781.
- Yazdani, M., Bahmanyar, M. A., Pirdashti, H., & Esmaili, M. A. (2009). Effect of phosphate solubilization microorganisms (PSM) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components of corn (*Zea mays* L.). *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 49(1), 90-92.
- Zhang, M., Smith, J. A. C., Harberd, N. P., & Jiang, C. (2016). The regulatory roles of ethylene and reactive oxygen species (ROS) in plant salt stress responses. *Plant molecular biology*, 91, 651-659.
- Zhao, S., Zhang, Q., Liu, M., Zhou, H., Ma, C., & Wang, P. (2021). Regulation of plant responses to salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4609.

CAPÍTULO III

Rizobacterias Halotolerantes Promueven el Crecimiento Vegetal y Disminuyen el Estrés Salino en *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch

3.1 RESUMEN

El cultivo del nogal pecanero tiene una importancia global significativa. La salinidad afecta negativamente la fisiología y el metabolismo de la planta. Sin embargo, ciertas bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) tienen la capacidad de reducir el estrés salino en las plantas. El objetivo fue analizar los efectos de la bacteria *Bacillus paralicheniformis* cepa LBEndo1 en el desarrollo de plántulas de nogal pecanero bajo condiciones de estrés salino. Se analizaron dos factores: la presencia de estrés salino y la inoculación bacteriana. La aplicación bacteriana se realizó a una concentración de 1×10^8 UFC/mL, y el riego se administró cada tercer día con 80 mL de agua conteniendo 50 mM de NaCl. Los resultados muestran que la rizobacteria tiene una tolerancia máxima del 15% de salinidad. Además, la inoculación de PGPR aumentó significativamente la biomasa de las plántulas, incluido el peso seco de las hojas, tallos y raíces, así como el diámetro y la altura del tallo. Además, las plántulas que interactuaron con la bacteria rizosférica exhibieron un desarrollo superior bajo condiciones salinas, con aumentos significativos del 105.5% en la concentración de clorofila y del 112% en la acumulación de prolina en comparación con las plántulas no inoculadas. Además, se observó una notable reducción en el daño foliar causado por el estrés salino. En conclusión, la bacteria rizosférica LBEndo1, al ser una cepa resistente a la salinidad y poseer múltiples mecanismos para promover el crecimiento mientras mitiga el estrés salino, tiene el potencial de ser utilizada en plántulas de nogal pecanero para aliviar el estrés causado por la salinidad y aumentar la biomasa.

Palabras clave: PGPR; estrés salino; promoción de crecimiento; nogal pecanero.

Halotolerant Rhizobacteria Promote Plant Growth and Decrease Salt Stress in *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch

3.2 ABSTRACT

Pecan cultivation holds significant global importance. Salinity negatively affects the physiology and metabolism of the plant. However, certain plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) have the ability to reduce salt stress in plants. The objective was to analyze the effects of the rhizobacteria *Bacillus paralicheniformis* strain LBEndo1 on the development of pecan seedlings under salinity stress conditions. Two factors were analyzed: the presence of saline stress and the bacterial inoculation. The bacterial application was conducted at a concentration of 1×10^8 CFU/mL, and irrigation was administered every third day with 80 mL of water containing 50 mM NaCl. The results show that the rhizobacteria has a maximum tolerance of 15% salinity. Furthermore, the inoculation of PGPR significantly increased the biomass of the seedlings, including the dry weight of leaves, stem, and roots, as well as the stem diameter and height. Furthermore, seedlings that interacted with the rhizobacteria exhibited superior development under saline conditions, with significant increases of 105.5% in chlorophyll concentration and 112% in proline accumulation compared to non-inoculated seedlings. Additionally, a remarkable reduction in leaf damage caused by salt stress was observed. In conclusion, the LBEndo1 rhizobacteria, being a strain resistant to salinity and possessing multiple mechanisms to promote growth while mitigating salt stress, has the potential to be utilized in pecan seedlings to alleviate stress caused by salinity and increases biomass.

Keywords: PGPR; salinity stress; growth promotion; pecan.

3.3 INTRODUCCIÓN

Carya illinoensis es una especie arbórea nativa del sur de los Estados Unidos y del norte de México, perteneciente a la familia Juglandaceae, y actualmente es uno de los cultivos más significativos a nivel mundial (Rani et al., 2017; Oliveira et al., 2021). Según datos de Sierra-Zurita et al. (2023), México ocupa el primer lugar en la producción mundial de nuez pecanera, con un área cultivada aproximada de 146,239 hectáreas y una producción de 136,947 toneladas en 2021. En las áreas de cultivo, incluido México, se utilizan plántulas de nueces de polinización libre como portainjertos en huertos injertados establecidos (Casales et al., 2018). Esta planta prospera naturalmente en áreas cercanas a arroyos o ríos, con suelos aluviales que son fértiles, profundos, bien drenados y poseen una excelente capacidad de retención de agua (Wolstenholme, 1979). Sin embargo, se sabe que es sensible a la salinidad, con un rango de tolerancia de aproximadamente 2 a 3 dS·m⁻¹ de conductividad eléctrica. Valores que exceden este rango pueden causar una disminución severa en el desarrollo, e incluso el daño puede ser fatal para la planta (Miyamoto et al., 1986; Miyamoto, 2010; Miyamoto y Nesbitt, 2011).

El estrés inducido por la sal en el nogal pecanero resulta en una reducción en la producción de hojas, diámetro del tallo y desarrollo de raíces, lo que lleva a una menor biomasa y un impacto negativo en la producción de frutos (Moreno-Izaguirre et al., 2015). Además, las altas concentraciones de sal afectan características fisiológicas como la conductancia estomática y la capacidad fotosintética (Campos-Villarreal et al., 2017). Además, otros aspectos metabólicos de las plantas pueden verse afectados, lo que conduce a estrés osmótico y desequilibrio iónico, perturbando la homeostasis del potencial hídrico (Shahid et al., 2020). Así como la sobreproducción de etileno puede desencadenar efectos adversos como la senescencia acelerada, también puede llevar al desarrollo de estrés oxidativo, impactando en la salud de la planta (Zhu, 2000).

La rizosfera, definida como la zona del suelo influenciada por la actividad biológica en las raíces de las plantas, crea un ambiente propicio para la interacción simbiótica entre estas raíces y los microorganismos. Numerosos estudios respaldan el

conocimiento de que las bacterias beneficiosas en la rizosfera pueden mejorar la producción de biomasa y aliviar el estrés abiótico en las plantas (Angelina et al., 2020). Estos microorganismos son conocidos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) (Bhattacharyya y Jha, 2012; Goswami y Suresh, 2020). Entre sus características notables está la capacidad para activar mecanismos de defensa en las plantas, incluida la mayor producción de prolina; este aminoácido es crucial para mejorar la tolerancia al estrés abiótico, como la sequía, los desequilibrios nutricionales y las altas concentraciones de salinidad. Actúa como un agente osmoprotector, preservando la integridad celular y mitigando el daño oxidativo (Dobbelaere et al., 2003; Mattioli et al., 2008). El uso de PGPR ha surgido como un enfoque prometedor para mitigar el estrés de las plantas causado por altas concentraciones de sal (Fu et al., 2020). Ali et al. (2014) demostraron que la enzima ACC desaminasa producida por la bacteria *Pseudomonas fluorescens* puede reducir el estrés salino en plantas de tomate al disminuir el nivel de etileno. Algunos beneficios proporcionados por las rizobacterias incluyen un aumento en el peso fresco de las plantas, una mejor relación K^+/Na^+ (Shilev et al., 2012), una germinación mejorada y un tamaño de planta más grande (Yao et al., 2010).

La inoculación de PGPR en suelos con problemas de alta conductividad eléctrica se ha considerado como la forma más efectiva de reducir los efectos adversos de la salinidad en las plantas (Glick et al., 2007; Mokrani et al., 2020). Las PGPR sintetizan compuestos específicos que actúan como inhibidores de cascadas de señalización en respuesta al estrés salino (Nadeem et al., 2010). Además, ejercen mecanismos directos que implican la fijación biológica de nitrógeno, la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfato, la reducción de toxicidad, todo lo cual contribuye a una mejor absorción de agua y nutrientes. Algunas bacterias reportadas con esta capacidad han sido del género *Bacillus* (Mohamed y Gomaa, 2012; Ha-Tran et al., 2021).

A pesar de la importancia global de este cultivo, la susceptibilidad de la planta a altas concentraciones de sal y la relevancia de las PGPR en la agricultura, pocos

estudios han abordado este problema. Basándonos en investigaciones previas que demuestran el efecto promotor de *B. paralicheniformis* LBEndo1 en *Arabidopsis thaliana*, decidimos ampliar nuestro análisis para determinar si estos beneficios se manifiestan de manera similar en plántulas de nuez pecanera. Por lo tanto, este estudio actual se realizó con el objetivo de examinar los efectos de las rizobacterias en el desarrollo de plántulas de nuez pecanera, especialmente bajo condiciones de estrés salino. Además, buscamos evaluar la capacidad de las rizobacterias para tolerar el estrés salino. Dada la naturaleza de los experimentos, fue crucial que las rizobacterias demostraran resistencia a altas concentraciones de sal.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Material Vegetal

Los experimentos se realizaron en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango (25°35'13" N y 103°30'04" W, a una altitud de 1114 m sobre el nivel del mar). Para los experimentos, se recolectaron semillas de nogal criollo de un huerto ubicado en el municipio de Nazas, Durango (25°15'08" N y 104°06'09" W, a una altitud de 1240 m sobre el nivel del mar). Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 20%, luego enjuagadas con agua destilada estéril. Posteriormente, se estratificaron en frío a 4 °C durante una semana antes de ser germinadas en arena estéril e irrigadas con agua destilada estéril cada tercer día. Después de que germinaron las plántulas de nogal pecanero, fueron trasplantadas a macetas de 20 cm de altura y 10 cm de diámetro. El sustrato utilizado fue arena estéril. Durante todo el experimento, las plántulas fueron irrigadas solo con agua destilada estéril, sin introducir soluciones de nutrientes adicionales. El experimento se llevó a cabo en una cámara bioclimática bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C) y fotoperíodos (16 h de luz y 8 h de oscuridad).

3.4.2 Diseño Experimental

Para este experimento, se estableció un diseño factorial completamente al azar 2×2 (cuatro tratamientos) con tres repeticiones, cada repetición consistió en cinco plántulas (15 plántulas por tratamiento), lo que resultó en un total de 60 unidades experimentales. El primer factor variable fue la PGPR *B. paralicheniformis* LBEndo1 en dos niveles (presencia y ausencia), y el segundo factor fue la concentración de NaCl (0 y 50 mM). Las irrigaciones se realizaron cada tercer día, aplicando 80 mL de solución salina o sin sales durante un período de 60 días. Los códigos para los cuatro tratamientos se designaron de la siguiente manera: Plántulas sin bacteria ni sal = Control, plántulas con bacteria sin sal = LBEndo1, plántulas sin bacteria con sal = Control+S, y plántulas con bacteria con sal = LBEndo1+S.

3.4.3 Determinación de la Halotolerancia en la Rizobacteria LBEndo1

Se llevaron a cabo una serie de experimentos con el objetivo de determinar la tolerancia de la cepa bacteriana LBEndo1 al estrés salino. Para lograr esto, se utilizó el medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB) como base y se enriqueció con diferentes concentraciones de NaCl (5%, 10% y 15% p/v) para simular condiciones de estrés salino. Las rizobacterias se cultivaron y posteriormente se incubaron a una temperatura de 35 °C, con agitación constante a 120 rpm para proporcionar condiciones óptimas de crecimiento. Después de un período de tres días, se realizó una evaluación del crecimiento bacteriano. Se realizó un recuento utilizando una cámara de Neubauer para determinar el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) y así confirmar el crecimiento bacteriano en las diferentes concentraciones salinas.

3.4.4 Inoculación Bacteriana

Para llevar a cabo este análisis, se utilizó la cepa *B. paralicheniformis* LBEndo1. Para su cultivo, se agregaron 100 mL de medio líquido LB a un matraz Erlenmeyer, que luego se incubó durante 24 h a una temperatura constante de 35 °C, con agitación continua a 120 rpm. Después del período de cultivo, se ajustó la concentración bacteriana a 1×10^8 UFC/mL utilizando una cámara de Neubauer.

Antes de la inoculación en las plántulas, las bacterias se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min para eliminar el medio de cultivo; luego se resuspendieron en agua destilada estéril. Las plántulas utilizadas en el ensayo tenían una semana de edad desde la germinación, y la inoculación se realizó en la base del tallo aplicando 10 mL de las bacterias previamente ajustadas a 1×10^8 UFC/mL.

3.4.5 Bioestimulación de *C. illinoensis* por la Rizobacteria LBEndo1

Después de un período de 60 días de interacción entre las rizobacterias, las plántulas y la salinidad, se realizaron mediciones morfométricas para analizar el crecimiento de todas las plántulas. Utilizando una balanza analítica, se determinó el peso seco de hojas, tallos y raíces, mientras que el diámetro del tallo se midió con un Vernier. Además, se registró semanalmente la altura de las 15 plántulas de cada tratamiento (60 plántulas en total) para observar la dinámica de crecimiento durante los 60 días del experimento. Al finalizar, los resultados obtenidos permitieron la evaluación de los efectos de las rizobacterias en el crecimiento de las plántulas.

3.4.6 Extracción y Medición de Prolina

La extracción y cuantificación de prolina se realizaron siguiendo la metodología de Bates et al. (1973). Para este análisis, se tomaron muestras de tejido fresco (hojas) de las plántulas de cada uno de los tratamientos. Utilizando una balanza analítica, se pesaron 100 mg de la parte aérea de las plántulas de *C. illinoensis*, y el material vegetal se colocó en un tubo de Eppendorf que contenía una solución de ácido sulfosalicílico al 140 mM para ser molido con un mortero. La solución resultante se filtró a través de un filtro de 0.20 μ m. El extracto líquido se mezcló con una solución de ninhidrina ácida al 140 mM y ácido acético glacial en una proporción de 1:1:1. Los tubos se calentaron a 100 °C durante una hora, luego se enfriaron sobre hielo. Se agregó tolueno en una proporción de 1:1, se vortexó vigorosamente y se dejó reposar. La fracción orgánica se extrajo y se colocó en una celdilla de cuarzo para medir la absorbancia del complejo ninhidrina-prolina a 520 nm utilizando espectrofotometría. Previamente se estableció una curva de calibración utilizando concentraciones de 10, 20, 40, 50, 75 y 100 μ g de prolina comercial (Sigma Aldrich Chemical Co, USA®).

3.4.7 Extracción y Medición de Clorofila

El ensayo para la medición de clorofila se realizó en las hojas de las plántulas de cada uno de los tratamientos, siguiendo el protocolo de Zhang y Huang (2013). La clorofila total se extrajo de 100 mg de hojas frescas de *C. illinoensis* sumergidas en tubos de Eppendorf con N, N-dimetilformamida (DMF) durante 24 h a una temperatura de 4 °C en oscuridad. Las concentraciones de clorofila A y clorofila B se midieron por espectrofotometría a longitudes de onda de absorción de 664 nm y 647 nm, respectivamente. El contenido de clorofila A, B y clorofila total (A + B) se determinó sustituyendo las absorbancias obtenidas en las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila: A} = 12.7 \times A_{664} - 2.79 \times A_{647}$$

$$\text{Clorofila: B} = 20.7 \times A_{647} - 4.62 \times A_{664}$$

$$\text{Clorofila: A + B} = 17.90 \times A_{647} + 8.08 \times A_{664}$$

3.4.8 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico para evaluar los diferentes parámetros de desarrollo en este estudio. Esto incluyó el análisis de pesos secos de raíces, tallos y hojas, diámetro del tallo, altura de las plántulas y niveles de prolina y clorofila. El diseño experimental se estableció de manera completamente aleatoria. Para el análisis estadístico, se utilizaron tanto la prueba t de Student como el método ANOVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 9.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Halotolerancia de la Rizobacteria LBEndo1

Una de las características clave que debe poseer una rizobacteria para ser utilizada en la reducción del estrés salino en plántulas es la capacidad de tolerar altas concentraciones de sal (Bhattacharyya y Jha, 2012). Después de tres días de

crecimiento de la cepa bacteriana en medio líquido LB enriquecido con NaCl (0, 5, 10 y 15%), se determinó que la capacidad máxima de tolerancia a la sal de las bacterias era del 15% p/v. Sin embargo, es evidente que, a una concentración de sal más alta, el crecimiento bacteriano disminuye (Figura 1).

