



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Evaluación de la capacidad bioestimulante de diferentes
productos de
origen natural.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Celdrán Alcázar, Marina

Tutor/a: Porcel Roldán, Rosa Caridad

Director/a Experimental: BENITO SANTANO, PATRICIA

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

Evaluación de la capacidad bioestimulante de diferentes productos de origen natural

I. Resumen

Español: La agricultura se ve afectada por el cambio climático debido a los cambios en las temperaturas promedio, las precipitaciones, etc. Factores abióticos, como el estrés salino, son unos de los de mayor repercusión en la productividad agrícola de los cultivos. Además, a causa de la variabilidad climática, la demanda de agua y los efectos ambientales socioeconómicos, es urgente tomar medidas para utilizar la cantidad de agua limitada de manera eficiente y desarrollar nuevas estrategias que permitan abastecer a la creciente población mundial. Ante esta problemática, surge la producción y uso de bioestimulantes, un tipo de insumo agrícola compuesto por extractos naturales cuya finalidad es mitigar el estrés salino. Surgen como alternativa a los productos químicos sintéticos para así lograr un sistema agrícola sostenible. Por este motivo, la venta y el uso de insumos agrícolas ambientalmente más sostenibles han aumentado en los últimos años. Sin embargo, hay poca investigación sobre el efecto beneficioso de la aplicación conjunta de bioestimulantes microbianos y no microbianos en cultivos bajo estrés abiótico. Además, las investigaciones publicadas solo han evaluado el efecto de la combinación de estos dos tipos de bioestimulantes en unas pocas especies vegetales, pero no de forma conjunta. En el presente trabajo se evaluaron los efectos a nivel fisiológico, bioquímico y molecular de la aplicación conjunta de la formulación no microbiana CalBio con microorganismos beneficiosos para las plantas, concretamente del tipo bacteriano, en plantas de lechuga bajo condiciones de estrés salino. Se empleó una cepa de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) de *Bacillus megaterium* conocida como BM08. También se llevaron a cabo estudios de contenido hormonal, metabolómica y transcriptómica.

Inglés: Agriculture is affected by climate change due to changes in average temperatures, precipitation, etc. Abiotic factors, such as salt stress, are some of the factors that have the greatest impact on the agricultural productivity of crops. Furthermore, due to climate variability, water demand and socio-economic environmental effects, it is urgent to take measures to use the limited amount of water efficiently and develop new strategies to supply the growing world population. Given this problem, the production and use of biostimulants arises, a type of agricultural input composed of natural extracts whose purpose is to mitigate salt stress. They emerge as an alternative to synthetic chemicals to achieve a sustainable agricultural system. For this reason, the sale and use of more environmentally sustainable agricultural inputs have increased in recent years. However, there is little research on the beneficial effect of co-application of microbial and non-microbial biostimulants in crops under abiotic stress. Furthermore, published research has only evaluated the effect of combining these two types of biostimulants in a few plant species, but not together. In the present work, the effects at the physiological, biochemical and molecular level of the joint application of the non-microbial formulation CalBio with microorganisms beneficial to plants, specifically the bacterial type, in lettuce plants under salt stress conditions are evaluated. A strain of plant growth-promoting bacteria (PGPB) from *Bacillus megaterium* known as BM08 was used. Hormonal content, metabolomics and transcriptomics studies were also carried out.

Palabras clave/Key words: estrés salino, bioestimulantes microbianos, bioestimulantes no microbianos, lechuga, PGPB / salt stress, microbial biostimulants, non-microbial biostimulants, lettuce, PGPB.

Alumna: Dña. Marina Celdrán Alcázar
Tutor académico: Dña. Rosa Caridad Porcel Roldán
Director externo: Dña. Patricia Benito Santano
Valencia, octubre de 2023.

II. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fin de máster no hubiera sido posible sin el apoyo de varias personas e instituciones a las que quiero mostrar mi agradecimiento.

En primer lugar, a mi tutora Prof. Dña. Rosa Caridad Porcel Roldán y a mi directora experimental Dña. Patricia Benito Santano, por sus labores como tutora y directora respectivamente. Gracias por compartir vuestros conocimientos conmigo, enseñarme a ser mejor científica y formarme durante todo este tiempo. Sin vuestra amabilidad, comprensión y empatía, no habría disfrutado y aprendido tanto haciendo este proyecto.

Agradezco también al grupo de investigación donde he realizado este trabajo fin de máster, Estrés Abiótico-Transporte de Potasio en Estrés Abiótico en Plantas y Levaduras y en especial, al catedrático José Miguel Mulet Salort, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo y confiar en mí para este proyecto de investigación.

A mis padres, por su esfuerzo y trabajo incansable. Gracias a ellos, yo he podido estudiar en la Universidad Politécnica de Valencia el máster que quería, lejos de casa y de ellos. También por transmitirme los verdaderos valores que hay que tener para ser una buena profesional: ser buena persona y trabajar duro hasta conseguir todos los objetivos que me proponga. A mi hermano y mi pareja, por apoyarme siempre en todo lo que hago y animarme cuando lo necesito.

A todos aquellos que durante este tiempo han ayudado a que este trabajo fin de máster hoy sea una realidad.

“Los sueños no se cumplen, como quien cumple años. Los sueños se madrugan, se curran, se estudian, se trabajan y un día ese sueño, a lo mejor, se hace realidad”

Toñi Acosta

III. ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Cambio climático y producción de alimentos.....	1
1.2. Estrés salino: causas y consecuencias de la salinización de los suelos.....	1
1.2.1. Efectos del estrés salino en las plantas.....	3
1.3. Mecanismos bioquímicos y moleculares de tolerancia al estrés salino de las plantas.....	4
1.3.1. Transducción de señales.....	5
1.3.2. Regulación hormonal.....	5
1.3.3. Acumulación de solutos compatibles.....	6
1.3.4. Defensa antioxidante.....	7
1.3.5. Homeostasis iónica.....	8
1.3.6. Ingeniería genética para conseguir tolerancia a la salinidad.....	9
1.4. Consecuencias del estrés por salinidad en lechuga.....	9
1.4.1. Uso de bioestimulantes.....	10
1.4.1.1. Extractos de algas marinas (SWE).....	11
1.4.1.2. Carbohidratos, proteínas, aminoácidos y lípidos.....	11
1.4.1.3. Ácidos húmicos y fúlvicos.....	11
1.4.1.4. Microorganismos que influyen en la tolerancia al estrés.....	11
1.4.1.5. Extractos vegetales.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	14
3.2. Diseño experimental y tratamientos aplicados.....	15
3.3. Medición de la conductividad eléctrica del sustrato.....	15
3.4. Colonización microbiana de la rizosfera y endosfera de lechuga.....	15
3.5. Determinación del rendimiento y biomasa total.....	16
3.6. Análisis fisiológicos y bioquímicos realizados en hoja y raíz de plantas de lechuga.....	16
3.6.1. Contenido hídrico relativo (CHR) y eficiencia del uso del agua (EUA).....	16
3.6.2. Conductividad eléctrica foliar.....	17
3.6.3. Pigmentos fotosintéticos y rendimiento del fotosistema II (FSII).....	17
3.6.4. Preparación de los extractos de determinados para el análisis de solutos osmoprotectores y antioxidantes no enzimáticos.....	18
3.6.5. Análisis de osmolitos indicadores de estrés: determinación de la concentración azúcares solubles totales (AST) y prolina.....	18
3.6.6. Análisis de antioxidantes no enzimáticos: determinación del contenido en flavonoides y fenoles totales.....	19
3.6.7. Análisis de antioxidantes enzimáticos indicadores de estrés salino.....	19
3.6.8. Daño oxidativo a lípidos (DOL).....	20
3.6.9. Cuantificación de proteínas.....	21
3.6.10. Determinación del contenido iónico.....	21
3.6.11. Determinación del contenido hormonal.....	21
3.6.12. Análisis de metabolitos primarios.....	21
3.7. Extracción de ARN y ARN-seq.....	22
3.8. Análisis estadístico.....	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. Conductividad eléctrica del sustrato durante la aplicación de estrés salino.....	24

4.2. Colonización microbiana en raíces de lechuga tras la aplicación de bioestimulantes microbianos y no microbianos	25
4.3. Efecto de la aplicación conjunta de CalBio y PGPB en la producción de lechuga	26
4.4. Factor de Alivio del Estrés (SAF) tras la aplicación de bioestimulantes	27
4.5. Efecto de la aplicación conjunta de CalBio y PGPB en el estado fisiológico y bioquímico de las plantas de lechuga	27
4.6. Contenido en fitohormonas en raíces y hojas de lechuga tratadas con CalBio y PGPB bajo condiciones de estrés salino.....	37
4.7. Análisis de la respuesta metabolómica al tratamiento con bioestimulantes microbianos y no microbianos en lechuga.....	40
4.8. Perfiles expresión génica en lechuga en respuesta al tratamiento con bioestimulantes	42
5. CONCLUSIONES	46
ANEXO I	58
ANEXO II	64

IV. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la respuesta de las plantas al estrés por salinidad	3
Figura 2. Visión general de los efectos del estrés salino en plantas	4
Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos de las plantas de tolerancia a estrés salino	5
Figura 4. Representación esquemática de la actividad enzimática antioxidante en respuesta al estrés salino	8
Figura 5. Distribución de las macetas en el invernadero y sistema de riego empleado.	14
Figura 6. Momento de recolección de las lechugas en el invernadero del Centro de Experiencias de Cajamar	15
Figura 7. Conductividad eléctrica del sustrato.....	24
Figura 8. Aislamiento bacteriano de la rizosfera de lechuga.....	25
Figura 9. Producción de la parte comercial de lechuga.	26
Figura 10. Factor de alivio del estrés (SAF) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino.	27
Figura 11. Porcentaje del contenido hídrico relativo (CHR) en hojas de plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes.	28
Figura 12. Eficiencia del uso del agua (EUA) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes.	28
Figura 13. Conductividad eléctrica foliar.....	29
Figura 14. Contenido en pigmentos fotosintéticos y rendimiento del fotosistema II de hojas de lechuga.	30
Figura 15. Acumulación de azúcares solubles totales (AST) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes.	30
Figura 16. Contenido en prolina en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes.	31
Figura 17. Actividad enzimática antioxidante de la superóxido dismutasa (SOD) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes.	33
Figura 18. Actividad enzimática antioxidante de la catalasa (CAT) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes.	33
Figura 19. Actividad enzimática antioxidante de la glutatión reductasa (GR) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes.	34
Figura 20. Actividad enzimática antioxidante de la ascorbato peroxidasa (APX) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes.	34
Figura 21. Contenido en antioxidantes no enzimáticos, flavonoides y fenoles, en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes.	32
Figura 22. Daño oxidativo a en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes.	35

Figura 23. Biplot del análisis de componentes principales (PCA) de los tratamientos con respecto a los parámetros fisiológicos y bioquímicos en condiciones de estrés salino.	36
Figura 24. Mapa de calor agrupado de la correlación de los tratamientos con respecto a los parámetros fisiológicos y bioquímicos en condiciones de estrés salino.	37
Figura 25. Biplot del análisis de componentes principales (PCA) de la correlación de los tratamientos con respecto a las hormonas en condiciones de estrés salino.	38
Figura 26. Mapa de calor agrupado de la correlación de los tratamientos con respecto a las hormonas en condiciones de estrés salino.	39
Figura 27. Diagrama radial del contenido metabólico de la lechuga en valores absolutos.	41
Figura 28. Metabolitos acumulados de forma significativamente diferencial en raíz de lechuga bajo condiciones de salinidad.	42
Figura 29. Genes expresados diferencialmente (GED) en los diferentes tratamientos bioestimulantes vs control.	43
Figura 30. Porcentaje de genes clasificados en diferentes categorías funcionales según las vías de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG).	44

V. ÍNDICE ECUACIONES

Ecuación 1. Biomasa vegetal a partir del % materia seca	16
Ecuación 2. Factor de alivio del estrés (SAF).....	16
Ecuación 3. Porcentaje de contenido hídrico relativo (CHR).....	17
Ecuación 4. Cuantificación de clorofilas.....	17

VI. ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Reacciones catalizadas por enzimas antioxidantes eliminadoras de ROS	7
---	---

VII. ABREVIATURAS

ABA: Ácido abscísico

AG: Ácido gálico

AIA: Ácido indolacético

ALA: Ácido α -linolénico

APX: Ascorbato peroxidasa

ARN-seq: Secuenciación del Transcriptoma Entero para Clonación al Azar

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

ASH: Ácido ascórbico

AST: Azúcares solubles totales

BS: Bioestimulante CalBio

BSA: Albúmina de suero bovino

CAT: Catalasa dismutasa

CDPK: Proteína quinasa dependiente de calcio

CHR: Contenido hídrico relativo

CK: Citoquinas

CT: Control sin bioestimulante

Cytb6f: Complejo citocromo

DHAR: Deshidroascorbato reductasa

DOL: Daño oxidativo a lípidos

DREV/CBF: Factores de transcripción de unión a elementos sensibles a la deshidratación/ C-repetición unión CRT

EBIC: Consejo Europeo de la Industria de Bioestimulantes

EC: Conductividad eléctrica

EUA Eficiencia del uso del agua

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FC: *Fold-change*

Fm: Fluorescencia máxima

FSI: Fotosistema I

FSII: Fotosistema II

Fv: Fluorescencia variable

GA3: Ácido giberélico

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GAs: Giberelinas
GB: Glicina-betaína
GED: Genes expresados diferencialmente
GO: Gene Ontology
GOPX: Guaiacol peroxidasa
GPX: Glutación peroxidasa
GR: Glutación reductasa
GSH: Glutación
GSSG: Glutación oxidado
GST: Glutación-S-transferasa
HBT: Butilhidroxitolueno
IPR: Isopenteniladenosina
JA-Ile: Conjugado de isoleucina JA
JA: Ácido jasmónico
KEGG: Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto
LP: Peroxidación lipídica
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno
MDA: Malondialdehído
MDHAR: Monodeshidroascorbato guaiacol peroxidasa
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT: Nitroazul de tetrazolio
OPDA: Ácido 12-oxo-fitodienoico
PA: Ácido faseico
PCA: Análisis de componentes principales
PF: Peso Fresco
PGPB: Bacterias promotora del crecimiento vegetal
PK: Tampón fosfato de potasio
Pro: Prolina
PS: Peso Seco
PT: Peso turgente
QTL: Locus de rasgo cuantitativo
ROS: Especies Reactivas de Oxígeno
SA: Ácido salicílico
SAF: Factor de alivio del estrés
SOD: Superóxido dismutasa

SWE: Extractos de algas marinas

TBA: Ácido 2-tribarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TSA: Agar tríptico de soja

UHPLC: Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento

UV/Vis: Ultravioleta/visible

YPD: Levadura peptona dextrosa

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cambio climático y producción de alimentos

Las variaciones en las temperaturas y patrones climáticos se traducen en cambios a largo plazo, lo cual, es conocido por las Naciones Unidas como cambio climático (NACIONES UNIDAS, 2023). Estos cambios pueden ser de origen natural. Sin embargo, desde el siglo XIX, las actividades realizadas por el ser humano han sido la principal causa del cambio climático. La actividad más destacada y perjudicial es la referente a la quema de combustibles fósiles como el carbón, petróleo y gas, que generan emisiones de efecto invernadero. Estos gases actúan envolviendo la Tierra, atrapando el calor del sol y elevando las temperaturas. Las principales emisiones de gases de efecto invernadero son el dióxido de carbono y el metano. Estos provienen del uso de combustible por parte de los diferentes medios de transporte, el desmonte de tierras y bosques, la agricultura, la industria, los edificios, etc. (NACIONES UNIDAS, 2023). En consecuencia, en un marco económico caracterizado por el acelerado crecimiento de la población y el aumento de la demanda de alimentos, cuando no hay una disminución de los mismos debido a la destrucción de cultivos y cosechas por causa del cambio climático, el desenlace final es el aumento de la inflación y hambruna global (Vargas, 2011).

Por tanto, el cambio climático y la agricultura con la que obtenemos nuestros alimentos son procesos interrelacionados que tienen lugar a escala global. La agricultura se ve afectada por el cambio climático debido a los cambios en las temperaturas promedio, las precipitaciones y los extremos climáticos (por ejemplo, olas de calor); el aumento de plagas y enfermedades; cambios en las concentraciones atmosféricas de CO₂ y de ozono a nivel del suelo; variaciones en la calidad nutricional de algunos alimentos y cambios en el nivel del mar (Verheye, 2010). En algunos casos, estos cambios generarán un aumento del rendimiento de los cultivos, pero en la mayoría de los casos se producirá una disminución dependiendo de la latitud del área y la aplicación de riego. De entre todos los cambios, los relacionados con las precipitaciones son los que más afectan al rendimiento de los cultivos (Bhattacharya, 2019).

El cambio climático amenaza la disponibilidad de agua debido al cambio en el patrón de precipitaciones especialmente grave en algunas regiones del mundo. A causa de la variabilidad climática, la demanda de agua y los efectos ambientales y sus consecuencias socioeconómicas, es urgente tomar medidas para utilizar la cantidad de agua limitada de manera eficiente y desarrollar nuevas estrategias hídricas. Particularmente, en las zonas más secas, al necesitar un riego intenso se produce una gran pérdida de agua debido a una combinación de evaporación y transpiración dando como resultado tierras muy salinas. Este proceso se conoce como evapotranspiración y, como resultado, la sal presente en el agua de riego se concentra año tras año en el suelo. Esto provoca enormes pérdidas en términos de tierra cultivable y productividad, ya que la mayoría de las especies de cultivos económicamente importantes son muy sensibles a la salinidad del suelo (Mahajan y Tuteja, 2005).

1.2. Estrés salino: causas y consecuencias de la salinización de los suelos

Se denomina estrés a cualquier factor externo abiótico (salinidad, sequía, frío, etc.) o biótico que limita la tasa fotosintética y reduce la capacidad de una planta de convertir energía en biomasa (Grime, 1977). Una menor productividad de los cultivos, en el 50% de los casos, es debida a estreses abióticos. En consecuencia, la agricultura mundial se ve afectada ya que la productividad de los cultivos no aumenta en paralelo con la demanda de alimentos de la creciente población (Munns y Tester, 2008). Por este motivo, reducir las pérdidas de cultivos por

causa de factores estresantes ambientales es uno de los principales objetivos del ser humano (Parihar *et al.*, 2015).

Se conoce como estrés salino al efecto adverso causado por una cantidad excesiva de sal en el suelo, el agua y la planta (Munns, 2005). Este estrés es uno de los factores limitantes más serios para el crecimiento y producción de cultivos y aunque, se ha demostrado que estaba presente antes de que el ser humano existiera, la salinización del suelo se ha incrementado con la agricultura debido a prácticas agrícolas como el riego o el uso descontrolado de insumos con alta conductividad (Zhu, 2001). La alta concentración de sal, en particular su depósito en el suelo, puede alterar la textura básica del suelo resultando en una disminución de la porosidad del mismo y, en consecuencia, una reducción de la aireación del suelo y la conductancia del agua. Además, la fisiología básica del estrés por alta salinidad y el estrés por sequía se superponen entre sí, ya que las altas deposiciones de sal en el suelo generan una zona de bajo potencial hídrico en el mismo, haciendo cada vez más difícil a la planta adquirir tanto agua como nutrientes. Por lo tanto, el estrés salino provoca un déficit de agua en la planta y toma la forma de una sequía fisiológica siendo los principales iones implicados en la señalización del estrés salino Na^+ , K^+ , H^+ y Ca^{2+} (Hussain *et al.*, 2019).

Ahora bien, podemos distinguir entre salinidad natural o primaria y salinidad secundaria o inducida por el hombre. La salinidad primaria se produce como resultado de la acumulación de sales durante largos períodos de tiempo en el suelo o aguas subterráneas y puede deberse a dos procesos naturales: (a) la meteorización de materiales originales que contienen sales solubles y (b) la deposición de sal oceánica transportada por viento y lluvia. Por otro lado, la salinización secundaria resulta de las actividades humanas que cambian el equilibrio hidrológico del suelo entre el agua aplicada (riego o lluvia) y el agua utilizada por los cultivos (transpiración) donde las causas más comunes son (a) el desmonte y la sustitución de la vegetación perenne por cultivos anuales, y (b) los sistemas de riego que utilizan agua rica en sal o que tienen un drenaje insuficiente (Parihar *et al.*, 2015).

La salinidad tiene tal repercusión contribuyendo a la pérdida de productividad de suelos cultivados que, según el Servicio de Gestión de Tierras y Nutrición Vegetal de la FAO, más del 6 % de la tierra del mundo está afectada por la salinidad (FAO, 2023). Aunque es difícil estimarlo con precisión, la superficie de suelos salinizados está aumentando y este fenómeno es especialmente intenso en los suelos irrigados. Se ha estimado que alrededor del 20% (45 millones de hectáreas) de las tierras irrigadas, que producen un tercio de los alimentos del mundo, están afectadas por la salinidad (Shrivastava y Kumar, 2015). Concretamente en la Unión Europea, la salinidad del suelo afecta a más de 1 millón de hectáreas. Estos suelos están situados principalmente en los países mediterráneos, y es una de las principales causas de desertificación. En España, el 3% de los 3,5 millones de hectáreas de regadío se encuentran gravemente afectados, reduciendo notablemente su potencial agrícola, mientras que otro 15% se encuentra en grave riesgo (Stolte *et al.*, 2016). En la región mediterránea española, la degradación de la tierra asociada con la alcalinización del suelo puede empeorar a un ritmo cada vez mayor en las próximas décadas, debido al aumento esperado de las áreas irrigadas y la creciente escasez de agua de buena calidad. Este ritmo puede verse acelerado por el cambio climático, el uso excesivo de aguas subterráneas (principalmente si están cerca del mar), el aumento del uso de agua de baja calidad para riego y la introducción masiva del riego asociado con la agricultura intensiva y el drenaje deficiente (Machado *et al.*, 2017).

Otro factor que contribuye a esta problemática es el agua de riego que agrega cantidades apreciables de sal, incluso con agua de riego de buena calidad. Sin embargo, la cantidad de sal eliminada por los cultivos es insignificante y en consecuencia, se acumula en la rizosfera donde debe ser lixiviada suministrando más agua de la que requieren los cultivos. Además, si el drenaje

no es adecuado, el exceso de agua hace subir el nivel freático movilizandando así las sales que se acumulan en la zona radicular. Consecuentemente, las zonas influenciadas por la salinidad cada vez son mayores y los problemas causados por ésta se están expandiendo a un ritmo muy rápido a causa de las bajas precipitaciones, la alta evaporación superficial, la erosión de las rocas nativas, el riego con agua salina y las malas prácticas agronómicas (Parihar *et al.*, 2015). Por tanto, la salinidad es un problema en casi todos los continentes y en una amplia gama de climas. Aunque, es mayor en los climas áridos y semiáridos que en los climas húmedos, donde las precipitaciones anuales no están equilibradas con la evapotranspiración en el mundo (Hussain *et al.*, 2019).

1.2.1. Efectos del estrés salino en las plantas

En un ambiente salino, el crecimiento de plantas glicófitas (sensibles a la sal) se ve afectado en forma de dos fases: fase osmótica (respuesta temprana) y fase iónica (respuesta tardía) (Munns y Tester, 2008). La fase temprana del estrés salino se debe a la acumulación de sales fuera en la zona de la raíz, mientras que el estrés salino en la fase tardía es el resultado del efecto tóxico de la sal dentro de la planta (Munns, 2005). La respuesta temprana al estrés por salinidad da como resultado la inhibición de la absorción de agua, el crecimiento de las raíces, el alargamiento de las células, el desarrollo de las hojas, la reducción de hojas nuevas y el daño a las células en las hojas en transpiración, etc. Por otro lado, la respuesta a largo plazo al estrés por salinidad, se genera por los efectos tóxicos de la sal dentro de la planta tales como el secuestro de sal en hojas más viejas causando la senescencia prematura de las hojas, la inhibición de la fotosíntesis y de las actividades enzimáticas (Figura 1) (Munns, 2005; De Oliveira *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2014).

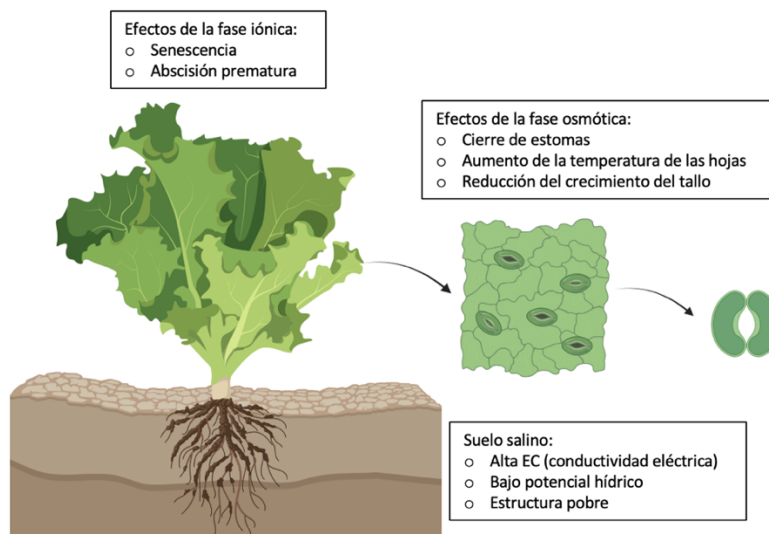


Figura 1. Representación esquemática de la respuesta de las plantas al estrés por salinidad (Modificada de Mukhopadhyay *et al.*, 2021).

La tasa fotosintética también se ve afectada de forma directa por el estrés salino mediante la disminución de la disponibilidad de CO₂ a causa de la limitada difusión a través de los estomas y el transporte de CO₂ en el mesófilo, así como por alteraciones en el metabolismo fotosintético o secundario, como el estrés oxidativo que surge de la superposición de múltiples estreses. La senescencia de las hojas es el último paso a medida que los nutrientes depositados en las hojas circulan a otros órganos en desarrollo (Chaves *et al.*, 2009). Por ende, el estrés salino produce senescencia temprana de las hojas, reducción de la tasa fotosintética y disminución de la acumulación de nutrientes, lo que en última instancia resulta en una reducción de la productividad de los cultivos (Figura 2).



Figura 2. Visión general de los efectos del estrés salino en plantas (Modificada de Muchate et al., 2016).

El estrés salino también implica la producción por parte de la planta de especies reactivas de oxígeno (ROS) como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH) y oxígeno singlete (1O_2) (Jithesh *et al.*, 2006; Luo y Liu, 2011). Estas ROS alteran el metabolismo normal de los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos mediante daño oxidativo (Srivastava y Suprasanna, 2015). La homeostasis redox es el regulador central del crecimiento y desarrollo de las plantas. Dado que la mayoría de los estreses abióticos y bióticos causan un desequilibrio redox dentro de las plantas, el funcionamiento de estos procesos dependientes de redox se altera, lo que lleva a una reducción del crecimiento de las plantas y del rendimiento de los cultivos (Srivastava y Suprasanna, 2015).

El metabolismo de los lípidos también se ve fuertemente afectado por el estrés salino al influir en la biosíntesis de lípidos esenciales. Los lípidos son los componentes estructurales de la membrana celular que desempeñan un papel importante en la tolerancia a varios factores estresantes fisiológicos, la biogénesis del aparato fotosintético en los cloroplastos en desarrollo y como fuente de almacenamiento de energía en forma de triacilglicerol (Rahdari y Hoseini, 2011; Chapman *et al.*, 2012). La exposición de la planta al estrés por salinidad reduce el monogalactosildiglicérido (MGDG) en la hoja, lo que resulta en la destrucción de la membrana del cloroplasto (Rahdari y Hoseini, 2011). Bajo estrés salino, la absorción de Na^+ compite con la absorción de K^+ , lo que resulta en un exceso de secuestro citoplasmático de Na^+ en lugar de Cl^- dentro de la célula. El aumento de la concentración de Na^+ y Cl^- disminuye la absorción de los niveles de Ca^{2+} , K^+ y Mg^{2+} en varias plantas y también afecta la relación K^+/Na^+ (Serrano et al., 1999).

1.3. Mecanismos bioquímicos y moleculares de tolerancia al estrés salino de las plantas

Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de respuesta al estrés salino del tipo fisiológicas, moleculares y bioquímicas. Por un lado, la respuesta fisiológica se centra en reducir el potencial hídrico de las hojas, la pérdida de turgencia, la disminución de la conductancia de los estomas, la reducción de la concentración interna de CO_2 y de la tasa fotosintética, la reducción del crecimiento y la senescencia de las hojas. Por otro lado, la respuesta bioquímica se basa en cambios en las rutas fotosintéticas, en aumentar la actividad enzimática antioxidante (SOD, APX, GR, GPX y CAT), en la inducción de hormonas (ABA, JA, etileno), en la homeostasis iónica y la acumulación de osmolitos (prolina, glicina-betaína y AST). De esta forma, se confiere protección osmótica e iónica contra la salinidad que implica una acumulación selectiva o exclusión de iones, un control de la absorción de iones por las raíces y su transporte hacia las hojas, compartimentación de iones a nivel celular y de toda la planta, síntesis de solutos

compatibles, cambios en la vía fotosintética y la inducción de enzimas antioxidantes y hormonas vegetales (Figura 3)(Parida y Das 2005; Roy *et al.*, 2014).

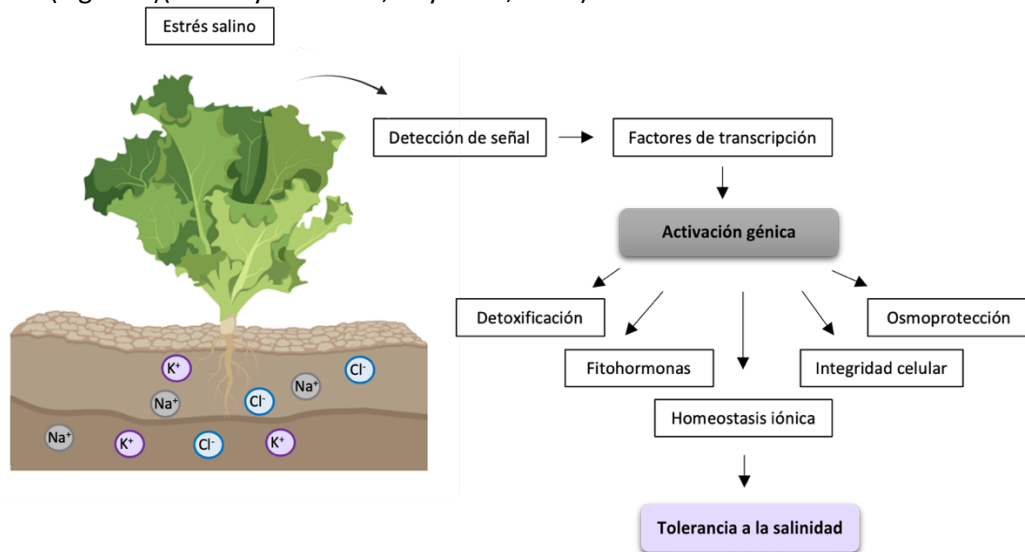


Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos de las plantas de tolerancia a estrés salino (Modificada de Muchate *et al.*, 2016).

