

**Tesis Doctoral:**

Efecto de la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento sobre la producción de plantines y de frutos de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cv. Calafyuco INTA para industria en Mendoza.

**Miguel Andrés Lobato Ureche**



**Universidad Nacional de Cuyo**

**Facultad de Ciencias Agrarias**

**Doctorado en Agronomía**

**2023**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. Ana Carmen Cohen**

**COORDIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. Romina Paula Monasterio**

**MIEMBROS DEL JURADO DE TESIS:**

**Dra. Claudia Travaglia**

**Dra. María Marta Dardanelli**

**Dr. Claudio Galmarini**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar mi agradecimiento es para Dios que me dio la vida y la oportunidad de venir a Argentina para realizar mis estudios de doctorado.

A las doctoras Ana Cohen y Romina Monasterio, mis directoras de tesis, a quienes les quiero agradecer profundamente por brindarme su apoyo científico, por su constante estímulo, por su flexibilidad y confianza en mí, por sus consejos y críticas que han hecho que siga creciendo.

Al doctor Jorge William Arboleda Valencia, mi Co-director de beca doctoral ante el CONICET, por su apoyo incondicional desde que lo conocí cuando adelantaba mis estudios de maestría en la Universidad del Atlántico.

Al Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM) y la Universidad Nacional de Cuyo, en particular a la Facultad de Ciencias Agrarias, por haberme brindado la educación de posgrado, el espacio físico, los equipos y las instalaciones necesarias para el desarrollo de este trabajo y para mi desarrollo personal.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET) por el otorgamiento de 5 años de beca que permitieron la realización de este trabajo.

A la Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuaria (AGROSAVIA) por darme la licencia para ausentarme seis años de mi lugar de trabajo para cursar los estudios de doctorado en Argentina.

## RESUMEN

La producción de pimiento procesado es de gran importancia económica en la provincia de Mendoza. El cultivar Calafyuco INTA es ampliamente utilizado en la región para este propósito. En la producción de pimiento se utilizan con frecuencia los agroquímicos para aumentar la producción. En exceso, la aplicación de estos productos puede resultar peligrosa para el suelo, los recursos hídricos e incluso para la salud humana. Por lo tanto, es necesario estudiar alternativas biológicas que permitan una reducción en el uso de agroquímicos. En este contexto a nivel mundial, el uso de bioinoculantes formulados a partir de microorganismos ha demostrado tener efectos positivos en el crecimiento de las plantas en condiciones normales, y bajo diferentes tipos de estrés abiótico. Algunos de los bioinoculantes más utilizados están formulados con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Entre los mecanismos de promoción del crecimiento de las PGPR, se encuentran la fijación biológica de nitrógeno, la producción de sideróforos que facilitan la captación de hierro, la solubilización de fuentes insolubles de fosfatos y la producción de fitohormonas o reguladores del crecimiento vegetal. Sin embargo, se desconoce el papel que tienen las PGPR en el perfil de otros metabolitos vegetales, en particular, hay poca investigación que documente el efecto de la inoculación sobre los compuestos fenólicos. El objetivo general de esta tesis fue evaluar el efecto de la inoculación de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA con PGPR nativas en diferentes estadios de crecimiento de la planta. La inoculación aceleró la germinación y aumentó los parámetros morfológicos de germinación. El efecto de las bacterias en las plántulas mostró una alta eficiencia en la promoción del crecimiento, lo que reduce los costos asociados con la producción industrial de plantines de pimiento. De la misma forma, la inoculación se correlacionó directamente con una mayor concentración de nitrógeno, lo que indicó que las plantas inoculadas no necesitaron un aporte extra de nitrógeno de origen químico. Asimismo, la inoculación de semillas de pimiento permitió identificar algunos compuestos fenólicos de gran importancia en

el proceso de quimiotaxis que median la colonización de las radículas de plántulas de pimiento. En plantas adultas cultivadas en macetas se observó un aumento de los diferentes parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en las plantas inoculadas principalmente con las cepas *Pseudomonas* 42P4 y *Cellulosimicrobium* 60I1. De igual forma, el perfil de compuestos fenólicos se vio afectado por la inoculación con PGPR. Por otro lado, las PGPR aliviaron el estrés impuesto a las plantas de pimiento por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En las plantas inoculadas se observó el correcto funcionamiento de los pigmentos fotosintéticos, paliando los efectos adversos de la salinidad en las plantas. Asimismo, se identificaron algunos compuestos fenólicos relacionados con la respuesta al estrés salino. De acuerdo a los resultados obtenidos en la inoculación de plantas de pimiento cultivadas en campo, el uso de PGPR incrementó el crecimiento de las plantas y la producción tanto en peso como en calidad de los frutos. El tratamiento de co-inoculación con *Pseudomonas* 42P4 + *Cellulosimicrobium* 60I1 demostró ser el más efectivo, lo que permite validar que estas cepas podrían ser seleccionadas para producir un bioinoculante que pueda ser utilizado en la región de Cuyo.