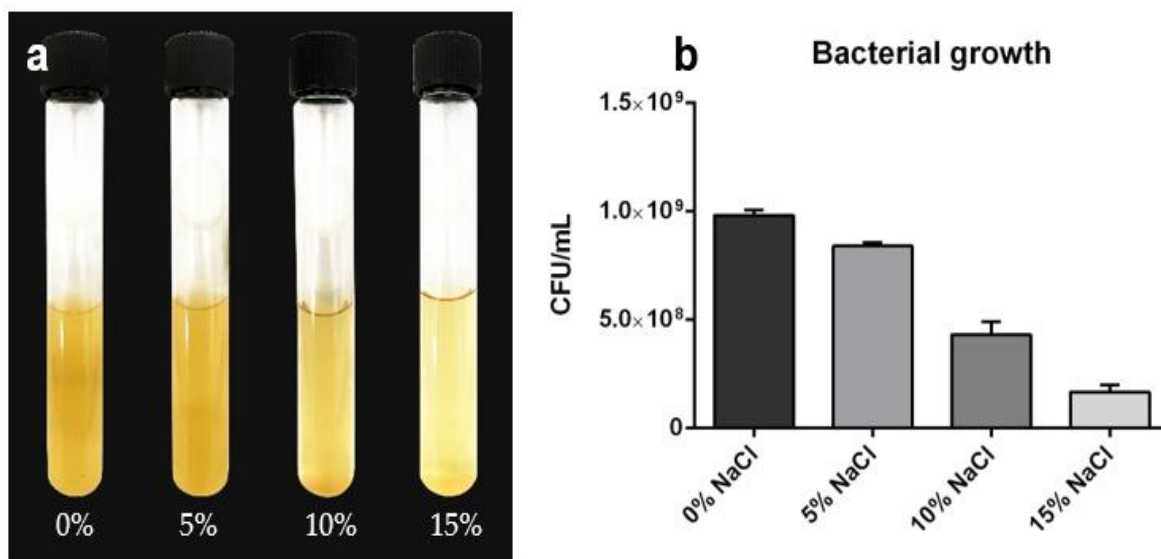


Figura 1. Tolerancia de las bacterias a la salinidad (a) Crecimiento de rizobacterias tolerantes al NaCl en tubos con medio LB suplementado con diferentes concentraciones de sal (0%, 5%, 10% y 15%); (b) Gráfico que ilustra la cantidad de UFC/mL de las bacterias cultivadas en varias concentraciones de NaCl.

3.5.2 Dinámica del Crecimiento de Plántulas

Durante el experimento, se encontró que las plántulas en el tratamiento inoculado con *B. paralicheniformis* LBEndo1, pero sin exposición al estrés salino (LBEndo1), mostraron un crecimiento significativamente mayor en comparación con las otras condiciones. Por otro lado, las plántulas que no estuvieron en contacto con las rizobacterias mostraron una altura de tallo más baja, siendo esta diferencia más pronunciada en el tratamiento Control+S. Esto sugiere que la salinidad tiene un impacto negativo en el desarrollo de las plántulas, mientras que las rizobacterias contribuyen beneficiosamente al crecimiento de las plántulas, incluso bajo condiciones salinas. También se observó que tanto el tratamiento LBEndo1+S como

el tratamiento Control+S mostraron un crecimiento más lento en las últimas tres semanas del experimento en comparación con los tratamientos LBEndo1 y Control (Figura 2). Estos resultados respaldan la importancia de la inoculación de rizobacterias en la promoción del crecimiento óptimo de las plántulas, especialmente bajo condiciones de estrés salino.

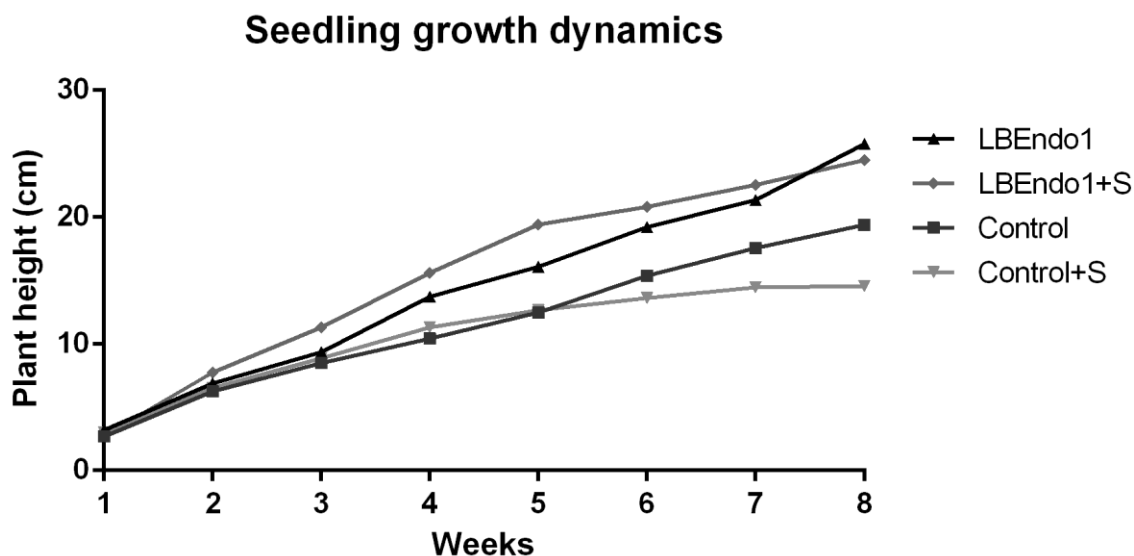


Figura 2. Se registraron cambios en la altura de plántulas de nogal pecanero sometidas a cuatro tratamientos diferentes: Control, LBEndo1, Control+S y LBEndo1+S. Las mediciones se realizaron durante un período de 60 días, con mediciones semanales tomadas a lo largo de ocho semanas.

3.5.3 Promoción del Crecimiento bajo Condiciones con y sin Estrés Salino

Los resultados obtenidos bajo condiciones de no estrés salino muestran que las plántulas inoculadas exhibieron una mayor producción de biomasa (Figura 3). En cada uno de los parámetros morfométricos evaluados, las plántulas que interactuaron con las rizobacterias (LBEndo1) demostraron un rendimiento superior en comparación con el tratamiento control (Control), como se evidencia en la Tabla 1. Específicamente, el efecto promotor del crecimiento fue más pronunciado en el peso seco de las hojas, mostrando un aumento promedio del 81.5%. Este resultado indica una mayor acumulación de biomasa foliar en las plántulas inoculadas. Además, los pesos secos de las raíces y los tallos también mostraron aumentos

significativos, con incrementos respectivos del 59.3% y 58.9%. Estos hallazgos sugieren un mejor desarrollo del sistema de raíces y del tejido estructural. En cuanto a la altura de las plántulas, se observó un aumento promedio del 32.8% en las plántulas que interactuaron con las bacterias. Es importante destacar que, aunque hubo un aumento del 9.63% en el diámetro del tallo en las plántulas inoculadas, esta diferencia no fue estadísticamente significativa en comparación con el tratamiento de Control. Esto sugiere que las bacterias LBEndo1 pueden tener un efecto limitado en el engrosamiento del tallo, aunque aún se observó una ligera tendencia al aumento.

Por otro lado, bajo condiciones de estrés salino, se observaron cambios positivos en varios parámetros morfométricos en las plántulas inoculadas con rizobacterias (LBEndo1+S) en comparación con el grupo de control (Control+S), detallados en la Tabla 1. En primer lugar, se logró un aumento significativo en el peso seco del tallo, con un aumento promedio del 98.7%. Del mismo modo, para las hojas, se registró un aumento del 163.3% en el peso seco, demostrando el efecto positivo de las rizobacterias en el crecimiento foliar bajo condiciones de salinidad. En cuanto a las raíces, se observó un aumento promedio del 112.9% en el peso seco en presencia de rizobacterias. En relación con la altura de las plántulas, a pesar del estrés salino, se logró un aumento promedio del 68.3% en las plántulas con rizobacterias. Además, se registró un aumento del 34.2% en el diámetro del tallo, lo que indica una mayor resistencia y rigidez estructural en las plántulas tratadas con rizobacterias. Estos hallazgos demuestran que la rizobacteria *B. paralicheniformis* LBEndo1 tiene la capacidad de aumentar la biomasa de las plántulas de *C. illinoensis* incluso bajo condiciones de estrés salino. A pesar de que ambas plantas experimentaron daños debido a la salinidad, es evidente que las plántulas inoculadas exhibieron menos daño que las no inoculadas con bacterias, lo que sugiere la influencia positiva de las rizobacterias en la mitigación del estrés salino en las plántulas (Figura 3).



Figura 3. Fotografías que muestran el aspecto de las plántulas de *C. illinoensis* de los tratamientos Control, LBEndo1, Control+S y LBEndo1+S a los 60 días post-inoculación. Estas imágenes ilustran tanto el efecto promotor del crecimiento inducido por las rizobacterias como el daño causado por el estrés salino.

Tabla 1. Datos morfométricos de los tratamientos Control, LBEndo1, Control+S y LBEndo1+S. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las medias de tratamiento según el análisis de ANOVA ($p \leq 0.05$).

	Peso Seco de Hoja (g)	Peso Seco del Tallo (g)	Peso Seco de la Raíz (g)	Peso Seco Total (g)	Altura de la plántula (cm)	Diámetro del Tallo (cm)
Control	1.3 ± 0.19 c	1.6 ± 0.19 c	10.1 ± 0.94 b	13.0 ± 0.89 b	19.3 ± 0.67 b	3.7 ± 0.39 a
LBEndo1	2.4 ± 0.13 a	2.5 ± 0.10 a	16.0 ± 2.02 a	21.0 ± 2.18 a	25.7 ± 1.22 a	4.1 ± 0.34 a
Control+S	0.7 ± 0.13 d	1.1 ± 0.10 d	6.9 ± 0.65 c	8.7 ± 0.67 c	14.5 ± 1.37 c	2.9 ± 0.35 b
LBEndo1+S	1.9 ± 0.22 b	2.2 ± 0.16 b	14.6 ± 1.06 a	18.9 ± 0.75 a	24.4 ± 1.37 a	3.9 ± 0.23 a

Los datos se muestran como media ± desviación estándar (n = 60).

3.5.4 Contenido de prolina

Para evaluar el impacto de las rizobacterias LBEndo1 en la acumulación de prolina, se realizaron mediciones en plántulas inoculadas con estas rizobacterias y en el

grupo de control no inoculado, tanto bajo condiciones de estrés salino como no salino. En el caso de las hojas sin estrés salino, las plántulas inoculadas con las rizobacterias mostraron un aumento del 54,2% en la producción de prolina, alcanzando un nivel de $31 \mu\text{mol g}^{-1}$, en contraste con las plántulas de control que produjeron $20,1 \mu\text{mol g}^{-1}$. Por otro lado, en las plántulas bajo estrés salino, el grupo de control registró una producción de $34,5 \mu\text{mol g}^{-1}$, mientras que en interacción con las rizobacterias lograron una producción de $56,6 \mu\text{mol g}^{-1}$, lo que representa un aumento del 64,05%. Es importante destacar que los tratamientos Control+S y LBEndo1 mostraron una producción de prolina similar (Figura 4a).

En cuanto a los tallos, bajo condiciones de estrés no salino, el tratamiento de Control tuvo un promedio de $23 \mu\text{mol g}^{-1}$, un 30% menos que las plántulas tratadas con LBEndo1, que produjeron $29,9 \mu\text{mol g}^{-1}$. En el caso de las plántulas expuestas a estrés salino, los tratamientos Control+S y LBEndo1+S produjeron $29,4 \mu\text{mol g}^{-1}$ y $62,6 \mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente, siendo el tratamiento inoculado un 112,9% más alto en la producción (Figura 4b). Una vez más, se observó una producción de prolina similar entre los tratamientos Control+S y LBEndo1.

En cuanto a las raíces de las plántulas bajo condiciones no salinas, se observó una producción de prolina estadísticamente similar, con una acumulación de $19,5 \mu\text{mol g}^{-1}$ en el tratamiento de Control y $18,9 \mu\text{mol g}^{-1}$ en las plántulas inoculadas con rizobacterias, en este caso, ligeramente por debajo del tratamiento de Control en un 3,07%. Del mismo modo, en las raíces de las plántulas sometidas a condiciones de estrés salino, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos Control+S y LBEndo1+S, con una producción de $46,4 \mu\text{mol g}^{-1}$ y $52,1 \mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente (Figura 4c), lo que representa un aumento del 12,2% en comparación con el tratamiento de Control. Estos resultados indican que las plántulas inoculadas con LBEndo1 muestran una mayor acumulación de prolina, incluso en ausencia de condiciones de estrés.

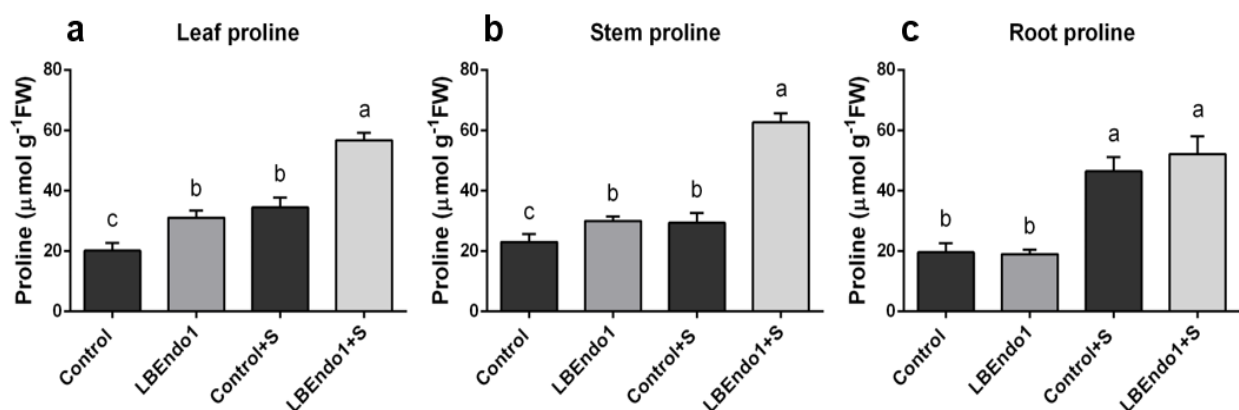


Figura 4. Producción de prolina en las hojas (a), tallo (b) y raíz (c) de *C. illinoensis* después de 60 días de interacción. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar (n = 60). Diferentes letras indican diferencias significativas entre las medias de tratamiento según el análisis de ANOVA ($p \leq 0.05$).

3.5.5 Contenido de Clorofila y Daño Foliar

Se realizó un análisis de la medición total de clorofila en hojas de *C. illinoensis* de 60 días de edad. Bajo condiciones de estrés salino, el tratamiento LBEndo1+S mostró un aumento del 105.5% en la concentración de clorofila en comparación con el tratamiento Control+S. Las plántulas inoculadas con LBEndo1 mostraron valores de clorofila de $14.4 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que el grupo de control alcanzó solo $7.01 \mu\text{g mL}^{-1}$. Este hallazgo sugiere que la inoculación bacteriana con LBEndo1 tuvo un efecto positivo en la producción de clorofila en plántulas de *C. illinoensis* bajo estrés salino (Figura 5a).