1.3.1. Transducción de señales

Las plantas son capaces de adaptarse al estrés por salinidad gracias a que éstas son capaces de percibir el estrés, transducir las señales y los cambios metabólicos (Mantri *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2015). En condiciones de estrés salino, las plantas perciben las señales y las transmiten a la maquinaria celular para activar la respuesta adaptativa. La vía general de transducción de señales comienza con la percepción de señales (receptores) y, en consecuencia, la generación de segundos mensajeros como Ca^{2+} , fosfato de inositol, ROS y fitohormonas (Xiong *et al.*, 2002). La cascada de señalización implica fosforilación y desfosforilación de proteínas, metabolismo de los fosfolípidos y detección de Ca^{2+} (Agarwal *et al.*, 2013). Estos segundos mensajeros regulan el nivel intracelular de Ca^{2+} que inicia las cascadas de fosfoproteínas (Agarwal *et al.*, 2013). Estas cascadas se dirigen a las proteínas que llevan la función de protección celular y también a los factores transcripcionales que regulan los genes de estrés, como los implicados en la síntesis o regulación de moléculas (Xiong *et al.*, 2002). Ejemplos de estas moléculas son el ácido abscísico (ABA), el etileno y el ácido salicílico (SA) que son responsables de la segunda ronda de señalización (Xiong *et al.*, 2002).

También, bajo estrés salino, la regulación de la homeostasis de los iones es fundamental para la tolerancia a la sal de las plantas. El aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico (Xiong *et al.*, 2002) y la posterior activación de la expresión y/o actividad de la proteína sensora de Ca^{2+} , se considera una respuesta significativa al estrés salino. La amplitud, frecuencia y duración del pico del proceso de señalización de Ca^{2+} citosólico pueden variar con el estrés y el tipo de tejido (Kiegle *et al.*, 2000).

1.3.2. Regulación hormonal

El crecimiento y desarrollo de las plantas está influido por fitohormonas. Para hacer frente al estrés por salinidad durante las diferentes etapas de desarrollo de una planta, se inducen o se regulan sus niveles de fitohormonas. Son ejemplos de hormonas vegetales reguladas el ácido

abscísico (ABA), el ácido indolacético (AIA), el ácido giberélico (GA), el ácido jasmónico (JA), el ácido salicílico (SA), los brasinoesteroides y el etileno (Ryu y Cho, 2015).

El ácido abscísico (ABA) desempeña un papel importante en condiciones de estrés salino debido a su rápida acumulación en respuesta al estrés. Esta hormona vegetal regula el estado hídrico de la planta a través de células protectoras y ayuda a superar los diferentes efectos adversos de la salinidad sobre el crecimiento, la fotosíntesis y la translocación de asimilados (Mahajan y Tuteja, 2005). Bajo estrés salino, se ha observado una mayor acumulación de ABA en el brote y la raíz, pudiendo mitigar los efectos adversos del estrés salino en la fotosíntesis, el crecimiento y la translocación de asimilados (Cramer y Quarrie, 2002; Cabot *et al.*, 2009). También el ABA posee un papel crucial en la señalización celular que regula la expresión de genes que responden al déficit de sal y agua. Además, la acumulación de ABA se ha atribuido a la mejora del contenido de K^+ , Ca^{2+} , prolina y azúcares en las vacuolas de la raíz en respuesta al estrés salino (Chen *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que los ácidos jasmónicos (JA) poseen un papel positivo como regulador de la tolerancia a la sal. También es el caso del etileno, hormona gaseosa que regula el crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones de estrés. Además, se ha investigado que la sobreexpresión de varios genes inducibles por etileno y JA mejoran tolerancia al estrés en diferentes especies sin efectos adversos en el desarrollo de las plantas, lo cual, podría ser empleado en la mejora genética de la tolerancia al estrés en plantas (Kazan, 2015).

1.3.3. Acumulación de solutos compatibles

La mayoría de las plantas aumentan la concentración celular de compuestos osmóticamente activos en condiciones de estrés (Penna *et al.*, 2005). Los solutos compatibles son hidrófilos y reemplazan el agua en la superficie de proteínas, complejos proteicos o membranas y no interfieren con el mecanismo bioquímico normal de la célula (Penna *et al.*, 2005). De esta forma, alivian los efectos inhibidores de altas concentraciones de iones sobre la actividad enzimática. Los aminoácidos y algunos derivados de aminoácidos, azúcares, polioles acíclicos y cíclicos, fructanos y compuestos de aminoácidos cuaternarios, ectoína y sulfonio actúan como solutos compatibles (Penna *et al.*, 2005). Estos solutos compatibles desempeñan una función osmorreguladora que se acumula en respuesta al estrés osmótico. Sin embargo, algunos solutos como la trehalosa, no responden al estrés osmótico pero son protectores incluso en concentraciones bajas y pueden funcionar como osmoprotectores (Slama *et al.*, 2015) o pueden tener una función señalizadora (Mulet *et al.*, 2004). Por otro lado, el manitol en bajas concentraciones ayuda a reducir el daño al generar radicales hidroxilo en los cloroplastos (Slama *et al.*, 2015). También se ha descubierto que otros solutos compatibles, en altas concentraciones, reducen los efectos inhibidores de los iones sobre la actividad enzimática (Slama *et al.*, 2015). La estabilización de proteínas, complejos o membranas proteicas y la eliminación de radicales de oxígeno son la función principal de los solutos compatibles (Penna *et al.*, 2005).

De todos los solutos compatibles, la acumulación de prolina es una respuesta adaptativa común a diversos estreses abióticos (Akula y Ravishankar, 2011). Varios estudios han demostrado que el metabolismo de la prolina tiene un efecto complejo sobre el desarrollo y las respuestas al estrés (Szabados y Savoure, 2009; Suprasanna *et al.*, 2014). Además, la acumulación de este aminoácido es importante para la tolerancia a ciertas condiciones ambientales adversas (Szabados y Savoure, 2009; Suprasanna *et al.*, 2014). La prolina se concentra en el citosol, el cloroplasto, el citoplasma y las vacuolas (Szabados y Savoure, 2009). Desempeña una función importante como ajuste osmótico. Actúa desintoxicando especies reactivas de oxígeno, como antioxidante, estabilizante de proteínas y complejos proteicos (Szabados y Savoure, 2009). Además de su papel en la tolerancia a la salinidad, la prolina actúa como una molécula reguladora o de señalización para mantener las reservas de metabolitos y el equilibrio redox y

controla la expresión genética (Szabados y Savoure, 2009). Por otro lado, la glicina-betaína (GB), también es un soluto compatible destacado que se encuentra en el cloroplasto y desempeña un papel importante en el ajuste osmótico, la protección de la membrana tilacoide, la protección del cloroplasto y el fotosistema II (FSII) en condiciones de estrés como el salino (Ashraf y Harris, 2003).

1.3.4. Defensa antioxidante

Las plantas han desarrollado mecanismos de eliminación de ROS, incluidas vías de defensa enzimáticas y no enzimáticas para contrarrestar los efectos adversos de los compuestos ROS (Tabla 1, Figura 4) (Jithesh *et al.* 2006; Gill y Tuteja 2010).

Tabla 1. Reacciones catalizadas por enzimas antioxidantes eliminadoras de ROS (Modificada de Muchate *et al.*, 2016).

Antioxidantes enzimáticos	Reacciones catalizadas
Superóxido dismutasa (SOD) EC 1.15.1.1	$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Catalasa (CAT) EC 1.11.1.6	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$
Ascorbato peroxidasa (APX) EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$
Guaiacol peroxidasa (GPX) EC 1.11.1.7	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$
Monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR) EC 1.6.5.4	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow AA + NAD(P)^+$
Deshidroascorbato reductasa (DHAR) EC 1.8.5.1	$DHA + 2GSH \rightarrow AA + GSSG$
Glutación reductasa (GR) EC 1.8.1.7	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$

Son enzimas antioxidantes la catalasa (CAT), la glutación reductasa (GR), la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX), la monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), la deshidroascorbato reductasa (DHAR), la glutación peroxidasa (GPX), la guaiacol peroxidasa (GOPX) y la glutación-S-transferasa (GST) (Jithesh *et al.* 2006; Gill y Tuteja 2010). Además de las enzimas antioxidantes, los antioxidantes no enzimáticos como el ácido ascórbico (ASH), el glutación (GSH), los compuestos fenólicos, los alcaloides, los aminoácidos no proteicos, el alfa-tocoferol, los flavonoides y los carotenoides también desempeñan un papel esencial en la eliminación de radicales libres (Jithesh *et al.* 2006; Gill y Tuteja 2010).

Dentro de las enzimas antioxidantes, encontramos a la SOD que metaboliza los radicales de oxígeno (O_2) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), protegiendo a las células vegetales de los posibles daños (Tabla 1, Figura 4) (de Azevedo Neto *et al.*, 2006). Es una de las enzimas más importantes del tipo antioxidante en el mecanismo de defensa contra la toxicidad de los radicales libres, que aprovecha la desproporción de los radicales superóxido para producir H_2O_2 . También es el caso de las catalasas que, bajo estrés salino y estrés abiótico, eliminan el H_2O_2 durante la β -oxidación de los ácidos grasos y participan en funciones fotorrespiratorias. La acción de este tipo de enzimas es indispensable para la desintoxicación de ROS y tienen el potencial de convertir directamente H_2O_2 en H_2O y O_2 (Tabla 1, Figura 4). Además, la APX realiza la misma función que las catalasas, pero catalizan la eliminación de H_2O_2 utilizando ascorbato como reductor. En el caso de la GR, cataliza la reducción dependiente de NADPH del glutación oxidado. En diversas investigaciones, se ha observado que la actividad de GR es alta en las hojas de plantas estresadas por salinidad en comparación con las hojas de plantas en condiciones control (de Azevedo Neto *et al.*, 2006).

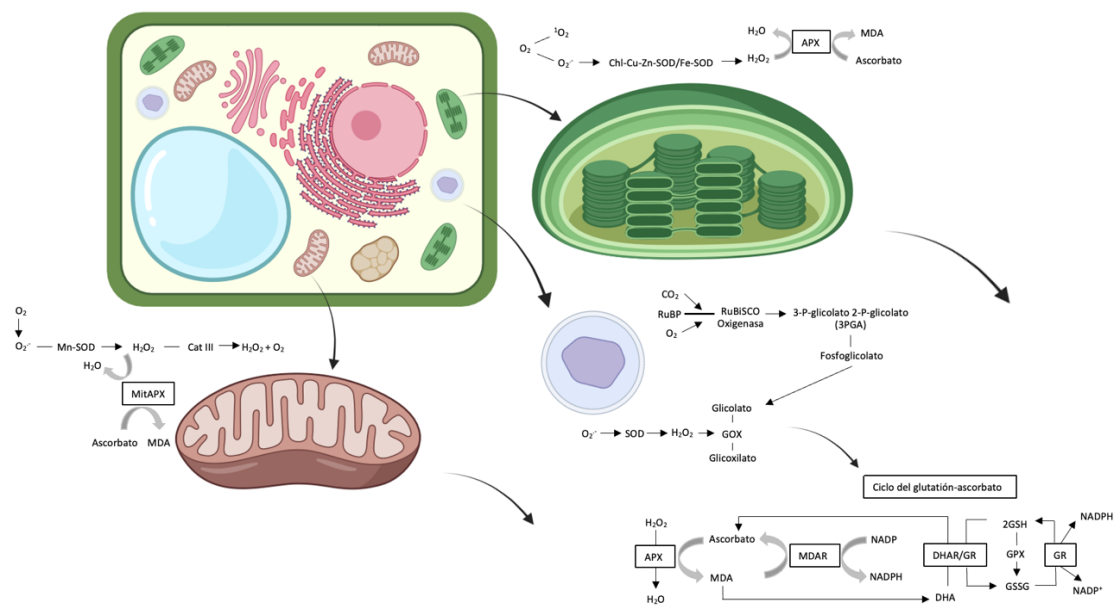


Figura 4. Representación esquemática de la actividad enzimática antioxidante en respuesta al estrés salino (Modificada de Muchate et al., 2016).

Por otro lado, entre los antioxidantes no enzimáticos, destaca el ASH ya que es un antioxidante soluble en agua que se encarga de prevenir o minimizar el daño por ROS en las plantas y está presente en todos los tejidos vegetales, aunque generalmente en mayor cantidad en las células fotosintéticas y los meristemos. En cambio, el GSH es uno de los metabolitos cruciales en las plantas y es considerado el más importante en la defensa intracelular contra el daño oxidativo inducido por ROS. También está involucrado en procesos fisiológicos como la transducción de señales, así como en eventos relacionados con el crecimiento y el desarrollo de las plantas como la diferenciación celular. También son ejemplo de antioxidantes no enzimáticos los flavonoides, metabolitos secundarios de las plantas más activos. Éstos se localizan en las hojas, las partes florales y en el polen y actúan eliminando ROS al localizar y neutralizar los radicales antes de que dañen a la célula (Gill y Tuteja, 2010).

1.3.5. Homeostasis iónica

El efecto de la salinidad se minimiza restringiendo la entrada de sales a la planta o minimizando la concentración de Na^+ en el citoplasma, es decir, excluyendo sal o secuestrando Na^+ dentro de la vacuola (Chinnusamy et al., 2005). Las plantas perciben el estrés salino mediante señales de estrés iónico (Na^+) y osmótico. En condiciones de estrés salino, el ajuste osmótico comienza ya sea por compartimentación del Na^+ en la vacuola o por la acumulación de solutos compatibles. El secuestro de Na^+ en la vacuola depende de la actividad de los antiportadores Na^+/H^+ y de las fosfatasa como $\text{H}^+ \text{-ATPasa}$ de tipo V y $\text{H}^+ \text{-Ppasa}$ (Chinnusamy et al., 2005). El exceso de iones Na^+ se puede detectar en la superficie de la membrana plasmática a través de proteínas transmembrana, proteínas de la membrana celular o enzimas sensibles al Na^+ (Zhu, 2003). En condiciones de estrés salino, la entrada de Na^+ a través de canales iónicos no específicos puede provocar la despolarización de la membrana, lo que activa los canales de Ca^{2+} y, por tanto, activa las señales de estrés salino (Seki et al., 2002). El Na^+ entra al citosol de las células de la raíz mediante canales catiónicos o transportadores que pueden ser selectivos o no, y posteriormente entran en la corriente del xilema de la raíz a través de una vía apoplástica que varía según la especie (Chinnusamy et al., 2005). El exceso de acumulación de Na^+ citosólico y de transporte de Na^+ hacia los brotes se mantiene mediante el flujo de salida de Na^+ desde la raíz (Chinnusamy et

al., 2005). También se han descrito varias vías simplásticas de entrada de Na⁺ a través de la raíz por competencia con transportadores de potasio (Mulet *et al.*, 2023).

Por otro lado, el estrés salino regula positivamente la biosíntesis de ABA (Xiong y Zhu, 2003) y la acumulación de especies ROS (Hernández *et al.*, 2001). Tanto el ABA como las ROS regulan la homeostasis osmótica e iónica y también los procesos de reparación y control de daños (Chinnusamy *et al.*, 2005). La prevención del exceso de entrada de Na⁺ y/o la regulación de la absorción de K⁺, la salida de Na⁺ de la célula y la utilización de Na⁺ para el ajuste osmótico son las estrategias comúnmente utilizadas por las plantas para mantener las proporciones citosólicas deseables de K⁺/Na⁺ (Zhu, 2002).

1.3.6. Ingeniería genética para conseguir tolerancia a la salinidad

Los mecanismos utilizados por las plantas para tolerar el estrés salino a nivel genético no han sido totalmente descritos debido a su complejidad (Allen *et al.*, 1994). Sin embargo, existen varios genes que controlan la tolerancia a la salinidad en diferentes especies cuyo efecto interactúa fuertemente con las condiciones ambientales (Allen *et al.*, 1994). Por este motivo, la variación genética solo puede demostrarse de forma indirecta midiendo las respuestas de diferentes genotipos. En ese caso, la respuesta más adecuada para medir sería la basada en el crecimiento o rendimiento especialmente a salinidades moderadas (Allen *et al.*, 1994).

A lo largo del tiempo, la mejora vegetal para conseguir tolerancia a la salinidad se ha centrado en la mejora tradicional. Sin embargo, aunque ha tenido éxito, su progreso ha sido lento y está limitado a la herencia poligénica (Silva y Gerós, 2009). Además, la susceptibilidad o tolerancia a la salinidad es una acción coordinada de múltiples genes de respuesta al estrés que también interactúan con otros componentes de las vías de transducción de señales de estrés (Silva y Gerós, 2009). Por tanto, los enfoques tradicionales presentan la dificultad de identificar las regiones genómicas que controlan la resistencia más conocidos como locus de rasgo cuantitativo (QTL). Esta problemática ha sido solventada gracias a la tecnología de marcadores moleculares, la cual, ha permitido el desarrollo de métodos de genotipado de alto rendimiento capaces de analizar los QTL responsables de la tolerancia (Silva y Gerós, 2009).

En los últimos años, una de las principales estrategias para mejorar la tolerancia a la salinidad ha sido la sobreexpresión de genes individuales que son inducidos por el estrés y/o se ha demostrado que son necesarios para niveles normales de tolerancia (Kishor *et al.*, 1995; Holmström *et al.*, 2000). Son ejemplo de ello las plantas transgénicas que sobreexpresan genes que participan en la síntesis o acumulación de osmoprotectores que intervienen en el ajuste osmótico como la prolina, la glicina-betaína y otros osmolitos mostrando así mayor tolerancia a la salinidad (Kishor *et al.*, 1995; Holmström *et al.*, 2000). También pueden modificarse para mejorar la tolerancia a la salinidad genes que codifican enzimas implicadas en la protección oxidativa como la GST, la APX, la SOD, la ASH y la GSH (Yang *et al.*, 2009). Del mismo modo, la sobreexpresión de genes reguladores en vías de señalización, como los factores de transcripción (DREB/CBF) y las proteínas quinasas (MAPK, CDPK), también aumenta la tolerancia a la salinidad de las plantas (Chen *et al.*, 2010). Un gran ejemplo es la sobreexpresión del antiportador vacuolar de Na⁺/H⁺ que ha demostrado mejorar la tolerancia a la salinidad en varias plantas (Silva y Gerós, 2009). Otra estrategia es mejorar el transporte de potasio para impedir la entrada de sodio (Mulet *et al.*, 2023).

1.4. Consecuencias del estrés por salinidad en lechuga

La lechuga (*Lactuca sativa*) es uno de los cultivos hortícolas de mayor producción nacional y es consumido habitualmente en forma de ensaladas. En la actualidad, existe una gran demanda por los productos vegetales de cuarta gama (corresponden a frutas, vegetales y hortalizas mínimamente procesadas) por ser alimentos saludables, frescos y listos para consumir. El principal componente de los vegetales de cuarta gama es la lechuga. Sin embargo, la producción de lechuga se ve limitada principalmente por la salinidad del suelo (Niñirola *et al.*, 2014; Coll *et al.*, 2009). Este es el caso de las zonas áridas y semiáridas del sureste español donde, el desequilibrio hídrico del suelo causado por la escasez de precipitaciones y/o el riego con agua salobre combinado con una intensa evapotranspiración y un drenaje inadecuado, pueden removilizar las sales a las capas superiores del suelo provocando una salinización secundaria del mismo (Cuevas *et al.*, 2019; Zahedi *et al.*, 2021). Por este motivo, la salinidad es una preocupación creciente en muchas regiones productoras de lechuga.

La sensibilidad de la lechuga a la salinidad es tal que su crecimiento se ve reducido a una conductividad eléctrica (EC) de alrededor 2dS/m (Cahn y Ajwa, 2004). Una salinidad igual o superior a esta EC, reduce la biomasa vegetal, aumenta la aparición de quemaduras foliares, disminuye el contenido de agua en las hojas, inhibe la germinación de las semillas, reduce la eficiencia fotosintética y aumenta la concentración de iones como cloruro y sodio y la peroxidación lipídica. Además, al ser la lechuga una fuente importante de vitaminas, carotenoides, antioxidantes, ácido cafeico y flavonoles (Humphries y Khachik, 2003; Nicolle *et al.*, 2004), la disminución en la producción de esta hortaliza, puede provocar una crisis alimentaria.

Ante esta problemática, surge la producción y uso de bioestimulantes, un tipo de insumo agrícola compuesto por extractos naturales cuya finalidad es mitigar el estrés salino (Abdelkader *et al.*, 2021). Surgen como alternativa a los productos químicos sintéticos para así lograr un sistema agrícola sostenible (Abdelkader *et al.*, 2021).

1.4.1. Uso de bioestimulantes

El Consejo Europeo de la Industria de Bioestimulantes (EBIC) define los bioestimulantes como sustancias y/o microorganismos cuya función, cuando se aplican a cultivos o a la rizosfera, es estimular procesos naturales para mejorar/beneficiar la absorción de nutrientes, la eficiencia de los nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y calidad de los cultivos (EBIC, 2019). Son diferenciados de los agroquímicos por solo influir en el vigor de las plantas y no tener acción directa contra plagas ni enfermedades (Drobek *et al.*, 2019). Además, los bioestimulantes no pueden definirse como fertilizantes porque no proporcionan nutrientes directamente a las plantas (Drobek *et al.*, 2019). Más bien, facilitan de manera única la absorción de nutrientes existentes, mejoran la resistencia al estrés abiótico como la salinidad o la sequía y contribuyen a una producción sostenible de alto rendimiento y bajos insumos. También, ayudan a mejorar atributos de alto valor agrícola como son el contenido nutricional, la apariencia y la vida útil ya que son fuentes ricas en minerales, hormonas de crecimiento vegetal, antioxidantes y metabolitos secundarios que afectan los procesos fisiológicos y bioquímicos, inducen tolerancia al estrés, mejoran el crecimiento de las plantas y optimizan la productividad (ur Rehman *et al.*, 2018).

Los bioestimulantes vegetales han sido clasificados en no microbianos (quitosano, ácidos húmicos y fúlvicos, hidrolizados de proteínas, sales inorgánicas, antitranspirantes, extractos de algas marinas, etc.) y microbianos (hongos micorrízicos arbusculares, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, *Trichoderma spp.*). Además, se pueden agrupar a su vez en tres grupos

según su finalidad: (a) promotores/inhibidores del crecimiento de las plantas, (b) aliviadores del estrés y (c) acción combinada (Colla y Rouphael, 2015).

1.4.1.1. Extractos de algas marinas (SWE)

Las algas marinas son un grupo grande e incluyen algas marinas macroscópicas y algas multicelulares que pertenecen a diferentes grupos taxonómicos, como algas marrones, rojas y verdes. Son una fuente importante de nutrientes, compuestos bioactivos, materia orgánica y fertilizantes (Khan *et al.*, 2009). Las algas se han utilizado en la agricultura desde la antigüedad como fertilizantes por sus efectos positivos en los cultivos y actualmente, se explotan en la agricultura como acondicionadores del suelo o como bioestimulantes de plantas. Cuando se utilizan como bioestimulantes, se aplican como tratamientos foliares y su efecto biológico se manifiesta al mejorar el crecimiento, el rendimiento de los cultivos, la calidad del producto y al aumentar la tolerancia al estrés abiótico. Los bioestimulantes a base de algas también contienen hormonas vegetales y muchos compuestos minerales y bioactivos, incluidos polisacáridos complejos como laminarina, fucoidan y alginatos (Bulgari *et al.*, 2019; Youssef y Colla, 2020).

1.4.1.2. Carbohidratos, proteínas, aminoácidos y lípidos

Los hidrolizados de proteínas son una mezcla de compuestos como aminoácidos, péptidos y polipéptidos que pueden obtenerse mediante hidrólisis química, enzimática y térmica de proteínas a partir de matrices biológicas complejas (Colla *et al.*, 2015). Muchos estudios realizados en cultivos hortícolas han informado que las aplicaciones de hidrolizados de proteínas de origen tanto animal como vegetal pueden mejorar el crecimiento de los cultivos y su tolerancia al estrés abiótico (Colla *et al.*, 2015). Sin embargo, la falta de información sobre la composición de los hidrolizados de proteínas sigue siendo un punto crucial para definir sus mecanismos de acción a nivel molecular y bioquímico (Franzoni *et al.*, 2022).

1.4.1.3. Ácidos húmicos y fúlvicos

Las sustancias húmicas son principalmente ácidos húmicos y fúlvicos. Son encontrados naturalmente en la sustancia orgánica del suelo ya que resultan de los procesos de descomposición de plantas, animales y microorganismos, y también son modificados por la actividad metabólica de los microbios del suelo (Nardi y Francioso, 2021). Diferentes estudios demuestran que los tratamientos con sustancias húmicas pueden estimular el crecimiento y desarrollo de las raíces de las plantas (Nardi y Francioso, 2021; Benito *et al.*, 2023). Estos efectos son consecuencia de la mejora en la absorción de nutrientes y/o agua y a una mayor tolerancia al estrés ambiental, así como a su efecto sobre el metabolismo de las plantas. Sin embargo, todavía se investiga cómo las sustancias húmicas afectan a la fisiología de las plantas debido a la complejidad molecular de estas sustancias y a la abundancia y diversidad de respuestas de las plantas alteradas por su aplicación. Los efectos positivos ejercidos por estos agregados podrían atribuirse tanto a la actividad hormonal de algunos de sus componentes como a otros mecanismos independientes (Yakhin *et al.*, 2017).

1.4.1.4. Microorganismos que influyen en la tolerancia al estrés

Este grupo incluye principalmente bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Kour *et al.*, 2019). Son aislados del suelo, plantas y otros materiales orgánicos y se aplican al suelo o a las semillas pudiendo tener una acción directa o indirecta en el aumento de la productividad de los cultivos. Los microorganismos pueden tener una acción directa sobre el cultivo mediante el establecimiento de una asociación simbiótica mutua (por ejemplo, micorrizas), o indirectamente

umentando la biodisponibilidad de los nutrientes para las plantas. Los microorganismos *Azotobacter spp.*, *Mycorrhiza*, *Rhizobium spp.* y *Azospirillum spp.* se reconocen como bioestimulantes en la Unión Europea (Colla *et al.*, 2015).

1.4.1.5. Extractos vegetales

Actualmente existe un creciente interés por las propiedades bioestimulantes de los extractos de plantas. Esto se debe a que los extractos vegetales contienen compuestos bioactivos que pueden mejorar la floración, el crecimiento de las plantas, el cuajado de frutos, la productividad de los cultivos y la eficiencia en el uso de nutrientes, así como la tolerancia contra una amplia variedad de factores de estrés abiótico (Colla *et al.*, 2015). El hecho de que sean productos naturales facilita su uso y comercialización bajo la mayoría de normativas. Además, una gran parte de la biodiversidad vegetal sigue sin explorarse para posibles usos en la agricultura. Por estos motivos, el análisis de extractos botánicos como agentes potenciales para ayudar a alcanzar el objetivo de una agricultura sostenible es un área de investigación cada vez más activa.

La yucca se utiliza principalmente en forma de extractos elaborados triturando tallos de *Yucca schidigera* y otras especies del género *Yucca*. La principal característica de este extracto vegetal es que contiene un alto contenido de saponinas esteroides y compuestos polifenólicos (Cheeke y Otero, 2005). La presencia de estos compuestos bioactivos en los extractos de yucca abre una gama de aplicaciones diferentes, como antiinflamatorios, antiartríticos, antimicrobianos, tensioactivos, agentes espumantes en bebidas, aditivos para piensos, reductores de amoníaco atmosférico y estimulantes del crecimiento de los cultivos. A pesar del uso comercial del extracto de yucca como bioestimulante vegetal, existen pocos estudios que caractericen y además cuantifiquen su efecto bioestimulante en los cultivos. Sin embargo, recientemente en nuestro grupo de investigación, se ha estudiado y cuantificado el efecto del extracto de yucca en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y en cultivos como brócoli, tomate y lechuga, en presencia de estrés salino y osmótico. También se evaluó su efecto antifúngico frente a la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* (Benito *et al.*, 2023).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del proyecto fue caracterizar a nivel fisiológico, bioquímico y molecular el efecto de la interacción de bioestimulantes, microbianos y no microbianos, en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L. cv. Romana) bajo condiciones control y de estrés salino. Para alcanzar este objetivo principal, se plantearon en el presente trabajo de investigación los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la posible sinergia del bioestimulante CalBio, desarrollado previamente en nuestro grupo de investigación, con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) bajo condiciones de estrés salino.
2. Cuantificar y estudiar el efecto del bioestimulante CalBio en lechuga mediante medidas fisiológicas y bioquímicas.
3. Cuantificar y estudiar el efecto del bioestimulante CalBio con respecto al estrés salino y el contenido hormonal en lechuga.
4. Evaluar el efecto del bioestimulante CalBio con respecto al estrés salino mediante estudios de metabolómica y transcriptómica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

La especie vegetal seleccionada para realizar los diferentes ensayos fue lechuga (*Lactuca sativa* L. cv. Romana) y concretamente, la variedad Romana, por ser la más consumida por la población. Los ensayos fueron realizados en experimentos en condiciones control y de salinidad en la cuenca mediterránea debido a la creciente problemática de estrés salino e hídrico de esta región.

Se diseñó un experimento de invernadero según el cultivo tradicional de la lechuga en invernaderos en la zona mediterránea. El ensayo se realizó durante el otoño de 2022 (del 20 de septiembre de 2022 al 9 de noviembre de 2022) en un invernadero de malla en el Centro de Experiencias Cajamar (Paiporta, Valencia) (39°25'01" N, 0°25'04" W). Previamente, las semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L. cv. Romana) se esterilizaron superficialmente con lejía comercial diluida 1:1 (v/v) durante 15 min y se enjuagaron con agua esterilizada hasta eliminar el agente desinfectante. La germinación de las semillas se realizó en semilleros con fibra de coco en CUCALA AGRICOLA S.L. (38°56'42" N, 0°25'42" W) del 25 de agosto de 2022 al 20 de septiembre de 2022.

Después de un mes, las plántulas se trasplantaron a macetas de 5 L (19x19x19,5 cm) y se colocaron en un invernadero a una distancia de 15 cm entre macetas y en disposición de zigzag para evitar la inhibición de crecimiento por competencia y facilitar el riego (Figura 5). La composición del sustrato utilizado correspondió a una mezcla de sustrato pasteurizado Terra Vagiota (Grupo Valagussa, Italia), con arena de río en proporción 1:1 (Anexo I, Tabla Suplementaria 1). El riego se realizó con solución nutritiva (13 mM NO_3^- , 0,3 mM H_2PO_4^- , 3,24 mM SO_4^{2-} , 1 mM HCO_3^- , 4,8 mM Cl^- , 1,6 mM NH_4^+ , 6,1 mM K^+ , 4,6 mM Ca^{2+} , 2,8 mM Mg^{2+} y 2,3 mM Na^+ , EC=2,5 mS/cm y pH 6) suministrada a cada maceta por goteo diario, excepto los días que se aplicó estrés salino. El estrés salino se aplicó 4 semanas después del trasplante y el proceso se intensificó en incrementos diarios de aproximadamente 40 mM de NaCl para evitar el shock osmótico hasta alcanzar una concentración de 100 mM. Posteriormente, cada maceta se regó con 100 mL de solución de NaCl 100 mM hasta la completa cosecha del cultivo. La aplicación de estrés salino se realizó durante 30 días. En el caso de las plantas donde no se aplicó estrés, se irrigaron con 100 mL de agua destilada.

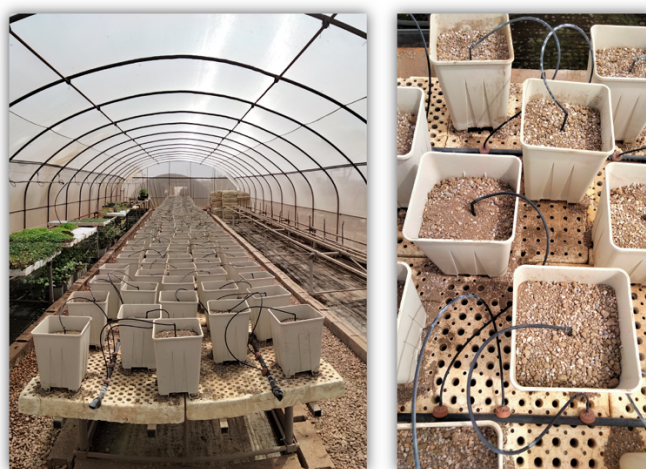


Figura 5. Distribución de las macetas en el invernadero y sistema de riego empleado.

La cosecha se realizó cuando las cabezas de lechuga estuvieron bien formadas (Figura 6), concretamente, el 9 de noviembre de 2022. Tras la cosecha, las muestras tanto de hoja como de

raíz fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta el momento de su utilización.

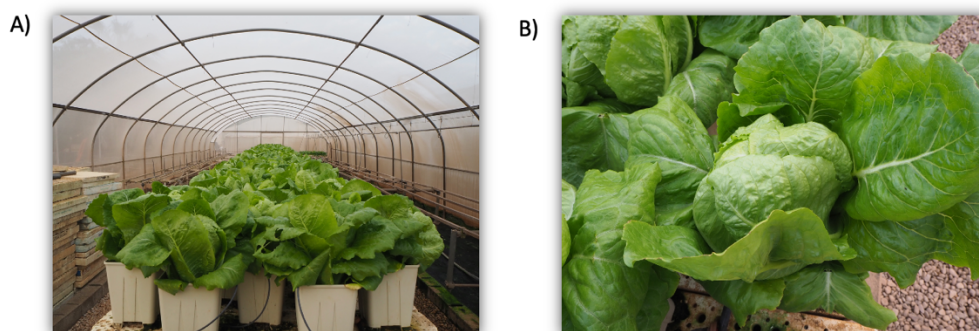


Figura 6. Momento de recolección de las lechugas en el invernadero del Centro de Experiencias de Cajamar (Paiporta, Valencia). (a) Visión general del cultivo; (b) Cogollo de lechuga bien formado.

3.2. Diseño experimental y tratamientos aplicados

El experimento de invernadero con lechuga se realizó en un diseño de bloques completos al azar con un total de 8 tratamientos que contenían 20 unidades experimentales (réplicas) cada uno ($n = 160$ plantas). Los tratamientos consistieron en (1) plantas control cultivadas sin ningún bioestimulante (CT); (2) plantas tratadas con bioestimulante CalBio (BS); (3) plantas tratadas con un bioestimulante de base microbiana que contenía la cepa comercial de *Bacillus megaterium* BM08, una cepa de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB); y (4) plantas tratadas con una combinación del bioestimulante de base no microbiana CalBio y el bioestimulante de base microbiana BM08 (BS+PGPB).

El bioestimulante no microbiano CalBio (Caldic Iberica S.L.U, Barcelona, España) fue aplicado en una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este bioestimulante se formuló a partir de una combinación de cuatro extractos naturales en nuestro laboratorio en una investigación anterior (Benito *et al.*, 2022). Los cuatro extractos naturales utilizados en el formulado fueron: extracto de levadura, extracto de alga *Ascophyllum nodosum*, extracto de raíz de regaliz y extracto de raíz de sauce. Específicamente, se aplicaron 10 mL de CalBio por planta a los 4 y 15 días después del trasplante. Por otro lado, la cepa PGPB utilizada en este ensayo fue *Bacillus megaterium* BM08, también proporcionada por Caldic Ibérica S.L.U (Barcelona, España) y se inocularon 5 mL de suspensión bacteriana ($1,8 \times 10^9$ UFC/mL) en la base del tallo una semana después del trasplante. La dosis de CalBio fue previamente determinada por Benito *et al.* (2022), mientras que el inóculo de microorganismos se estableció a partir de análisis previos de su capacidad para colonizar la rizosfera y promover el crecimiento en plantas de trébol blanco (*Trifolium repens*).

3.3. Medición de la conductividad eléctrica del sustrato

Se realizaron cuatro mediciones de la conductividad del sustrato tras el inicio del riego con una solución de NaCl 100 mM. Las mediciones se realizaron cada 7 días, siendo la primera medición antes del inicio de la aplicación de estrés salino y la última el día de la recolección del cultivo. Se recolectaron 3 g de suelo de diferentes puntos del sustrato y se homogeneizaron. El material recolectado, se resuspendió en 100 mL de agua destilada y se agitó durante 15 minutos. Posteriormente, la solución resultante se filtró y su conductividad eléctrica fue medida utilizando un conductímetro BASIC30 (CRISON®). Las mediciones se realizaron por triplicado.

3.4. Colonización microbiana de la rizosfera y endosfera de lechuga

La colonización bacteriana llevada a cabo por la cepa de PGPB BM08, se evaluó aislándola de muestras de rizosfera. Para ello, previamente se pesó la rizosfera de la planta en condiciones asépticas, se resuspendió en 100 mL de agua destilada estéril y posteriormente, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Se hicieron diluciones seriadas y, las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , se inocularon en medio de extracto de levadura peptona dextrosa (YPD) (1% extracto de levadura, 2% peptona bacteriológica, 2% glucosa y 2% agar en agua destilada) y agar triptonsoja (TSA) (3% caldo de soja tripticasa y agar 2% en agua destilada). Las placas se incubaron durante 4 días a 28 °C y transcurrido ese tiempo, se contaron las unidades formadoras de colonias por mL de inóculo (UFC/mL). Se aislaron colonias con morfología similar a la de BM08 y su identidad se confirmó mediante amplificación y secuenciación del gen de ARN ribosómico 16S utilizando los cebadores descritos por Lane (1991) (Anexo 1, Tabla Suplementaria 2).

3.5. Determinación del rendimiento y biomasa total

Cuando el cogollo estuvo bien formado y cerrado (Figura 6 B) (9 de noviembre de 2022), se realizó la recolección de la cosecha de lechugas. Tras la recolección de la cosecha de forma manual, se midió el perímetro, el peso fresco y el largo de cada cogollo individualmente.

La biomasa aérea y radicular del cultivo se obtuvo al final del cultivo. El peso fresco (PF) se midió en el momento de la recolección, mientras que el peso seco (PS) se registró después de que las muestras se secaran en estufa a 65 °C durante siete días o hasta que los pesos fueran constantes. La biomasa vegetal se calculó determinando el porcentaje de materia seca (Ecuación 1). Con el fin de evaluar la capacidad de los diferentes tratamientos para mejorar el estado fisiológico de las plantas de lechuga bajo estrés salino, se calculó el factor de alivio del estrés (SAF) (Carlson *et al.*, 2020) (Ecuación 2). Este factor se calculó a partir de la altura de la planta, el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la raíz.

$$\% \text{ Materia seca} = \left(\frac{PS}{PF} \right) \times 100$$

Ecuación 1. Biomasa vegetal a partir del % materia seca donde: PS=peso seco; PF=peso fresco.

$$SAF = \frac{\left(\frac{I_h - C_h}{C_h} \times 100 \right) + \left(\frac{I_r - C_r}{C_r} \times 100 \right) + \left(\frac{I_s - C_s}{C_s} \times 100 \right)}{3}$$

Ecuación 2. Factor de alivio del estrés (SAF) donde: I=aislado de rizobacterias; C=control no tratado recibiendo estrés; h=altura de la planta; r=masa seca de la raíz; s=masa seca del tallo; según Carlson *et al.*, 2020.

3.6. Análisis fisiológicos y bioquímicos realizados en hoja y raíz de plantas de lechuga

3.6.1. Contenido hídrico relativo (CHR) y eficiencia del uso del agua (EUA)

Para calcular el contenido hídrico relativo (CHR) y la eficiencia del uso del agua (EUA), se pesaron los discos de hojas jóvenes de diferentes réplicas biológicas de cada tratamiento (peso fresco; PF) inmediatamente después de la cosecha. Seguidamente, se colocaron en un vial saturado con agua a 4 °C durante 24 h, para ser pesadas a continuación (peso turgente; PT). Posteriormente, las muestras se secaron en estufa a 60 °C por un período de 48 h (Barrs y Weatherley, 1962) y se obtuvo su peso seco (PS). El porcentaje de contenido hídrico relativo (CHR) de las hojas se determinó según lo descrito previamente por Ruiz-Lozano y Azcón (1997) y la eficiencia del uso del agua se calculó según lo descrito por Marulanda *et al.* (2007), y se expresó como g H₂O/g de PF. Se utilizaron cinco réplicas por tratamiento.

$$\left[\frac{(PF - PS)}{(PT - PS)} \right] * 100$$

Ecuación 3. Porcentaje de contenido hídrico relativo (CHR) según Ruiz-Lozano y Azcón, 1997.

3.6.2. Conductividad eléctrica foliar

La conductividad eléctrica es un parámetro que determina la facilidad con que una corriente eléctrica pasa a través del agua. En nuestro caso de estudio, esta medida nos facilitó datos sobre el posible daño celular que sufre la hoja tras la exposición al estrés. Cuanto más elevada sea la conductividad mayor será el daño celular. Este parámetro se midió a partir de discos de hoja de 1 cm de diámetro de cada tratamiento. Estos discos fueron previamente pesados y posteriormente, sumergidos en 5 mL de agua destilada estéril durante 2 días a temperatura ambiente. El contenido de sal en el agua se midió utilizando un conductímetro BASIC-30 (CRISON®; Alella, (España)). Los resultados se expresaron en $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{mg}$ de PF y se utilizaron cinco réplicas por tratamiento.

3.6.3. Pigmentos fotosintéticos y rendimiento del fotosistema II (FSII)

Los pigmentos de las hojas, incluidas las clorofilas a y b y los carotenoides, se extrajeron y cuantificaron utilizando el método descrito por Lichtenthaler *et al.* (1987). En primer lugar, las muestras de hojas de lechuga fueron pesadas (100 mg) y machacadas con ayuda de un pistilo y nitrógeno líquido. A continuación, fueron maceradas en 1,5 mL de metanol (100 %, v/v) y seguidamente sometidas a agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras centrifugar las muestras a 17.700 g durante 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante obtenido se recolectó en nuevos tubos de 2 mL para ser diluido (1:25) y examinar las dos fracciones de clorofila (clorofila-a y clorofila-b) y carotenoides. Para ello, se empleó un espectrofotómetro para lectura de microplacas (Infinite® 200PRO; Tecan) con el fin de realizar mediciones a una longitud de onda de 665,2 nm, 652,4 nm y 470 nm. Por otro lado, el material vegetal residual obtenido tras la centrifugación, fue secado en horno a 65 °C durante 4 días para la obtención del PS. Los resultados se expresaron en μg de pigmento/g de PS. Se analizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de cada tratamiento.

$$\begin{aligned} C_a &= 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4} \\ C_b &= 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2} \\ C_{a+b} &= 1.44 A_{665.2} - 24.93 A_{652.4} \end{aligned}$$

$$C_{x-c} = \frac{1000 A_{440} - 1.63 C_a - 104.96 C_b}{221}$$

Ecuación 4. Cuantificación de clorofilas según Lichtenthaler *et al.*, 1987.

En cuanto a los índices de rendimiento del fotosistema II (FSII), se midieron con el fluorímetro HandyPEA (Hansatech, Pentney, Inglaterra) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La recolección de los datos se realizó en el momento previo a la cosecha, concretamente los datos relativos al ratio fluorescencia variable (Fv)/fluorescencia máxima (Fm), también conocido como el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (FSII). Con esto, se obtuvo la eficiencia de los centros de reacción del FSII que se encuentran abiertos. De forma previa a la medición, las hojas de las plantas se adaptaron a la oscuridad durante 45 min colocando pinzas de exclusión de luz en la superficie del haz de la hoja evitando la vena central. Posteriormente, la fluorescencia máxima se midió tras la exposición de las hojas a un flash

intenso de luz. Las mediciones se realizaron en 10 plantas por tratamiento. Los resultados se expresaron como Fv/Fm.

3.6.4. Preparación de los extractos de determinados para el análisis de solutos osmoprotectores y antioxidantes no enzimáticos

El extracto empleado para la determinación de osmolitos indicadores de estrés (prolina y azúcares solubles totales) y antioxidantes no enzimáticos (fenoles y flavonoides), se obtuvo a partir del método descrito por Bligh y Dyer (1959) modificado. Se partió de 100 mg PF de cada uno de los tejidos a analizar y posteriormente, fueron molidos con pistilo utilizando nitrógeno líquido para evitar la descongelación. Se añadieron 375 µL de metanol y se homogeneizó durante 1 minuto con vórtex. Se realizó este último paso dos veces. Seguidamente se añadieron 750 µL de cloroformo y se homogeneizó con vórtex nuevamente durante 1 minuto. Posteriormente, se adicionaron 375 µL de agua salada 0,88 % y se volvió a homogeneizar 1 minuto con vórtex. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 12.300 g a 0 °C durante 10 minutos para la separación en dos fases: la superior es la fase metanólica y la inferior la fase clorofórmica. La primera de ellas fue transferida a un nuevo tubo y las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Para todos los análisis mencionados se emplearon 3 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas

3.6.5. Análisis de osmolitos indicadores de estrés: determinación de la concentración azúcares solubles totales (AST) y prolina

Los azúcares solubles totales (AST) se analizaron mediante la reacción de 100 µL del extracto metanólico (descrito en el apartado 3.6.4) con 3 mL de reactivo de antrona recién preparado (200 mg de antrona en 100 mL de H₂SO₄ 13,33 M) y se colocaron en un baño de agua a 100 °C durante 10 minutos (Irigoyen *et al.*, 1992). Después de calentar las muestras y detener la reacción en hielo, se determinó la absorbancia a 620 nm de cada muestra en un espectrofotómetro para lectura de multiplacas (Infinite[®] 200 PRO; Tecan). La curva de calibración se realizó utilizando glucosa en el rango de 20 a 400 µg/mL y antrona sin extracto como blanco. Los resultados se expresaron como µg TSS/g de PF. Se analizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de cada tratamiento.

Por otro lado, la prolina libre se estimó a partir de 100 µL de extracto cuya extracción fue descrita en el apartado anterior (3.6.4). Dicho extracto se hizo reaccionar con 100 µL de metanol 100 % (v/v), 200 µL de ácido acético y 200 µL del reactivo de ninhidrina (1,25 g de ninhidrina en 30 mL de ácido acético glacial y 20 mL de ácido fosfórico 6 M), según las especificaciones de Bates *et al.* (1973). Las muestras fueron incubadas en un termobloque a 96 °C durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, fueron enfriados en cama de hielo y seguidamente, se adicionó 1 mL de tolueno. A continuación, se homogenizó la mezcla con vórtex y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. El tolueno fue empleado con el fin de obtener una separación en dos fases de la ninhidrina-prolina del metanol. Para la medida espectrofotométrica a 520 nm se utilizó un espectrofotómetro para lectura de microplacas (Infinite[®] 200PRO; Tecan). El tolueno fue utilizado como blanco y la curva de calibración se realizó utilizando prolina en el rango de concentraciones de 0 a 300 µM, partiendo de una solución madre de 1 mM. Los resultados se expresaron en nmol de prolina/g PF. Se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas de cada tratamiento tanto en hoja como en raíz.

3.6.6. Análisis de antioxidantes no enzimáticos: determinación del contenido en flavonoides y fenoles totales

Se analizó el contenido de fenoles y flavonoides totales a partir de la fase metanólica utilizada anteriormente para determinar el contenido en azúcares solubles totales y prolina (descrito en el apartado 3.6.4). La determinación de fenoles totales se realizó según Blainski *et al.* (2013) con base en el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Con este fin, se diluyeron 10 μL de extracto en 140 μL de agua esterilizada. Seguidamente, se adicionaron 10 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (Reagecon) y se dejó reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadieron 35 μL de Na_2CO_3 1,42 M y las muestras se incubaron en oscuridad durante 90 minutos. La absorbancia se midió a 765 nm en espectrofotómetro para lectura de microplacas (Infinite® 200PRO; Tecan). Además, para determinar la concentración de polifenoles, se utilizó como curva patrón ácido gálico (AG) en un rango de concentraciones de 0 a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de una solución stock al 0,2 mg/mL. Los resultados se expresaron como μg de equivalentes de AG/mg de PF.

Por otro lado, el contenido total de flavonoides se determinó con base al método colorimétrico de cloruro de aluminio (Zhishen *et al.*, 1999) optimizándolo para llevar a cabo la reacción y medición directamente en microplaca de 96 pocillos. En primer lugar, se diluyeron 80 μL de extracto en 60 μL de agua esterilizada. A continuación, se adicionó NaNO_2 0,73 M a los extractos y se incubaron durante 5 minutos. Seguidamente, se realizó durante 6 minutos una incubación tras la adición de 8 μL de AlCl_3 0,75 M. Transcurrido dicho tiempo, se añadió NaOH 1 M y se midió la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro para lectura de microplacas (Infinite® 200PRO; Tecan). Como estándar de referencia, se utilizó catequina en un rango de concentración de 0 a 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados se expresaron en μg de equivalentes de catequina/mg de PS. Se analizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de cada tratamiento tanto para flavonoides como para fenoles totales.

3.6.7. Análisis de antioxidantes enzimáticos indicadores de estrés salino

Las enzimas antioxidantes fueron extraídas a partir de 300 mg (PF) de muestras de raíz y hoja, previamente machacadas con pistilo y nitrógeno líquido. Se utilizó tampón de fosfato de potasio (PK) 50 mM (pH 7,8), que contenía $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 0,1 mM y polivinilpolipirrolidona insoluble (PVPP) al 1 % (p/v). A cada muestra se le adicionaron 3 mL de tampón PK con EDTA y PVPP anteriormente descrito y seguidamente, se homogenizó la mezcla en vórtex durante 1 minuto. Seguidamente, las muestras fueron incubadas en hielo y centrifugadas a 4.420 g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue dividido según el análisis posterior a realizar. Con el fin de determinar la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD, la CAT y el daño oxidativo a lípidos, se utilizó el tampón PK con EDTA y PVPP sin ningún compuesto adicional (Gogorcena *et al.*, 1995). El mismo tampón con β -mercaptoetanol 10 mM se utilizó para la GR (Moran *et al.*, 1994). Para APX, se adicionó ácido ascórbico 4 mM. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C para análisis enzimáticos posteriores.

La actividad total de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) se midió según Beyer y Fridovich (1987). La reacción se llevó a cabo utilizando tampón PK 50 mM (pH 7,8), que contenía nitroazul de tetrazolio (NBT) 65 μM , metionina 13,32 mM y riboflavina 1,33 μM . La preparación de la reacción se realizó protegiendo de la luz para evitar posibles reacciones causadas por la exposición lumínica. Para este análisis se emplearon 2 placas multipocillo. A estas placas se le adicionaron 200 μL de tampón PK 50 mM pH 7,8 con NBT, metionina y riboflavina, y 5 μL de extracto de enzimas antioxidantes. Solo una de las placas se iluminó con luz directa (muestra problema) durante 30 minutos hasta que el reactivo sin extracto tomó coloración morada,

mientras que la otra placa se mantuvo en oscuridad (blanco). Por tanto, se utilizaron dos microplacas de 96 pocillos para cada tejido con el fin de medir la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro para lectura de microplacas (Infinite® 200PRO; Tecan). Los resultados obtenidos se expresaron en unidades de SOD/min mg proteína.

La actividad enzimática de la ascorbato peroxidasa (APX) (EC 1.11.1.11) se midió mediante la determinación de la tasa de oxidación del ascorbato siguiendo el protocolo descrito por Nakano y Asada (1981). Este método se centra en la oxidación del ácido ascórbico, cuya disminución va asociada a una caída de la absorbancia a 290 nm. El extracto se mezcló con tampón PK 50 mM (pH 7,0) que contenía Na₂-EDTA 0,1 mM y ácido ascórbico 0,5 mM. Para la determinación de la actividad de la APX se utilizaron dos microplacas. Una de ellas, el blanco, contuvo 195 µL de tampón PK con ácido ascórbico y EDTA junto con 5 µL de extracto. Para la otra placa, la que contenía las muestras, se adicionaron 175 µL del mismo tampón, 5 µL de extracto y 20 µL de H₂O₂ 12 mM. La adición de H₂O₂ se realizó justo antes de la medición para así iniciar la reacción. La disminución de la absorbancia a 290 nm se registró cada 30 segundos durante 3 minutos en un espectrofotómetro para lectura de microplacas (Infinite® 200PRO; Tecan) (Amako *et al.*, 1994). Los resultados fueron expresados en µmol APX/min mg proteína.

La determinación de la actividad de la enzima antioxidante glutatión reductasa (GR) (EC 1.6.4.2) se realizó siguiendo el procedimiento de Carlberg y Mannervik (1985). Este método se basa en determinar la caída de la absorbancia a 340 nm cuando el NADPH es oxidado. La mezcla de reacción se formó por tampón HEPES 0,1 M (pH 7,8), Na₂-EDTA 1 mM y MgCl₂ 3 mM. Este tampón fue dividido en dos volúmenes iguales. Al primero de ellos, se le añadió 0,5 mM de glutatión disulfuro (GSSG) y al otro, no se le adicionó ningún sustrato. De igual manera que en las reacciones anteriores (SOD y APX), se utilizaron dos microplacas. Una de las placas fue empleada como blanco y contenía 240 µL de tampón sin GSSG, 50 µL de extracto y 10 µL de NADPH 4 mM. A la otra placa, denominada muestra o problema, se le añadieron 250 µL de tampón con GSSG, 50 µL de extracto y 10 µL de NADPH 4 mM. En ambos casos, se añadió NADPH 0,2 mM justo antes de la medición. La velocidad de oxidación del NADPH se controló mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm cada 30 segundos durante 2 minutos empleando un espectrómetro para lectura de microplacas (Infinite® 200PRO; Tecan). Se utilizaron dos blancos como controles, uno sin extracto enzimático y otro sin glutatión oxidado. Los resultados se expresaron en µmol GR/min mg proteína.

Por último, la actividad enzimática de la catalasa (CAT) (EC 1.16.1.6) se midió observando la descomposición del H₂O₂ en H₂O y O₂ (Aebi, 1984). Se extrajeron 2 µL de extracto y se mezclaron con 200 µL de tampón PK 50 mM (pH 7,0). La reacción se inició añadiendo 10,6 µL de H₂O₂ 10,6 mM a la muestra justo antes de la lectura espectrofotométrica controlando el cambio en la absorbancia a 240 nm cada 30 segundos durante 3 minutos en el espectrofotómetro de UV/Vis VWR® UV-3100PC. En cuanto a los blancos, estos poseían únicamente tampón PK. Los resultados se expresaron en µmol CAT/min mg proteína.

3.6.8. Daño oxidativo a lípidos (DOL)

La peroxidación lipídica fue determinada preparando y empleando un reactivo con ácido tricloroacético (TCA) 1,22 M, ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 40 mM, butilhidroxitolueno (HBT) 0,45 mM y HCl 0,25 N. Seguidamente, fue adicionado hidroxitolueno butilado (BHT) 0,45 mM. Se mezclaron 100 µL de extracto y 1 mL de reactivo, y dicha mezcla fue incubada a 95 °C durante 30 min (Minotti y Aust, 1987). Después de detener la reacción en cama de hielo y centrifugar las muestras a 10.000 g durante 10 minutos, el sobrenadante se utilizó para la lectura espectrofotométrica a 532 nm en un espectrofotómetro para lectura de microplacas (Infinite®

200PRO; Tecan). La curva de calibración se realizó utilizando malondialdehído (MDA) en el rango de concentraciones 0 a 10 μM . Los resultados se expresaron en nmol MDA/g PF.

3.6.9. Cuantificación de proteínas

Los datos de las actividades enzimáticas fueron normalizados utilizando los mg de proteína presentes en la muestra, determinando dicha cantidad mediante el procedimiento propuesto por Bradford (1976). Este procedimiento fue adaptado a microplaca de 96 pocillos. La mezcla de reacción contuvo 4 μL de muestra junto con 156 μL de agua esterilizada y 40 μL de reactivo de Bradford. Para la curva patrón, se utilizó un stock de albúmina de suero bovino (BSA) (0,1 mg/mL (p/v)) y se prepararon concentraciones de 0 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro para lectura de microplacas (Infinite® 200PRO; Tecan). Se utilizó como curva patrón BSA y se dejó incubar la reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se analizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas de cada tratamiento. De esta forma, los resultados de la actividad de las enzimas antioxidantes (APX, GR y CAT) se expresaron como μmol enzima/min mg de proteína. Sin embargo, para la SOD, los resultados se expresaron como unidades de SOD/min mg de proteína.

3.6.10. Determinación del contenido iónico

El contenido iónico de las muestras se determinó como se describe en Gisbert *et al.* (2020). Se liofilizaron las muestras de hoja y raíz de plantas de lechuga durante dos días. Transcurrido dicho tiempo, se determinó el PS y se extrajeron los iones mediante una incubación de 30 minutos en 1 mL de HNO_3 0,1 M a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron las muestras y el sobrenadante se diluyó con 4 mL de agua esterilizada y se filtró (0,22 μm). Los iones de sodio, potasio, calcio y magnesio se midieron en un espectrofotómetro de emisión de plasma (Agilent Technologies serie 700 ICP-OES) como lo describen Rios *et al.* (2012). Las mediciones se normalizaron al PS. Se analizaron tres réplicas biológicas de cada tratamiento.

3.6.11. Determinación del contenido hormonal

La extracción y el análisis del contenido hormonal se realizó como se describe en Durgbanshi *et al.* (2005), con pocas modificaciones (Matayoshi *et al.* 2020). Para la extracción de giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), conjugado de isoleucina JA (JA-Ile), ácido indolacético (AIA), ácido faseico (PA), ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), isopenteniladenosina (IPR) y ácido salicílico (SA), se utilizaron aproximadamente 10 mg de tejido vegetal liofilizado. La solución estándar interna utilizada contenía 1 mg/L de [2H]-GA1, [2H]-GA7, [2H6]-ABA, DHJA, [2H3]-PA y [13C6]-SA y 0,1 mg/L de [2H2]-IAA. La solución resultante se ajustó a pH 3 con ácido acético al 30 % y la extracción líquido:líquido se realizó con éter dietílico. Después de secar la muestra, el residuo se resuspendió en una solución de metanol:agua 10:90. Las hormonas se midieron utilizando un sistema de cromatografía líquida de ultra rendimiento (Alliance 2695, Waters Corp., Milford, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC-MS). Las fitohormonas se detectaron según sus transiciones específicas utilizando un método de espectrometría de masas de residuos múltiples. Todos los datos fueron adquiridos y procesados utilizando el software MassLynx v4.1. La cuantificación relativa se logró comparando las áreas de las diferentes muestras.

3.6.12. Análisis de metabolitos primarios

Para el análisis de metabolitos primarios se recolectaron las segundas hojas más jóvenes y las raíces secundarias evitando la raíz principal. Dichos tejidos vegetales se liofilizaron durante dos días y, seguidamente, se homogeneizaron empleando un disruptor tisular de tungsteno (Retsch Ball Mills; Düsseldorf; Alemania) y bolas mecánicas durante 1 minuto a una frecuencia de 30/segundo. Seguidamente, se tomaron 10 mg del material vegetal machacado para su procesado. El análisis de metabolitos primarios se llevó a cabo en la Plataforma Metabólica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC, Valencia, España) utilizando un método modificado del descrito por Roessner *et al.* (2000). De cada muestra se analizaron tres réplicas biológicas y de cada uno se realizó tres réplicas técnicas. A las muestras liofilizadas, tanto de raíz como de hoja, se les añadió 1,4 mL de metanol al 100%, para detener la actividad enzimática, y 60 µL de Ribitol como estándar interno. La mezcla se agitó y calentó durante 15 minutos a 70 °C y se centrifugó a 21.952 g durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, donde se agregaron 250 µL de cloroformo y 500 µL de agua, se mezcló con un vórtex y se centrifugó a 1.792 g durante 15 minutos. De la mezcla resultante se pasó 150 µL de la fase polar a un nuevo tubo y se dejó secar por evaporación utilizando un speed-vac durante tres horas. A la muestra seca se le añadió 40 µL de clorhidrato de metoxiamina en piridina para iniciar la derivatización y se agitó durante 2 horas a 37 °C. Seguidamente, se le adicionó 70 µL de MSTFA-Mix (1 mL de N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida + 2 µL de FAME-Mix), se agitó durante 30 minutos a 37 °C y se transfirió a un vial de medición.