Por otro lado, bajo condiciones de estrés no salino, se observó una tendencia similar, donde el tratamiento LBEndo1 tuvo una concentración total de clorofila de $20.23 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que el tratamiento Control solo alcanzó $10.08 \mu\text{g mL}^{-1}$. La diferencia entre los dos tratamientos fue del 100.6%, lo que indica que la inoculación bacteriana también favoreció la producción de clorofila bajo condiciones de estrés no salino (Figura 5a). Estos resultados son prometedores, ya que la inoculación bacteriana con LBEndo1 puede mejorar la concentración de clorofila en plántulas de *C. illinoensis*. Este pigmento es crucial para la fotosíntesis y el crecimiento de

las plántulas, por lo que un aumento en su concentración podría tener un impacto positivo en la capacidad de las plántulas para hacer frente a condiciones adversas.

Además, se realizaron evaluaciones del daño foliar para analizar el impacto del estrés salino. Los tratamientos que no fueron sometidos a riego con sal mostraron hojas de aspecto saludable. Por el contrario, se observó marchitamiento en las hojas de los tratamientos expuestos a NaCl. Sin embargo, se observó un efecto retardado en las plántulas inoculadas con la bacteria LBEndo1. Especialmente, el tratamiento Control+S fue más severamente afectado, mostrando un 100% de daño foliar, mientras que el tratamiento LBEndo1+S exhibió un daño menor del 42.5% (Figura 5b). Por lo tanto, se puede inferir que la bacteria rizobacteria LBEndo1 podría proporcionar cierta protección contra los efectos adversos del estrés salino en las hojas de las plántulas.

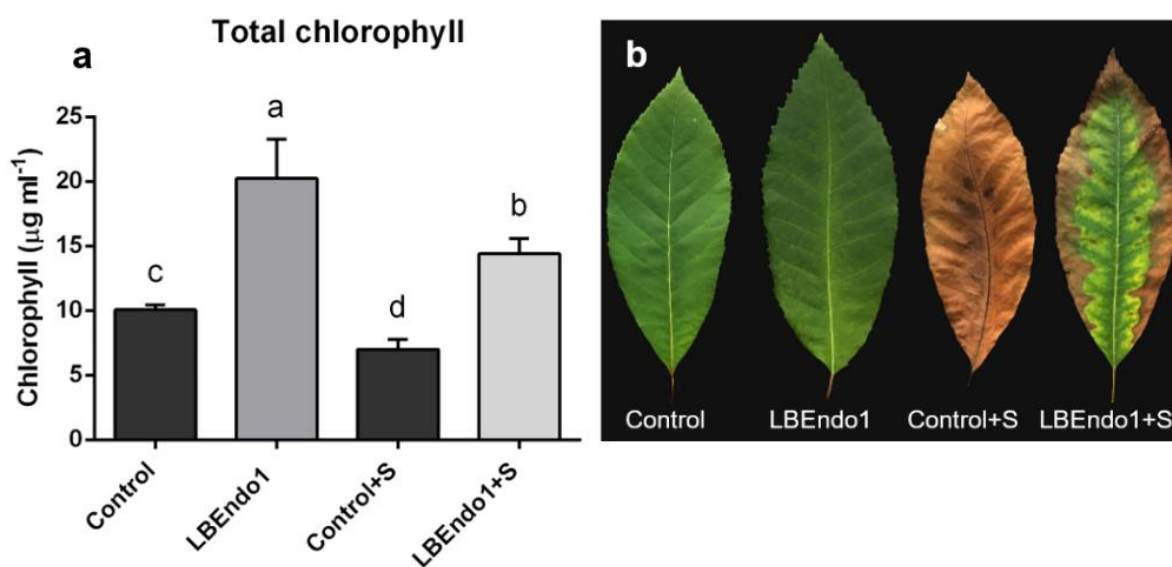


Figura 5. Efecto de la bacteria rizobacteria LBEndo1 en la producción total de clorofila en hojas de *C. illinoensis* bajo condiciones de estrés salino y no salino. (a) Clorofila total en cada uno de los cuatro tratamientos. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de tratamiento según el análisis de ANOVA ($p \leq 0.05$) en comparación con el control respectivo. (b) Fotografía que ilustra el efecto del NaCl en las hojas y la reducción del daño en el tratamiento LBEndo1+S.

3.6 DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación demuestran la capacidad beneficiosa de la rizobacteria *B. paralicheniformis* LBEndo1 para estimular el crecimiento y mejorar la tolerancia al estrés salino en plántulas de *C. illinoensis*. Estos hallazgos confirman la hipótesis inicial que proponía que la inoculación con esta rizobacteria podría ofrecer ventajas a las plántulas bajo condiciones de salinidad, sugiriendo una relación entre la presencia de la rizobacteria y la vitalidad y el rendimiento de las plántulas bajo estrés salino. Nuestros hallazgos se alinean con investigaciones previas, como las de Zhang et al. (2021) y Jiao et al. (2022), indicando la susceptibilidad de *C. illinoensis* a la salinidad. La respuesta negativa de esta especie a la salinidad está en línea con el entendimiento científico actual. Estos resultados subrayan la importancia de abordar el estrés salino en la gestión de la productividad y calidad del nogal pecanero.

De manera similar a los hallazgos de Etesami y Beattie (2018), nuestros resultados indican que la cepa *B. paralicheniformis* LBEndo1 es resistente a altas concentraciones salinas (Figura 1) y tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, así como aliviar el estrés salino; en su trabajo, investigaron el efecto promotor de crecimiento mediado por bacterias del género *Bacillus*. Descubrimientos muestran que las cepas de *Bacillus* con tolerancia a la sal tienen una mayor capacidad para conferir beneficios a las plantas bajo condiciones de estrés salino (Paul y Lade, 2020; Patani et al., 2023). La descripción de especies bacterianas del género *Bacillus* como promotoras del crecimiento de plantas también ha sido reportada por Ibarra-Villarreal (et al., 2021). La rizobacteria *B. paralicheniformis* ha sido reconocida como una PGPR con la capacidad de aumentar la biomasa de varias plantas de relevancia agrícola, así como de aliviar los efectos adversos de diferentes tipos de estrés abiótico (Du et al., 2019; Liu et al., 2023).

La investigación realizada por Khalilpour et al. (2021) ha indicado que las bacterias promotoras del crecimiento de plantas pueden influir en el crecimiento de las plantas al mejorar la absorción de nutrientes, la solubilización de minerales y la producción

de fitohormonas. En su estudio, observaron un aumento en el crecimiento de *Pistacia vera* tras la inoculación con diferentes bacterias promotoras del crecimiento de plantas, como también informó Salimi et al. (2023). De manera similar, nuestros hallazgos revelan un aumento significativo en el crecimiento de plántulas inoculadas con *B. paralicheniformis* LBEndo1 en ausencia de estrés salino (Tabla 1), y estos resultados son respaldados por investigaciones previas que destacan la capacidad de la rizobacteria para estimular el desarrollo de plántulas del nogal pecanero. Estas observaciones también se alinean con estudios realizados por Shi et al. (2022), quienes han demostrado que las interacciones planta-microorganismo pueden tener un impacto positivo en el crecimiento de estas plantas.

Los resultados que indican una mayor acumulación de biomasa foliar y un aumento en el peso seco de raíces y tallos en plántulas en interacción con la rizobacteria *B. paralicheniformis* LBEndo1 bajo condiciones de estrés salino (Figura 4) se alinean con investigaciones que han destacado la influencia positiva de las bacterias promotoras del crecimiento de plantas en el desarrollo y arquitectura de las plantas. Estos hallazgos también se relacionan con estudios que han investigado los mecanismos que podrían estar involucrados en mejorar el crecimiento de las plantas. En su estudio, Shabaan et al. (2022) examinaron el efecto de la inoculación con *Acinetobacter johnsonii* en el crecimiento del maíz bajo estrés salino. Encontraron que las plantas inoculadas con bacterias mostraron un aumento significativo en la acumulación de biomasa foliar y un aumento en el peso seco de raíces y tallos en comparación con las plantas no inoculadas. Este resultado apoya la noción de que las bacterias promotoras del crecimiento de plantas pueden tener un impacto positivo en el desarrollo de las plantas bajo condiciones de estrés salino. De manera similar, investigaciones como la realizada por Pérez-Jaramillo et al. (2017) también han explorado cómo las bacterias pueden influir en la arquitectura radicular y mejorar la absorción de nutrientes. En su estudio, encontraron que ciertas bacterias promotoras del crecimiento de plantas pueden modificar el patrón de ramificación de las raíces, resultando en una mayor capacidad para explorar el suelo en busca de nutrientes.

La prolina juega un papel crucial como un osmolito compatible, cumpliendo su función vital en mantener el equilibrio osmótico y la homeostasis celular bajo situaciones de estrés, evitando así la deshidratación y la pérdida de turgencia celular (Hosseinifard et al., 2022). Un estudio de Ji et al. (2022) reforzó la relación entre la inoculación con *Bacillus subtilis* y la acumulación de prolina en las plantas. En su investigación, exploraron los efectos de las bacterias promotoras del crecimiento de plantas en la respuesta de las plantas de trigo al estrés salino. Observaron que las plantas inoculadas con bacterias exhibieron un aumento significativo en la acumulación de prolina en comparación con las plantas no inoculadas. Esto sugiere que las bacterias podrían estar induciendo activamente la acumulación de prolina en la respuesta al estrés de la planta. Además, investigaciones como la de Ashraf y Foolad (2007) han enfatizado la importancia de la acumulación de prolina en la respuesta adaptativa de las plantas al estrés osmótico derivado del estrés salino. Estos estudios se alinean con los resultados obtenidos en nuestra investigación, donde se evidenció un aumento significativo en la producción de prolina en plántulas inoculadas con *B. paralicheniformis* LBEndo1, tanto bajo condiciones de estrés salino como en ambientes libres de estrés (Figura 4). Estos resultados indican que la inoculación con esta rizobacteria no solo promueve una mayor acumulación de prolina, sino que también imparte una mayor tolerancia al estrés salino en las plantas, como ha sido ampliamente reportado por Shahid et al. (2022).

En nuestro proyecto, se revela un aumento significativo en la concentración de clorofila en las hojas de plántulas inoculadas con la rizobacteria *B. paralicheniformis* LBEndo1, tanto bajo condiciones de estrés salino como en condiciones libres de estrés (Figura 5a). Esta observación sugiere que la rizobacteria podría estar ejerciendo un impacto positivo en la eficiencia fotosintética y el metabolismo de las plántulas. Estos resultados son similares a los estudios de Kamran et al. (2022), donde se ha demostrado que las bacterias promotoras del crecimiento de plantas pueden aumentar la concentración de clorofila en plantas sometidas a estrés salino. Además, investigaciones como la de Han et al. (2022) han respaldado la asociación entre la inoculación bacteriana y el aumento de la concentración de clorofila, implicando una influencia directa en la fotosíntesis de las plantas y su rendimiento.

Colectivamente, estos hallazgos apoyan la idea de que la rizobacteria *B. paralicheniformis* LBEndo1 podría estar optimizando la concentración de clorofila en las hojas de las plántulas. El aumento en la concentración de clorofila en las hojas de plántulas inoculadas con la rizobacteria LBEndo1 podría estar relacionado con los hallazgos previamente descritos de aumento en la acumulación de prolina. Esta coincidencia en los resultados sugiere una posible relación entre el aumento de clorofila y prolina en plantas bajo estrés salino, como también reportó Altuntaş et al. (2020), apoyando la idea de que los mecanismos de tolerancia al estrés salino pueden tener múltiples efectos beneficiosos en la fisiología de las plantas.

El efecto protector observado en las hojas de plántulas inoculadas con la rizobacteria LBEndo1 contra el daño inducido por el estrés salino (Figura 5b) subraya su capacidad para mitigar los efectos adversos de la salinidad en la salud de las plantas. Por ejemplo, la investigación realizada por Khan et al. (2019) ha demostrado que las bacterias promotoras del crecimiento de plantas pueden inducir la producción de enzimas antioxidantes en las plantas, contrarrestando el estrés oxidativo causado por la salinidad. Por otro lado, un estudio de Munns y Tester (2008) examinó el impacto del estrés salino en la fisiología de las plantas y destacó cómo altas concentraciones de sal en el suelo pueden afectar negativamente la función de las membranas celulares y los procesos fotosintéticos, resultando en daño evidente en las hojas. En este contexto, la disminución en el porcentaje de daño foliar entre los tratamientos Control+S y LBEndo1+S sugiere que la rizobacteria podría estar mejorando la resistencia de las plántulas al estrés salino, posiblemente a través de la inducción de mecanismos de defensa antioxidante u otros procesos bioquímicos.

3.7 CONCLUSIONES

La bacteria *B. paralicheniformis* LBEndo1 mostró una capacidad notable para tolerar el estrés salino, alcanzando un máximo del 15% de NaCl. Sin embargo, se observó una disminución en el crecimiento bacteriano a medida que aumentaba la concentración de sal.

La aplicación de la rizobacteria LBEndo1 tuvo un impacto positivo en el crecimiento de plántulas de nogal, tanto bajo condiciones de estrés salino como en condiciones normales. Las plántulas inoculadas mostraron un aumento notable en la producción de biomasa seca, con mejoras en los pesos secos de hojas, tallos y raíces en comparación con las plántulas no inoculadas.

Además, se encontró que la bacteria influía en la acumulación de prolina, un indicador clave de resistencia al estrés. Las plántulas inoculadas con la bacteria exhibieron un aumento en la producción de prolina bajo condiciones tanto salinas como no salinas, sugiriendo la influencia de la bacteria en la respuesta de las plántulas al estrés salino.

Con respecto a la producción de clorofila, se observó un aumento esencial inducido por la bacteria en las plántulas de nogal. Este aumento en la concentración de clorofila es crucial para la fotosíntesis y, por lo tanto, para el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

La falta de investigación centrada en abordar el estrés salino en plántulas de nogal a través de PGPR hace que nuestro estudio sea particularmente relevante. Para comprender mejor cómo LBEndo1 alivia el estrés salino en los nogales, se necesita más investigación de naturaleza metabólica y molecular. Estos estudios adicionales no solo podrían respaldar nuestros hallazgos, sino también reforzar el uso de PGPR en la agricultura. Este estudio subraya la necesidad de incorporar estratégicamente PGPR para crear sistemas agrícolas más eficientes y resistentes a la sal.

3.8 LITERATURA

- Ali, S., Charles, T.C., & Glick, B.R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 160–167.
- Altuntaş, C., Demiralay, M., Sezgin Muslu, A., & Terzi, R. (2020). Proline-stimulated signaling primarily targets the chlorophyll degradation pathway and photosynthesis associated processes to cope with short-term water deficit in maize. *Photosynthesis Research*, 144, 35–48.
- Angelina, E., Papatheodorou, E.M., Demirtzoglou, T., & Monokrousos, N. (2020). Effects of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* Inoculation on Attributes of the Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Soil Rhizosphere Microbial Community: The Role of the Management System. *Agronomy*, 10, 1428.
- Ashraf, M.F.M.R., & Foolad, M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206–216.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205–207.
- Bhattacharyya, P.N., & Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327–1350.
- Campos-Villarreal, A.G., Arreola-Ávila, J.G., Chávez-Simental, J.A., Calzada, R.T., de la Rosa, A.B., Santos, A.L., & Salgado, J.R.H. (2017). Respuesta fisiológica, acumulación iónica y peso seco en portainjertos de nogal pecanero (*Carya illinoensis* (Wangenh) k. Koch) desarrollados bajo condiciones de estrés salino. *Interciencia*, 42, 744–749.
- Casales, F.G., van der Watt, E., & Coetzer, G.M. (2018). Propagation of Pecan (*Carya illinoensis*): A review. *African Journal of Biotechnology*, 17, 586–605.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., & Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22, 107–149.
- Du, Y., Ma, J., Yin, Z., Liu, K., Yao, G., Xu, W., Fan, L., Du, B., Ding, Y., & Wang, C. (2019). Comparative genomic analysis of *Bacillus paralicheniformis* MDJK30 with its closely related species reveals an evolutionary relationship between *B. paralicheniformis* and *B. licheniformis*. *BMC Genomics*, 20, 283.
- Etesami, H., & Beattie, G.A. (2018). Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops. *Frontiers in Microbiology*, 9, 148.