3.7. Extracción de ARN y ARN-seq

Se aisló ARN total a partir de tejido de raíces y hojas de lechuga de los cuatro tratamientos realizados en las dos condiciones probadas (normal y estrés salino). El ARN total se extrajo utilizando el kit NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel, Alemania) según las instrucciones del fabricante. En total, se obtuvieron 48 muestras de ARN. La calidad del ARN se comprobó en un gel de agarosa al 1 % (p/v) y se analizó empleando Bioanalyzer Agilent 2100 en la Plataforma de Genómica del Instituto de Biología Molecular y Celular Vegetal (UPV-CSIC, Valencia, España). Una vez que los valores de calidad del ARN fueron óptimos (concentración ≥ 400 ng, valores de calidad: RIN ≥ 6 y 28S/18S: $\geq 1,0$), las muestras se secuenciaron en la empresa BGI Genomics (Beijing Genomics Institute, Hong Kong). El ARN-seq se realizó en la plataforma DNBseq™ mediante la secuenciación de una longitud de lectura de 150 pb. Los resultados se alinearon con el genoma de referencia de *Lactuca sativa* depositado en la base de datos NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) (Versión GCF_002870075.4_Lsat_Salinas_v11). Los datos fueron analizados con el programa Dr.Tom proporcionado por BGI Genomics.

3.8. Análisis estadístico

Los datos sobre el efecto de bioestimulantes microbianos (PGPB) y no microbianos (CalBio) a niveles fisiológicos y bioquímicos en plantas de lechuga sometidas a estrés salino se procesaron utilizando el software estadístico R (v4.3.1; R Core Team 2023). Los mapas de calor para representar los resultados de estos análisis se crearon utilizando el recurso web Heatmapper (Babicki *et al.*, 2016). La prueba t-Student se calculó comparando los resultados obtenidos para cada tratamiento con las condiciones control. Se consideraron datos significativamente diferentes aquellos que se ajustan a $p < 0,05$.

En cuanto a los datos hormonales, éstos se adquirieron, procesaron y normalizaron utilizando el software MassLynx v4.1. y R Statistical Software (v4.3.1; R Core Team 2023).

Por otro lado, los datos metabólicos fueron obtenidos en forma de cromatogramas y espectros de masas. Éstos se evaluaron utilizando el programa CHROMATOF (LECO, St. Joseph, MI) y fueron

normalizados con el peso seco. Los datos obtenidos con este programa, se analizaron y normalizaron mediante el software MetaboAnalyst 5.0 (Wishart Research Group, University of Alberta, Alberta, Canadá) (Xia y Wishart, 2011). La normalización de los datos se realizó mediante suma y escalado por Pareto. Los metabolitos con un *Fold change* $\geq 1,5$ y un p-valor en la prueba t-Student $\leq 0,05$ se consideraron significativamente diferencialmente acumulados. El análisis de las vías metabólicas también se realizó utilizando MetaboAnalyst 5.0 con el fin de identificar y visualizar las vías metabólicas afectadas.

Para el análisis de datos transcriptómicos, se utilizó Bowtie2 (Langmead, 2012) con el fin de mapear las lecturas limpias a la secuencia del genoma de referencia. Posteriormente, se empleó RSEM (Li y Dewey, 2011) para calcular el nivel de expresión génica de cada muestra. Los genes expresados diferencialmente (GED) se obtuvieron usando el método DESseq2 (Love *et al.*, 2014), basado en el principio de distribución binomial negativa, con un umbral de valor $Q \leq 0,05$ y un *Fold change* ≥ 2 . El análisis de enriquecimiento metabólico de GED se realizó mediante anotaciones y mapeo con la base de datos Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>) y la base de datos Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG) (<https://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa *et al.*, 2008).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La venta y el uso de insumos agrícolas ambientalmente más sostenibles han aumentado en los últimos años. Los bioestimulantes son una excelente estrategia para mantener el rendimiento de los cultivos sin dañar el ecosistema circundante. Sin embargo, hay poca investigación sobre el efecto beneficioso de la aplicación conjunta de bioestimulantes microbianos y no microbianos en cultivos bajo estrés abiótico. Además, las investigaciones publicadas solo han evaluado el efecto de la combinación de estos dos tipos de bioestimulantes en unas pocas especies vegetales como el cacahuete (Furlan *et al.* 2019), la cebolla (Bettoni *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2021) y la lechuga (Rouphael *et al.*, 2017), pero en condiciones de crecimiento normal. El presente estudio es el primero en mostrar los resultados tras la aplicación conjunta de bioestimulantes microbianos y no microbianos en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L. cv. Romana) cultivadas bajo estrés salino (NaCl 100 mM). Este trabajo evaluó los efectos a nivel fisiológico, bioquímico y molecular de la aplicación conjunta de la formulación no microbiana CalBio con microorganismos beneficiosos para las plantas. Concretamente, se empleó una cepa de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) de *Bacillus megaterium* conocida como BM08. También se llevaron a cabo estudios de contenido hormonal, metabolómica y transcriptómica.

4.1. Conductividad eléctrica del sustrato durante la aplicación de estrés salino

La productividad agrícola puede ser modulada por diversos factores ambientales, tanto bióticos como abióticos. Entre los factores abióticos problemáticos se encuentra el alto nivel de salinidad de algunos suelos, medida por su conductividad eléctrica (EC) (del Carmen *et al.*, 2020). En consecuencia, se realizaron mediciones de la conductividad eléctrica del sustrato cada 7 días, desde el inicio del riego hasta la recogida de la cosecha. Estas mediciones nos permitieron visualizar un aumento progresivo de la conductividad eléctrica (Figura 7). Dicho aumento fue de 1,5 mS/cm desde el inicio del riego hasta la recogida de la cosecha. En los últimos 15 días del riego, con la solución de NaCl 100 mM, se observó el mayor aumento de la conductividad eléctrica (1 mS/cm). Estos resultados se traducen en un aumento de la concentración de sales del sustrato y una acumulación progresiva de sales en el mismo. De esta forma, se verifica que en el sustrato se fue aplicando el estrés salino de forma correcta y a qué velocidad se fueron concentrando las sales.

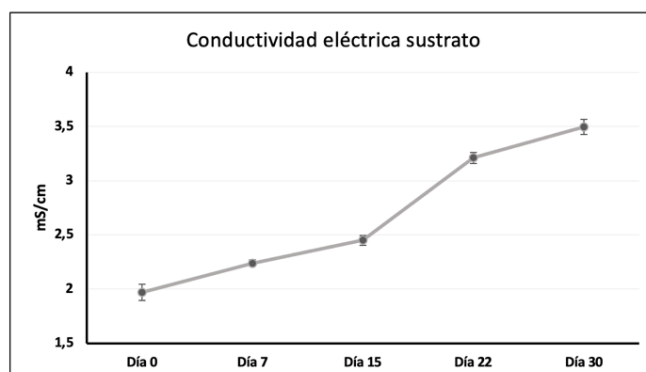


Figura 7. Conductividad eléctrica del sustrato. La conductividad eléctrica (EC) se midió cada 7 días desde el inicio del riego hasta la cosecha con NaCl 100 mM. El eje X representa los días que se realizó la medición de EC con respecto al inicio del estrés salino. El eje Y muestra la conductividad expresada en mS/cm.

4.2. Colonización microbiana en raíces de lechuga tras la aplicación de bioestimulantes microbianos y no microbianos

Las PGPB son un grupo diverso de bacterias que promueven el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos, como la producción de hormonas vegetales, aumento de la viabilidad de los nutrientes, inducción de resistencia de las plantas, inducción de la biosíntesis de moléculas osmoprotectoras y producción de enzimas hidrolíticas (Ferrusquía-Jiménez *et al.*, 2022). Todos estos mecanismos ayudan a la planta a hacer frente a diferentes formas de estrés biótico, como el ataque de organismos patógenos, y estreses abióticos, como la sequía y la salinidad (Kumar *et al.*, 2021). Entre los géneros que contienen especies identificadas como PGPB, las especies del género *Bacillus spp.* han adquirido gran relevancia en la agricultura. Por ejemplo, *Bacillus cereus* YL6 mejoró el rendimiento en soja (*Glycine max* L.), trigo (*Triticum vulgare* L.) y repollo (*Brassica rapa subsp. Pekinensis*); esto se debe a su capacidad para solubilizar fósforo orgánico e inorgánico y a la producción de fitohormonas como el ácido indol-3-acético (AIA) y las giberelinas (GAs) (Ku *et al.*, 2018). Otro ejemplo, es el caso de *B. amyloliquefaciens* SN13, que promovió el crecimiento e indujo tolerancia a la salinidad en el arroz (Tiwari *et al.*, 2017).

Por este motivo, se evaluó la capacidad de la cepa comercial *Bacillus megaterium* BM08 para colonizar la rizosfera de lechuga en aquellas plantas en las que fue inoculada (tratamientos PGPB y BS+PGPB). Esta cepa de *Bacillus megaterium* (BM08) no puede ocupar los tejidos internos de la planta, pero sí es capaz de colonizar la rizosfera y el rizoplano e interactuar con las raíces de las plantas (del Carmen *et al.*, 2020). Por este motivo, el aislamiento bacteriano se realizó a partir de rizosfera en medio sólido YPD o TSA. Se recogieron datos de todas las colonias obtenidas y de colonias con morfología similar a BM08, que posteriormente se identificaron mediante la secuenciación del gen 16S ARNr. Se observó que la carga microbiana general disminuyó con los diferentes tratamientos en condiciones de salinidad en comparación con condiciones no estresantes. Se detectaron colonias con morfología similar a *Bacillus megaterium* BM08 solo en aquellas plantas tratadas con esta cepa bacteriana (tratamientos PGPB y BS+PGPB), tanto en condiciones normales como de salinidad (Figura 8). Además, se observó que la presencia de BM08 disminuyó en el tratamiento BS+PGPB con respecto a PGPB bajo estrés salino. Esto puede ser debido a que, aunque estas bacterias son halotolerantes no son halófitas, y en consecuencia también pueden verse afectadas por dicho estrés (del Carmen *et al.*, 2020). Por otro lado, la mayor presencia de BM08 estuvo presente en BS+PGPB en condiciones normales (Figura 8). Esto demuestra que BM08 tiene la capacidad de colonizar y establecerse en la rizosfera de la lechuga y aislarse de este hábitat.

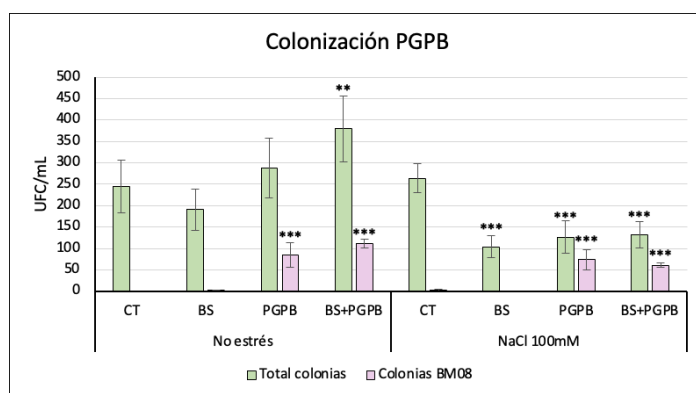


Figura 8. Aislamiento bacteriano de la rizosfera de lechuga. Aislamiento e identificación de colonias bacterianas, diferenciando entre el número total de colonias aisladas (verde) y las identificadas como cepa PGPB (BM08) utilizada como inoculante (lila). La colonización de la rizosfera bacteriana se evaluó en condiciones normales y de estrés salino (NaCl 100 mM). Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El

eje X representa los tratamientos y condiciones probados. El eje Y muestra la carga microbiana aislada en unidades formadoras de colonias UFC/mL. Las barras representan el error estándar. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$ representan la significancia según las pruebas t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

4.3. Efecto de la aplicación conjunta de CalBio y PGPB en la producción de lechuga

A nivel fisiológico, el estrés salino se caracteriza por reducir de forma considerable el tamaño y peso de la planta, así como su producción de frutos. La producción del cultivo de lechuga se determinó midiendo el peso de los cogollos (toda la estructura y solo la parte comercial) al momento de la cosecha (Figura 9). También se determinaron la longitud y el diámetro del cogollo, pero no proporcionaron datos significativos entre tratamientos (Anexo I, Figura Suplementaria 1 A, B). Sin embargo, BS+PGPB fue el tratamiento que mostró los mayores resultados en condiciones salinas, especialmente en los datos del diámetro de los cogollos (Anexo I, Figura suplementaria 1 A).

En cuanto a la producción de fruto, todas las plantas de lechuga del ensayo produjeron cogollo por lo que la producción del ensayo fue del 100%. Para evaluar el peso de los cogollos se midió tanto el peso real como el peso comercial. Sin embargo, los resultados de la Figura 9, muestran los resultados referentes a la parte comercial ya que es la que se va a comercializar, consumir y la de mayor interés para nuestro proyecto. Pudimos observar cómo se obtuvo una mayor producción en aquellas plantas que correspondían a los tratamientos PGPB y BS+PGPB, tanto en condiciones normales como de estrés salino, con unos resultados muy similares (Figura 9). En condiciones normales, se observó un aumento del 16 y 17% en el peso de los frutos de los tratamientos PGPB y BS+PGPB respectivamente con respecto al control. Sin embargo, en condiciones salinas, el tratamiento BS+PGPB fue el que mostró el peso de los cogollos más notable, un 30% mayor respecto al control. Aunque pudimos ver que la producción fue menor en todos los tratamientos en condiciones de estrés salino con respecto a las condiciones de no estrés, el tratamiento BS+PGPB fue el que mayor peso de los cogollos mostró siendo incluso mayor al tratamiento CT en condiciones normales (Figura 9). Estos resultados obtenidos coinciden con los obtenidos en un estudio de arroz bajo condiciones de salinidad, pero diferente PGPB y sin tratamiento con bioestimulantes no microbianos (Sen y Chandrasekhar, 2014). Esto es debido a que nuestro proyecto fue el primero en medir el efecto combinado de diferentes extractos naturales utilizados como bioestimulantes y la acción de PGPB bajo condiciones de salinidad.

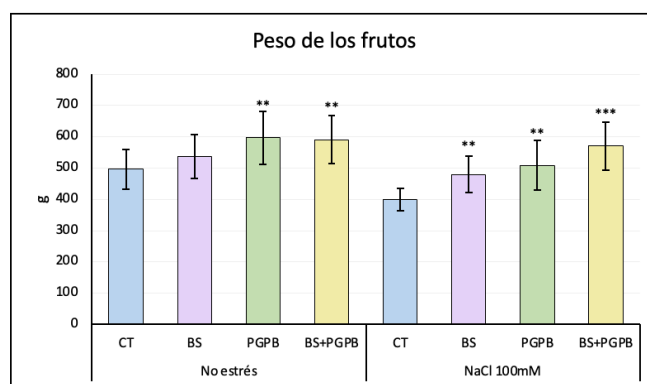


Figura 9. Producción de la parte comercial de la lechuga. Peso promedio de cogollos cosechados por tratamiento en condiciones normales y de estrés salino. Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los tratamientos y condiciones probados y el eje Y muestra el peso promedio de la parte comercial de lechuga (cogollo) en gramos (g). Las barras representan el error estándar. **

$p < 0,01$ y $*** p < 0,0001$ representan la significancia según las pruebas de *t-Student* para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

4.4. Factor de Alivio del Estrés (SAF) tras la aplicación de bioestimulantes

Se ha determinado que la aplicación conjunta de PGPB y el bioestimulante no microbiano CalBio incrementó la productividad de la lechuga, especialmente bajo estrés salino (Figura 9). Posteriormente, se determinó el Factor de Alivio del Estrés (SAF) (Ecuación 2), con el fin de evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento y acumulación de biomasa bajo estrés salino. Las puntuaciones SAF mostraron que el tratamiento BS+PGPB presentó los mejores resultados en comparación con las plantas no tratadas y las plantas tratadas con PGPB bajo estrés salino (Figura 10). Los resultados del SAF solo se evaluaron en condiciones salinidad porque es un parámetro que mide el efecto del tratamiento bajo estrés (Carlson *et al.*, 2020).

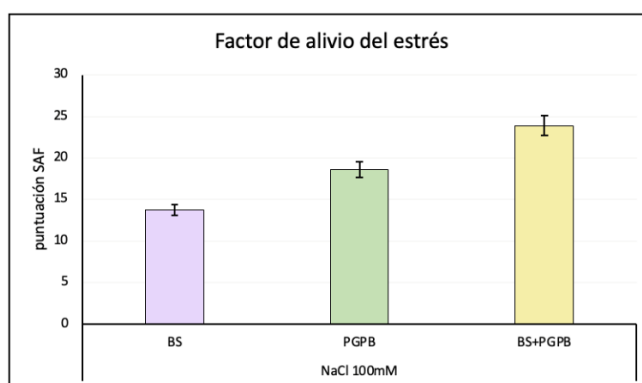


Figura 10. Factor de alivio del estrés (SAF) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino. Tratamientos realizados: bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los tratamientos y condiciones probados y el eje Y muestra el valor del factor de alivio del estrés. Las barras representan el error estándar.

4.5. Efecto de la aplicación conjunta de CalBio y PGPB en el estado fisiológico y bioquímico de las plantas de lechuga

El contenido hídrico relativo (CHR) es una variable útil que refleja el estado hídrico de la planta (Kadioglu *et al.*, 2011). Es un determinante clave de la supervivencia de las hojas y de la actividad metabólica que puede usarse como parámetro para comparar plantas sensibles y tolerantes al estrés por salinidad (Sinclair y Ludlow, 1986). El estrés salino afecta negativamente a la absorción de agua debido al efecto osmótico. La acumulación de sales en la zona de la raíz disminuye el potencial osmótico, lo que conduce a la reducción del potencial hídrico (Acosta-Motos *et al.*, 2017). Esto, a su vez, reduce la cantidad de agua disponible para el sistema radicular de la planta. Las plantas pueden equilibrar su potencial hídrico perdiendo agua, lo que induce una disminución del potencial osmótico (Acosta-Motos *et al.*, 2017). Por tanto, el CHR proporciona información sobre el contenido de agua presente en el tejido en estudio con respecto al estado de hidratación óptimo y permite evaluar si se ha producido una reducción en el contenido de agua de la planta. Por este motivo, dicho parámetro fue evaluado en hojas de lechuga y se pudo observar cómo el CHR se vio afectado por el estrés por salinidad (Figura 11). En condiciones normales, el menor CHR lo presentó el tratamiento BS+PGPB, pero con pocas variaciones con respecto al resto de tratamientos. En condiciones de estrés salino, se obtuvo el mismo resultado (Figura 11). También se observó que todos los tratamientos de las condiciones de estrés salino presentaban una ligera disminución en CHR con respecto a las condiciones normales (Figura 11). El estrés salino reduce la presión de turgencia y la disponibilidad de agua en el suelo inhibe la absorción de agua, lo que resulta en una disminución del CHR de las hojas (Sarker y Oba, 2020).

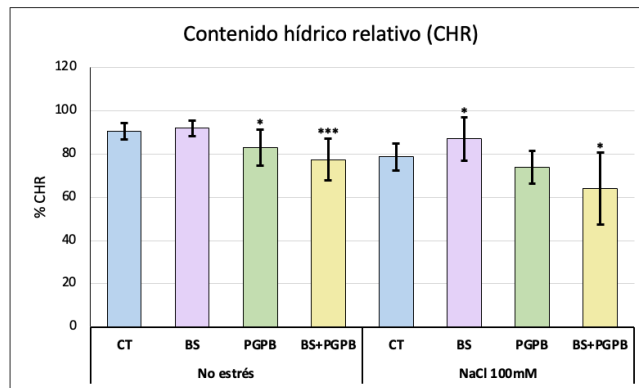


Figura 11. Porcentaje del contenido hídrico relativo (CHR) en hojas de plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes. Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los tratamientos y condiciones probados. El eje Y el porcentaje de CHR. Las barras representan el error estándar. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,0001$ representan la significancia según las pruebas de t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

Otro parámetro relacionado con el estado de hidratación de las plantas es la eficiencia del uso del agua (EUA). Un potencial hídrico más bajo en las células, puede causar el cierre de los estomas y la asimilación de CO_2 , lo que conlleva a una reducción del crecimiento finalmente. Se ha informado de que la baja densidad estomática es un determinante crítico de una alta EUA (Barbieri *et al.*, 2012), una respuesta fisiológica que a menudo se ha observado en plantas expuestas a condiciones salinas (Chartzoulakis y Klapaki, 2000). En los resultados obtenidos (Figura 12), se observó que no había diferencias significativas entre los diversos tratamientos y condiciones. Aunque en el tratamiento BS+PGPB en condiciones salinas, sí que se observó una ligera disminución en la EUA con respecto al mismo tratamiento en condiciones normales (Figura 12). Este resultado podría indicar que las plantas de este tratamiento están siendo más tolerantes a la salinidad al no aumentar su EUA drásticamente, sino que incluso la disminuyen.

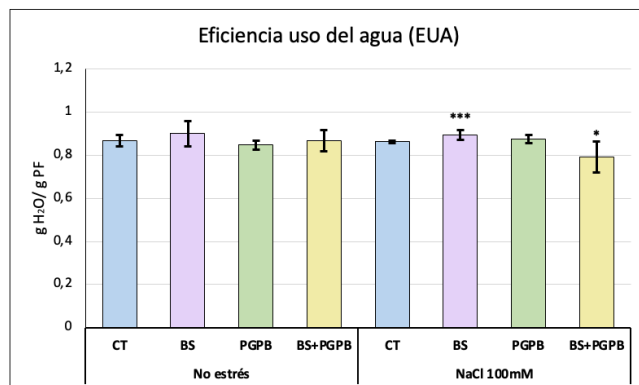


Figura 12. Eficiencia del uso del agua (EUA) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes. Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los tratamientos y condiciones probados y el eje Y la cantidad de agua promedio en gramos (g) por gramos (g) de peso fresco (PF) de hojas de lechuga. Las barras representan el error estándar. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,0001$ representan la significancia según las pruebas de t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

Con el fin de evaluar el daño celular presente en las hojas, tras estar sometidas a estrés salino, se determinó la conductividad eléctrica foliar de las mismas. En los resultados obtenidos, se observó un aumento drástico de la conductividad eléctrica foliar en el tratamiento CT con respecto al resto de tratamientos en condiciones de salinidad (Figura 13). Estos resultados nos

indican que, en los tratamientos BS, PGPB y también BS+PGPB, las plantas toleran mejor el estrés salino impidiendo una gran acumulación de sales en el interior de las hojas.

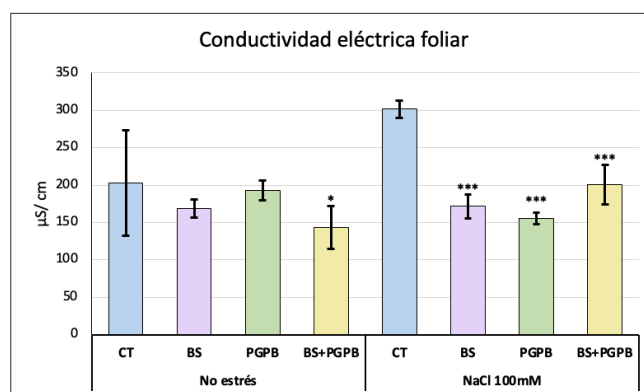


Figura 13. Conductividad eléctrica foliar. Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los tratamientos y condiciones probados y el eje Y muestra la conductividad expresada en $\mu\text{S}/\text{cm}$. Las barras representan el error estándar. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,0001$ representan la significancia según las pruebas de t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

Uno de los efectos del estrés salino, como vimos al principio de este trabajo, es la disminución de la tasa fotosintética, la síntesis de pigmentos y el rendimiento del fotosistema II (FSII). Entre todos los pigmentos fotosintéticos, se evaluó el contenido en clorofilas a y b y carotenoides en todas las plantas y sus diversos tratamientos (Figura 14 A-C). Se observó una disminución en la concentración de estos pigmentos en hojas de lechuga en condiciones de salinidad con respecto a las condiciones no estresantes a excepción del tratamiento con PGPB, donde hubo un ligero aumento de contenido (Figura 14 A-C). En condiciones de estrés salino, para todos los tratamientos, aumentó la concentración de pigmentos en comparación con el tratamiento CT siendo muy destacable en el caso de los carotenoides (Figura 14 C). Por tanto, la utilización del bioestimulante CalBio y de la cepa de PGPB de *Bacillus megaterium* BM08, podrían conferir una mayor tolerancia a salinidad. Estos resultados son de gran importancia ya que los carotenoides, además de funcionar como pigmentos fotosintéticos y tener un papel clave en la fotosíntesis, también poseen actividad antioxidante capaz de conferir protección a la planta (Ann y Gothandam, 2011). La disminución en pigmentos fotosintéticos fue observada en investigaciones anteriores realizadas también en hojas de lechuga con niveles elevados de estrés salino (Shin *et al.*, 2020). Esta disminución en pigmentos evaluada es una consecuencia de la acumulación de sales en las hojas, que produce la oxidación de las clorofilas y el cloroplasto y como resultado, concentraciones reducidas de proteína pigmentaria (Liu *et al.*, 2014). Otra causa podría ser que, la producción mejorada de ROS bajo estrés salino, redujera la actividad fotosintética y aumentara la degradación de estos pigmentos (Liu *et al.*, 2014).

El rendimiento y la productividad de los cultivos están influenciados por una serie de factores ambientales. Entre los diversos procesos metabólicos que se ven afectados por cualquier tipo de estrés ambiental, la fotosíntesis es uno de los procesos más sensibles. En la fotosíntesis, el fotosistema II (FSII) es particularmente más susceptible al estrés. El estrés salino influye en la actividad del FSII y sus efectos varían con la duración del estrés y con la especie vegetal (Jajoo, 2012). Los cuatro componentes proteicos principales de la cadena de transporte de electrones fotosintética son el fotosistema II (FSII), el fotosistema I (FSI), el complejo citocromo (Cytb6f) y la ATP sintasa. El FSII es un complejo de múltiples subunidades cuya función es organizar las clorofilas para la captación de luz, así como albergar los cofactores de transporte de electrones necesarios para la oxidación del agua (Jajoo, 2012). En los resultados obtenidos, se observaron pocas variaciones entre los tratamientos en condiciones de estrés salino con respecto al tratamiento CT, siendo el de mayor rendimiento el tratamiento PGPB (Figura 14 D).

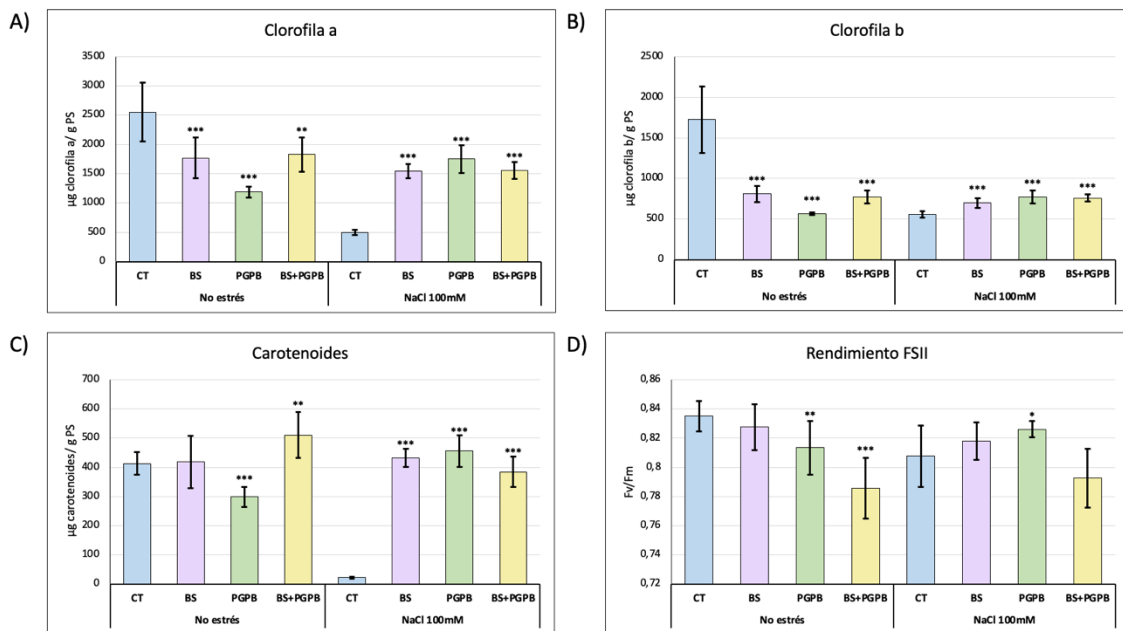


Figura 14. Contenido en pigmentos fotosintéticos y rendimiento del fotosistema II de hojas de lechuga. El eje X representa los tratamientos y condiciones probados. El eje Y muestra (A) contenido de clorofila a en μg de clorofila a/g de PS, (B) contenido de clorofila b en μg de clorofila b/g de PS, (C) el contenido de carotenoides en μg de carotenoides/g de PS y (D) el rendimiento del fotosistema II (FSII) en F_v/F_m . Fluorescencia variable (F_v); Fluorescencia máxima (F_m). Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). Las barras representan el error estándar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$ representan la significancia según las pruebas de t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

Por otro lado, la acumulación de azúcares solubles totales (AST) es un fenómeno común en plantas ante condiciones de estrés salino (Williams *et al.*, 2000). Éstos protegen a las biomoléculas y membranas actuando como solutos protectores de tensiones osmóticas. Además, también son utilizados como moléculas de energía y son necesarios en procesos como la asimilación de CO_2 y la expresión de ciertos genes (Dubey y Singh, 1999). En consecuencia, se evaluó la AST tanto en raíz como hoja de lechuga (Figura 15 A, B). En ambos tejidos, se observó en condiciones salinas una disminución en la AST en todos los tratamientos con respecto al tratamiento CT (Figura 15 A, B). Tanto en raíz como en hoja, en condiciones de estrés salino, el tratamiento PGPB fue el que menor AST mostró (Figura 15 A, B). Estos resultados nos sugirieron que las plantas del tratamiento PGPB fueron las menos afectadas por el estrés salino y que las plantas de todos los tratamientos fueron capaces de tolerar el estrés salino y no necesitar producir gran cantidad de azúcares para defenderse pudiendo aprovechar dicha energía para otras funciones.

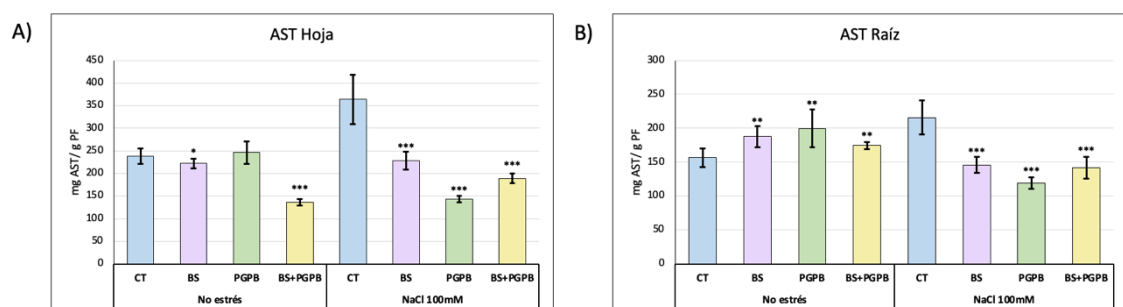


Figura 15. Acumulación de azúcares solubles totales (AST) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes. (A) AST en hoja. (B) AST en raíz. Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con

bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los tratamientos y condiciones probados. El Y representa la AST en miligramo (mg) por gramo (g) de peso fresco (PF) de tejido. Las barras representan el error estándar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$ representan la significancia según las pruebas de t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

Otro compuesto con función osmoprotectora en las plantas es la prolina. En condiciones de estrés salino, las plantas acumulan prolina en mayores cantidades que las plantas en condiciones no estresantes tanto en raíz como en hoja, tal y como pudimos observar en la (Figura 16 A, B). Esto es debido a que, el déficit de sal y agua, contribuyen a la acumulación de prolina en las plantas (Ashraf y Harris, 2004). La prolina es un soluto compatible que estabiliza la membrana celular y actúa para evitar que el NaCl altere la membrana celular (Ashraf y Harris, 2004). En una investigación realizada recientemente (Ahmed *et al.*, 2019), encontraron una correlación positiva entre la acumulación de prolina y las concentraciones crecientes de sal en todos los tratamientos y plantas de lechuga. Se esperaba encontrar estos resultados debido a su coherencia ya que, bajo estrés salino, la prolina protege a las enzimas, la maquinaria fotosintética y las membranas celulares contra el estrés oxidativo, aumentando en consecuencia la tolerancia a la salinidad en las plantas (Baz *et al.*, 2020). Sin embargo, en nuestros resultados no se cumplió en su totalidad. En hoja, en condiciones de salinidad, el tratamiento con mayor acumulación de prolina fue el CT y el de menor acumulación el tratamiento BS+PGPB (Figura 16 A). Por otro lado, en raíz, el tratamiento de mayor acumulación fue BS y el de menor también fue BS+PGPB (Figura 16 B). Estos resultados nos sugirieron que, las plantas del tratamiento BS+PGPB, pudieron ser las menos afectadas por el estrés salino con respecto al CT al no necesitar sintetizar una gran cantidad de prolina con la que defenderse.

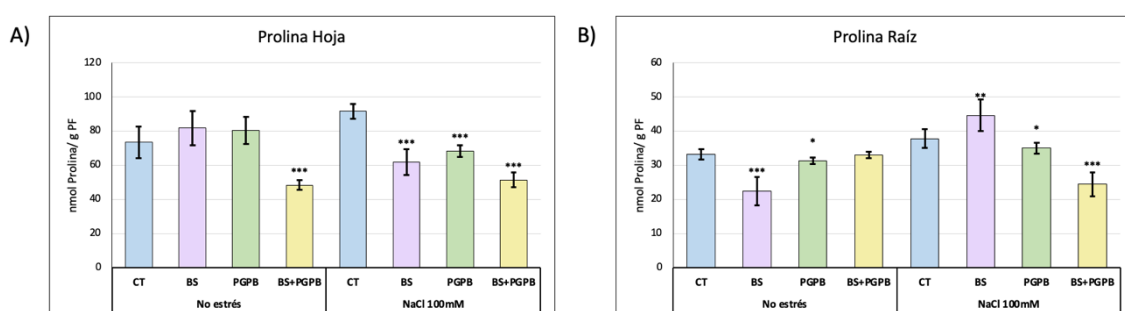


Figura 16. Contenido en prolina en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes. (A) Contenido en prolina en hoja. (B) Contenido en prolina en raíz. Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los tratamientos y condiciones probados. El Y representa (A) el contenido en prolina en hoja en nanomol (nmol) por gramo (g) de peso fresco (PF) de hoja de lechuga y (B) el contenido en prolina en raíz en nanomol (nmol) por gramo (g) de peso fresco (PF) de raíz de lechuga. Las barras representan el error estándar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$ representan la significancia según las pruebas de t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

También se determinó la acumulación de antioxidantes no enzimáticos durante la exposición al estrés salino, concretamente, la de flavonoides y fenoles totales, tanto en raíz como en hoja de plantas de lechuga. Estos compuestos son productos del metabolismo secundario sintetizados como respuesta a los cambios que se producen en el entorno y actúan como eliminadores de radicales libres en las plantas al acumularse en varios tejidos con el fin de tolerar el estrés salino (Şirin y Aslım, 2019). En raíz, estos compuestos no fueron detectados. Sin embargo, en hoja sí se pudo detectar actividad de estos dos grupos de compuestos antioxidantes no enzimáticos (Figura 21 A, B). Tanto flavonoides como fenoles, disminuyeron su concentración en todos los tratamientos en condiciones de estrés salino con respecto al tratamiento CT en hoja (Figura 21 A, B). En cuanto al contenido de flavonoides, en condiciones de estrés salino, se observó que el tratamiento con menor contenido fue BS+PGPB con respecto al tratamiento CT (Figura 21 A). Por el contrario, en el contenido en fenoles, se observó que el tratamiento con menor contenido fue PGPB con respecto al tratamiento CT en condiciones de estrés salino (Figura 21 B). Resultados

similares se obtuvieron en investigaciones anteriores llevadas a cabo en lechuga de la variedad romana confirmando que el contenido fenólico y el de flavonoides disminuye con el estrés salino (Kim *et al.*, 2008; Mahmoudi *et al.*, 2010).

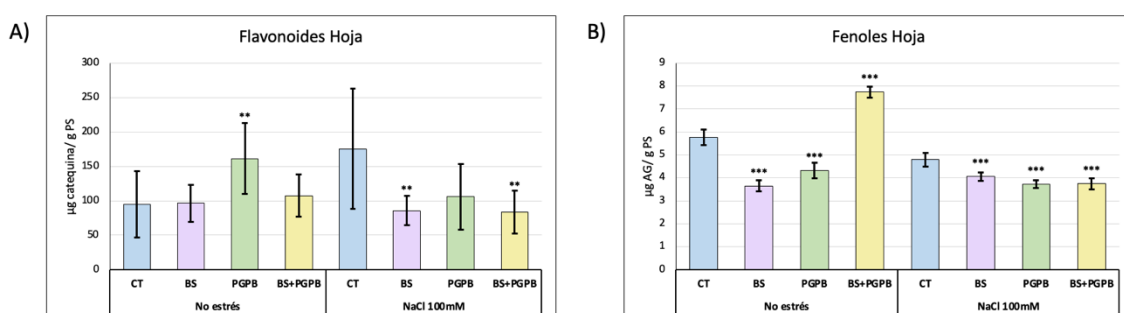


Figura 17. Contenido en antioxidantes no enzimáticos, flavonoides y fenoles, en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes. (A) Contenido en flavonoides totales en hoja. (B) Contenido en fenoles totales en hoja. Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los tratamientos y condiciones probados. El Y representa (A) contenido en flavonoides totales en microgramos (μg) de catequina por minuto (min) y miligramo (mg) de proteína y (B) contenido en fenoles totales en micromol (μmol) de ácido gálico (AG) por minuto (min) y miligramo (mg) de proteína. Las barras representan el error estándar. *** $p < 0,0001$ representa la significancia según las pruebas de t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

Las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión reductasa (GR) y la ascorbato peroxidasa (APX) protegen la membrana celular del daño oxidativo y proporcionan tolerancia a la salinidad al eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS). Investigaciones anteriores ya revelaron el papel y la importancia de estas enzimas antioxidantes en la eliminación de ROS bajo estrés salino en lechuga (Shams *et al.*, 2016; Hasanuzzaman *et al.*, 2021). Sin embargo, no se ha evaluado su papel ante una aplicación conjunta de bioestimulantes microbianos y no microbianos en plantas de lechuga cultivadas bajo estrés salino. Por este motivo, evaluamos en nuestro proyecto la variación de estas enzimas en condiciones de estrés salino y no estresantes tanto en hoja como en raíz de lechuga.

En el caso de la enzima superóxido dismutasa (SOD), se observó que en hoja aumentó la actividad de dicha enzima para todos los tratamientos en condiciones de estrés salino con respecto al tratamiento CT a excepción del tratamiento BS donde disminuyó ligeramente (Figura 17 A). En cambio, en raíz en condiciones de estrés salino, sí que se observó un aumento de la actividad de la SOD para todos los tratamientos con respecto al tratamiento CT (Figura 17 B). En ambos tejidos, en condiciones de estrés salino, las plantas del tratamiento BS+PGPB fueron las que mayor cantidad de SOD con respecto al tratamiento CT mostraron (Figura 17 A, B). Estos resultados nos indicaron que, la acción combinada del BS CalBio con PGPB, podría permitir a la planta tolerar mejor el estrés por salinidad ya que posee una mayor actividad antioxidante de tipo SOD para combatir el daño oxidativo y eliminar las ROS generadas como consecuencia de este estrés. Como en otras investigaciones realizadas (Omari y Nhiri, 2015), se observó una mayor actividad de la SOD en raíz que en hoja sugiriendo que esta enzima y tejido toleran mejor el estrés salino (Panda y Khan, 2004).

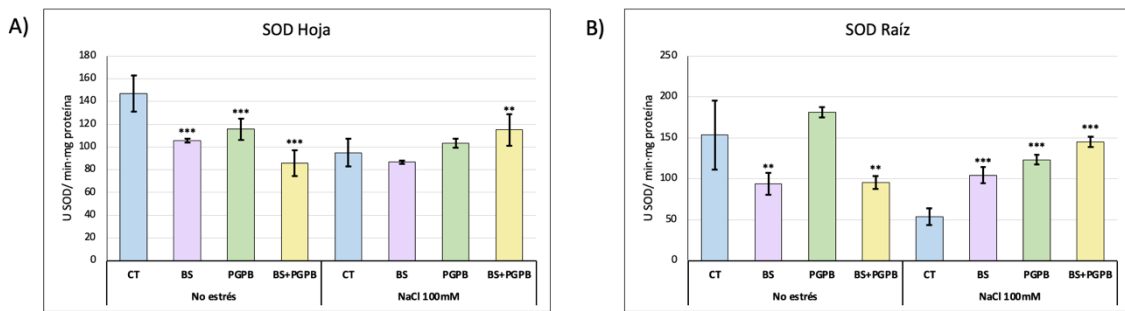


Figura 18. Actividad enzimática antioxidante de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes. (A) Actividad de la SOD en hoja. (B) Actividad de la SOD en raíz. Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los tratamientos y condiciones probados. El Y representa la actividad de la SOD en U SOD por minuto (min) y miligramo (mg) de proteína. Las barras representan el error estándar. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$ representan la significancia según las pruebas de t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

Por otro lado, en el caso de la enzima catalasa (CAT) en condiciones de estrés salino, su actividad fue menor en hoja en todos los tratamientos con respecto al tratamiento CT (Figura 18 A). Por el contrario, en raíz en condiciones de estrés salino, todos los tratamientos mostraron una mayor cantidad de CAT con respecto al tratamiento CT a excepción del tratamiento BS (Figura 18 B). Estos resultados nos sugirieron que las hojas fueron capaces de tolerar el estrés salino al no necesitar una mayor cantidad de enzima CAT para combatir el daño oxidativo y eliminar las ROS, mientras que las raíces sí que sufrieron más estas condiciones de estrés salino al necesitar mayor actividad CAT que el tratamiento CT (Figura 18 A, B). Se ha evaluado la actividad CAT tanto en raíz como en hoja de lechuga en estudios anteriores, pero sin la aplicación de bioestimulantes (Mahmoudi *et al.*, 2010). Por esta razón, la importancia de nuestro proyecto y ser el primero en evaluar la actividad enzimática antioxidante ante la aplicación conjunta de bioestimulantes microbianos y no microbianos en plantas de lechuga cultivadas bajo estrés salino.

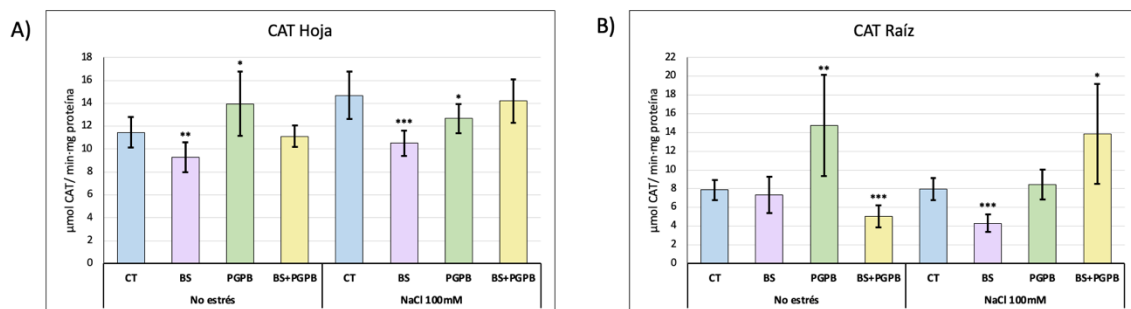


Figura 19. Actividad enzimática antioxidante de la catalasa (CAT) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes. (A) Actividad de la CAT en hoja. (B) Actividad de la CAT en raíz. El eje X representa los tratamientos y condiciones probados. El Y representa la actividad de la CAT en micromol (μmol) de CAT por minuto (min) y miligramo (mg) de proteína. Las barras representan el error estándar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$ representan la significancia según las pruebas de t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

Se evaluó también la actividad enzimática de la glutatión reductasa (GR) en hoja y raíz de lechuga (Figura 19 A, B). En hoja, en condiciones de estrés salino, se observó una disminución de la actividad enzimática GR para todos los tratamientos con respecto al tratamiento CT (Figura 19 A). En este caso, el tratamiento BS+PGPB fue el que menor cantidad de GR mostró con respecto al tratamiento CT (Figura 19 A). En cambio, en raíz en condiciones de estrés salino, se observaron diferentes resultados (Figura 19 B). En este caso, todos los tratamientos mostraron una menor actividad GR con respecto al CT a excepción del tratamiento BS+PGPB que aumentó (Figura 19 B). Varios autores que investigan cultivares tolerantes y sensibles a la salinidad, han sugerido que el carácter de tolerancia a la sal está relacionado con una mayor actividad de la GR en cultivares

tolerantes a la salinidad (Hernández *et al.*, 2000, Sudhakar *et al.*, 2001, Meloni *et al.*, 2003). Pudimos observar en estos resultados que, la acción combinada del bioestimulante CalBio con PGPB en raíces, podría permitir a las plantas de lechuga tolerar mejor el estrés salino y verse menos afectadas por él.

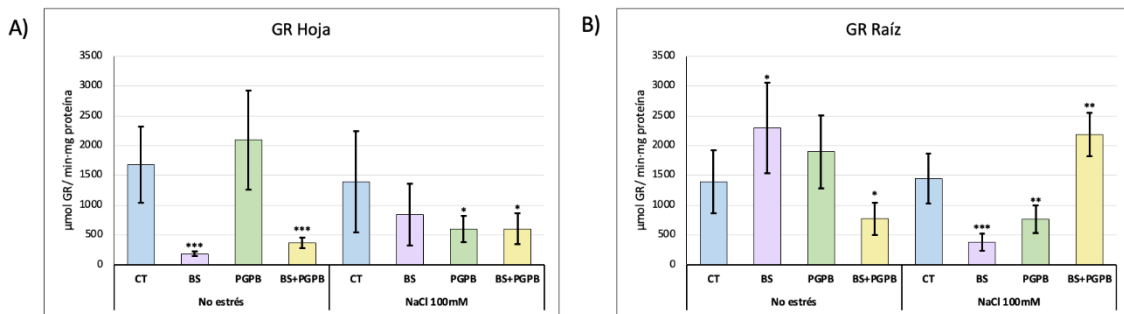


Figura 20. Actividad enzimática antioxidante de la enzima glutatión reductasa (GR) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes. (A) Actividad de la GR en hoja. (B) Actividad de la GR en raíz. Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los tratamientos y condiciones probados. El Y representa la actividad de la GR en micromol (μmol) de GR por minuto (min) y miligramo (mg) de proteína. Las barras representan el error estándar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$ representan la significancia según las pruebas de t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

Asimismo, la actividad APX fue evaluada en hoja y raíz de plantas de lechuga tanto en condiciones no estresantes como en condiciones de estrés salino (Figura 20 A, B). Se observó una menor cantidad de APX en todos los tratamientos con respecto al tratamiento CT tanto en raíz como en hoja (Figura 20 A, B), siendo destacable el resultado obtenido en hoja en condiciones de salinidad donde el tratamiento BS+PGPB fue el que menor cantidad APX mostró con respecto al tratamiento CT (Figura 20 A). Resultados similares se observaron en raíz y hoja en estudios anteriores realizados en soja, pero sin la aplicación de bioestimulantes (Doğan, 2011). Por esta razón, la importancia de nuestro proyecto y ser el primero en evaluar la actividad enzimática antioxidante ante la aplicación conjunta de bioestimulantes microbianos y no microbianos en plantas de lechuga cultivadas bajo estrés salino.

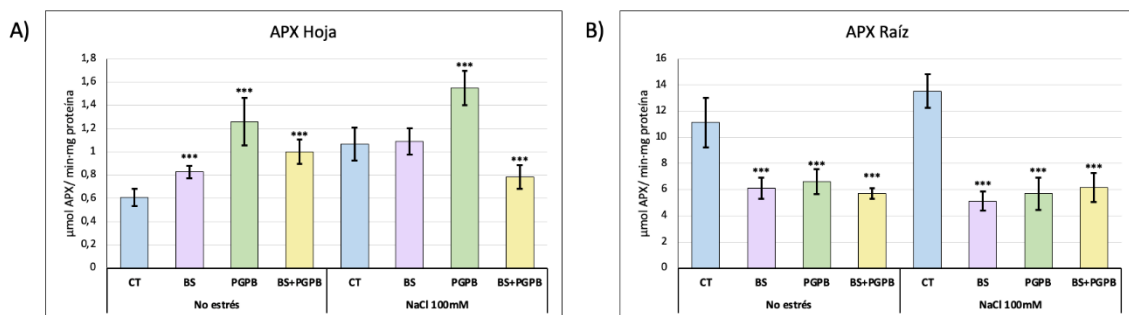


Figura 21. Actividad enzimática antioxidante de la enzima ascorbato peroxidasa (APX) en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes. (A) Actividad de la APX en hoja. (B) Actividad de la APX en raíz. Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los tratamientos y condiciones probados. El Y representa la actividad de la APX en micromol (μmol) de APX por minuto (min) y miligramo (mg) de proteína. Las barras representan el error estándar. *** $p < 0,0001$ representa la significancia según las pruebas de t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

La peroxidación lipídica de las membranas inducida por ROS es un reflejo del daño inducido por el estrés a nivel celular (Jain *et al.*, 2001). Asimismo, el nivel de malondialdehído (MDA), un producto de descomposición de ácidos grasos poliinsaturados producido durante la

peroxidación de los lípidos de membrana, se utiliza a menudo como indicador de daño oxidativo a lípidos (DOL) (Mittler, 2002). En nuestro proyecto, el contenido de MDA se utilizó como biomarcador de la peroxidación lipídica y fue evaluado tanto en hoja como en raíz (Figura 22 A, B). En raíz, en condiciones de estrés salino, se observó una disminución de MDA en todos los tratamientos con respecto al tratamiento CT (Figura 22 B). Tanto en raíz como en hoja, el tratamiento BS+PGPB fue el que menos MDA mostró con respecto al tratamiento CT (Figura 22 A, B). Este resultado nos indicó que la acción combinada del bioestimulante CalBio con PGPB podría permitir a las plantas de lechuga tolerar mejor el estrés salino y verse menos afectadas por él. Los resultados obtenidos en su conjunto nos mostraron que las raíces se vieron menos afectadas que las hojas por la salinidad. Tal fenómeno ya se observó en otros estudios (Salim, 1989) y no se comprende bien, ya que las raíces son los principales sitios de contacto entre la planta y las altas concentraciones externas de sales (Bajji *et al.*, 1998).

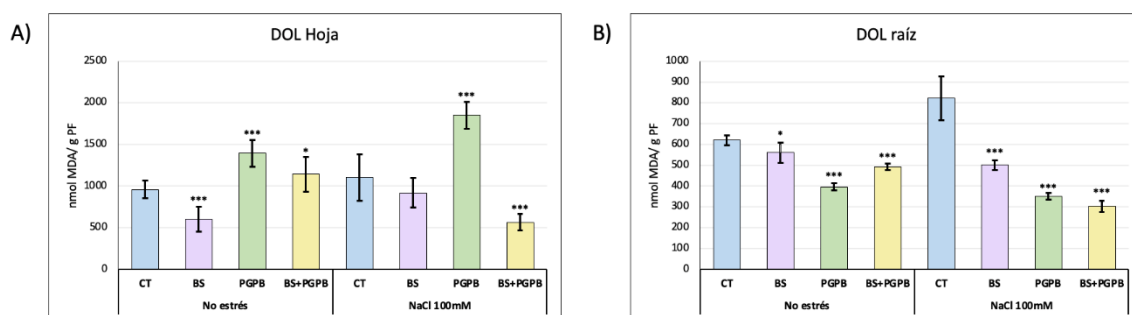


Figura 22. Daño oxidativo a en plantas de lechuga cultivadas en condiciones de estrés salino y condiciones no estresantes. (A) DOL en hoja. (B) DOL en raíz. Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). El eje X representa los tratamientos y condiciones probados. El Y representa el DOL en nanomol (nmol) de malondialdehído (MDA) por gramo (g) de peso fresco (PF). Las barras representan el error estándar. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,0001$ representan la significancia según las pruebas de t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

Para tener una visión general del efecto sinérgico de combinar el bioestimulante no microbiano CalBio (BS) con la cepa BM08 (PGPB), realizamos análisis de componentes principales (PCA) en hoja (Figura 23 A) y raíz (Figura 23 B) de plantas de lechuga bajo condiciones de estrés salino. El PCA se realizó con datos del efecto de los diferentes tratamientos sobre los parámetros fisiológicos y bioquímicos de hoja de lechuga como son: el contenido hídrico relativo (CHR) y la eficiencia del uso del agua (EUA), la conductividad eléctrica de la hoja, el rendimiento del fotosistema II (FSII), el contenido de pigmentos fotosintéticos y antioxidantes no enzimáticos. Además, se analizó la acumulación de solutos osmoprotectores y enzimas antioxidantes tanto en raíz como en hoja. La distribución de las muestras mostró correlación entre los tres tratamientos en hoja, distanciados del control (Figura 23 A). Sin embargo, los diferentes tratamientos no se correlacionaron en raíz, donde el tratamiento BS+PGPB fue el más alejado del control (Figura 23 B). Tanto los tratamientos de raíz como los de hoja se alejaron de las muestras control, mostrando un cambio en los parámetros fisiológicos y bioquímicos debido a la aplicación individual y combinada de bioestimulantes microbianos y no microbianos.

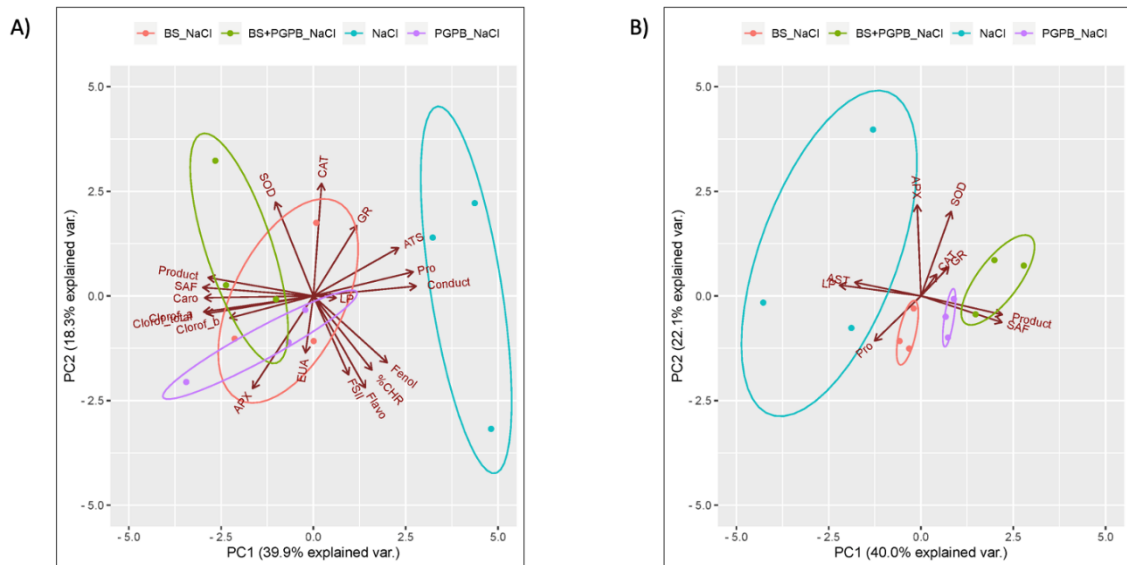


Figura 23. Biplot del análisis de componentes principales (PCA) de los tratamientos con respecto a los parámetros fisiológicos y bioquímicos en condiciones de estrés salino. El análisis se realizó en hoja (A) y en raíz (B). Tratamientos: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). Factor de alivio del estrés (SAF); Azúcares solubles totales (AST); Prolina (PRO); Contenido de flavonoides totales (TFC); Contenido de fenoles totales (TPC); peroxidación lipídica (LP); superóxido dismutasa (SOD); catalasa (CAT); glutatión reductasa (GR); ascorbato peroxidasa (APX); Porcentaje de contenido relativo de agua (% CHR); Eficiencia del uso del agua (EUA); Clorofila a (Chl a); Clorofila b (Chl b); Carotenoides (Caro); Rendimiento del fotosistema II (FSII).

También se realizó un mapa de calor con agrupamiento jerárquico de Pearson con respecto al control tanto en hoja como en raíz (Figura 24 A, B). Este análisis mostró diferencias entre tratamientos y la respuesta al estrés salino. Tanto en los tejidos de raíz como de hoja, el tratamiento combinado de BS con PGPB (BS+PGPB) se clasificó por separado de los tratamientos individuales (BS y PGPB). Como se ve en la distribución de las muestras de hoja en el PCA, los resultados de los tres tratamientos fueron muy similares (Figura 23 A, Figura 24 A). En este tejido se observó que todos los tratamientos presentaron una mayor concentración de pigmentos fotosintéticos en comparación con el control. Sin embargo, disminuyeron el % CHR, EUA, los osmolitos y los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En el caso del tratamiento BS+PGPB, se observó una menor concentración de prolina (Pro), peroxidación lipídica (LP), conductividad foliar y APX con respecto a los tratamientos individuales (Figura 24 A). Por otro lado, este tratamiento combinado mostró la menor producción de AST, Pro, LP y APX en raíces, pero la concentración de CAT y GR fue mayor a la detectada en el resto de los tratamientos (Figura 24 B).

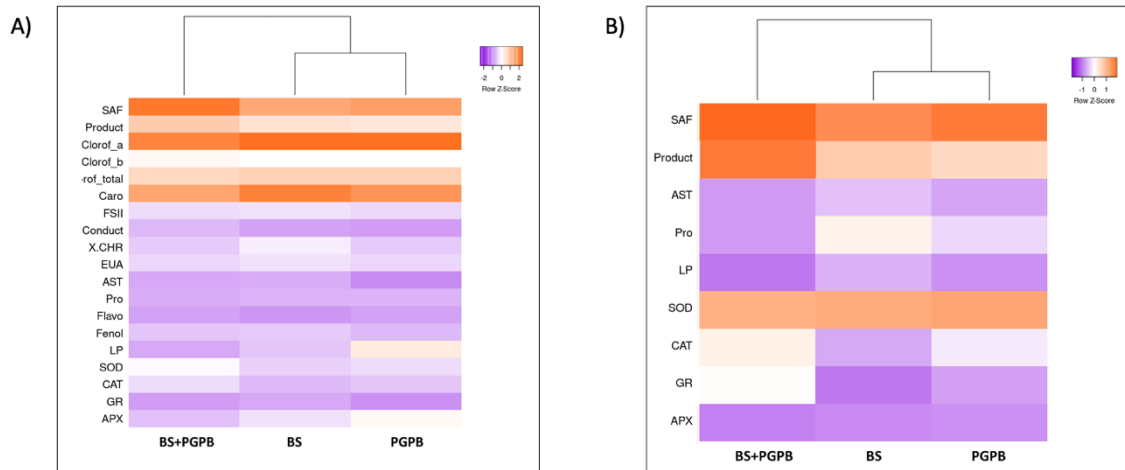


Figura 24. Mapa de calor agrupado de la correlación de los tratamientos con respecto a los parámetros fisiológicos y bioquímicos en condiciones de estrés salino. El análisis se realizó en hoja (A) y en raíz (B). Tratamientos: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). Factor de alivio del estrés (SAF); Azúcares solubles totales (AST); Prolina (PRO); Contenido de flavonoides totales (TFC); Contenido de fenoles totales (TPC); peroxidación lipídica (LP); superóxido dismutasa (SOD); catalasa (CAT); glutatión reductasa (GR); ascorbato peroxidasa (APX); Porcentaje de contenido relativo de agua (% CHR); Eficiencia del uso del agua (EUA); Clorofila a (Chl a); Clorofila b (Chl b); Carotenoides (Caro); Rendimiento del fotosistema II (FSII).