- Fu, Q., Liu, C., Ding, N., Lin, Y., & Guo, B. (2020). Ameliorative effects of inoculation with the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* sp. DW1 on growth of eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings under salt stress. *Agricultural Water Management*, 97, 1994–2000.
- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 329–339.
- Goswami, M., & Suresh, D.E.K.A. (2020). Plant growth-promoting rhizobacteria alleviators of abiotic stresses in soil: A review. *Pedosphere*, 30, 40–61.
- Han, L., Zhang, M., Du, L., Zhang, L., & Li, B. (2022). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 on photosynthesis and antioxidant characteristics of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) under drought stress. *Agronomy*, 12, 2177.
- Ha-Tran, D.M., Nguyen, T.T.M., Hung, S.H., Huang, E., & Huang, C.C. (2021). Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 3154.
- Hosseinifard, M., Stefaniak, S., Ghorbani Javid, M., Soltani, E., Wojtyla, Ł., & Garnczarska, M. (2022). Contribution of exogenous proline to abiotic stresses tolerance in plants: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5186.
- Ibarra-Villarreal, A.L., Gándara-Ledezma, A., Godoy-Flores, A.D., Herrera-Sepúlveda, A., Díaz-Rodríguez, A.M., Parra-Cota, F.I., & 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, 104399.
- Ji, C., Tian, H., Wang, X., Song, X., Ju, R., Li, H., & Liu, X. (2022). *Bacillus subtilis* HG-15, a halotolerant rhizoplane bacterium, promotes growth and salinity tolerance in wheat (*Triticum aestivum*). *BioMed Research International*, 2022, 9506227.
- Jiao, Y., Zhang, J., & Pan, C. (2022). Genome-wide analysis of the GDSL genes in pecan (*Carya illinoensis* K. koch): Phylogeny, structure, promoter cis-elements, co-expression networks, and response to salt stresses. *Genes*, 13, 1103.
- Kamran, M., Imran, Q.M., Ahmed, M.B., Falak, N., Khatoon, A., & Yun, B.W. (2022). Endophyte-mediated stress tolerance in plants: A sustainable strategy to enhance resilience and assist crop improvement. *Cells*, 11, 3292.
- Khalilpour, M., Mozafari, V., & Abbaszadeh-Dahaji, P. (2021). Tolerance to salinity and drought stresses in pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings inoculated with indigenous stress-tolerant PGPR isolates. *Scientia Horticulturae*, 289, 110440.
- Khan, M.A., Asaf, S., Khan, A.L., Adhikari, A., Jan, R., Ali, S., Imran, M., Kim, K.-M., & Lee, I.J. (2019). Halotolerant rhizobacterial strains mitigate the adverse effects of NaCl stress in soybean seedlings. *BioMed Research International*, 2019, 9530963.

- Liu, J., Fimognari, L., de Almeida, J., Jensen, C.N.G., Compant, S., Oliveira, T., Baelum, J., Pastar, M., Sessitsch, A., & Moelbak, L. et al. (2023). Effect of *Bacillus paralicheniformis* on soybean (*Glycine max*) roots colonization, nutrient uptake and water use efficiency under drought stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 209, 547–565.
- Mattioli, R., Marchese, D., D'Angeli, S., Altamura, M.M., Costantino, P., & Trovato, M. (2008). Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 66, 277–288.
- Miyamoto, S. (2010). Supplement of Diagnosis and Management of Salinity Problems in Irrigated Pecan Production: Salt Leaching. Texas Water Resources Institute Technical Report No. 387A.
- Miyamoto, S., & Nesbitt, M. (2011). Effectiveness of soil salinity management practices in basin-irrigated pecan orchards. *HortTechnology*, 21, 569–576.
- Miyamoto, S., Riley, T., Gobran, G., & Petticrew, J. (1986). Effects of saline water irrigation on soil salinity, pecan tree growth and nut production. *Irrigation Science*, 7, 83–95.
- Mohamed, H.I., & Gomaa, E.Z. (2012). Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. *Photosynthetica*, 50, 263–272.
- Mokrani, S., Nabti, E.H., & Cruz, C. (2020). Current advances in plant growth promoting bacteria alleviating salt stress for sustainable agriculture. *Applied Sciences*, 10, 7025.
- Moreno-Izaguirre, E., Ojeda-Barrios, D., Avila-Quezada, G., Guerrero-Prieto, V., Parra-Quezada, R., & Ruiz-Anchondo, T. (2015). Sodium sulfate exposure slows growth of native pecan seedlings. *Phyton*, 84, 80.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681.
- Nadeem, S.M., Zahir, Z.A., Naveed, M., & Ashraf, M. (2010). Microbial ACC-deaminase: Prospects and applications for inducing salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29, 360–393.
- Oliveira de Oliveira, L., Carlos Beise, D., Damian Dos Santos, D., Caroline Nagel, J., Poletto, T., Poletto, I., & Stefenon, V.M. (2021). Molecular markers in *Carya illinoensis* (Juglandaceae): From genetic characterization to molecular breeding. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 96, 560–569.
- Patani, A., Prajapati, D., Ali, D., Kalasariya, H., Yadav, V.K., Tank, J., Bagatharia, S., Joshi, M., & 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, 1168155.

- Paul, D., & Lade, H. (2020). Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34, 737–752.
- Pérez-Jaramillo, J.E., Carrión, V.J., Bosse, M., Ferrão, L.F., De Hollander, M., Garcia, A.A., Ramírez, C.A., Mendes, R., & Raaijmakers, J.M. (2017). Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. *ISME Journal*, 11, 2244–2257.
- Rani, S., Sharma, A., Wali, V.K., Kour, K., Sharma, M., & Sharma, M. (2017). Evaluation of genetic diversity of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wang) K. Koch.] in Jammu region. *Indian Journal of Horticulture*, 74, 601–603.
- Salimi, F., Khorshidi, M., Amirahmadi, F., & Amirahmadi, A. (2023). Effectiveness of Phosphate and Zinc Solubilizing *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* P1 as Halotolerant Rhizobacterium with Growth-Promoting Activity on *Pistacia vera* L. *Current Microbiology*, 80, 336.
- Shabaan, M., Asghar, H.N., Zahir, Z.A., Zhang, X., Sardar, M.F., & Li, H. (2022). Salt-tolerant PGPR confer salt tolerance to maize through enhanced soil biological health, enzymatic activities, nutrient uptake and antioxidant defense. *Frontiers in Microbiology*, 13, 901865.
- Shahid, M.A., Sarkhosh, A., Khan, N., Balal, R.M., Ali, S., Rossi, L., Gómez, C., Mattson, N., Nasim, W., & Garcia-Sanchez, F. (2020). Insights into the physiological and biochemical impacts of salt stress on plant growth and development. *Agronomy*, 10, 938.
- Shahid, S., Shahbaz, M., Maqsood, M.F., Farhat, F., Zulfiqar, U., Javed, T., Fraz Ali, M., Alhomrani, M., & Alamri, A.S. (2022). Proline-induced modifications in morpho-physiological, biochemical and yield attributes of pea (*Pisum sativum* L.) cultivars under salt stress. *Sustainability*, 14, 13579.
- Shi, J.W., Lu, L.X., Shi, H.M., & Ye, J.R. (2022). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on the growth and soil microbial community of *Carya illinoensis*. *Current Microbiology*, 79, 352.
- Shilev, S., Sancho, E.D., & Benlloch-González, M. (2012). Rhizospheric bacteria alleviate salt-produced stress in sunflower. *Journal of Environmental Management*, 95, S37–S41.
- Sierra-Zurita, D., Santana-Espinoza, S., Rosales-Serna, R., Ríos-Saucedo, J.C., & Carrillo-Parra, A. (2023). Productivity and Characterization of Biomass Obtained from Pruning of Walnut Orchards in México. *Energies*, 16, 2243.
- Wolstenholme, B.N. (1979). The ecology of pecan trees. 2. Climatic aspects of growing pecans. *Pecan Quarterly*, 13, 14–19.

- Yao, L., Wu, Z., Zheng, Y., Kaleem, I., & Li, C. (2010). Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. *European Journal of Soil Biology*, 46, 49–54.
- Zhang, J., Jiao, Y., Sharma, A., Shen, D., Wei, B., Hong, C., Zheng, B., & Pan, C. (2021). Transcriptomic analysis reveals potential pathways associated with salt resistance in pecan (*Carya illinoensis* K. Koch). *Journal of Biotechnology*, 330, 17–26.
- Zhang, Z., & Huang, R. (2013). Analysis of malondialdehyde, chlorophyll proline, soluble sugar, and glutathione content in *Arabidopsis* seedling. *Bio-Protocol*, 3, e817.
- Zhu, J.K. (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124, 941–948.

Capítulo IV

Bacillus paralicheniformis* modula la expresión génica y mejora la tolerancia a la salinidad en *Carya illinoensis

4.1 RESUMEN

El nogal pecanero (*Carya illinoensis*), tiene una gran importancia económica en México y a nivel mundial. Sin embargo, el estrés salino afecta su desarrollo. La salinidad induce desequilibrio iónico y estrés osmótico, lo que reduce la fotosíntesis y la conductancia estomática, generando a su vez estrés oxidativo. Para contrarrestar estos efectos, se ha explorado el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), como *Bacillus paralicheniformis* LBEndo1. En este estudio, se utilizó un diseño experimental factorial 2x2 para evaluar el impacto de LBEndo1 y la salinidad en plántulas de nogal pecanero criollo. Se midió la producción de exopolisacáridos de la rizobacteria, la acumulación de Na⁺ en diversos tejidos de la planta y el daño foliar. La expresión génica se cuantificó por qRT-PCR, con β -Actina como gen de referencia. Los resultados mostraron que la producción de exopolisacáridos de LBEndo1 aumenta cuando está en condiciones salinas. Además, reduce significativamente la acumulación de Na⁺ en hojas y tallos bajo estrés salino, disminuyendo las concentraciones de 1.4497 a 0.58203 mmol/gDW y de 1.7075 a 0.4660 mmol/gDW, respectivamente, mientras que, en las raíces, la acumulación se mantuvo estable. Asimismo, el daño foliar se redujo notablemente de 95.6% a 44.9% en plantas tratadas con LBEndo1 bajo estrés salino. A nivel genético, se observó una sobreexpresión de genes clave para la producción de ATP y defensa antioxidante, además de mejoras en la expresión de genes del fotosistema II y relacionados con la señalización del ácido abscísico y la respuesta al estrés. Estos hallazgos confirman que *B. paralicheniformis* LBEndo1 mejora la tolerancia de *C. illinoensis* al estrés salino mediante la modulación de la acumulación de sodio y la regulación de genes cruciales para la adaptación de la planta.

Palabras clave: Salinidad, Estrés oxidativo, NADH deshidrogenasa, exopolisacáridos, rizobacterias, PGPR, Fotosistema II, Acido abscísico

Bacillus paralicheniformis* Modulates Gene Expression and Enhances Salt Tolerance in *Carya illinoensis

4.2 ABSTRACT

The pecan tree (*Carya illinoensis*) holds significant economic value in Mexico and globally. However, its development is impacted by salt stress. Salinity induces ionic imbalance and osmotic stress, which reduce photosynthesis and stomatal conductance, in turn generating oxidative stress. To counter these effects, the use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), such as *Bacillus paralicheniformis* LBEndo1, has been explored. In this study, a 2x2 factorial experimental design was used to assess the impact of LBEndo1 and salinity on pecan seedlings. The production of exopolysaccharides by the rhizobacteria, the accumulation of Na⁺ in various plant tissues, and leaf damage were measured. Gene expression was quantified by qRT-PCR, using *β-Actin* as a reference gene. Results showed that LBEndo1's exopolysaccharide production increases under saline conditions. Additionally, it significantly reduces Na⁺ accumulation in leaves and stems under salt stress, lowering concentrations from 1.4497 to 0.58203 mmol/gDW and from 1.7075 to 0.4660 mmol/gDW, respectively, while accumulation in roots remained stable. Moreover, leaf damage was notably reduced from 95.6% to 44.9% in plants treated with LBEndo1 under salt stress. Genetically, an overexpression of key genes for ATP production and antioxidant defense was observed, along with improvements in the expression of photosystem II genes and those related to abscisic acid signaling and stress response. These findings confirm that *B. paralicheniformis* LBEndo1 enhances the salt tolerance of *C. illinoensis* by modulating sodium accumulation and regulating crucial genes for plant adaptation.

Keywords: Salinity, Oxidative Stress, NADH Dehydrogenase, Exopolysaccharides, Rhizobacteria, PGPR, Photosystem II, Abscisic Acid

4.3 INTRODUCCIÓN

El nogal pecanero (*Carya illinoensis*), nativo del sur de Estados Unidos y norte de México, representa un cultivo de significativa importancia económica a nivel mundial. México, en particular, ha emergido como líder en la producción de este cultivo, con un área de cultivo que alcanza las 146,239 hectáreas y una producción total de 136,947 toneladas en 2021, destacándose como un componente vital para la economía agrícola del país (Sierra-Zurita et al., 2023). La adopción de técnicas agronómicas adaptadas a las necesidades específicas del nogal pecanero refleja un compromiso con la mejora continua de la eficiencia en la producción y la calidad del fruto. Sin embargo, un desafío significativo para el cultivo es su susceptibilidad a la salinidad, tolerando rangos de conductividad eléctrica de aproximadamente 2 a 3 dS·m⁻¹, siendo este un factor que puede comprometer severamente su crecimiento y rendimiento (Miyamoto & Nesbitt, 2011).

El estrés salino es reconocido como uno de los desafíos abióticos más significativos en la agricultura, afectando profundamente la fisiología y el metabolismo de cultivos como el nogal pecanero (Liu et al., 2022). La salinidad del suelo induce un desequilibrio iónico y estrés osmótico en las plantas, comprometiendo la homeostasis hídrica y la distribución de iones esenciales, lo que resulta en una reducción significativa del crecimiento vegetal y la producción de frutos (Ojeda-Barrios et al., 2021). Estos efectos negativos incluyen limitaciones en la conductancia estomática y la fotosíntesis, exacerbando el estrés osmótico y dificultando la absorción de agua por parte de la planta, lo que subraya la urgencia de desarrollar estrategias eficaces para mejorar la tolerancia a la salinidad (Campos-Villarreal et al., 2017). Además, la salinidad puede provocar estrés oxidativo al restringir la capacidad de la planta para neutralizar las especies reactivas de oxígeno, enfatizando la importancia de respuestas antioxidantes eficientes (Farooq et al., 2019).

Ante la problemática de la salinidad en la agricultura, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) emergen como una alternativa para disminuir los efectos negativos del estrés salino (Bhattacharyya & Jha, 2012). Estos

microorganismos benéficos, activan mecanismos que potencian la resistencia de las plantas, incluyendo la salinidad (Shultana et al., 2022). Además, la producción de enzimas como la ACC desaminasa por parte de las PGPR reduce los niveles de etileno inducido por estrés, mitigando así el impacto del estrés salino en cultivos como el tomate y promoviendo un aumento en la producción de biomasa (Orozco-Mosqueda et al., 2019). Este enfoque proporciona una alternativa ecológica a los fertilizantes sintéticos, destacando el potencial de las PGPR en la agricultura (Nazari & Smith, 2020). La diversidad de bacterias dentro del grupo de las PGPR, incluye géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azospirillum* y *Azotobacter* (Mushtaq et al., 2020; Widawati, 2015). La eficacia de las PGPR en la mejora de la tolerancia a la salinidad ha sido demostrada en diversos cultivos, incluidos el trigo (Upadhyay et al., 2012), el tomate (Yan et al., 2014) y el maíz (Marulanda et al., 2010), a través de la modificación de la fisiología de la planta para aumentar la absorción de agua y nutrientes, lo que resulta en un crecimiento y rendimiento mejorados bajo estrés salino.

La interacción entre las plantas y las PGPR juega un papel crucial en la adaptación y supervivencia de las primeras en condiciones de estrés salino, a través de la modulación de su respuesta génica. Específicamente, ciertas cepas de PGPR, incluidas *Pseudomonas* (Shavalikohshori et al., 2020) y *Bacillus* (Khan et al., 2021), han demostrado influir en la expresión genética de las plantas, mejorando su capacidad para tolerar la salinidad. Estas bacterias benéficas inducen la expresión de genes implicados en la síntesis de osmoprotectores como la prolina y activan genes que codifican para enzimas antioxidantes, proporcionando así a las plantas herramientas mejoradas para enfrentarse a ambientes salinos (Li et al., 2020). Un estudio destacado muestra cómo *Bacillus oryzicola* incrementa los niveles de expresión del gen *SOS* en *Arabidopsis thaliana*, mejorando la regulación del transporte de sodio y potasio, esenciales para la homeostasis iónica bajo condiciones de estrés salino (Baek et al., 2020). Además, se ha identificado que los antiportadores Na^+/H^+ y los canales de K^+ juegan roles fundamentales en la tolerancia al estrés salino, facilitando el manejo de iones Na^+ y la acumulación de K^+ , mientras que la biosíntesis de osmolitos compatibles y la actividad de enzimas

antioxidantes son esenciales para la protección celular y el metabolismo antioxidante bajo tales condiciones (Li et al., 2020; Batool et al., 2020). La modulación de la biosíntesis de etileno y la señalización hormonal por PGPR, así como la activación de genes antioxidantes y factores de transcripción relevantes para la respuesta al estrés, subrayan la complejidad y eficacia de los mecanismos mediante los cuales las PGPR pueden mejorar la tolerancia al estrés salino en las plantas (Brunetti et al., 2021; Hasanuzzaman et al., 2022).

Si bien el rol de las PGPR en la mejora de la tolerancia al estrés salino es reconocido, el impacto específico y los mecanismos a través de los cuales *B. paralicheniformis* influye en *C. illinoensis* en condiciones de estrés salino permanecen inexplorados. Este estudio tiene como objetivo mostrar cómo *B. paralicheniformis* modula la expresión genética en *C. illinoensis* sometida a estrés salino, con la posibilidad de descubrir mecanismos moleculares y fisiológicos que faciliten una mejor adaptación de la planta a ambientes salinos. A través de este enfoque, pretendemos contribuir al conocimiento existente sobre la interacción microorganismo-planta bajo estrés salino y ofrecer estrategias sostenibles para el manejo agrícola del nogal pecanero en regiones afectadas por la salinidad.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Material vegetal

Los experimentos se desarrollaron en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, situadas en las coordenadas 25°35'13" N y 103°30'04" O, a una elevación de 1114 metros sobre el nivel del mar. Las semillas de nogal pecanero criollo, se obtuvieron de un huerto localizado en el municipio de Nazas, Durango (25°15'08" N y 104°06'09" O), a una altitud de 1240 metros. Las semillas se sometieron a un proceso de desinfección utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 20% y, posteriormente, se enjuagaron con agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas fueron vernalizadas a 4 °C durante una semana antes de su germinación. Una vez

germinadas, las plántulas se trasladaron a macetas de 20 cm de altura por 10 cm de diámetro, utilizando arena estéril como sustrato. A lo largo de todo el experimento, se mantuvo un riego constante con agua destilada estéril cada tercer día, no se introdujo ningún tipo de solución nutritiva, con el fin de prevenir efectos cruzados que pudieran influir en los resultados experimentales. El experimento se realizó en una cámara bioclimática bajo condiciones de temperatura de 25 °C y fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

4.4.2 Inoculación bacteriana

El procedimiento de inoculación se realizó utilizando la cepa rizobacteriana *B. paralicheniformis* LBEndo1. Inicialmente, se preparó el cultivo bacteriano añadiendo 100 mL de medio LB a un matraz de Erlenmeyer, seguido de una incubación de 24 horas a 35 °C con agitación constante a 120 rpm. Posteriormente, se ajustó la densidad bacteriana a 1×10^8 UFC/mL mediante conteo en cámara de Neubauer. Para preparar el inóculo, las bacterias se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos, eliminando así el medio de cultivo, y posteriormente se resuspendieron en agua destilada estéril. La inoculación se llevó a cabo en plántulas con una semana de germinación, aplicando directamente en la base del tallo 10 mL de la suspensión bacteriana, con una concentración ajustada a 1×10^8 UFC/mL.

4.4.3 Diseño experimental

En este estudio se implementó un diseño factorial completamente al azar 2×2 , resultando en cuatro tratamientos. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones, y en cada repetición se utilizaron cinco plántulas de *C. illinoensis*, sumando un total de 15 plántulas por tratamiento, dando un total de 60 unidades experimentales. Los tratamientos se definieron según dos factores: 1) La presencia o ausencia de la rizobacteria *B. paralicheniformis* LBEndo1, y 2) la concentración de NaCl, con niveles de 0 mM y 50 mM. Las plantas fueron irrigadas cada tercer día, aplicando 80 mL de solución, ya sea con concentración salina o libre de sales, el período experimental duró 60 días. Se asignaron códigos para identificar cada tratamiento de la siguiente manera: las plántulas sin aplicación de bacterias ni sal se

identificaron como "Control"; las plántulas inoculadas con LBEndo1 en ausencia de sal, como "LBEndo1"; las plántulas regadas con solución salina sin bacterias, como "Control+S"; y, finalmente, las plántulas tratadas con LBEndo1 y solución salina, como "LBEndo1+S".

4.4.4 Medición de exopolisacáridos

En este estudio, se evaluó la producción de exopolisacáridos en *B. paralicheniformis* bajo condiciones normales y con estrés salino (50 mM de NaCl). Se inoculó 100 µL del inóculo bacteriano en frascos conteniendo 10 mL de medio Nitrogen Fixing bacteria (NFb) líquido, sin sal y con sal. Los frascos se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm y 30 °C durante 96 horas. Para la cuantificación, se empleó el método fenol-ácido sulfúrico de Dubois et al. (1956), añadiendo 1 mL de fenol al 5% y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado directamente a 2 mL de muestra. Tras reposar 10 minutos, la mezcla se agitó durante 30 segundos y se sometió a un baño María a 25 °C por 10 minutos. La absorbancia se midió a 490 nm utilizando un espectrofotómetro. Este procedimiento permitió comparar la producción de exopolisacáridos entre las bacterias cultivadas en condiciones salinas y no salinas.

4.4.5 Acumulación de Na⁺ en hojas tallo y raíz

Para determinar la concentración de sodio en *C. illinoensis*, las muestras de hojas, tallos y raíces se lavaron inicialmente con agua destilada para eliminar contaminantes superficiales, y posteriormente se secaron a 60 °C durante dos días. Posteriormente, se molieron hasta obtener un polvo fino, asegurando una homogeneidad adecuada para la extracción. Se pesaron 100 mg de cada muestra molida, y se añadieron a tubos Falcon con 10 mL de ácido nítrico 0.5 M. Las muestras se agitaron durante 24 horas a temperatura ambiente. La cuantificación de Na se realizó utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica, analizando alícuotas del extracto diluidas (Jian, 1990).

4.4.6 Porcentaje de daño en las hojas

Para medir el área de la hoja y analizar el daño foliar causado por la salinidad en *C. illinoensis*, se empleó el software ImageJ versión 1.54d, siguiendo la metodología propuesta por Katabuchi (2015). El procedimiento inició con la digitalización de las imágenes de las hojas, ajustando previamente el brillo y contraste para mejorar la diferenciación entre las áreas sanas y dañadas. Posteriormente, se realizó una calibración dentro del software para asegurar que el recuento de píxeles reflejara con precisión el área foliar. El análisis mostró la estimación del área foliar mediante el recuento de píxeles, seleccionando específicamente los píxeles verdes para áreas sanas y los marrones para el daño foliar. Este enfoque permitió el cálculo preciso del porcentaje del área dañada.

4.4.7 Expresión génica

La extracción de ARN de las plantas de *C. illinoensis* de 60 días de edad se efectuó conforme al protocolo proporcionado por el kit PureLink® Plant RNA (Invitrogen). Posteriormente, el RNA extraído se trató con DNase1 (Ambion) con el objetivo de eliminar cualquier residuo de DNA, para ello, se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante. Una vez asegurada la ausencia de DNA, se procedió a preparar la mezcla de reacción para la qRT-PCR. Dicha mezcla incluyó: 5 µl de Power SYBR RT-PCR, 0.4 µl del mix de primers (Fw y Rv), 0.08 µl de RT Enzyme Mix para la síntesis de cDNA, 3.5 µl de H₂O DEPC y 1 µl de la muestra de RNA a una concentración de 50 ng. Se realizaron reacciones de PCR en un volumen total de 10 µl, siguiendo un programa térmico específico: inicialmente, 48°C por 30 minutos y 95°C por 10 minutos para la síntesis del cDNA; seguido de 95°C por 15 minutos, y luego 45 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 60 segundos (esta temperatura varía según la requerida por los primers) para la amplificación del cDNA y la detección mediante fluoróforos de SYBR Green. Para verificar la especificidad de los primers, se generó una curva melting del proceso. La expresión relativa de los genes se calculó utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, con β -Actina sirviendo como gen de referencia en los análisis. Los genes específicos analizados en este estudio fueron CIL0912S0112, CIL0900S0005, CIL1264S0041, CIL0919S0158,

CIL1273S0033, CIL0272S0015, CIL0245S0004, CIL0840S0001, CIL1403S0034 y CIL1321S0006. La secuencia de los primers para estos genes, se detallan en la Tabla 1.

Tabla1. Códigos de los genes relacionados al estrés salino en *C. illinoensis*, secuencias de primers y temperaturas de alineación (TM) utilizados para la amplificación por qRT-PCR.

Código del gen	Secuencia de los primers (5'-3')	TM (°C)	Código del gen	Secuencia de los primers (5'-3')	TM (°C)
CIL0919S0158	F AGAATTTGGTGTCTTTCTGGTCAGT	65.5	CIL1264S0041	F CTGGGCACTGAAACCTTCGT	65.7
	R GCTGGCATGTGATGTTTGGA	64.3		R AGCAAGAGCGCGAATCTTCT	65.2
CIL0272S0015	F ATCCCAGAGGCCTACCAGTGT	67.9	CIL0900S0005	F GACGGGCCGTACCCTACCTA	67.8
	R GAGGTCCAGCCCTAGGATGAT	65.9		R GATGCGTGACCGGATTCAAC	64.4
CIL1273S0033	F AAACCTCCAAACCGTGAGCAA	64.0	CIL0245S0004	F TCAGCCTGGTGGGCATATTAC	65.1
	R TTGACAAGACCCGTCGAAATG	63.8		R CGTGTGCTATGCTGCCAAGA	65.9
CIL0912S0112	F GGCCAAGGTTGTTGGAGTGA	65.7	CIL0840S0001	F CAACACCGGAGTGACATTCTG	64.0
	R GGGTGAGAATGCCCTCTCT	66.5		R GGGAATTCTGGCTCCAACCTG	63.8
CIL1239S0040	F GCTACAGGGACGACGCATTT	65.7	CIL1321S0006	F GCTGCGGAGGCTATTGCTT	66.0
	R CGCCACCGATAAACCATTCT	63.5		R TTTCTTCGGCTGCCTTGAAA	63.6
				F ACCAACTGGGACGATATGGAGAAGA	68.0
			β-Actina	R TACGACCAGAGGCATACAGGGACAA	69.8

Tabla 2. Funciones de genes seleccionados y sus locus ID correspondientes

Código del gen	Implicación	Locus ID*
CIL0919S0158	Codifica la proteína ribosomal citosólica, parte de la familia e124	AT2G44860.2
CIL0272S0015	Codifica para la enzima PI4K	AT2G46500.2
CIL1273S0033	Codifica la E3 ubiquitina ligasa PUB11	AT1G23030.1
CIL0912S0112	Codifica una proteína RING/U-box	AT5G42200.1
CIL1239S0040	Codifica la RDUF2, una ligasa de ubiquitina E3	AT5G59550.1
CIL1264S0041	Codifica WDR55 es una proteína que regula la síntesis de ARN ribosómico	AT2G34260.1
CIL0900S0005	Codifica la subunidad 7 de la NADH deshidrogenasa	ATMG00510.1
CIL0245S0004	Codifica la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa	ATMG00580.1
CIL0840S0001	Codifica la proteína D1 del fotosistema II	ATCG00020.1
CIL1321S0006	Codifica la proteína CP47 del fotosistema II	ATCG00680.1

4.4.8 Análisis bioinformático

Para evaluar la expresión relativa de genes específicos en *Carya illinoensis* en respuesta a tratamientos sin estrés salino LBEndo1 y estrés salino (LBEndo1+S), se utilizó un enfoque de análisis bioinformático en R. Los datos de expresión génica

fueron normalizados para comparar efectivamente los niveles de expresión entre los tratamientos y los controles correspondientes. Posteriormente, se organizó una matriz de expresión con genes en las filas y tratamientos en las columnas.

Utilizando la función `heatmap()` del paquete estadístico R, se generó un mapa de calor para visualizar los patrones de expresión génica. Este mapa fue complementado con un dendrograma, generado mediante clustering jerárquico, para ilustrar la agrupación de genes según la similitud en sus patrones de expresión. La escala de color del mapa de calor, que variaba de amarillo a rojo, representaba un gradiente de expresión desde valores bajos a altos, respectivamente.

4.4.9 Análisis Estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico para evaluar los distintos parámetros evaluados. El diseño experimental se estableció de manera completamente al azar. Para el análisis estadístico, se emplearon tanto la prueba ANOVA, seguidos de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples, así como la de *t* de Student. El nivel de significancia se fijó en $p \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 9.

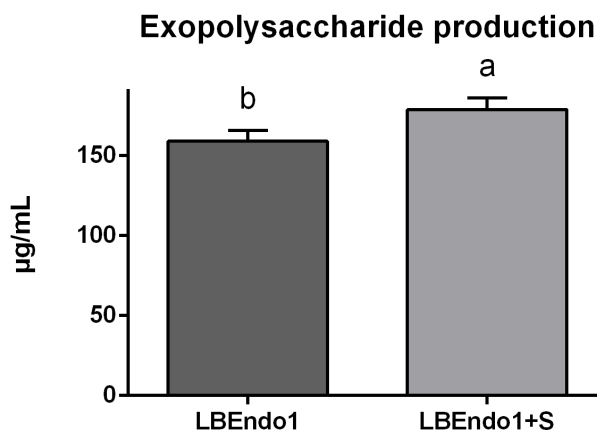
4.5 RESULTADOS

4.5.1 Producción de exopolisacáridos

En este estudio se investigó la producción de exopolisacáridos por la rizobacteria *B. paralicheniformis* LBEndo1 como mecanismo de defensa ante condiciones de salinidad. Bajo condiciones sin sal (LBEndo1), la cepa produjo exopolisacáridos con una concentración promedio de 159.16 µg/mL. Sin embargo, al someter las bacterias a un estrés salino (LBEndo1+S) mediante la adición de 50 mM de NaCl, se observó un incremento en la producción media de exopolisacáridos de 178.95 µg/mL (Figura 1). Este aumento muestra una respuesta adaptativa de la bacteria,

optimizando la producción de exopolisacáridos para mejorar la tolerancia al estrés causado por la salinidad.