4.6. Contenido en fitohormonas en raíces y hojas de lechuga tratadas con CalBio y PGPB bajo condiciones de estrés salino

Se investigó el efecto de los bioestimulantes sobre el perfil hormonal medido empleando el sistema de cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento (UHPLC). Se sabe que la respuesta de las plantas al estrés abiótico implica una respuesta hormonal compleja (Waadt *et al.*, 2022), y se ha demostrado que la diferencia entre cultivares tolerantes y sensibles podría deberse a la concentración hormonal (Chevilly *et al.*, 2021). También se ha descrito que PGPB y bioestimulantes pueden alterar la respuesta hormonal (Bhat *et al.*, 2022; Yakhin *et al.*, 2017). Como análisis estadístico, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). En consecuencia, se estudió la distribución espacial de las réplicas biológicas de los tratamientos en los diferentes tejidos analizados y en condiciones de salinidad (Figura 25 A, B). En hoja (Figura 25 A), se observó que los tratamientos PGPB y BS+PGPB se alejaron del control y que una de las réplicas pertenecientes a PGPB tuvo una alta correlación con las réplicas de BS+PGPB. El vector correspondiente a la hormona isopenteniladenosina (IPR) contribuyó significativamente a estos tratamientos. Por otro lado, en raíz, se observó una alta relación entre el control y el tratamiento BS+PGPB (Figura 25 B).

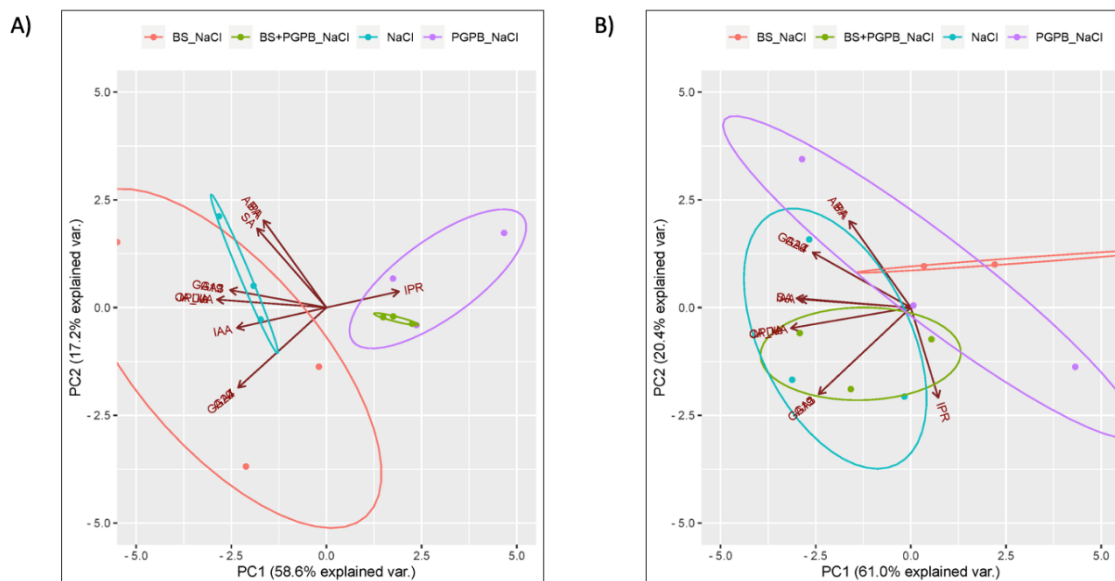


Figura 25. Biplot del análisis de componentes principales (PCA) de la correlación de los tratamientos con respecto a las hormonas en condiciones de estrés salino. El análisis se realizó en hoja (A) y en raíz (B). Tratamientos: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). Hormonas: giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), conjugado de isoleucina JA (JA-Ile), ácido indol-3-acético (AIA), ácido faseico (PA), ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), isopenteniladenosina (IPR) y ácido salicílico (SA).

En cuanto a los mapas de calor, éstos se realizaron tras confrontar los tratamientos frente al control (Figura 26 A, B). Como en el caso de los datos fisiológicos y bioquímicos (Figura 24 A, B), BS+PGPB se agrupó independientemente de los tratamientos BS y PGPB en ambos tejidos analizados (Figura 26 A, B). Destaca la alta concentración de IPR detectada en BS+PGPB en los dos tejidos, que fue un 200 % superior a los datos del control. La IPR es un tipo de citoquinina (CK), la cual, es de gran importancia en la proliferación y diferenciación celular (Singh *et al.*, 2017). Se ha demostrado, en anteriores investigaciones, que los microorganismos asociados a plantas mejoran la tolerancia de las plantas al estrés salino mediante mecanismos como la producción de osmoprotectores, antioxidantes no enzimáticos, enzimas antioxidantes y fitohormonas como la IPR (Singh *et al.*, 2017; Arora *et al.*, 2017). Las CKs producidas por microorganismos mejoran la división celular, el desarrollo de la raíz y la formación de los pelos radiculares, inhiben la elongación de la raíz y la iniciación del tallo y mejoran otras respuestas fisiológicas (Arora *et al.*, 2017). Además, los extractos de algas como los presentes en el bioestimulante utilizado, se caracterizan por mejorar las propiedades del suelo y el crecimiento vegetal, ya que están compuestos por carbohidratos y reguladores del crecimiento de las plantas como CKs y giberelinas (GAs). De esta forma, contribuyen a un crecimiento eficaz de las plantas bajo condiciones adversas como el estrés salino (Crouch y Staden, 1993). Por tanto, el resultado obtenido de una alta concentración de IPR nos indicó que, la capacidad de la planta para aclimatarse al estrés salino depende de su interacción con microorganismos que tienen la capacidad de producir fitohormonas del tipo ácido indolacético (AIA), GAs y CKs como la IPR (Berg *et al.*, 2013). Analizando las hormonas presentes en el tratamiento BS+PGPB en hoja de lechuga, se observó que la mayoría de las hormonas tuvieron una concentración menor que las condiciones control excepto IPR (Figura 4 C). Sin embargo, en el tratamiento con PGPB se observó presencia positiva de AIA, ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA) y varias GAs. Esto puede deberse a que, las PGPB que poseen capacidad de producción de ciertas hormonas, estimulan la síntesis endógena de dichas hormonas y compensan así la reducción inducida por la salinidad en las plantas (Liu *et al.*, 2013). Como en el caso del tratamiento BS+PGPB, PGPB también presentó regulación negativa de ácido gamma-aminobutírico (GABA) y ácido faseico (PA), pero la concentración detectada fue menor (Figura

26 A). Por otro lado, las hormonas presentes en raíz, para los tratamientos PGPB y BS+PGPB dieron un perfil de concentración hormonal muy similar entre ellas. Ambos tratamientos presentaron concentraciones mayores que el control de las hormonas IAA, IPR, SA, GA1, GA3 y GA19 (Figura 26 B). En este caso, se volvió a observar lo anteriormente descrito, que las condiciones de salinidad redujeron la síntesis y concentración de hormonas como las GAs, mientras que la inoculación con PGPB activó el nivel endógeno de dichas hormonas. De esta forma, se activan las estrategias que mitigan el estrés por salinidad previniendo así los daños causados por dicho estrés (Shahzad *et al.*, 2016). Tanto en raíz como en hoja, el tratamiento BS mostró un perfil hormonal diferente al de los tratamientos que contenían bacterias (PGPB y BS+PGPB). En hoja, la hormona en mayor proporción fue la IPR para el tratamiento BS+PGPB. También lo fue en el caso de raíz para los tratamientos BS+PGPB y PGPB.

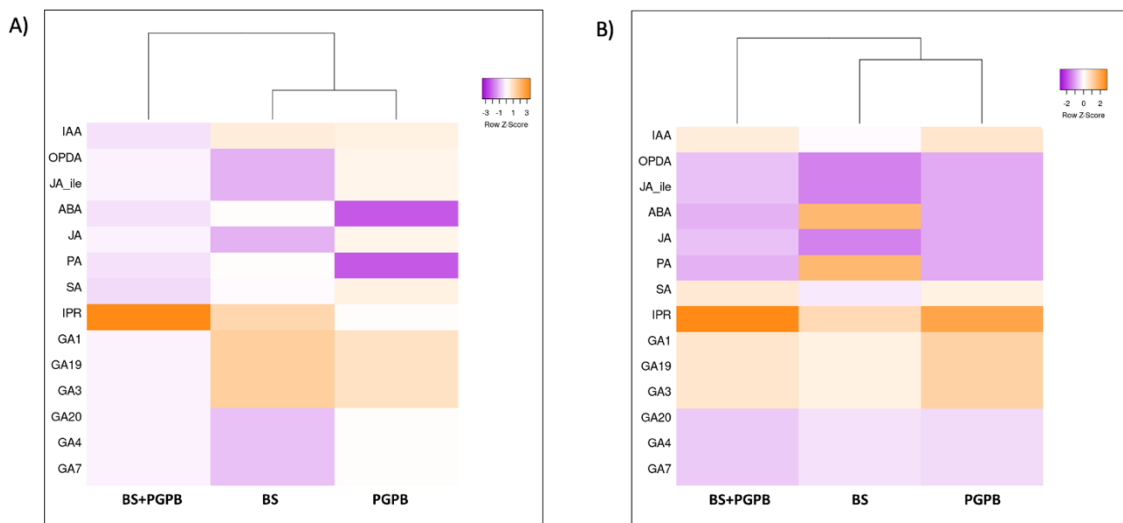


Figura 26. Mapa de calor agrupado de la correlación de los tratamientos con respecto a las hormonas en condiciones de estrés salino. El análisis se realizó en hoja (A) y en raíz (B). Tratamientos: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). Hormonas: giberelinas (GA), ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), conjugado de isoleucina JA (JA-Ile), ácido indol-3-acético (AIA), ácido faseico (PA), ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), isopenteniladenosina (IPR) y ácido salicílico (SA).

Dentro de las diferentes hormonas vegetales, las auxinas como el ácido indolacético (AIA), juegan un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. La acumulación y redistribución de auxinas se ve afectada por el estrés salino (Petersson *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Esta redistribución de las auxinas, en los tejidos vegetales, se correlaciona con un crecimiento reducido. Por otro lado, el ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal que actúa como molécula señal endógena permitiendo a las plantas sobrevivir a condiciones ambientales adversas graves, como es el caso del estrés por salinidad y sequía. Esta hormona vegetal interviene regulando diversos procesos de desarrollo de las plantas, así como las respuestas adaptativas a los cambios ambientales (Raghavendra *et al.*, 2010). De hecho, se ha descubierto que la exposición de las plantas a estreses abióticos, incluida la sequía y un elevado estrés salino, induce rápidamente un aumento proporcional en el nivel endógeno de ABA (Zhu, 2002) y la expresión de sus genes biosintéticos en las plantas (Zhu, 2002). Por tanto, un alto contenido en ABA, ayuda a las plantas a aclimatarse en condiciones de menor disponibilidad de agua al cerrar los estomas y acumular numerosas proteínas y osmoprotectores para el ajuste osmótico. Sin embargo, en nuestro proyecto, se observó que en el caso de las hojas el tratamiento salino no indujo una acumulación de ABA. Por el contrario, los tejidos de raíz no mostraron la misma respuesta y mantuvieron prácticamente la misma cantidad de ABA en sus tejidos a lo igual que en anteriores investigaciones realizadas (Jia *et al.*, 2002). Cuando el ABA es oxidado, se obtiene principalmente el metabolito conocido como ácido faseico (PA). Es un

isoprenoide y una fitohormona que regula importantes procesos fisiológicos vegetales, el desarrollo de las plantas y su adaptación ambiental actuando como una molécula de señalización (Weng *et al.*, 2016). También el ácido jasmónico (JA) es una molécula que actúa como hormona vegetal de señalización, la cual, es crítica para diversos procesos de desarrollo y respuestas de defensa en las plantas (Kazan y Manners, 2012). De manera similar al ABA, una acumulación de niveles endógenos de JA, es propia de cultivos tolerantes a la salinidad en comparación con cultivares sensibles a la salinidad. Además, se ha observado que el JA biológicamente activo, aumentó ante condiciones elevadas de salinidad en las plantas, lo que indica que un alto contenido de JA podría actuar como un protector eficaz contra los efectos adversos de la salinidad (Moons *et al.*, 1997). El ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) es un precursor esencial de JA, que se sintetiza a través de la vía metabólica del ácido α -linolénico (ALA) (Chini *et al.*, 2018). Investigaciones anteriores, sugieren que el OPDA participa en las respuestas al estrés biótico y abiótico, el desarrollo de embriones y la germinación de semillas (Savchenko *et al.*, 2014). En cambio, el ácido salicílico (SA) es un compuesto fenólico endógeno que actúa como señal para regular la respuesta de las plantas. Esta hormona protege a las células vegetales de la toxicidad ante la acumulación de iones y la muerte celular mediante la gestión de procesos como la defensa antioxidante, el metabolismo del nitrógeno, la fotosíntesis y el estrés hídrico (Khan *et al.*, 2015). El estrés abiótico puede inducir expresiones genéticas en serie en las plantas, algunas de las cuales están relacionadas con la activación dependiente de SA. Estos genes tienen un impacto en una variedad de procesos biológicos, incluidas las chaperonas moleculares, la biosíntesis de antioxidantes y la síntesis de metabolitos secundarios (Arif *et al.*, 2020). Otra hormona vegetal de importancia son las giberelinas (GAs), que participan en el crecimiento y el desarrollo, la germinación de las semillas, la expansión de las hojas, la fotomorfogénesis, el alargamiento del tallo y la floración (Davière y Achard, 2013). Sin embargo, altas concentraciones de GAs pueden causar estrés osmótico, interferir con el metabolismo normal de proteínas y ácidos nucleicos, inhibir la diferenciación y el desarrollo celular y, por lo tanto, ralentizar el crecimiento de las plantas. En los resultados obtenidos, no todos los tipos de GAs tuvieron una concentración superior al control. Sin embargo, una de las GAs acumuladas en raíz fue el ácido giberélico (GA3). Las GAs participan en la tolerancia al estrés salino, especialmente el GA3, aliviando los efectos del estrés salino sobre el contenido de pigmentos, la actividad de Hill (Aldesuquy y Gaber, 1993), la eficiencia en el uso del agua (Shah, 2007) y la relación hídrica de la planta (Yamaguchi, 2008).

4.7. Análisis de la respuesta metabólica al tratamiento con bioestimulantes microbianos y no microbianos en lechuga

Se realizó un análisis metabólico indirecto para determinar la respuesta metabólica en hojas y raíces de *Lactuca sativa* a diferentes tratamientos. En total, se detectaron 30 y 47 metabolitos primarios en raíces y hojas, respectivamente. Los datos se normalizaron mediante suma y escalado utilizando el método de Pareto. También se realizó un análisis del perfil metabólico en términos absolutos para estudiar la composición metabólica de los diferentes tratamientos. En hoja, se observó que la fructosa y la glucosa fueron los metabolitos con mayor concentración. En este tejido también destacaron el mioinositol, el ácido citramálico, el ácido aconítico y el ácido glicínico (Figura 28 A). Por el contrario, en raíz, la rafinosa y la sacarosa destacaron por su alta abundancia en todos los tratamientos y condiciones, pero también sobresalieron en menores concentraciones la fructosa y el ácido málico (Figura 28 B). Estos resultados coinciden con una de las respuestas más importantes de las plantas glicófitas, como la lechuga, al estrés por salinidad. Esta respuesta se basa en la acumulación de solutos orgánicos osmóticamente activos llamados osmolitos (Hasegawa *et al.*, 2000). Son un ejemplo de solutos orgánicos los azúcares, los cuales, mantienen el equilibrio osmótico y protegen las enzimas en presencia de altas concentraciones de sales donde también los ácidos orgánicos, como el ácido

málico, juegan un papel clave (Hajlaoui *et al.*, 2010). En el caso de los azúcares, son considerados como el principal factor que contribuye al ajuste osmótico y de gran importancia en diversos eventos metabólicos. En estos eventos metabólicos, funcionan como señal para regular la expresión de diferentes genes que intervienen en la fotosíntesis, la síntesis de osmolitos y el metabolismo de la sacarosa (Khan *et al.*, 2020). Por otro lado, el mioinositol, es un poliol cíclico de seis carbonos que actúa como precursor de otros polioles asociados al estrés hídrico (Streeter *et al.*, 2001). También actúa como osmoprotector en condiciones de estrés salino (Streeter *et al.*, 2001).

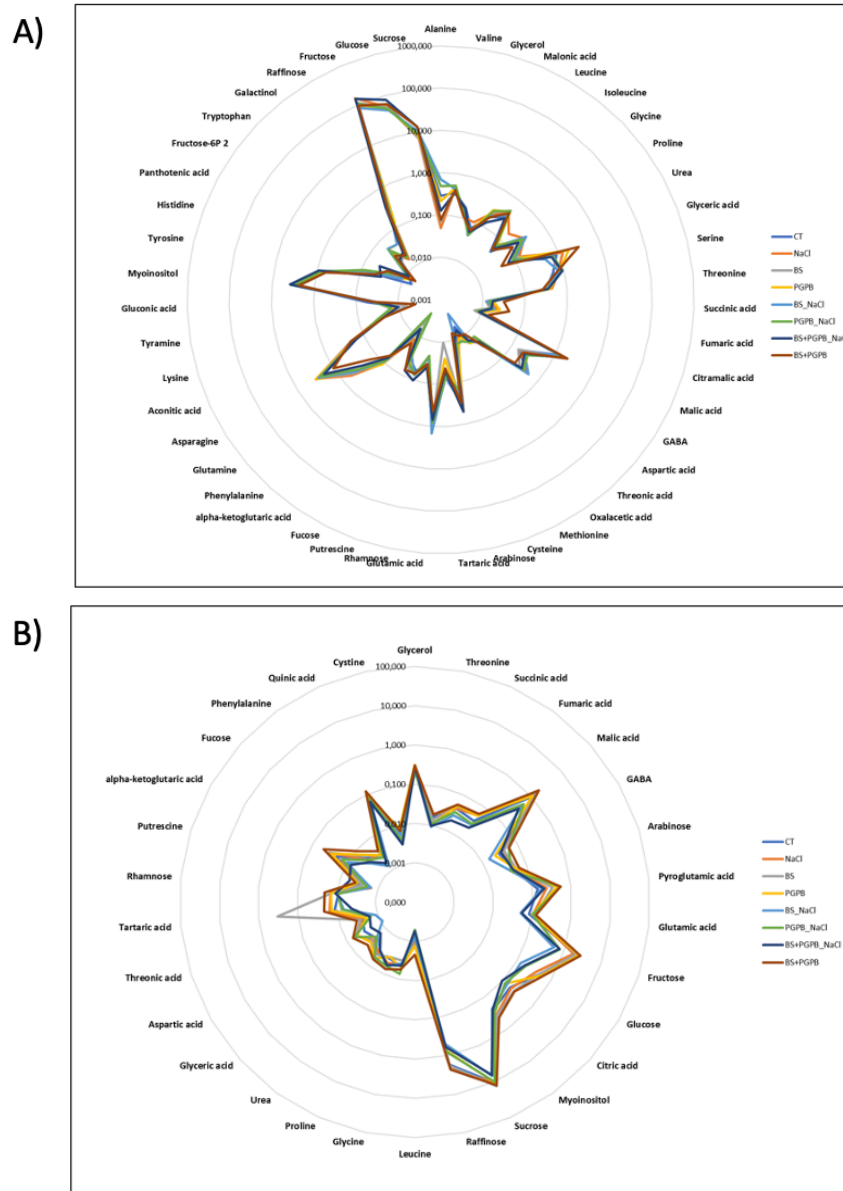


Figura 27. Diagrama radial del contenido metabólico de la lechuga en valores absolutos. Realizado en hoja (A) y en raíz (B). Tratamientos: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB).

Para estudiar qué metabolitos se acumularon de manera significativamente diferencial en hoja y raíz de lechuga, se estableció un *Fold change* (FC) de $\geq 1,5$ y un p-valor $\leq 0,05$. Se hicieron diagramas de Venn (Figura 29 A) con los metabolitos acumulados de manera significativamente diferencial utilizando el programa "InteractiveVenn" con el fin de identificar esos compuestos comunes entre los tratamientos probados en condiciones de estrés salino. Del total de metabolitos acumulados de manera significativamente diferencial, solo se identificaron

metabolitos comunes en las raíces entre los tres tratamientos probados (Figura 29 A). El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es un compuesto de señalización vegetal que se acumula rápidamente en los tejidos vegetales en respuesta al estrés biótico y abiótico y regula el crecimiento de las plantas (Ramesh *et al.*, 2015). Este fue el metabolito presente en los tres tratamientos, sobreacumulado en los tratamientos que contenían PGPB y subacumulado en el caso de BS (Figura 29 B). Además, en estudios anteriores, se ha detectado una fuerte acumulación de GABA en la rizosfera de plantas de tomate inoculadas con PGPB a lo igual que en nuestro caso (Zuluaga *et al.*, 2021). Por otro lado, hubo varios metabolitos compartidos entre dos tratamientos. En el caso de BS y PGPB, tenían ácido ascórbico como metabolito común, que estaba subacumulado en BS y sobreacumulado en PGPB (Figura 29 B). El ácido ascórbico es un ácido orgánico y uno de los antioxidantes más poderosos, que aumentan los componentes orgánicos totales tanto en tallos como raíces de la planta y mitigan el impacto inhibitor de la salinidad en el metabolismo de la planta (El-Sayed y Hagab, 2020). PGPB y BS+PGPB también mostraron un metabolito común: el ácido málico (Figura 29 A). En ambos tratamientos el ácido málico estuvo subacumulado (Figura 29 B). El ácido málico también es un ácido orgánico y antioxidante importante (El-Sayed y Hagab, 2020). Finalmente, BS y BS+PGPB también compartieron un único metabolito: el glicerol, que se sobreacumuló en ambos tratamientos (Figura 29 A, B; Tabla Suplementaria 3). El glicerol es un soluto compatible que actúa como osmoprotector en condiciones de estrés salino (Raymond *et al.*, 2020).

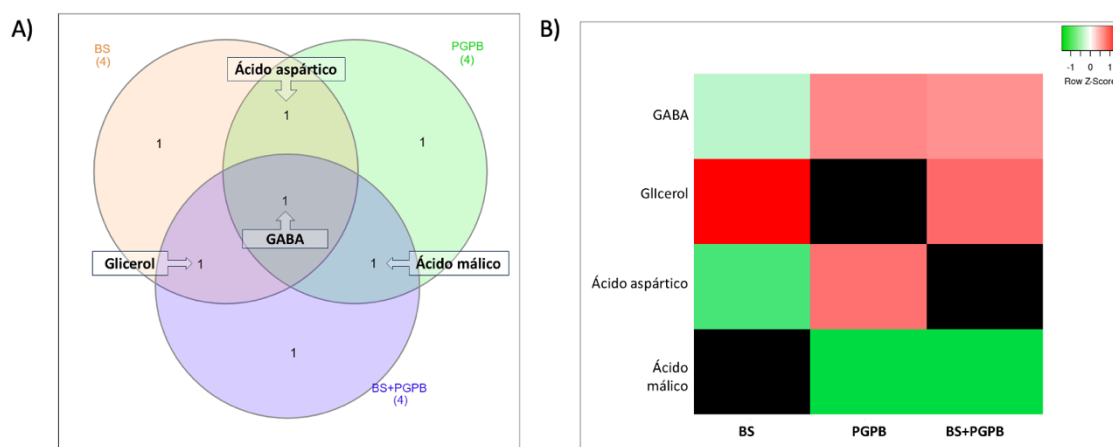


Figura 28. Metabolitos acumulados de forma significativamente diferencial en raíz de lechuga bajo condiciones de salinidad. (A) Diagrama de Venn de los metabolitos acumulados significativamente comunes con Fold-change $\geq 1,5$ y p -valor $\leq 0,05$. (B) Mapa de calor de los metabolitos acumulados de forma significativamente diferencial por tratamientos aplicados. El color rojo y verde representan los metabolitos sobreacumulados y subacumulados, respectivamente. El negro muestra la ausencia de metabolitos significativos. Los colores más intensos indican una mayor sobreacumulación o falta de acumulación de metabolitos. Tratamientos: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB).

4.8. Perfiles expresión génica en lechuga en respuesta al tratamiento con bioestimulantes

Se dispone de información limitada sobre los mecanismos moleculares que tienen lugar cuando las plantas se tratan con una combinación de bioestimulantes microbianos y no microbianos en condiciones de estrés abiótico. El análisis del cambio transcripcional de la lechuga en respuesta a bioestimulantes en hojas y raíces, en condiciones normales y de estrés salino, se evaluó mediante secuenciación de ARN (ARN-Seq). El ratio de mapeo promedio con el genoma de referencia de *Lactuca sativa* (GCF_002870075.4_Lsat_Salinas_v11) fue de 96,30% y el ratio de mapeo promedio por gen fue de 78,39%; se identificaron un total de 28669 genes en cada

muestra. Los genes expresados diferencialmente (GED) de lechuga en presencia de bioestimulantes se identificaron mediante el análisis DESseq2 (Love *et al.*, 2014), con criterios de p-valor $\leq 0,05$ y FC $\geq 1,5$ ($-1 \leq \text{Log}_2\text{FC} \leq 1$). Para obtener los GED se compararon los diferentes tratamientos con su respectivo control dependiendo del tejido y condición analizada (BS vs CT; PGPB vs CT; BS+PGPB vs CT). De los tratamientos probados, el tratamiento conjunto de CalBio y la cepa bacteriana *Bacillus megaterium* BM08 (BS+PGPB), fue el que mostró mayor número de GED tanto en hoja como en raíz y en las dos condiciones probadas. Este tratamiento destacó sobre todo en raíz, donde se detectaron 4763 GED en condiciones normales y 6703 GED en condiciones salinas, en comparación con los datos obtenidos en hoja donde se obtuvieron 617 y 1799 GED en condiciones normales y de estrés salino respectivamente (Figura Suplementaria 2). Con respecto a la expresión génica, se observó en hojas, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés salino, una mayor cantidad de genes subexpresados que sobreexpresados. Por el contrario, se observó una mayor cantidad de genes sobreexpresados en raíces en condiciones salinas (Figura Suplementaria 2). Esto nos indicó que las raíces tuvieron mayor respuesta a la aplicación del bioestimulante. Esto puede ser debido a que la aplicación de los bioestimulantes, tanto microbianos y no microbianos se realizaron radicularmente, siendo este tejido el primero en interactuar con estos productos. Además, se ha descrito anteriormente que la interacción de microorganismos con las raíces de la planta puede activar o inhibir diferentes mecanismos de la planta para establecer interacción (Trujillo *et al.*, 2015). Posteriormente, se compararon los GED de los tres tratamientos. Los diagramas de Venn (Figura 30) mostraron que 878 GED fueron comunes en los tres tratamientos en raíz bajo condiciones de estrés salino (Figura 30 D). En el resto de condiciones y tejidos, se detectaron pocos genes comunes en los tres tratamientos (Figura 30 A-C). Sin embargo, al comparar los tratamientos por pares, se observó que los tratamientos PGPB y BS+PGPB compartieron una mayor cantidad de genes en condiciones de estrés, destacando 646 GED en hoja (Figura 30 B) y 1483 GED en raíz (Figura 30 D).

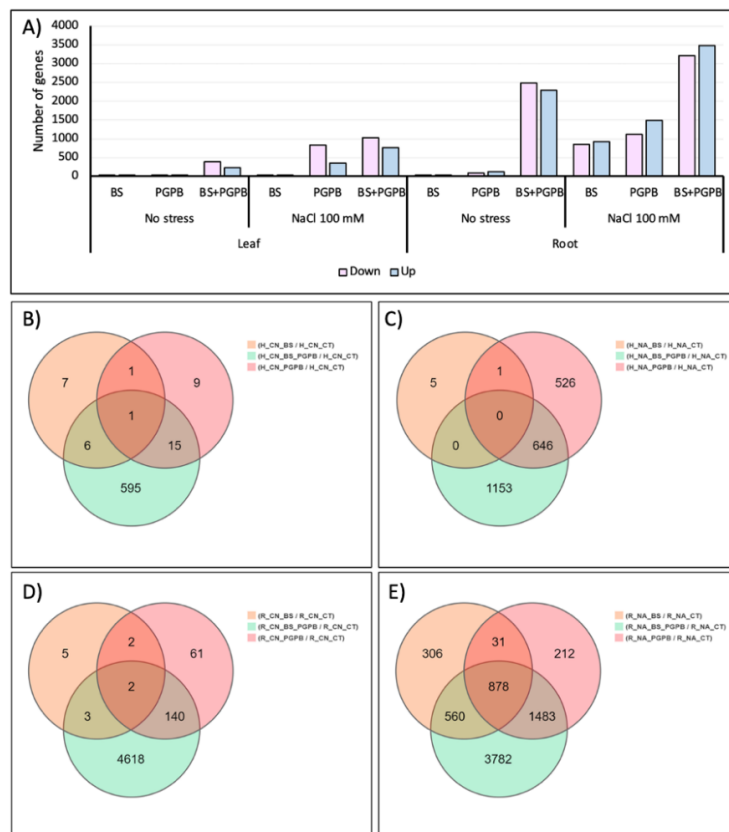


Figura 29. Genes expresados diferencialmente (GED) en los diferentes tratamientos bioestimulantes vs control. (A) Número de genes sobreexpresados (azul) y subexpresados (lila) tras el efecto de los diferentes tratamientos en hoja y

raíz, y en condiciones normales y de estrés salino. (B-E) Diagramas de Venn muestran la superposición de GED entre tratamientos: bioestimulante CalBio (BS) (naranja); bacterias promotoras del crecimiento vegetal BM08 (PGPB) (rosa); la combinación de CalBio con BM08 (BS+PGPB)(verde). La presencia de genes comunes entre los diferentes tratamientos se evaluó en (B,C) hoja y (D,E) raíz y en condiciones (B,D) normales y (C,E) de estrés salino. Cada círculo representa un grupo de conjuntos de genes y las áreas superpuestas por los diferentes círculos representan la intersección de estos conjuntos de genes. Las partes que no se superponen indican los genes expresados de forma única y los números en la figura indican la cantidad de genes en el área correspondiente.

En general, aproximadamente el 90 % de los GED estaban funcionalmente anotados de manera global según las bases de datos KEGG, GO, Pfam, Reactome EggNOG e InterPro, de los cuales el 36 % de los GED estaban bien anotados según las categorías de vías de KEGG. En el caso del enriquecimiento de la vía KEGG (Figura 31), se observó un cambio en las categorías funcionales según el tipo de tratamiento aplicado. En el tratamiento donde solo se utilizó CalBio (BS), se observó que la mayoría de los GED estaban involucrados en rutas metabólicas. Esto se observó en los dos tejidos vegetales y en las dos condiciones probadas (Figura 31), detectándose una ligera variación en hoja en condiciones normales (Figura 31 A). En los GED pertenecientes al tratamiento PGPB se observó que, si bien la categoría de Metabolismo continuó siendo la más dominante, también predominaron las categorías Procesamiento de Información Ambiental y Sistemas Organísmicos. Sin embargo, la categoría que prevaleció sobre las dos anteriores fue la de Procesamiento de Información Genética en salinidad. Por otro lado, el tratamiento combinatorio de CalBio y PGPB (BS+PGPB), presentó que los perfiles de enriquecimiento funcional de KEGG fueron muy similares tanto en raíz como en hoja en condiciones salinas, donde las categorías de Metabolismo y Procesamiento de Información Genética fueron las más predominantes. En raíz, en condiciones normales (Figura 31 B), el perfil funcional de BS+PGPB tuvo un perfil similar al de salinidad, aunque el predominio de la categoría Procesamiento de Información Ambiental fue más significativo entre sus GED (Figura 31).

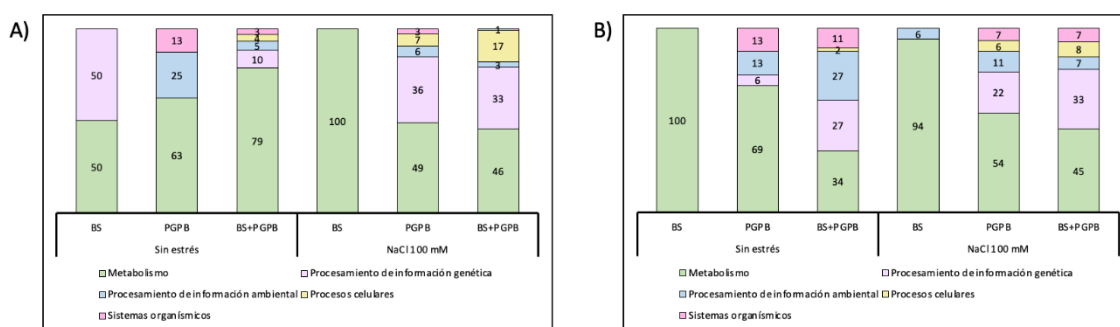


Figura 30. Porcentaje de genes clasificados en diferentes categorías funcionales según las vías de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG). Realizado tanto en hoja (A) como en raíz (B). El eje X representa los tratamientos y condiciones probados. Tratamientos: bioestimulante CalBio (BS); bacterias promotoras del crecimiento vegetal BM08 (PGPB), y la combinación de CalBio con la cepa PGPB BM08 (BS+PGPB).

También se estudiaron las vías KEGG compartidas mediante análisis de combinaciones de los diferentes tratamientos (Anexo I, Figura Suplementaria 3). En hoja, se observó que PGPB y BS+PGPB bajo salinidad compartían 29 y 30 vías presentes entre los genes sobrerregulados (Anexo I, Figura Suplementaria 3A) y subregulados (Anexo I, Figura Suplementaria 3), respectivamente. Además, estos dos tratamientos en condiciones de salinidad compartieron con el tratamiento BS+PGPB en condiciones normales, 22 y 32 vías entre los genes sobrerregulados (Anexo I, Figura Suplementaria 3A) y subregulados (Anexo I, Figura Suplementaria 3B), respectivamente. Entre los genes sobreexpresados, su función estaba relacionada con el metabolismo de carbohidratos, nucleótidos y aminoácidos, así como con diferentes vías relacionadas con el procesamiento de la información genética como la transcripción, la traducción, y la replicación y reparación. Entre los genes subexpresados, destacaron la biosíntesis y metabolismo de glucanos, el metabolismo de cofactores y vitaminas, la biosíntesis de otros metabolitos secundarios y el metabolismo de terpenoides y policétidos. Además, se

observó que BS+PGPB en las dos condiciones analizadas compartían 12 vías entre sus genes sobreexpresados (Anexo I, Figura Suplementaria 3 A), también relacionadas con el metabolismo. Por otro lado, en raíz, (Anexo I, Figura Suplementaria 3 C, D), se observó que los tratamientos que compartieron mayor número de vías fueron BS, PGPB y BS+PGPB en salinidad y BS+PGPB en condiciones normales, ambos entre genes sobreexpresados (52 vías) (Anexo I, Figura Suplementaria 3 C) y subexpresados (64 vías) (Anexo I, Figura Suplementaria 3 D). Las vías compartidas entre los genes sobreexpresados (Anexo I, Figura Suplementaria 3 C) estaban relacionadas principalmente con el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, el metabolismo de cofactores y vitaminas, así como con vías involucradas en el procesamiento de información genética, como la transcripción y la traducción. Entre los genes subexpresados (Anexo I, Figura Suplementaria 3D), también destacaron los relacionados con metabolitos de carbohidratos y otras vías metabólicas. En el Anexo II, se pueden consultar las diferentes rutas KEGG compartidas entre tratamientos. Se obtuvieron las rutas KEGG más destacadas (Anexo I, Figura Suplementaria 4), en los diferentes tratamientos bajo salinidad, teniendo en cuenta el ratio de enriquecimiento, un valor Q altamente significativo (burbuja roja) y un número de genes implicados en la ruta superior a 5. Se observó que de las vías más enriquecidas en hoja, PGPB y BS+PGPB mostraron vías coincidentes de ribosa y espliceosoma (Anexo I, Figura Suplementaria 4 B, C). La ribosa al ser un azúcar y un osmolito con función osmoprotectora confiere protección a la planta ante el estrés salino (Slama *et al.*, 2015). En cuando al espliceosoma, varios componentes del mismo han sido identificados con un papel clave en la regulación de las respuestas al estrés salino en las plantas (Hong *et al.*, 2023). Por el contrario, se observó que los tres tratamientos compartían varias vías en raíz (Anexo I, Figura Suplementaria 4 D-F), como la traducción de señales de hormonas vegetales, la biosíntesis de zeatina y la biosíntesis de benzoxazinoides. La zeatina es una fitohormona del grupo de las citoquininas que, bajo estrés salino, promueve el crecimiento y productividad de las plantas (Rady y Mohamed, 2015). Por otro lado, los benzoxazinoides son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas ante estreses bióticos y abióticos como la salinidad (Bakera y Rakoczy-Trojanowska, 2020). Además, PGPB y BS+PGPB (Anexo I, Figura Suplementaria 4 D, E) compartieron varias vías altamente enriquecidas, como la biosíntesis de carotenoides, la degradación de otros glucanos, la degradación de glucosaminoglicanos y el metabolismo de esfingolípidos. Todos estos lípidos poseen funciones esenciales en la célula vegetal, como formar parte de las membranas, y se ven fuertemente afectados por el estrés salino (Rahdari y Hoseini, 2011; Chapman *et al.*, 2012).

5. CONCLUSIONES

Tras la realización del presente trabajo de investigación como trabajo fin de máster, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. Se evaluó la posible sinergia del bioestimulante CalBio, desarrollado previamente en nuestro grupo de investigación, con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) bajo condiciones de estrés salino y se observó, que hubo colonización bacteriana en aquellos tratamientos en los que se aplicó PGPB (PGPB y BS+PGPB) tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés salino. También se observó cómo se obtuvo una mayor producción de fruto en aquellas plantas de lechuga que correspondían a los tratamientos PGPB y BS+PGPB tanto en condiciones normales como de estrés salino con unos resultados muy similares.
2. Tras el estudio, mediante medidas fisiológicas y bioquímicas, del efecto de la aplicación conjunta de bioestimulantes microbianos (PGPB) y no microbianos (CalBio) en plantas de lechuga cultivadas bajo estrés salino, se observaron buenos resultados. Estos resultados fueron cuantitativamente, en la mayoría de los casos, más desfavorables que los tratamientos individuales con BS o PGPB.
3. La cuantificación y evaluación del efecto del bioestimulante CalBio con respecto al estrés salino y el contenido hormonal en lechuga, mostró resultados significativos y diferenciales entre la acción conjunta del BS y PGPB y estos tratamientos de forma individual. En común, mostraron una alta concentración de la hormona vegetal IPR tanto para raíz como para hoja.
4. Por último, se evaluó el efecto del bioestimulante CalBio con respecto al estrés salino mediante estudios de metabolómica y transcriptómica. Se observó que los metabolitos que se acumularon de forma significativamente diferencial para los tratamientos probados (BS, PGPB, BS+PGPB) se encontraban en raíz y fueron GABA, ácido ascórbico, ácido málico y glicerol. También se estudiaron los diferentes perfiles de expresión génica y se observaron una mayor cantidad de genes expresados diferencialmente (GED) en raíz para los tratamientos probados (BS, PGPB, BS+PGPB). Estos genes en su mayoría estuvieron anotados funcionalmente en bases de datos KEGG y se observaron diferentes resultados según el tratamiento aplicado, aunque todos en su mayoría tuvieron una mayor cantidad de GED relacionados con el metabolismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelkader, M. M., Gaplaev, M. S., Terekbaev, A. A., & Puchkov, M. Y. (2021). The influence of biostimulants on tomato plants cultivated under hydroponic systems. *Journal of Horticultural Research*, 29(2), 107-116.
- Acosta-Motos, J. R., Ortuño, M. F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M. J., & Hernandez, J. A. (2017). Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy*, 7(1), 18.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro *Methods in enzymology*, 105, 121–126.
- Agarwal, P. K., Shukla, P. S., Gupta, K., & Jha, B. (2013). Bioengineering for salinity tolerance in plants: state of the art. *Molecular biotechnology*, 54, 102-123.
- Ahmed, S., Ahmed, S., Roy, S. K., Woo, S. H., Sonawane, K. D., & Shohael, A. M. (2019). Effect of salinity on the morphological, physiological and biochemical properties of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Bangladesh. *Open Agriculture*, 4(1), 361-373.
- Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Allen, J. A., Chambers, J. L., & Stine, M. (1994). Prospects for increasing the salt tolerance of forest trees: a review. *Tree physiology*, 14(7-8-9), 843-853.
- Amako, K., Chen, G. X., & Asada, K. (1994). Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology*, 35(3), 497-504.
- Ann, B. M., Devesh, S., & Gothandam, K. M. (2011). Effect of salt stress on expression of carotenoid pathway genes in tomato. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7(3), 87-94.
- Ashraf, M. P. J. C., & Harris, P. J. C. (2003). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant science*, 166(1), 3-16.
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A., & Wishart, D. S. (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic acids research*, 44(W1), W147-W153.
- Bajji, M., Kinet, J. M., & Lutts, S. (1998). Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant science*, 137(2), 131-142.
- Bakera, B., & Rakoczy-Trojanowska, M. (2020). Isolation and structural analysis of the Bx6 and Bx7 genes controlling the biosynthesis of benzoxazinoids in rye (*Secale cereale* L.). *Acta physiologiae plantarum*, 42(4), 56.
- Barbieri, G., Vallone, S., Orsini, F., Paradiso, R., De Pascale, S., Negre-Zakharov, F., & Maggio, A. (2012). Stomatal density and metabolic determinants mediate salt stress adaptation and water use efficiency in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 169(17), 1737-1746.

- Barrs, H. D., & Weatherley, P. E. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian journal of biological sciences*, 15(3), 413-428.
- Bates, L. S., Waldren, R. A., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39, 205-207.
- Baz, H., Creech, M., Chen, J., Gong, H., Bradford, K., & Huo, H. (2020). Water-soluble carbon nanoparticles improve seed germination and post-germination growth of lettuce under salinity stress. *Agronomy*, 10(8), 1192.
- Benito, P., Bellón, J., Porcel, R., Yenush, L., & Mulet, J. M. (2023). The biostimulant, potassium humate ameliorates abiotic stress in *Arabidopsis thaliana* by increasing starch availability. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12140.
- Benito, P., Ligorio, D., Bellón, J., Yenush, L., & Mulet, J. M. (2022). A fast method to evaluate in a combinatorial manner the synergistic effect of different biostimulants for promoting growth or tolerance against abiotic stress. *Plant Methods*, 18(1), 1-17.
- Benito, P., Ligorio, D., Bellón, J., Yenush, L., & Mulet, J. M. (2023). Use of *Yucca* (*Yucca schidigera*) Extracts as Biostimulants to Promote Germination and Early Vigor and as Natural Fungicides. *Plants*, 12(2), 274.
- Bettoni, M. M., Mogor, Á. F., Pauletti, V., & Goicoechea, N. (2014). Growth and metabolism of onion seedlings as affected by the application of humic substances, mycorrhizal inoculation and elevated CO₂. *Scientia Horticulturae*, 180, 227-235.
- Beyer Jr, W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical biochemistry*, 161(2), 559-566.
- Bhattacharya, A. (2019). Global climate change and its impact on agriculture. *Changing climate and resource use efficiency in plants*, 1, 1-50.
- Blainski, A., Lopes, G. C., & De Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18(6), 6852-6865.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bulgari, R., Franzoni, G., & Ferrante, A. (2019). Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy*, 9(6), 306.
- Cabot, C., Sibole, J. V., Barceló, J., & Poschenrieder, C. (2009). Abscisic acid decreases leaf Na⁺ exclusion in salt-treated *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 187-192.

- Cahn, M. D., & Ajwa, H. A. (2005). Using Polyacrylamide (PAM) for Reducing Sediment and Nutrient Losses from Cool Season Vegetable Fields. *HortScience*, 40(4), 1110C-1110.
- Carlberg, I., & Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. In *Methods in enzymology*, 113(59), 484-490.
- Carlson, R., Tugizimana, F., Steenkamp, P. A., Dubery, I. A., Hassen, A. I., & Labuschagne, N. (2020). Rhizobacteria-induced systemic tolerance against drought stress in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Microbiological research*, 232, 126388.
- Chapman, K. D., Dyer, J. M., & Mullen, R. T. (2012). Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: thematic review series: lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man. *Journal of lipid research*, 53(2), 215-226.
- Chartzoulakis, K., & Klapaki, G. (2000). Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Scientia horticulturae*, 86(3), 247-260.
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 103(4), 551-560.
- Cheeke, P. R., & Otero, R. (2005). Yucca, quillaja may have role in animal nutrition. *Feedstuffs*.
- Chen, L., Ren, F., Zhong, H., Jiang, W., & Li, X. (2010). Identification and expression analysis of genes in response to high-salinity and drought stresses in *Brassica napus*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 42(2), 154-164.
- Chen, Y., Zong, J., Tan, Z., Li, L., Hu, B., Chen, C., ... & Liu, J. (2015). Systematic mining of salt-tolerant genes in halophyte-*Zoysia matrella* through cDNA expression library screening. *Plant Physiology and Biochemistry*, 89, 44-52.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., & Zhu, J. K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop science*, 45(2), 437-448.
- Coll, P. J. Z., Mula, M. S., Pretel, M. T. P., & Marrero, M. Á. B. (2009). Tolerancia a la salinidad de distintas variedades de lechuga durante el desarrollo vegetativo. *Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura*, 28(325), 84-88.
- Colla, G., & Rouphael, Y. (2015). Biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 1-134.
- Colla, G., Rouphael, Y., Di Mattia, E., El-Nakhel, C., & Cardarelli, M. (2015). Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(8), 1706-1715.
- Cramer, G. R., & Quarrie, S. A. (2002). Abscisic acid is correlated with the leaf growth inhibition of four genotypes of maize differing in their response to salinity. *Functional plant biology*, 29(1), 111-115.
- Cuevas, J., Daliakopoulos, I. N., del Moral, F., Hueso, J. J., & Tsanis, I. K. (2019). A review of soil-improving cropping systems for soil salinization. *Agronomy*, 9(6), 295.

- de Azevedo Neto, A. D., Prisco, J. T., Enéas-Filho, J., de Abreu, C. E. B., & Gomes-Filho, E. (2006). Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, *56*(1), 87-94.
- De Oliveira, A. B., Alencar, N. L. M., & Gomes-Filho, E. (2013). Comparison between the water and salt stress effects on plant growth and development. *Responses of organisms to water stress*, *4*, 67-94.
- del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2020). ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research*, *235*, 126439.
- Doğan, M. (2011). Antioxidative and proline potentials as a protective mechanism in soybean plants under salinity stress. *African Journal of Biotechnology*, *10*(32), 5972-5978.
- Drobek, M., Fraç, M., & Cybulska, J. (2019). Plant biostimulants: Importance of the quality and yield of horticultural crops and the improvement of plant tolerance to abiotic stress— A review. *Agronomy*, *9*(6), 335.
- Dubey, R. S., & Singh, A. K. (1999). Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolising enzymes in rice plants. *Biologia Plantarum*, *42*, 233-239.
- Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J. V., & Gómez-Cadenas, A. (2005). Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography– electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, *53*(22), 8437-8442.
- European Biostimulants Industry Council (EBIC), <http://www.biostimulants.eu>, (2019).
- Ferrusquía-Jiménez, N. I., González-Arias, B., Rosales, A., Esquivel, K., Escamilla-Silva, E. M., Ortega-Torres, A. E., & Guevara-González, R. G. (2022). Elicitation of bacillus cereus-amazcala (Bc-A) with SiO₂ nanoparticles improves its role as a plant growth-promoting bacteria (PGPB) in Chili pepper plants. *Plants*, *11*(24), 3445.
- Franzoni, G., Cocetta, G., Prinsi, B., Ferrante, A., & Espen, L. (2022). Biostimulants on crops: Their impact under abiotic stress conditions. *Horticulturae*, *8*(3), 189.
- Furlan, A., Bianucci, E., Sequeira, M., Álvarez, L., Peralta, J. M., Valente, C., ... & Castro, S. (2019). Combined application of microbial and non-microbial biostimulants to improve growth of peanut plants exposed to abiotic stresses. *Microbial Probiotics for Agricultural Systems: Advances in Agronomic Use*, 239-256.
- Gill, P. K., Sharma, A. D., Singh, P., & Bhullar, S. S. (2001). Effect of various abiotic stresses on the growth, soluble sugars and water relations of sorghum seedlings grown in light and darkness. *Bulg J Plant Physiol*, *27*(1-2), 72-84.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, *48*(12), 909-930.

- Gisbert, C., Timoneda, A., Porcel, R., Ros, R., & Mulet, J. M. (2020). Overexpression of BvHb2, a class 2 non-symbiotic hemoglobin from sugar beet, confers drought-induced withering resistance and alters iron content in tomato. *Agronomy*, *10*(11), 1754.
- Gogorcena, Y., Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P. R., & Becana, M. (1995). Antioxidant defenses against activated oxygen in pea nodules subjected to water stress. *Plant Physiology*, *108*(2), 753-759.
- Grime, J. P. (1977). Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The american naturalist*, *111*(982), 1169-1194.
- Gupta, S., Stirk, W. A., Plačková, L., Kulkarni, M. G., Doležal, K., & Van Staden, J. (2021). Interactive effects of plant growth-promoting rhizobacteria and a seaweed extract on the growth and physiology of *Allium cepa* L.(onion). *Journal of Plant Physiology*, *262*, 153437.
- Hasanuzzaman, M., Raihan, M. R. H., Masud, A. A. C., Rahman, K., Nowroz, F., Rahman, M., ... & Fujita, M. (2021). Regulation of reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under salinity. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17), 9326.
- Hernández, J. A., Ferrer, M. A., Jiménez, A., Barceló, A. R., & Sevilla, F. (2001). Antioxidant systems and O₂·⁻/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant physiology*, *127*(3), 817-831.
- Hernandez, J. A., Jiménez, A., Mullineaux, P., & Sevilla, F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, cell & environment*, *23*(8), 853-862.
- Holmström, K. O., Somersalo, S., Mandal, A., Palva, T. E., & Welin, B. (2000). Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of experimental botany*, *51*(343), 177-185.
- Hong, Y., Gao, Y., Pang, J., Shi, H., Li, T., Meng, H., ... & Wang, Z. (2023). The Sm core protein SmEb regulates salt stress responses through maintaining proper splicing of RCD1 pre-mRNA in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*.
- Hussain, S., Shaukat, M., Ashraf, M., Zhu, C., Jin, Q., & Zhang, J. (2019). Salinity stress in arid and semi-arid climates: Effects and management in field crops. *Climate change and agriculture*, *13*, 201-226.
- Influencia de la salinidad de la solución nutritiva en la calidad y producción de dos cultivares de lechuga Baby Leaf (2014). (s. f.). Interempresas. <https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/125894-Influencia-salinidad-solucion-nutritiva-calidad-produccion-dos-cultivares-lechuga-baby.html>
- Irigoyen, J. J., Einerich, D. W., & Sánchez-Díaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia plantarum*, *84*(1), 55-60.

- Jain, M., Mathur, G., Koul, S., & Sarin, N. (2001). Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports*, *20*, 463-468.
- Jajoo, A. (2012). Changes in photosystem II in response to salt stress. In *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*, 149-168.
- Jithesh, M. N., Prashanth, S. R., Sivaprakash, K. R., & Parida, A. K. (2006). Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *Journal of Genetics*, *85*, 237-254.
- Kadioglu, A., Saruhan, N., Sağlam, A., Terzi, R., & Acet, T. (2011). Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system. *Plant Growth Regulation*, *64*, 27-37.
- Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M., ... & Yamanishi, Y. (2008). KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic acids research*, *36*(suppl_1), D480-D484.
- Kazan, K. (2015). Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in plant science*, *20*(4), 219-229.
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., ... & Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of plant growth regulation*, *28*, 386-399.
- Kiegle, E., Moore, C. A., Haseloff, J., Tester, M. A., & Knight, M. R. (2000). Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *The Plant Journal*, *23*(2), 267-278.
- Kim, H. J., Fonseca, J. M., Choi, J. H., Kubota, C., & Kwon, D. Y. (2008). Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(10), 3772-3776.
- Kishor, P. K., Hong, Z., Miao, G. H., Hu, C. A. A., & Verma, D. P. S. (1995). Overexpression of [δ]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant physiology*, *108*(4), 1387-1394.
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, N., Yadav, A. N., Singh, J., Rastegari, A. A., & Saxena, A. K. (2019). Agriculturally and industrially important fungi: current developments and potential biotechnological applications. *Recent advancement in white biotechnology through fungi: Volume 2: Perspective for value-added products and environments*, 1-64.
- Ku, Y., Xu, G., Tian, X., Xie, H., Yang, X., & Cao, C. (2018). Root colonization and growth promotion of soybean, wheat and Chinese cabbage by *Bacillus cereus* YL6. *PLoS One*, *13*(11), e0200181.
- Kumar, M., Giri, V. P., Pandey, S., Gupta, A., Patel, M. K., Bajpai, A. B., ... & Siddique, K. H. (2021). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria emerging as an effective bioinoculant to improve the growth, production, and stress tolerance of vegetable crops. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(22), 12245.

- Kumari, A., Das, P., Parida, A. K., & Agarwal, P. K. (2015). Proteomics, metabolomics, and ionomics perspectives of salinity tolerance in halophytes. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 537.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 115–136.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, *9*(4), 357-359.
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, *12*, 1-16.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *In Methods in enzymology*, *148*(34), 350-382.
- Liu, S., Dong, Y., Xu, L., & Kong, J. (2014). Effects of foliar applications of nitric oxide and salicylic acid on salt-induced changes in photosynthesis and antioxidative metabolism of cotton seedlings. *Plant Growth Regulation*, *73*, 67-78.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, *15*(12), 1-21.
- Luo, M. B., & Liu, F. (2011). Salinity-induced oxidative stress and regulation of antioxidant defense system in the marine macroalga *Ulva prolifera*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *409*(1-2), 223-228.
- Machado, R. M. A., & Serralheiro, R. P. (2017). Soil salinity: effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization. *Horticulturae*, *3*(2), 30.
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, *444*(2), 139-158.
- Mahmoudi, H., Huang, J., Gruber, M. Y., Kaddour, R., Lachaal, M., Ouerghi, Z., & Hannoufa, A. (2010). The impact of genotype and salinity on physiological function, secondary metabolite accumulation, and antioxidative responses in lettuce. *Journal of agricultural and food chemistry*, *58*(8), 5122-5130.
- Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R., & Pang, E. (2012). Abiotic stress responses in plants: present and future. *Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability*, 1-19.
- Marulanda, A., Porcel, R., Barea, J. M., & Azcón, R. (2007). Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive *Glomus* species. *Microbial ecology*, *54*, 543-552.
- Meloni, D. A., Oliva, M. A., Martinez, C. A., & Cambraia, J. (2003). Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and experimental botany*, *49*(1), 69-76.

- Minotti, G., & Aust, S. D. (1987). The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 262(3), 1098-1104.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Moran, J. F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R. V., & Aparicio-Tejo, P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, 194, 346-352.
- Mulet, J. M., Alejandro, S., Romero, C., & Serrano, R. (2004). The trehalose pathway and intracellular glucose phosphates as modulators of potassium transport and general cation homeostasis in yeast. *Yeast*, 21(7), 569-582.
- Mulet, J. M., Porcel, R., & Yenush, L. (2023). Modulation of potassium transport to increase abiotic stress tolerance in plants. *Journal of Experimental Botany*, erad333.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, 167(3), 645-663.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880.
- Nardi, S., Schiavon, M., & Francioso, O. (2021). Chemical structure and biological activity of humic substances define their role as plant growth promoters. *Molecules*, 26(8), 2256.
- Nicolle, C., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J. L., Rock, E., Michel, H., ... & Remesy, C. (2004). Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa* folium). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(15), 2061-2069.
- Omari, R. E., & Nhiri, M. (2015). Adaptive response to salt stress in sorghum (*Sorghum bicolor*). *Am-Euras. J Agric and Environ Sci*, 15(7), 1351-1360.
- Panda, S. K., & Khan, M. H. (2004). Changes in growth and superoxide dismutase activity in *Hydrilla verticillata* L. under abiotic stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 16, 115-118.
- Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental science and pollution research*, 22, 4056-4075.
- Pena, L. B., Matayoshi, C. L., Arbona Mengual, V., Gómez Cadenas, A., & Gallego, S. M. (2020). Early responses of maize seedlings to Cu stress include sharp decreases in gibberellins and jasmonates in the root apex. *Protoplasma*, 257(4), 1243-1256.

- Penna, S., Teixeira da Silva, J. A., & Anant, B. V. (2006). Plant abiotic stress, sugars and transgenics: a perspective. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical*, 3, 86-93.
- Rady, M. M., & Mohamed, G. F. (2015). Modulation of salt stress effects on the growth, physio-chemical attributes and yields of *Phaseolus vulgaris* L. plants by the combined application of salicylic acid and *Moringa oleifera* leaf extract. *Scientia Horticulturae*, 193, 105-113.
- Rahdari, P., & Hoseini, S. M. (2011). Salinity stress: a review. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 1(3), 63-66.
- Ríos, G., Cabedo, M., Rull, B., Yenush, L., Serrano, R., & Mulet, J. M. (2013). Role of the yeast multidrug transporter Qdr2 in cation homeostasis and the oxidative stress response. *FEMS yeast research*, 13(1), 97-106.
- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N., & Willmitzer, L. (2000). Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *The plant journal*, 23(1), 131-142.
- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., & Colla, G. (2017). Synergistic action of a microbial-based biostimulant and a plant derived-protein hydrolysate enhances lettuce tolerance to alkalinity and salinity. *Frontiers in Plant Science*, 8, 131.
- Roy, S. J., Negrão, S., & Tester, M. (2014). Salt resistant crop plants. *Current opinion in Biotechnology*, 26, 115-124.
- Ruiz-Lozano, J. M. (1997). Effect of calcium application on the tolerance of mycorrhizal lettuce plants to polyethylene glycol-induced water stress. *Symbiosis* 23(1), 9-22
- Ryu, H., & Cho, Y. G. (2015). Plant hormones in salt stress tolerance. *Journal of Plant Biology*, 58, 147-155.
- Salim, M. (1989). Effects of salinity and relative humidity on growth and ionic relations of plants. *New Phytologist*, 113(1), 13-20.
- Sarker, U., & Oba, S. (2020). The response of salinity stress-induced *A. tricolor* to growth, anatomy, physiology, non-enzymatic and enzymatic antioxidants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 559876.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., ... & Shinozaki, K. (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal*, 31(3), 279-292.
- Sen, S., & Chandrasekhar, C. N. (2014). Effect of PGPR on growth promotion of rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress. *Asian J Plant Sci Res*, 4(5), 62-67.
- Serrano, R., Mulet, J. M., Rios, G., Marquez, J. A., De Larrinoa, I. F., Leube, M. P., ... & Montesinos, C. (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of experimental botany*, 1023-1036.

- Shams, M., Yildirim, E., Ekinci, M., Turan, M., Dursun, A., Parlakova, F., & Kul, R. (2016). Exogenously applied glycine betaine regulates some chemical characteristics and antioxidative defence systems in lettuce under salt stress. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, *57*, 225-231.
- Shin, Y. K., Bhandari, S. R., Jo, J. S., Song, J. W., Cho, M. C., Yang, E. Y., & Lee, J. G. (2020). Response to salt stress in lettuce: Changes in chlorophyll fluorescence parameters, phytochemical contents, and antioxidant activities. *Agronomy*, *10*(11), 1627.
- Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi journal of biological sciences*, *22*(2), 123-131.
- Silva, P., & Gerós, H. (2009). Regulation by salt of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase activities and Na⁺/H⁺ exchange. *Plant signaling & behavior*, *4*(8), 718-726.
- Sinclair, T. R., & Ludlow, M. M. (1986). Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. *Functional Plant Biology*, *13*(3), 329-341.
- Şirin, S., & Aslim, B. (2019). Determination of antioxidant capacity, phenolic acid composition and antiproliferative effect associated with phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in some plants naturally growing under salt stress. *Medicinal Chemistry Research*, *28*, 229-238.
- Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., & Saviouré, A. (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of botany*, *115*(3), 433-447.
- Srivastava, A. K., & Suprasanna, P. (2015). Redox-regulated mechanisms: implications for enhancing plant stress tolerance and crop yield. *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants: Functional Genomics Perspectives*, *1*, 191-205.
- Stolte, J., Tesfai, M., Oygarden, L., Kvaerno, S., Keizer, J., Verheijen, F., ... & Hessel, R. (2016). *Soil threats in Europe: status, methods, drivers and effects on ecosystem services: deliverable 2.1 RE CARE project*. European Commission DG Joint Research Centre.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A., & Giridarakumar, S. (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant science*, *161*(3), 613-619.
- Suprasanna, P., Rai, A. N., Kumari, P. H., Kumar, S. A., & Kishor, P. K. (2014). Modulation of proline: implications in plant stress tolerance and development. *In Plant adaptation to environmental change: significance of amino acids and their derivatives*, 68-96.
- Szabados, L., & Saviouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, *15*(2), 89-97.
- Tiwari, S., Prasad, V., Chauhan, P. S., & Lata, C. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1510.