Figura 1. Comparación de la producción media de exopolisacáridos en $\mu\text{g/mL}$ por *B. paralicheniformis* LBEndo1 bajo condiciones sin sal (LBEndo1) y sometida a estrés salino (LBEndo1+S). La prueba de *t* de Student reveló una diferencia estadísticamente significativa en la producción de exopolisacáridos entre las condiciones experimentales, con un valor de $p \leq 0.05$.



4.5.2 Acumulación de Na^+ en hojas tallo y raíz

4.5.2.1 Hojas

En el estudio con *C. illinoensis*, se observaron bajas concentraciones de Na^+ en las hojas para los tratamientos Control y LBEndo1, con promedios de 0.0314 y 0.01935 mmol/gDW respectivamente (Figura 2), lo cual estaba anticipado ya que no se aplicó riego con solución salina a estos grupos. Estos valores representan los niveles basales de sodio en condiciones sin estrés y corroboran la ausencia de un efecto inducido por la rizobacteria LBEndo1 en la acumulación de Na^+ bajo estas condiciones. Sin embargo, cuando las plántulas estaban sometidas a estrés salino (Control+S), se registró un incremento en la concentración de Na^+ , alcanzando un promedio de 1.4497 mmol/gDW, reflejando una acumulación significativa típica de la exposición a ambientes salinos. Contrariamente, las plántulas que recibieron inoculación con LBEndo1 junto con el estrés salino (LBEndo1+S) presentaron una concentración promedio de Na^+ más baja, con 0.58203 mmol/gDW, lo que evidencia el efecto mitigador de la rizobacteria en la absorción de Na^+ provocada por la salinidad (Figura 2). Estos resultados muestran la influencia protectora de *B. paralicheniformis* LBEndo1, que no solo se mantiene sin influencia en la

acumulación de Na^+ en condiciones normales, sino que también reduce su concentración en un contexto de estrés.

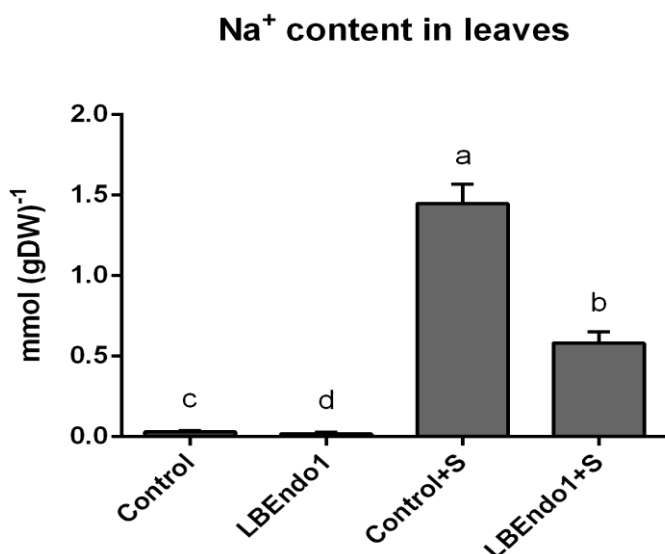


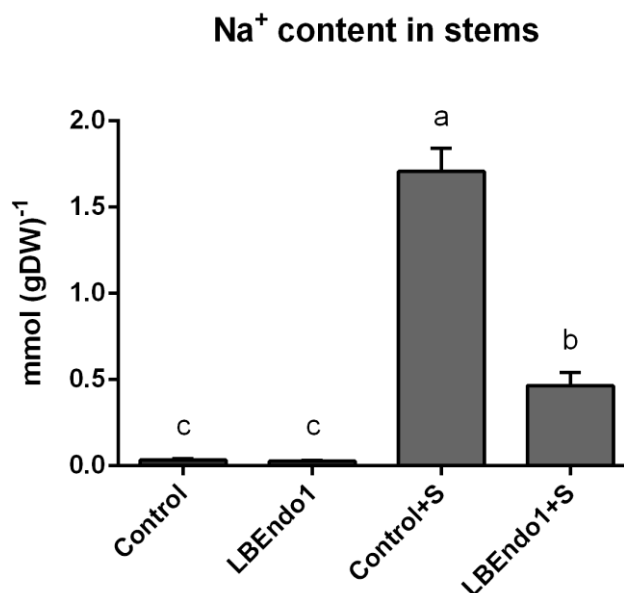
Figura 2. Efecto de la rizobacteria LBEndo1 en la acumulación de Na^+ en hojas de *C. illinoensis* bajo estrés salino. Las barras representan el promedio de concentración de Na^+ (en mmol por gramo de peso seco) en las hojas para cada tratamiento. Las diferencias significativas entre los tratamientos, determinadas mediante ANOVA y la prueba post-hoc de Tukey, están indicadas por letras distintas sobre las barras ($p \leq 0.05$).

4.5.2.2 Tallo

En el estudio sobre la acumulación de Na^+ en el tallo de *C. illinoensis*, los resultados reflejaron una respuesta diferencial al tratamiento con la rizobacteria *B. paralicheniformis* LBEndo1 y la salinidad. La concentración promedio de Na^+ en los tallos fue de 0.0349 mmol/gDW para el control sin inocular, 0.0272 mmol/gDW para las plantas tratadas con LBEndo1, 1.7075 mmol/gDW para el control sometido a estrés salino y 0.4660 mmol/gDW para las plantas tratadas con LBEndo1 en presencia de sal (Figura 3). Estos datos indican que, similar a las hojas, la presencia de LBEndo1 ayuda a reducir la acumulación de Na^+ en los tallos de las plantas bajo condiciones de estrés salino. En comparación con las plantas del Control+S, que mostraron una acumulación considerablemente alta, aquellas en el tratamiento LBEndo1+S mantuvieron menores niveles de Na^+ , sugiriendo un posible efecto protector de la rizobacteria. En ausencia de estrés salino, tanto el control como las

plantas tratadas con LBEndo1 exhibieron bajos niveles de Na^+ , lo cual era esperado debido a la ausencia de estrés por salinidad.

Figura 3. Efecto de la rizobacteria LBEndo1 en la acumulación de Na^+ en los tallos de *C. illinoensis* bajo estrés salino. Las barras representan el promedio de concentración de Na^+ (en mmol por gramo de peso seco) en las hojas para cada tratamiento. Las diferencias significativas entre los tratamientos, determinadas mediante ANOVA y la prueba post-hoc de Tukey, están indicadas por letras distintas sobre las barras ($p \leq 0.05$).



4.5.2.3 Raíz

Los resultados en la acumulación de Na^+ en la raíz de *C. illinoensis* bajo distintos tratamientos muestran un patrón interesante. En los tratamientos Control y con LBEndo1, que no incluyeron estrés salino, las concentraciones medias de Na^+ fueron de 0.0552 y 0.0377 mmol/gDW respectivamente, reflejando los niveles basales de sodio en la planta. Por otra parte, al añadir estrés salino, en el tratamiento Control+S, la acumulación de Na^+ en las raíces aumentó significativamente, con una media de 0.3194 mmol/gDW, lo cual era esperado debido al aumento de disponibilidad de Na^+ en el entorno radicular. De igual manera, las plantas tratadas con LBEndo1 bajo estrés salino (LBEndo1+S) mostraron una concentración similar de Na^+ , con una media de 0.3095 mmol/gDW. Esto indica que la rizobacteria puede no reducir la acumulación de Na^+ en las raíces bajo estrés salino. Sin embargo, su presencia no aumentó la absorción de Na^+ y mantuvo los niveles similares al Control+S.

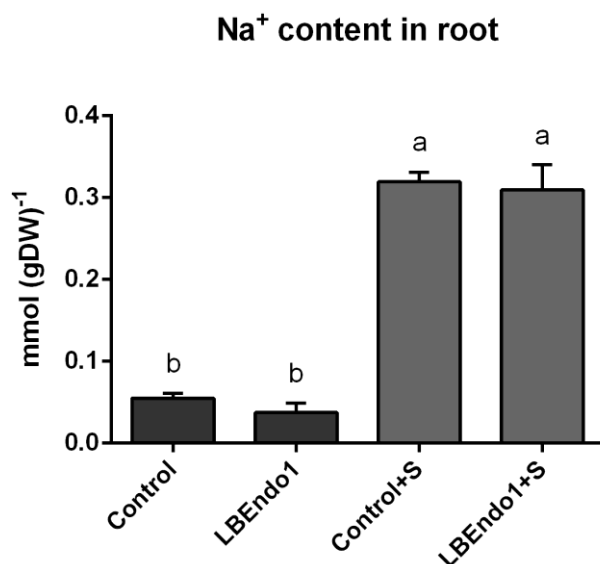
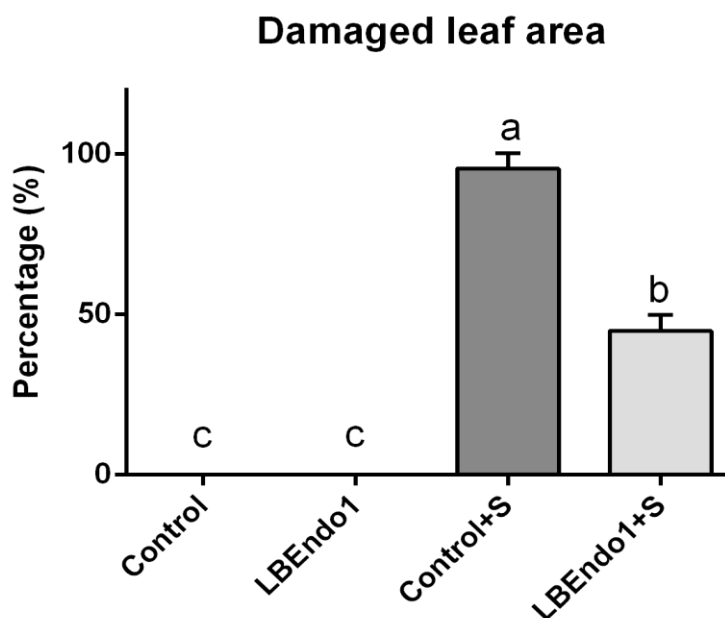


Figura 4. Efecto de la rizobacteria LBEndo1 en la acumulación de Na⁺ en la raíz de *C. illinoensis* bajo estrés salino. Las barras representan el promedio de concentración de Na⁺ (en mmol por gramo de peso seco) en las hojas para cada tratamiento. Las diferencias significativas entre los tratamientos, determinadas mediante ANOVA y la prueba post-hoc de Tukey, están indicadas por letras distintas sobre las barras ($p \leq 0.05$).

4.5.3 Porcentaje de daño en las hojas

Se realizó un análisis para determinar el factor de protección de la rizobacteria *B. paralicheniformis* LBEndo1 en el daño foliar de *C. illinoensis* bajo condiciones de estrés salino. Los resultados indicaron que las plántulas en los tratamientos Control y LBEndo1 no mostraron daño en las hojas, con un porcentaje de daño de 0.0% en todas las replicaciones. En contraste, las plántulas en el tratamiento Control+S experimentaron un daño foliar significativo, con porcentajes de daño promedio de 95.6%. Esto indica una alta susceptibilidad del nogal pecanero al estrés salino en ausencia de LBEndo1. Sin embargo, en las plántulas del tratamiento LBEndo1+S, donde se combinaron la rizobacteria y el estrés salino, el daño foliar fue considerablemente menor, con un valor promedio de 44.9%. Este resultado demuestra una reducción significativa del daño foliar asociada con la presencia de LBEndo1 bajo condiciones de estrés salino (Figura 5). Estos hallazgos sugieren que *B. paralicheniformis* LBEndo1 puede desempeñar un rol protector en *C. illinoensis*, mitigando los efectos negativos del estrés salino sobre las hojas.

Figura 5. Porcentaje de daño foliar en *C. illinoensis* de los cuatro tratamientos después de 60 días de interacción. La gráfica muestra las medias de daño foliar ($n = 20$). Los resultados del análisis ANOVA indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$), donde las barras con letras diferentes representan estas diferencias estadísticas.



4.5.4 Expresión relativa de genes relacionados al estrés salino

En este estudio, se empleó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para el análisis de la expresión génica, utilizando β -Actina como gen de referencia. Para evaluar los cambios en la expresión genética en condiciones sin sal, se comparó la expresión relativa entre el tratamiento con LBEndo1 y Control. De igual manera, para condiciones de estrés salino, la comparación se realizó entre el tratamiento LBEndo1+S y Control+S.

En el estudio, se observó una regulación positiva significativa de los genes CIL0245S0004 y CIL0900S0005, que codifican las subunidades 4 y 7 de la NADH deshidrogenasa, respectivamente. Estos genes son importantes para la producción de ATP y la disminución de especies reactivas de oxígeno (ROS). La influencia de *B. paralicheniformis* LBEndo1 mostró un incremento de la expresión del gen CIL0245S0004, alcanzando un valor medio de expresión relativa de 13.381 en ausencia de sal, y de 13.001 bajo estrés salino (Figura 6). Por su parte, el gen CIL0900S0005 también mostró un aumento en su expresión a 9.208 sin estrés salino y a 8.033 bajo estrés por salinidad (Figura 7). Esta sobreexpresión sugiere

que LBEndo1 podría desempeñar un papel importante en la optimización del metabolismo energético y la respuesta antioxidante.

Además, los genes CIL0840S0001 y CIL1321S0006, que codifican para las proteínas del fotosistema II, D1 y CP47 respectivamente, mostraron respuestas diferenciales ante la inoculación con LBEndo1 bajo condiciones normales y de estrés salino. El gen CIL0840S0001 tuvo una expresión reducida de 0.456 en condiciones sin sal, pero aumentó significativamente a 5.760 bajo estrés salino, sugiriendo una posible adaptación que podría influir en la eficiencia fotosintética y en la gestión del estrés oxidativo en condiciones salinas, pero no en condiciones normales (Figura 6). El gen CIL1321S0006 experimentó una leve disminución en su expresión a 0.716 sin sal, pero se incrementó notablemente a 6.578 bajo estrés salino, reflejando una interacción beneficiosa que mejora la respuesta fotosintética y la adaptación al estrés (Figura 7). Estos hallazgos sugieren un rol significativo de LBEndo1 en la modulación de la eficiencia del fotosistema II y la resistencia general de la planta bajo condiciones de estrés salino.

Los estudios sobre los genes CIL1239S0040 y CIL1264S0041, ambos relacionados con la respuesta al estrés abiótico y la señalización del ácido abscísico (ABA), resaltan el papel modulador de LBEndo1. CIL1239S0040 (RDUF2) mostró una disminución en su expresión a 0.445 en ausencia de sal cuando las plántulas fueron tratadas solo con LBEndo1, indicando que la rizobacteria por sí sola no induce en la expresión de RDUF2. Sin embargo, bajo estrés salino, la expresión del gen se elevó dramáticamente a 27.785 (Figura 6). Por otro lado, CIL1264S0041 (WDR55), esencial para la señalización del ABA y adaptaciones como el cierre estomático, mostró una baja expresión de 0.403 en condiciones sin sal, pero aumentó a 13.176 bajo estrés salino, demostrando que LBEndo1 potencia las respuestas adaptativas que mejoran la eficiencia en el uso del agua y la tolerancia al estrés (Figura 7).

Los genes CIL1273S0033 y CIL0912S0112 también mostraron una regulación positiva asociada con la inoculación de LBEndo1 bajo condiciones de estrés. CIL1273S0033, que codifica la E3 ubiquitina ligasa PUB11, mostró un aumento en su expresión de 3.936 sin estrés salino (LBEndo1) y se incrementó notablemente

bajo estrés salino (LBEndo1+S) a 12.675 veces más que el control (Figura 6). Por otro lado, CIL0912S0112, que codifica una proteína RING/U-box implicada en la respuesta a estrés abiótico, también mostró una sobreexpresión significativa; en ausencia de sal, la expresión fue de 2.972 y aumentó a 4.720 bajo estrés salino (Figura 7). Estos incrementos indican un efecto sinérgico de LBEndo1 en la regulación del gen, contribuyendo a una mayor tolerancia al estrés salino.

Por otra parte, el análisis del gen CIL0272S0015, que codifica para la enzima PI4K, ha evidenciado una regulación significativa inducida por la rizobacteria LBEndo1. En condiciones sin sal, la expresión del gen se incrementó notablemente a un valor de 13.796, en comparación con el control, indicando que LBEndo1 activa este gen (Figura 6). Bajo estrés salino, la expresión aumentó aún más, alcanzando una media de 14.886, lo que refleja una sobreexpresión del gen en respuesta a la inoculación con LBEndo1 en presencia de salinidad (Figura 7). Dado el papel esencial de PI4Kb1 en la síntesis y regulación del antiportador Na^+/H^+ para la expulsión de sodio excesivo, esta elevada expresión sugiere que LBEndo1 podría potenciar la capacidad de las plantas para gestionar el estrés salino.

Finalmente, el estudio del gen CIL0919S0158, que codifica la proteína ribosomal L24e y componente esencial de la maquinaria ribosomal, reveló que la expresión del gen varió bajo la influencia de *B. paralicheniformis* LBEndo1. En condiciones sin estrés salino, la presencia de LBEndo1 resultó en una expresión del gen a un promedio de 0.137 (Figura 6), mientras que, bajo estrés salino, las plántulas tratadas con LBEndo1+S también mostraron una expresión baja, con un promedio de 0.794 comparado al control (Figura 7). Estos resultados sugieren que LBEndo1 no tiene un impacto significativo en la expresión de este gen, tanto en condiciones normales como bajo estrés salino, lo que indica que la rizobacteria no influye significativamente en la regulación de la maquinaria ribosomal.

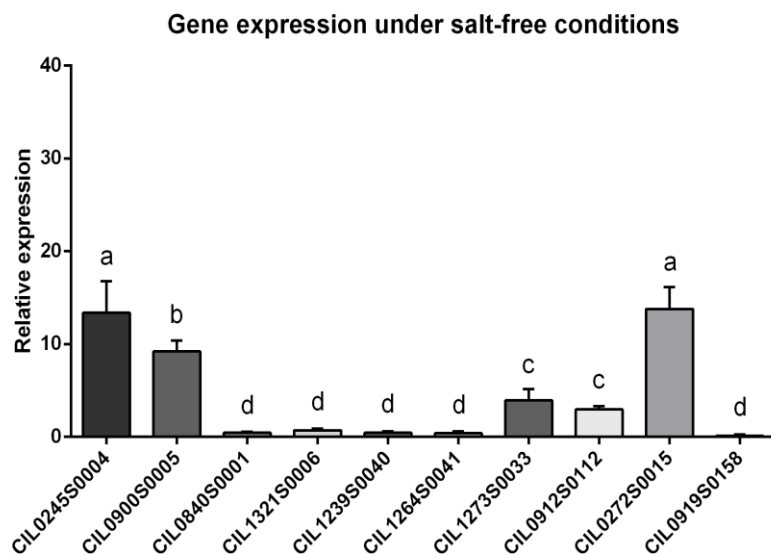
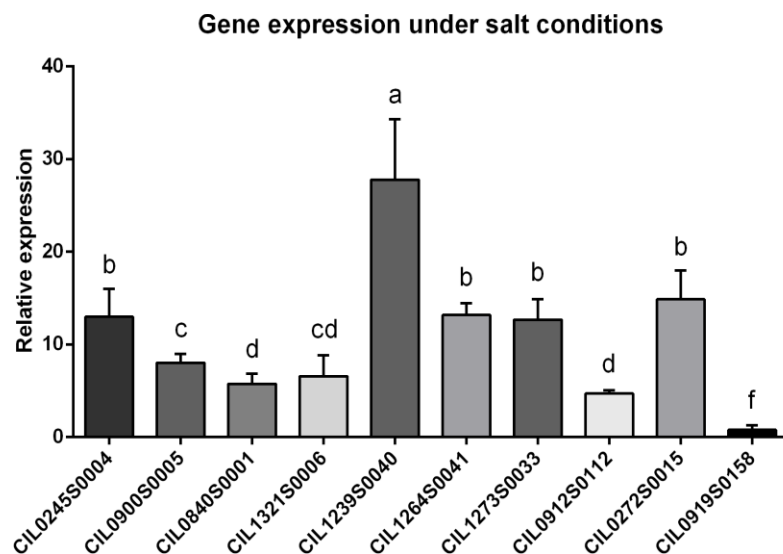


Figura 6. Expresión relativa de genes en plántulas de *C. illinoensis* inoculadas con *B. paralicheniformis* LBEndo1 en ausencia de estrés salino, utilizando β -Actina como gen de referencia. El análisis ANOVA muestra diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de los genes ($p \leq 0.05$). Las barras con letras distintas indican estas diferencias, señalando una respuesta genética diferencial en presencia de LBEndo1.

Figura 7. Expresión relativa de genes en plántulas de *C. illinoensis* inoculadas con *B. paralicheniformis* LBEndo1 en condiciones de estrés salino, utilizando β -Actina como gen de referencia. El análisis ANOVA muestra diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de los genes ($p \leq 0.05$). Las barras con letras distintas indican estas diferencias, señalando una respuesta genética diferencial en presencia de LBEndo1.



4.5.5 Relación en la variación de la expresión génica

Para examinar la relación en la expresión de genes, se generó un heat map acompañado de su dendrograma, como se muestra en la Figura 8. Este análisis revela patrones de expresión similares entre los genes en respuesta a la inoculación con *Bacillus paralicheniformis* LBEndo1 y al estrés salino en *Carya illinoensis*. Las ramificaciones del dendrograma indican que genes como CIL1273S0033 y CIL1264S0041, posiblemente involucrados en la respuesta al estrés y la defensa antioxidante, se sobreexpresan conjuntamente bajo condiciones de estrés salino, indicando una vía de respuesta compartida. De manera similar, los genes asociados al fotosistema II, CIL0840S0001 y CIL1321S0006, también muestran una expresión superior, lo que sugiere una coordinación en la protección ante las ROS y una eficiencia del fotosistema bajo condiciones adversas. Además, los genes CIL1239S0040 y CIL1264S0041 presentan un aumento significativo bajo estrés salino, lo que respalda la hipótesis de que LBEndo1 estimula la señalización del ácido abscísico (ABA). Por último, la expresión elevada de los genes CIL0245S0004 y CIL0900S0005 refleja un aumento en el metabolismo y la producción de energía inducido por LBEndo1.

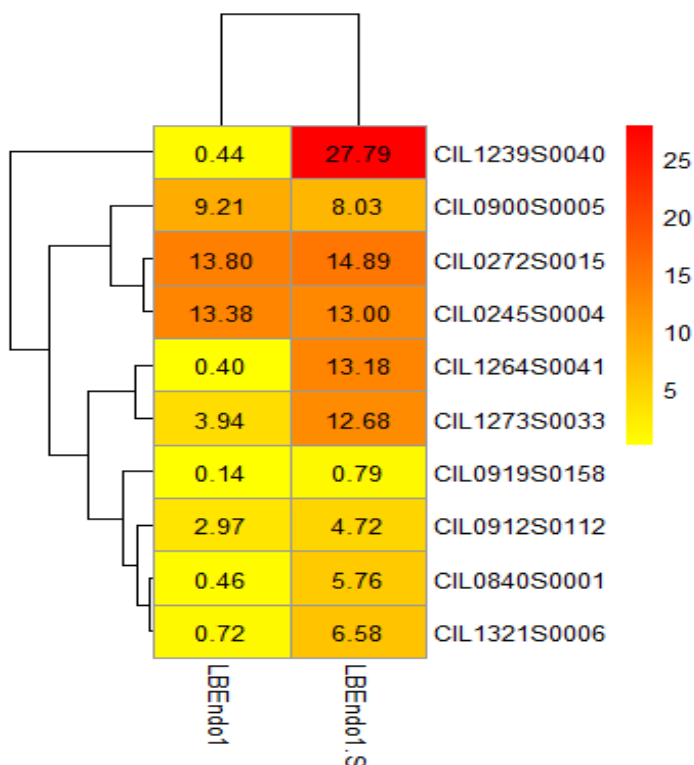


Figura 8. El heat map ilustra la expresión relativa de genes en respuesta a dos tratamientos LBEndo1 y LBEndo1+S. Los datos de expresión relativa, están representados en una escala de color de amarillo a rojo, donde el amarillo indica una menor expresión y el rojo una mayor expresión. Los dendrogramas adjuntos muestran la agrupación jerárquica de genes basada en la similitud de sus patrones de expresión. Los valores ayudan a identificar genes específicos que responden de manera significativa a la inoculación bacteriana.

4.6 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran la capacidad de la rizobacteria *Bacillus paralicheniformis* LBEndo1 para mejorar la tolerancia al estrés salino en *Carya illinoensis* y modular la expresión genética. Estos hallazgos validan la hipótesis inicial que proponía que la inoculación con esta rizobacteria podría conferir ventajas significativas a las plantas bajo condiciones de salinidad, indicando una relación importante entre la presencia de la rizobacteria y la adaptación y eficiencia de las plantas ante el estrés salino. Esta interacción sugiere que *Bacillus paralicheniformis* LBEndo1 podría jugar un rol crucial en la modulación de la respuesta de las plantas a ambientes adversos, potencialmente a través de la optimización del metabolismo energético y la modulación del estrés oxidativo.

Este estudio revela que la presencia de NaCl potencia la producción de exopolisacáridos (EPS) en *Bacillus paralicheniformis* LBEndo1, sugiriendo que esto podría ser un mecanismo defensivo adaptativo. Esta observación es coherente con los hallazgos de Liu et al. (2022b), quienes notaron un aumento en la producción de EPS hasta ciertos niveles de concentración salina, después de los cuales se evidencia una posible saturación o limitación fisiológica. Los análisis sugieren que estos EPS pueden formar barreras que limitan la penetración de iones tóxicos como sodio y cloruro, mitigando así sus efectos nocivos. Adicionalmente, Thakur & Yadav (2024) resaltaron la variabilidad en la producción de EPS entre diferentes cepas, indicando una diversidad en la capacidad adaptativa que podría ser esencial para aplicaciones agrícolas específicas. Por tal razón, se infiere que los EPS actúan no solo como protectores físicos, sino también como moduladores del ambiente rizosférico, influyendo en el equilibrio osmótico y la tolerancia al estrés salino en las plantas hospedadas.

Por otro lado, LBEndo1 también condujo a una notable disminución de Na^+ en las hojas y tallos de *Carya illinoensis* bajo condiciones de estrés salino, mientras que los niveles en las raíces permanecieron estables. Este comportamiento es similar al observado por Li et al. (2021) con la rizobacteria *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 en

Robinia pseudoacacia, lo que sugiere un mecanismo común entre diferentes PGPR para mitigar el estrés salino. Además, Asadullah & Javed (2021) complementaron estos hallazgos al demostrar que las PGPR pueden mejorar la gestión de iones críticos bajo condiciones salinas, enfatizando la capacidad de LBEndo1 para optimizar el equilibrio iónico mediante la modulación del transporte de Na^+ y, posiblemente, K^+ .

En nuestra investigación, observamos que la inoculación bacteriana intensificó significativamente la expresión de los genes CIL0245S0004 y CIL0900S0005 en *Carya illinoensis*, que son esenciales para codificar las subunidades 4 y 7 de la NADH deshidrogenasa, involucradas crucialmente en la síntesis de ATP y en la regulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta sobreexpresión fue evidente tanto en condiciones normales como bajo estrés salino, indicando que LBEndo1 juega un papel crucial en la optimización del metabolismo energético y en la mitigación de la respuesta antioxidante, similar a lo descrito en estudios como el de Ramadan et al. (2021), quienes resaltan cómo el mal funcionamiento de las subunidades del Complejo I puede elevar los niveles de ROS y aumentar la sensibilidad al estrés en *Arabidopsis thaliana*. Además, el estudio de Hayashi et al. (2015) también apoya esta idea, mostrando que la cadena respiratoria, y específicamente la relación NADH/NAD^+ , es vital para la tolerancia a la salinidad en *Zymomonas mobilis*. Estos resultados indican que una función eficiente del Complejo I es clave para manejar los niveles de NADH y minimizar el estrés oxidativo, destacando la importancia de los genes de la NADH deshidrogenasa en la adaptación al estrés salino.

De igual manera, la inoculación con *Bacillus paralicheniformis* LBEndo1 mostró un efecto en la regulación de los genes del fotosistema II, específicamente los que codifican D1 y CP47, en *Carya illinoensis* bajo estrés salino. Se observó un aumento en la expresión de estos genes que sugiere una adaptación que mejora la eficiencia fotosintética y la gestión del estrés oxidativo, mientras que en condiciones normales la expresión fue reducida, indicando una activación específica por el estrés. Estos resultados están alineados con estudios previos; por ejemplo, Shweta

et al. (2012) y Khan et al. (2019) indican que plantas bajo estrés oxidativo pueden tener daños en la proteína D1 del PSII, reduciendo su actividad y afectando la eficiencia fotosintética. Asimismo, Rodrigues et al. (2024) describen cómo, bajo condiciones combinadas de salinidad y calor, se reduce la acumulación de transcritos de estos genes. Estos estudios indican que LBEndo1 influye positivamente para aumentar la resistencia de las plantas al estrés salino, potencialmente mediante la modulación del fotosistema II.

En nuestro estudio, la inoculación con LBEndo1 en *Carya illinoensis* demostró un impacto significativo en la expresión de los genes CIL1239S0040 y CIL1264S0041, ambos críticos para la respuesta al estrés abiótico y la señalización del ácido abscísico (ABA). Se observó que mientras CIL1239S0040 aumentó dramáticamente bajo estrés salino, su expresión fue más baja en ausencia de sal, indicando que LBEndo1 activa este gen principalmente en condiciones adversas. De igual forma, CIL1264S0041, esencial para el cierre estomático y otras adaptaciones mediadas por ABA, también aumentó su expresión bajo estrés salino. Este comportamiento resalta cómo LBEndo1 potencia respuestas adaptativas específicas que mejoran la eficiencia en el uso del agua y la gestión del estrés. Estudios comparativos como los de Davik et al. (2021) y Park et al. (2020) sugieren que estos genes, al igual que sus homólogos en *Arabidopsis*, juegan roles vitales en la regulación de la ubiquitinación y la respuesta al estrés mediante ABA, mostrando un incremento en su expresión en respuesta a estrés por sal y sequía. Así, LBEndo1 no solo facilita una respuesta directa al estrés salino, sino que también refuerza la capacidad antioxidante y la regulación hormonal.