- Trujillo, M. E., Riesco, R., Benito, P., & Carro, L. (2015). Endophytic actinobacteria and the interaction of Micromonospora and nitrogen fixing plants. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1341.
- United Nations. (s. f.). ¿Qué es el cambio climático? | Naciones Unidas. <https://www.un.org/es/climatechange/what-is-climate-change>
- ur Rehman, H., Alharby, H. F., Alzahrani, Y., & Rady, M. M. (2018). Magnesium and organic biostimulant integrative application induces physiological and biochemical changes in sunflower plants and its harvested progeny on sandy soil. *Plant Physiology and Biochemistry*, 126, 97-105.
- Vargas, E. M., (2011). Cambio climático y crisis alimentaria. *PERSPECTIVAS*, (27), 147-160.
- Verheye, W. H. (Ed.). (2010). *Soils, Plant Growth and Crop Production-Volume III*. EOLSS Publications.
- Williams, L. E., Lemoine, R., & Sauer, N. (2000). Sugar transporters in higher plants—a diversity of roles and complex regulation. *Trends in plant science*, 5(7), 283-290.
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2011). Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature protocols*, 6(6), 743-760.
- Xiong, L., Schumaker, K. S., & Zhu, J. K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The plant cell*, 14(suppl_1), S165-S183.
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in plant science*, 7, 2049.
- Yang, Q., Chen, Z. Z., Zhou, X. F., Yin, H. B., Li, X., Xin, X. F., ... & Gong, Z. (2009). Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Molecular Plant*, 2(1), 22-31.
- Youssef, R., & Colla, G. (2020). *Editorial: Biostimulants in Agriculture*. Front. Plant Sci.
- Zahedi, S. M., Hosseini, M. S., Fahadi Hoveizeh, N., Gholami, R., Abdelrahman, M., & Tran, L. S. P. (2021). Exogenous melatonin mitigates salinity-induced damage in olive seedlings by modulating ion homeostasis, antioxidant defense, and phytohormone balance. *Physiologia Plantarum*, 173(4), 1682-1694.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4), 555-559.
- Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 6(2), 66-71.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53(1), 247-273.
- Zhu, J. K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current opinion in plant biology*, 6(5), 441-445.

ANEXO I

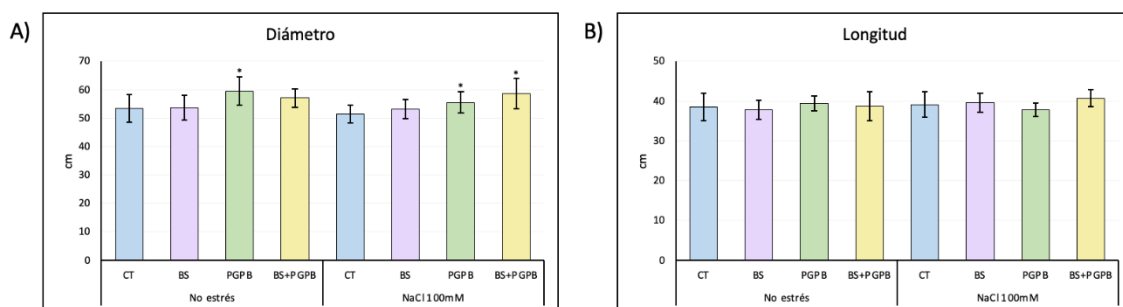


Figura Suplementaria 1. Diámetro y longitud de las yemas de lechuga. El eje X representa los tratamientos y condiciones probados. El eje Y muestra (A) diámetro en centímetros (cm) y (B) longitud en centímetros (cm). Tratamientos realizados: muestras control sin tratamiento (CT), bioestimulante CalBio (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). Las barras representan el error estándar. * $p < 0,05$ representa la significancia según las pruebas de t-Student para la muestra objetivo en comparación con la muestra control.

Tabla Suplementaria 1. Contenido del sustrato Terra Vagiota (Grupo Valagussa, Italia).

Características del sustrato Terra Vagiota	
Granulometría	2-25 mm
pH	8,11
NPKs	1 Kg/m ³
CaCO ₃ y Mg	2,7 Kg/m ³
Conductividad eléctrica	1,8 mS/m
Capacidad de intercambio catiónico	9,9 meq/100 g
Carbono orgánico	13 g/Kg
N ₂ total	< 5 g/Kg
Fósforo soluble	27 mh/Kg
Potasio soluble	110-3300 mg/Kg
Humedad	50-65%
Densidad seca aparente	80 Kg/m ³

Tabla Suplementaria 2. Primers utilizados en la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S descritos por Lane (1991).

Primers	Secuencia	Función
SF1	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3'	Amplificar la región del gen ARNr 16S
SR2	5'- GWATTACCGCGGCKGCTG - 3'	Secuenciar completamente el gen ARNr 16S
SR3	5'- CCGTCATTCMTTTRAGTTT - 3'	Secuenciar completamente el gen ARNr 16S
SR4	5' - GGGTTGCGCTCGTTG - 3'	Secuenciar completamente el gen ARNr 16S
1522R	5'-AAGGAGGTGATCCANCC-3'	Amplificar la región del gen ARNr 16S

Tabla Suplementaria 3. Metabolitos acumulados de manera significativamente diferencial en tratamientos en hoja y raíz bajo estrés salino. Fold-change (FC) $\geq 1,5$ y p-valor $\leq 0,05$. CalBio bioestimulante (BS), bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB).

Tejido	Tratamiento	Metabolito	FC	log ₂ (FC)	p-valor
Hoja	BS	Glicerol	1,836	0,877	0,009
	PGPB	Alanina	0,114	-3,132	0,000
		Arabinosa	2,706	1,436	0,009
	BS+PGPB	Valina	0,634	-0,658	0,048
Raíz	BS	Glicerol	1,960	0,971	0,049
		GABA	0,630	-0,667	0,049
		Ácido aspártico	0,411	-1,283	0,032
		Cistina	1,923	0,943	0,035
	PGPB	GABA	1,646	0,719	0,007
		Ácido piroglutámico	2,704	1,435	0,008
		Ácido aspártico	1,695	0,761	0,044
		Ácido málico	0,599	-0,739	0,027
	BS+PGPB	GABA	1,569	0,650	0,008
		Urea	1,628	0,703	0,012
		Ácido málico	0,477	-1,069	0,042
		Glicerol	1,821	0,865	0,047

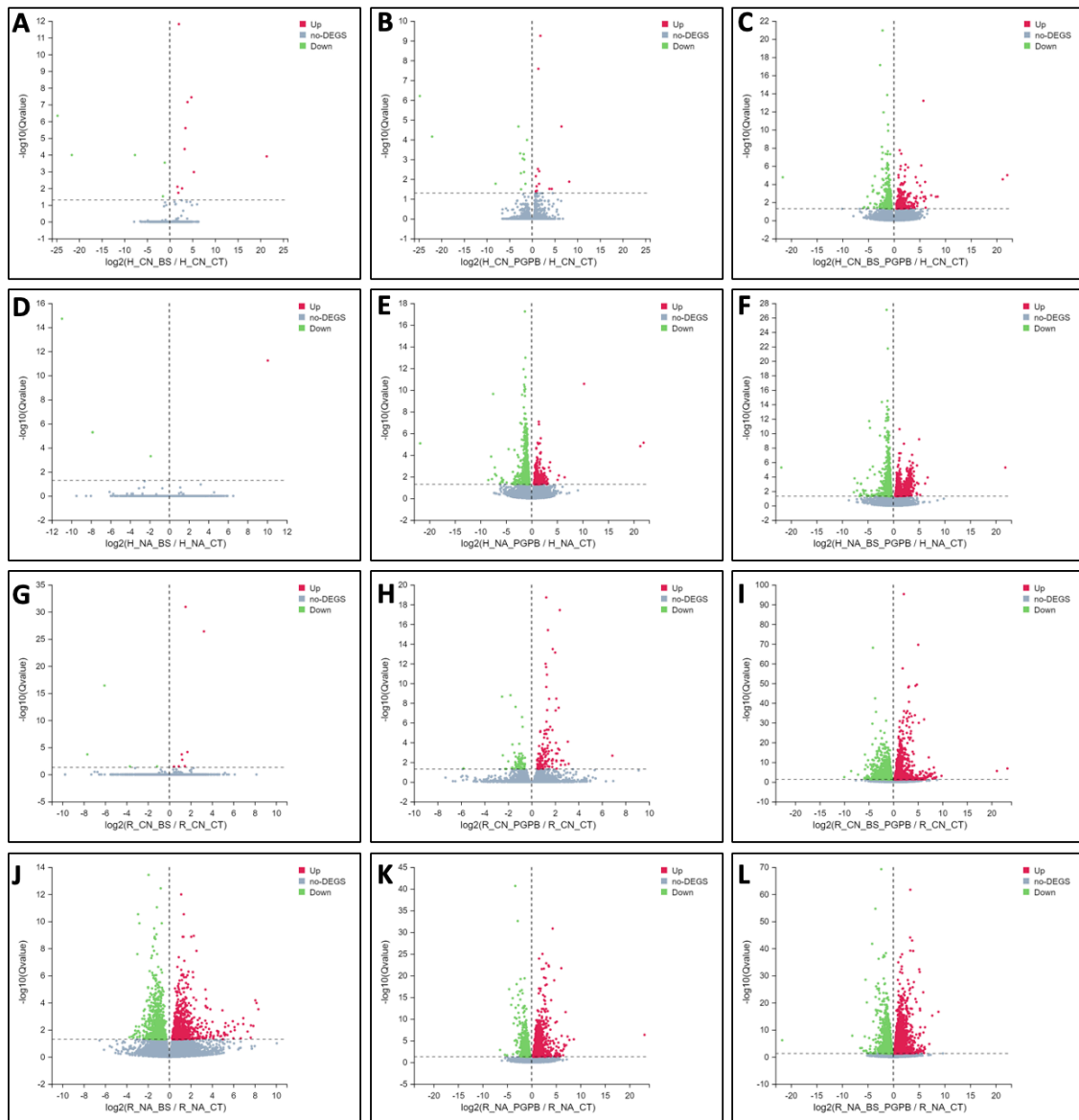
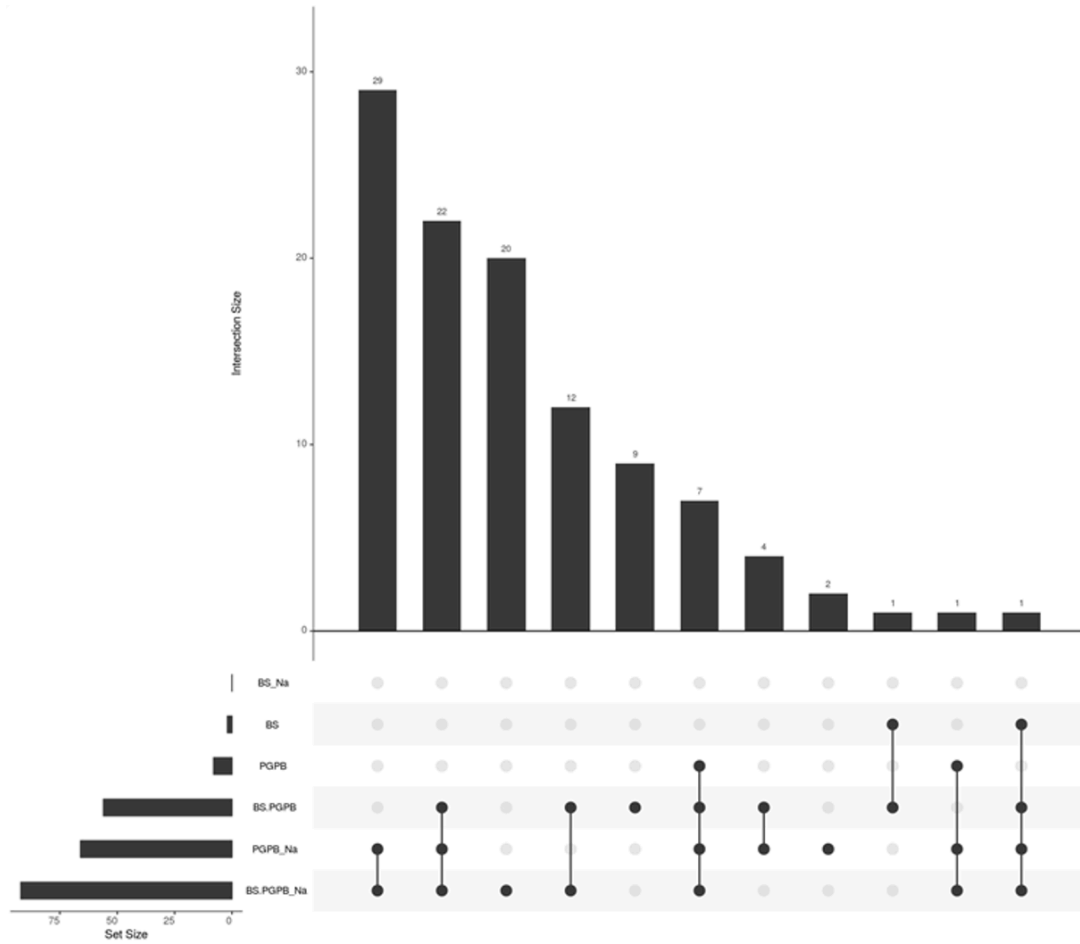
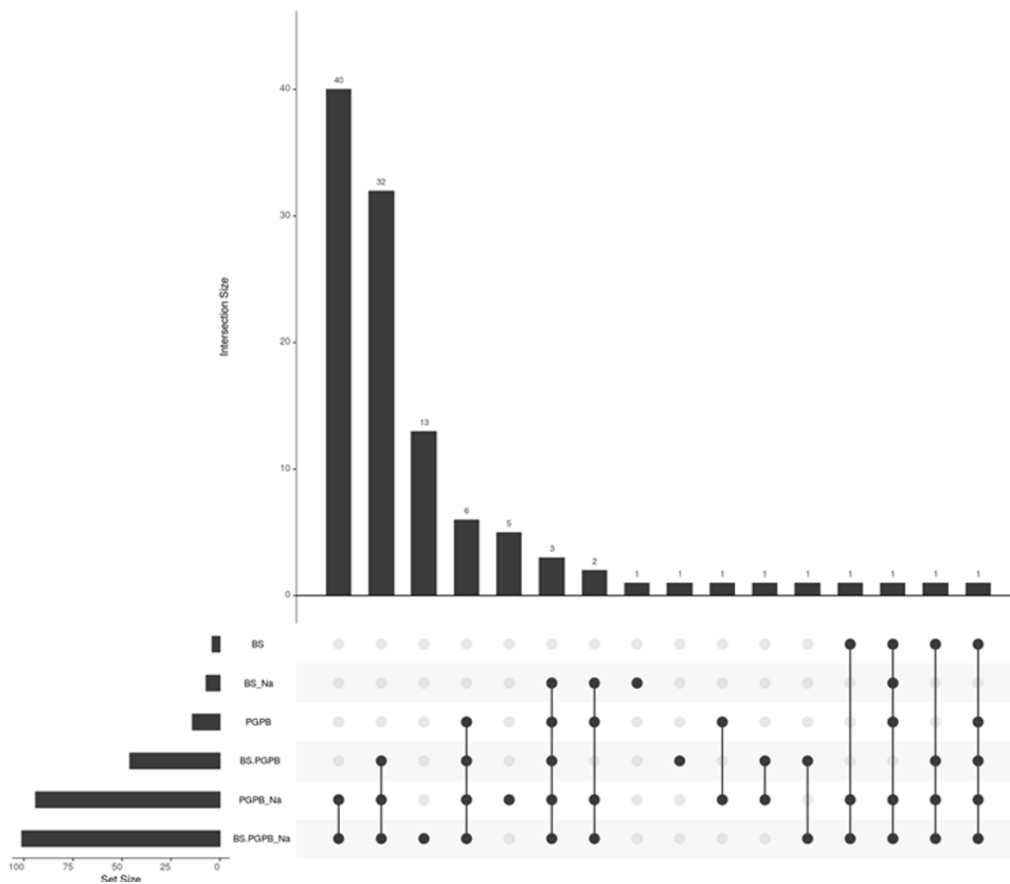


Figura Suplementaria 2. Volcano-plot que muestra la expresión diferencial de genes respecto al control (CT) de los diferentes tratamientos: (A,D,G,J) bioestimulante CalBio (BS), (B,E,H,K) bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y (C,F,I,L) CalBio con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BS+PGPB). Esta diferencia en la expresión se realizó tanto en hojas (A-F) como en raíces (G-L) de lechuga y en condiciones (A-C, G-I) normales y (D-F, J-L) de estrés salino (NaCl 100 mM). Cada punto representa un gen. Los puntos rojos y verdes representan genes expresados diferencialmente con p -valor $< 0,05$ y $FC \geq 2$ en el momento de la recolección del cultivo. Los puntos grises representan genes no significativos. El eje X representa el valor absoluto \log_2 del Fold-change, mientras que el eje Y muestra \log_{10} del valor Q.

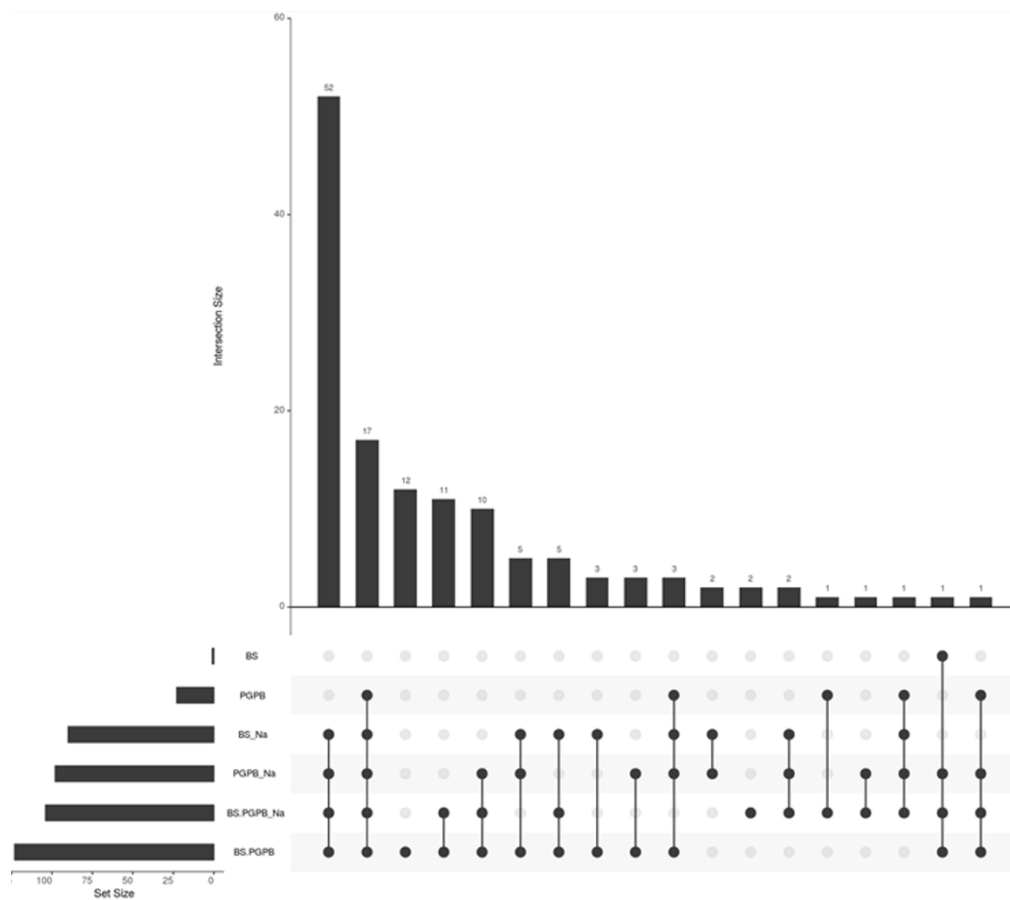
A)



B)



C)



D)

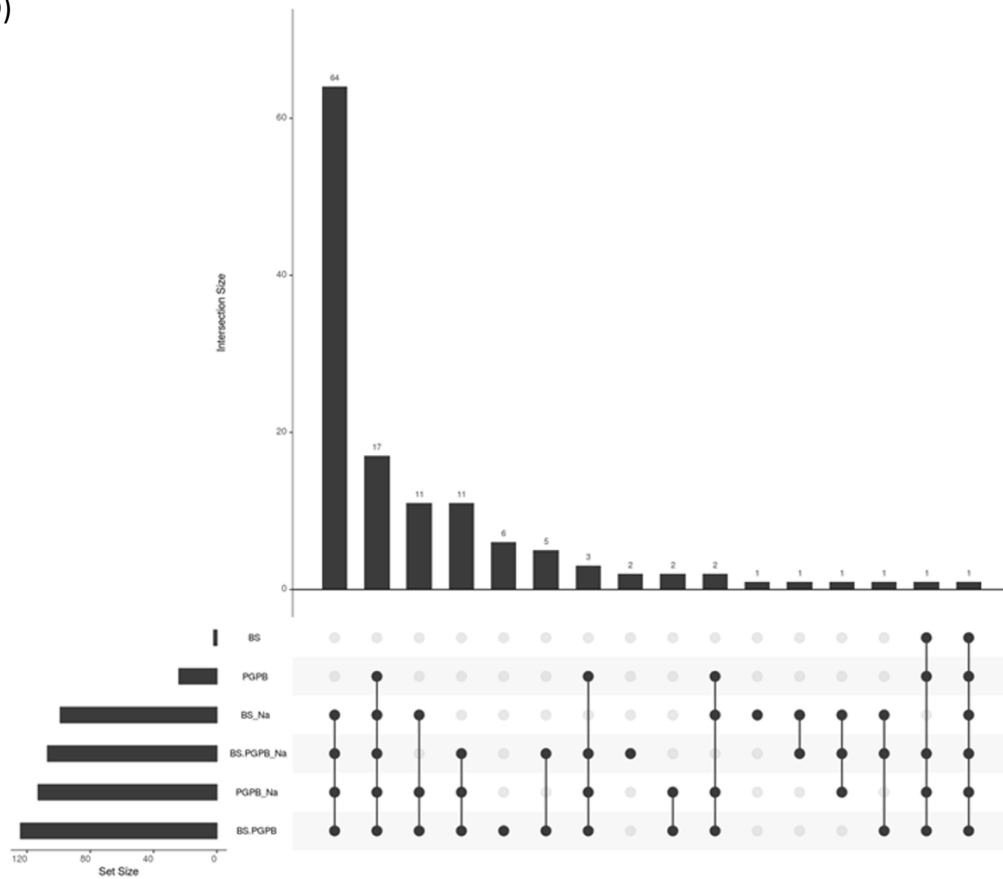
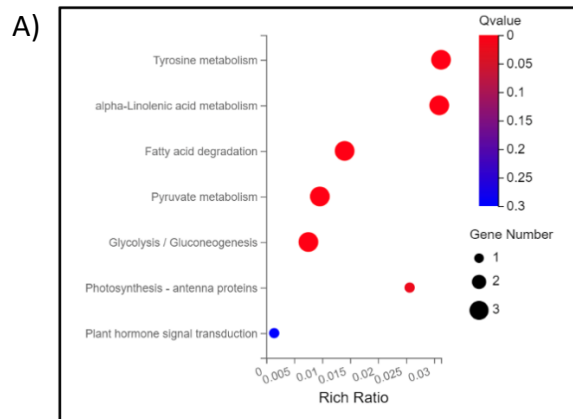
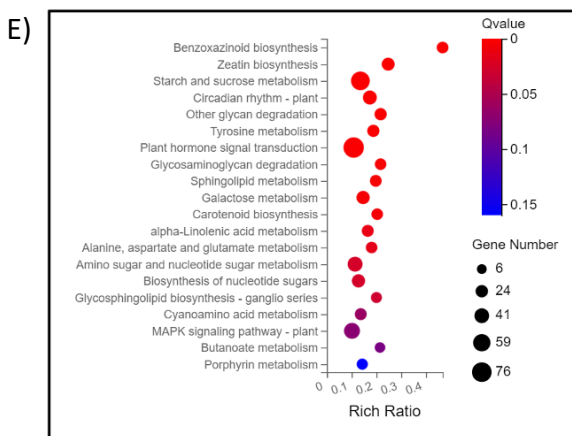
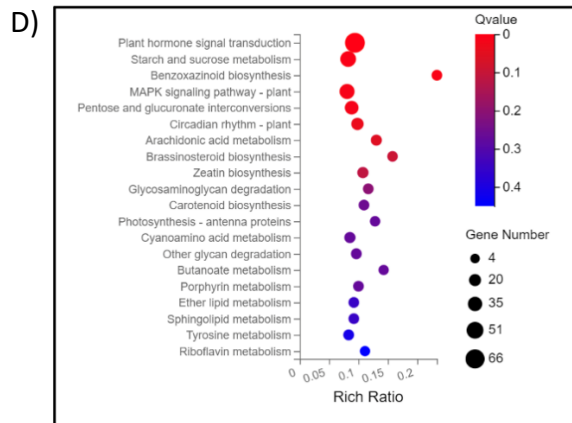
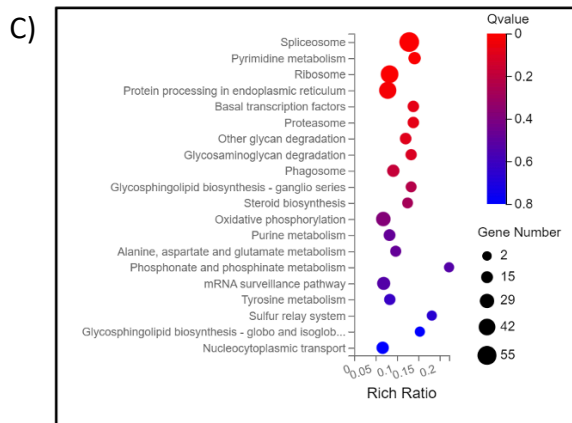
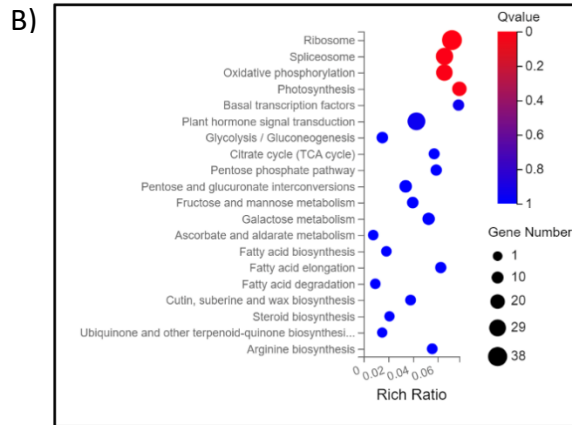


Figura Suplementaria 3. Upset-plot de las vías comunes de KEGG en los diferentes tratamientos presentes en hoja (A,B) y raíz (C,D) en condiciones normales y de estrés salino. En el gráfico de barras de la izquierda, el eje X representa el número total de rutas KEGG y el eje Y representa el nombre del conjunto de tratamiento. En el histograma superior derecho, el eje X representa la intersección de diferentes conjuntos de vías KEGG y el eje Y representa el número de vías KEGG. Cada columna en la parte inferior derecha muestra la relación entre el conjunto de vías izquierdas y la intersección superior. Tratamientos: bioestimulante CalBio (BS); bacterias promotoras del crecimiento vegetal BM08 (PGPB), y la combinación de CalBio con la cepa PGPB BM08 (BS+PGPB).





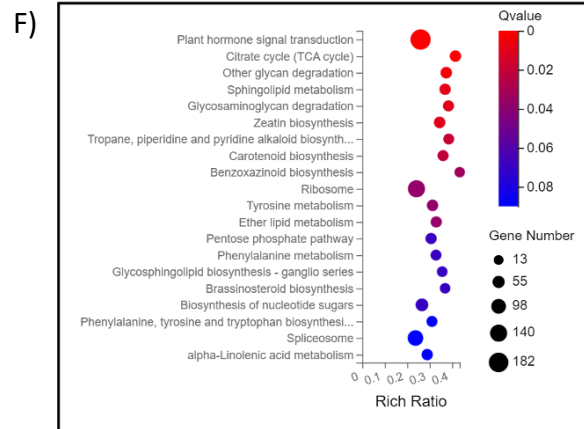


Figura Suplementaria 4. Gráfico de burbujas del análisis de enriquecimiento de la vía KEGG de genes expresados diferencialmente (GED). Las vías KEGG más representativas están representadas en condiciones estresantes de los tratamientos (A,D) bioestimulante CalBio (BS); (B,E) bacterias promotoras del crecimiento vegetal BM08 (PGPB), y (C,F) la combinación de CalBio con la cepa PGPB BM08 (BS+PGPB). Este enriquecimiento de la vía se evaluó en hoja (A-C) y raíz (D-F). El tamaño de las burbujas indica la cantidad de GED enriquecidos en la vía. "Rich Ratio" indica la cantidad de genes expresados diferencialmente enriquecidos en la vía/cantidad de todos los genes en el background de genes. Y el valor Q indica significancia de enriquecimiento, es decir, el p-valor corregido después de múltiples pruebas de hipótesis.

ANEXO II

<https://drive.google.com/drive/folders/1ia8aFH5YjB655UpdXDE04u4KxKp4sHLo?usp=sharing>