Con respecto al impacto de *Bacillus paralicheniformis* LBEndo1 en la modulación de genes asociados a las proteínas E3 ubiquitina ligasa y RING/U-box en *Carya illinoensis*, destacamos su papel esencial en la respuesta al estrés abiótico. Estos genes, activados bajo estrés salino, están implicados en procesos como la ubiquitinación, que regula la degradación proteica y la señalización celular durante el estrés. A diferencia de lo observado en otras especies como *Arabidopsis* y arroz, donde la sobreexpresión de genes similares puede disminuir la tolerancia al estrés

(Yang et al., 2022), en *Carya illinoensis* la respuesta parece ser favorable, sugiriendo que LBEndo1 facilita una mejor gestión del estrés al afinar la degradación de proteínas mal plegadas. Además, Kim et al. (2021) resaltan que las proteínas U-box E3 desempeñan un rol regulatorio en la degradación proteica en respuesta a señales celulares durante el desarrollo vegetal y respuestas al estrés, lo que ilustra la complejidad de estos sistemas en distintas especies y contextos de estrés. Esta variabilidad y la influencia de fitohormonas como el ABA indican que la inoculación con LBEndo1 podría mejorar la tolerancia al estrés en *Carya illinoensis* mediante la modulación de estas importantes vías proteicas y hormonales.

En nuestro estudio, se reveló una regulación significativa del gen CIL0272S0015, que codifica para la enzima PI4Kb1, esencial en la síntesis y regulación del antiportador Na^+/H^+ para la expulsión de sodio excesivo. Bajo estrés salino, este gen mostró un incremento notable en su expresión, lo que sugiere que LBEndo1 podría estar fortaleciendo la capacidad de las plantas para manejar el estrés salino. Esta observación es consistente con investigaciones previas como la de Yang et al. (2021), que en *Arabidopsis* demostraron que mutantes deficientes en *pi4kb1* experimentaron una sensibilidad aumentada al estrés salino debido a la disminución en el contenido de PI4P y la actividad del antiportador PM Na^+/H^+ . Estos estudios muestran la importancia de PI4Kb1 en la adaptación al estrés salino, indicando que la sobreexpresión inducida por LBEndo1 puede ser una estrategia adaptativa común para mejorar la tolerancia al estrés. Tal activación genética no solo ayuda a las plantas a regular mejor los niveles intracelulares de sodio bajo condiciones de salinidad.

4.7 CONCLUSIONES

El presente estudio integral sobre *C. illinoensis* inoculada con *B. paralicheniformis* LBEndo1 ha demostrado múltiples mecanismos mediante los cuales esta rizobacteria ejerce un efecto protector y promotor de la tolerancia en plantas bajo condiciones de estrés salino. La investigación destacó cómo LBEndo1 influye en la expresión génica, modula la acumulación de sodio, reduce el daño foliar y aumenta

la producción de exopolisacáridos, trabajando sinérgicamente para mejorar la resistencia de la planta a la salinidad.

Primero, la capacidad de LBEndo1 para aumentar la producción de exopolisacáridos sugiere un mecanismo defensivo que probablemente limita la absorción de sodio o crea barreras físicas alrededor de las raíces, reduciendo la entrada de Na⁺ y protegiendo la planta de los efectos deletéreos de la salinidad. Esta función se correlaciona con la observada disminución en la acumulación de Na⁺ en las hojas y tallos de las plantas tratadas, mientras que los niveles en las raíces permanecieron comparables entre tratamientos con y sin LBEndo1 bajo estrés salino. Este patrón destaca una acción selectiva de la rizobacteria, enfocada más en las partes aéreas de la planta.

La expresión diferencial de genes cruciales relacionados con la fotosíntesis, el manejo de ROS, la señalización hormonal, y la respuesta al estrés abiótico bajo la influencia de LBEndo1 apunta a una adaptación molecular profunda. Genes como CIL0245S0004 y CIL0900S0005, implicados en la producción de ATP y la defensa antioxidante, así como CIL0840S0001 y CIL1321S0006 del fotosistema II, mostraron una regulación positiva que contribuye a la eficiencia fotosintética y al manejo del estrés oxidativo. Además, la activación de genes como CIL1239S0040 y CIL1264S0041, relacionados con la señalización del ABA y respuestas adaptativas como el cierre estomático, refuerzan la capacidad de la planta para conservar agua y mantener la homeostasis celular en condiciones adversas.

Finalmente, la notable reducción en el daño foliar en plantas tratadas con LBEndo1 bajo estrés salino resalta la efectividad de la rizobacteria en proteger las partes aéreas de la planta, lo que es consistentemente apoyado por la modulación de la acumulación de sodio y la sobreexpresión de genes protectores y antioxidantes. En conjunto, estos resultados muestran el potencial de *B. paralicheniformis* LBEndo1 como una herramienta biotecnológica viable para el mejoramiento de la tolerancia al estrés salino en *C. illinoensis* y posiblemente en otros cultivos. Esto no solo mejora la sostenibilidad de la agricultura en zonas propensas a la salinización, sino

que también ofrece una estrategia prometedora para la utilización de rizobacterias en el manejo integrado del estrés ambiental en plantas.

4.8 LITERATURA

- Asadullah, A. B., & Javed, H. A. S. S. A. A. N. (2021). PGPR assisted bioremediation of heavy metals and nutrient accumulation in *Zea mays* under saline sodic soil. *Pak J Bot*, 53(1), 31-38.
- Ayash, M., Abukhalaf, M., Thieme, D., Proksch, C., Heilmann, M., Schattat, M. H., & Hoehenwarter, W. (2021). LC–MS based draft map of the *Arabidopsis thaliana* Nuclear Proteome and Protein Import in Pattern Triggered immunity. *Frontiers in plant science*, 12, 744103.
- Baek, D., Rokibuzzaman, M., Khan, A., Kim, M. C., Park, H. J., Yun, D. J., & Chung, Y. R. (2020). Plant-growth promoting *Bacillus oryzicola* YC7007 modulates stress-response gene expression and provides protection from salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 10, 497302.
- Batool, T., Ali, S., Seleiman, M. F., Naveed, N. H., Ali, A., Ahmed, K., ... & Mubushar, M. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports*, 10(1), 16975.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Brunetti, C., Saleem, A. R., Della Rocca, G., Emiliani, G., De Carlo, A., Balestrini, R., ... & Centritto, M. (2021). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria strains producing ACC deaminase on photosynthesis, isoprene emission, ethylene formation and growth of *Mucuna pruriens* (L.) DC. in response to water deficit. *Journal of Biotechnology*, 331, 53-62.
- Campos-Villarreal, A. G., Arreola-Avila, J. G., Chávez-Simental, J. A., Trejo Calzada, R., Borja de la Rosa, A., Lopez Santos, A., & Hernandez Salgado, J. R. (2017). Physiological response, ion accumulation and dry weight of pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch) rootstocks grown under saline stress conditions. *Interciencia*, 42(11), 744-749.
- Chen, X., Wang, T., Rehman, A. U., Wang, Y., Qi, J., Li, Z., ... & Gong, Z. (2021). Arabidopsis U-box E3 ubiquitin ligase PUB11 negatively regulates drought

- tolerance by degrading the receptor-like protein kinases LRR1 and KIN7. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(3), 494-509.
- Cheong, B. E., Beine-Golovchuk, O., Gorka, M., Ho, W. W. H., Martinez-Seidel, F., Firmino, A. A. P., Skirycz, A., Roessner, U., & Kopka, J. (2021). *Arabidopsis* REI-LIKE proteins activate ribosome biogenesis during cold acclimation. *Scientific reports*, 11(1), 2410.
- Davik, J., Wilson, R. C., Njah, R. G., Grini, P. E., Randall, S. K., Alsheik, M. K., & Sargent, D. J. (2021). Genetic mapping and identification of a QTL determining tolerance to freezing stress in *Fragaria vesca* L. *Plos one*, 16(5), e0248089.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Farooq, M. A., Niazi, A. K., Akhtar, J., Farooq, M., Souri, Z., Karimi, N., & Rengel, Z. (2019). Acquiring control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 353-369.
- Hasanuzzaman, M., Raihan, M. R. H., Nowroz, F., & 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(10), 1856.
- Hayashi, T., Kato, T., Watakabe, S., Song, W., Aikawa, S., & Furukawa, K. (2015). The respiratory chain provides salt stress tolerance by maintaining a low NADH/NAD⁺ ratio in *Zymomonas mobilis*. *Microbiology*, 161(Pt_12), 2384-2394.
- Jethva, J., Lichtenauer, S., Schmidt-Schippers, R., Steffen-Heins, A., Poschet, G., Wirtz, M., van Dongen, J. T., Eirich, J., Finkemeier, I., Bilger, W., Schwarzländer, M., & Sauter, M. (2023). Mitochondrial alternative NADH dehydrogenases NDA1 and NDA2 promote survival of reoxygenation stress in *Arabidopsis* by safeguarding photosynthesis and limiting ROS generation. *New Phytologist*, 238(1), 96-112.
- Jian Xin, Q. I. (1990). Determination of Cu, Zn, Fe, Ca, Mg, Na and K in serum flame by atomic absorption spectroscopy. *Varian Instruments at Work*, 1-2.
- Katabuchi, M. (2015). Leaf Area: an R package for rapid digital image analysis of leaf area. *Ecological Research*, 30, 1073-1077.

- Khan, M. A., Hamayun, M., Asaf, S., Khan, M., Yun, B. W., Kang, S. M., & Lee, I. J. (2021). Rhizospheric *Bacillus spp.* rescues plant growth under salinity stress via regulating gene expression, endogenous hormones, and antioxidant system of *Oryza sativa* L. *Frontiers in Plant Science*, 12, 665590.
- Khan, N., Bano, A., Rahman, M. A., Guo, J., Kang, Z., & Babar, M. A. (2019). Comparative physiological and metabolic analysis reveals a complex mechanism involved in drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) induced by PGPR and PGRs. *Scientific reports*, 9(1), 2097.
- Kim, D. Y., Lee, Y. J., Hong, M. J., Kim, J. H., & Seo, Y. W. (2021). Genome wide analysis of U-box E3 ubiquitin ligases in wheat (*Triticum aestivum* L.). *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2699.
- Li, P. S., Kong, W. L., Wu, X. Q., & Zhang, Y. (2021). Volatile organic compounds of the plant growth-promoting rhizobacteria JZ-GX1 enhanced the tolerance of *Robinia pseudoacacia* to salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 12, 753332.
- Li, X., Sun, P., Zhang, Y., Jin, C., & Guan, C. (2020). A novel PGPR strain *Kocuria rhizophila* Y1 enhances salt stress tolerance in maize by regulating phytohormone levels, nutrient acquisition, redox potential, ion homeostasis, photosynthetic capacity and stress-responsive genes expression. *Environmental and Experimental Botany*, 174, 104023.
- Liu, J., Ma, J. Y., Zhang, J. C., Ma, S. L., Wang, Y. H., Nie, H., & Cao, P. X. (2022a). Effects of different soil improvement measures on the growth of *Carya illinoensis* in saline soil in northern Jiangsu Province.
- Liu, X., Chai, J., Zhang, Y., Zhang, C., Lei, Y., Li, Q., & Yao, T. (2022b). Halotolerant rhizobacteria mitigate the effects of salinity stress on maize growth by secreting exopolysaccharides. *Environmental and Experimental Botany*, 204, 105098.
- Miyamoto, S., & Nesbitt, M. (2011). Effectiveness of soil salinity management practices in basin-irrigated pecan orchards. *HortTechnology*, 21, 569–576.
- Nazari, M., & Smith, D. L. (2020). A PGPR-produced bacteriocin for sustainable agriculture: a review of thuricin 17 characteristics and applications. *Frontiers in plant science*, 11, 547681.
- Ojeda-Barrios, D., Benavides-Mendoza, A., Hernández-Rodríguez, A., Orozco-Meléndez, L. R., & Sanchez, E. (2021). Causes, effects, and management of salinity problems in pecan production in North Mexico. In *Saline and Alkaline Soils in Latin America: Natural Resources, Management and Productive Alternatives* (pp. 177-187).

- Orozco-Mosqueda, M. D. C., Duan, J., DiBernardo, M., Zetter, E., Campos-García, J., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2019). The production of ACC deaminase and trehalose by the plant growth promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4 synergistically protect tomato plants against salt stress. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1392.
- Park, S. R., Hwang, J., & Kim, M. (2020). The Arabidopsis WDR55 is positively involved in ABA-mediated drought tolerance response. *Plant Biotechnology Reports*, 14, 407-418.
- Ramadan, A. M., Alnufaei, A. A., Khan, T. K., Ali, H. M., Eissa, H. F., & Hassan, S. M. (2021). The first report of RNA U to C or G editing in the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5 (Nad5) transcript of wild barley. *Molecular Biology Reports*, 48(8), 6057-6064.
- Rodrigues, F., Sousa, B., Soares, C., Moreira, D., Pereira, C., Moutinho-Pereira, J., ... & Fidalgo, F. (2024). Are tomato plants co-exposed to heat and salinity able to ensure a proper carbon metabolism?—An insight into the photosynthetic hub. *Plant Physiology and Biochemistry*, 206, 108270.
- Shavalikohshori, O., Zalaghi, R., Sorkheh, K., & Enaytizamir, N. (2020). The expression of proline production/degradation genes under salinity and cadmium stresses in *Triticum aestivum* inoculated with *Pseudomonas* sp. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17, 2233-2242.
- Shultana, R., Zuan, A. T. K., Naher, U. A., Islam, A. M., Rana, M. M., Rashid, M. H., ... & Hasan, A. K. (2022). The PGPR mechanisms of salt stress adaptation and plant growth promotion. *Agronomy*, 12(10), 2266.
- Mittal, S., Kumari, N., & Sharma, V. (2012). Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant physiology and biochemistry*, 54, 17-26.
- Sierra-Zurita, D., Santana-Espinoza, S., Rosales-Serna, R., Ríos-Saucedo, J. C., & Carrillo-Parra, A. (2023). Productivity and Characterization of Biomass Obtained from Pruning of Walnut Orchards in México. *Energies*, 16(14), 2243.
- Thakur, R., & Yadav, S. (2024). Biofilm forming, exopolysaccharide producing and halotolerant, bacterial consortium mitigates salinity stress in *Triticum aestivum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130049.
- Upadhyay, S. K., Singh, J. S., Saxena, A. K., & Singh, D. P. (2012). Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14(4), 605-611.

- Wang, S., Lv, X., Zhang, J., Chen, D., Chen, S., Fan, G., ... & Wang, Y. (2022). Roles of E3 ubiquitin ligases in plant responses to abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2308.
- Wang, Y., Bian, Z., Pan, T., Cao, K., & Zou, Z. (2021). Improvement of tomato salt tolerance by the regulation of photosynthetic performance and antioxidant enzyme capacity under a low red to far-red light ratio. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 806-815.
- Yan, J., Smith, M. D., Glick, B. R., & Liang, Y. (2014). Effects of ACC deaminase containing rhizobacteria on plant growth and expression of Toc GTPases in tomato (*Solanum lycopersicum*) under salt stress. *Botany*, 92(11), 775-781.
- Yang, Y., Han, X., Ma, L., Wu, Y., Liu, X., Fu, H., Liu, G., Lei, X., & Guo, Y. (2021). Dynamic changes of phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4-phosphate levels modulate H⁺-ATPase and Na⁺/H⁺ antiporter activities to maintain ion homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress. *Molecular Plant*, 14(12), 2000-2014.
- Yang, Y., Karthikeyan, A., Yin, J., Jin, T., Ren, R., Fang, F., ... & Zhi, H. (2022). The E3 ligase GmPUB21 negatively regulates drought and salinity stress response in soybean. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 6893.
- Zhang, J., Jiao, Y., Sharma, A., Shen, D., Wei, B., Hong, C., ... & Pan, C. (2021). Transcriptomic analysis reveals potential pathways associated with salt resistance in pecan (*Carya illinoensis* K. Koch). *Journal of Biotechnology*, 330, 17-26.
- Zhao, Y. P., Shen, J. L., Li, W. J., Wu, N., Chen, C., & Hou, Y. X. (2021). Evolutionary and characteristic analysis of RING-DUF1117 E3 ubiquitin ligase genes in *Gossypium* discerning the role of GhRDUF4D in *Verticillium dahliae* resistance. *Biomolecules*, 11(8), 1145.