## ABSTRACT

Processing pepper production is of great economic importance in the province of Mendoza. The cultivar Calafyuco INTA is widely used in the region for this purpose. In pepper production, agrochemicals are frequently used to increase production. In excess, the application of these products can be dangerous for the soil, water resources, and even human health. Therefore, it is necessary to study biological alternatives that allow a reduction in agrochemical use. In this context worldwide, the use of bioinoculants formulated from microorganisms has been shown to have positive effects on plant growth under normal conditions, and under different types of abiotic stress. Some of the most used are formulated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Among the growth promotion mechanisms of PGPR, are biological nitrogen fixation, the production of siderophores that facilitate iron uptake, the solubilization of insoluble sources of phosphates and the production of phytohormones or plant growth regulators. However, the role that PGPR have on the profiles of other plant metabolites are unknown, in particular, there is little research documenting the effect of inoculation on phenolic compounds. The general objective of this thesis was to evaluate the effect of the inoculation of pepper plants cv. Calafyuco INTA with native PGPR in different stages of plant growth. The inoculation accelerated germination and increased the morphological parameters of germination. The effect of bacteria on seedlings showed high efficiency in promoting growth, which reduces the costs associated with the industrial production of pepper seedlings. In the same way, the inoculation was directly correlated with a higher nitrogen concentration, which indicated that the inoculated plants did not need an extra supply of nitrogen. Also, the inoculation of pepper seeds allowed the identification of some phenolic compounds of great importance in the chemotaxis process that mediates the colonization of the radicles of pepper seedlings. In adult plants grown in pots, an increase in the different morphological, physiological and biochemical parameters was observed in the plants inoculated mainly with the *Pseudomonas* 42P4 y *Cellulosimicrobium* 60I1 strains. Similarly, the profile of phenolic compounds was affected by inoculation with PGPR. On the other hand, PGPR relieved the stress

imposed on pepper plants by NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. In the inoculated plants, the correct functioning of the photosynthetic pigments were observed, alleviating the adverse effects of salinity on the plants. Likewise, some phenolic compounds related to the response to salt stress were identified. According to the results obtained in the inoculation of pepper plants grown in the field, the use of PGPR increased the growth of the plants and the production both in weight and quality of the fruits. The co-inoculation treatment with *Pseudomonas* 42P4 + *Cellulosimicrobium* 60I1 proved to be the most effective, which allows validation that these strains could be selected to produce a bioinoculant that can be used in the Cuyo region.

## Publicaciones derivadas de la tesis

Lobato-Ureche, M.A., Pérez-Rodríguez, M.M., Ortiz, R., Monasterio, R.P., & Cohen, A.C. (2021). Rhizobacteria improve the germination and modify the phenolic compound profile of pepper (*Capsicum annum* L.). *Rhizosphere*, 18, 100334.

Lobato-Ureche M.A, Pérez-Rodríguez M.M, Segura D, Monasterio R and Cohen A.C (2023) *Pseudomonas* 42P4 and *Cellulosimicrobium* 60I1 as a sustainable approach to increase growth, development, and productivity in pepper plants. *Front. Sustain. Food Syst.* 6:1111573.



## Tabla de contenido

ABREVIATURAS EMPLEADAS	17
<b>CAPITULO 1</b>	19
I. INTRODUCCION GENERAL	19
A. Origen del género <i>Capsicum</i>	19
B. El género <i>Capsicum</i> spp	20
C. Producción del pimiento y su importancia	23
D. Ambiente y agricultura	24
E. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	26
F. Mecanismos de promoción del crecimiento por las PGPR	26
F.1. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	28
F.2. Solubilización de fosfatos	29
F.3. Producción de sideróforos	31
F.4. Reguladores de crecimiento o fitohormonas	32
F.4.1. Auxinas	32
F.4.2. Giberelinas	33
F.4.3. Citocininas	34
F.4.4. Ácido abscísico	35
F.5. Producción de la enzima ACC desaminasa	35
F.6. Producción de antibióticos	36
F.7. Enzimas líticas	37

F.8. Resistencia sistémica inducida	37
G. Compuestos fenólicos	38
G.1. Rol de los compuestos fenólicos en la interacción rizobacterias-planta	41
H. La salinización de los suelos	42
H.1. Suelos salinos de Argentina	43
H.2. El estrés salino y su efecto en las plantas	45
H.2.1. Estrés osmótico	46
H.2.2. Estrés iónico	46
H.2.3. Estrés oxidativo	47
H.3. Acumulación de solutos compatibles	47
H.4. Rol de las PGPR en la tolerancia de las plantas a la salinidad	48
II. HIPÓTESIS	50
III. OBJETIVOS	51
A. OBJETIVO GENERAL	51
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS	51
<b>CAPITULO 2: Evaluación in vitro del efecto de las PGPR en la germinación, promoción del crecimiento y perfil de compuestos fenólicos de semillas de pimiento Calahorra (cv. Calafyuco INTA)</b>	
I. Introducción	53
II. Objetivo específico	56
III. Hipotesis	56
IV. Materiales y métodos	56
A. Material vegetal	56

B. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	56
C. Germinación de las semillas	57
D. Diseño experimental	57
E. Confrontación de bacterias in-vitro	57
F. Extracción de compuestos fenólicos libres y ligados	58
G. Análisis de compuestos fenólicos	58
H. Análisis estadístico	59
V. Resultados y discusión	60
A. Efecto de la inoculación sobre la germinación de las semillas	60
B. Efecto de la inoculación con PGPR sobre plántulas de pimiento	61
C. Prueba de compatibilidad entre las bacterias	65
D. Efectos del consorcio sobre la germinación y el vigor de las semillas	65
E. Perfil de compuestos fenólicos	67
<b>CAPITULO 3: Evaluación del efecto de la inoculación de plantines de pimiento cultivar Calafyuco INTA con PGPR nativas</b>	
I. Introducción	77
II. Objetivos específicos	79
III. Hipótesis	80
IV. Materiales y métodos	80
A. Material vegetal	80
B. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	80
C. Germinación de las semillas	80
D. Diseño experimental	80

E. Variables evaluadas	81
F. Determinación de nitrógeno	81
G. Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores	82
H. Extracción de compuestos fenólicos para su perfil por HPLC	83
I. Análisis de compuestos fenólicos	83
J. Análisis estadístico	83
V. Resultados y discusión	84
A. Efecto de la inoculación sobre el crecimiento de platines de pimiento	84
B. Efecto de la inoculación sobre la acumulación de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores	88
C. Efecto de la inoculación sobre el perfil de compuestos fenólicos en tejido foliar de plantines de pimiento Calafyuco INTA	89

**CAPITULO 4: Evaluación del efecto de la inoculación de plantas de pimiento cultivar Calafyuco INTA con PGPR nativas**

I. Introducción	102
II. Objetivos específicos	103
III. Hipótesis	103
IV. Materiales y métodos	103
A. Material vegetal	103
B. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	104
C. Germinación de las semillas	104
D. Diseño experimental	104
E. Variables evaluadas	104
F. Determinación de nitrógeno	105

G. Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores	105
H. Extracción de compuestos fenólicos	105
I. Análisis de compuestos fenólicos	105
J. Análisis estadístico	105
V. Resultados y discusión	106
A. Efecto de la inoculación con PGPR sobre el desarrollo de plantas de pimiento cultivadas en macetas bajo condiciones de invernáculo	106
B. Efecto de la inoculación con PGPR sobre parámetros fisiológicos de plantas de pimiento cultivadas en macetas bajo condiciones de invernáculo	109
C. Análisis de componentes principales (ACP)	112
D. Efecto de la inoculación con PGPR sobre perfil de compuestos fenólicos de plantas de pimiento	115
<b>CAPITULO 5: Evaluación del efecto del estrés salino en plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR nativas</b>	
I. Introducción	125
II. Objetivos específicos	127
III. Hipótesis	127
IV. Materiales y métodos	127
A. Material vegetal	127
B. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	127
C. Germinación de las semillas	128
D. Ensayo para evaluar la dosis - respuesta de pimiento cv. Calafyuco INTA a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y sulfato de sodio	128
D.1. Variables evaluadas en el ensayo de dosis respuesta de pimiento cv. Calafyuco INTA a NaCl y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	128

E. Ensayo para evaluar el efecto de la inoculación con PGPR en plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA sometidas a estrés salino por NaCl y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	129
E.1. Variables evaluadas en el ensayo de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y sometidas a estrés salino por NaCl y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	129
E.1.1. Determinación de nitrógeno	130
E.1.2. Determinación de MDA	130
E.1.3. Determinación de prolina	130
E.1.4. Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores	131
E.1.5. Extracción de compuestos fenólicos	131
E.1.6. Análisis de compuestos fenólicos	131
F. Análisis estadístico	131
V. Resultados y discusión	132
A. Efecto de diferentes dosis de NaCl sobre el crecimiento de pimiento cv. Calafyuco INTA	132
B. Efecto de diferentes dosis de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sobre el crecimiento de pimiento cv. Calafyuco INTA	135
C. Efectos del estrés salino por NaCl y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR	139
D. Efectos del estrés salino por NaCl y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sobre los pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR	143
E. Efectos del estrés salino por NaCl y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sobre el contenido de nitrógeno de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR	145
F. Efectos del estrés salino por NaCl y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sobre parámetros fisiológicos medidos <i>in situ</i> en plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR	147
G. Efectos del estrés salino por NaCl y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sobre indicadores de tolerancia a la salinidad en plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR	151

H. Efectos del estrés salino por NaCl sobre el perfil de compuestos fenólicos de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR	152
---	-----

**CAPITULO 6: Evaluación del efecto de la inoculación de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA con PGPR nativas bajo condiciones de campo en la provincia de Mendoza**

I. Introducción	165
II. Objetivos específicos	167
III. Hipótesis	167
IV. Materiales y métodos	167
A. Material vegetal	167
B. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	167
C. Germinación de las semillas	167
D. Ubicación geográfica de los experimentos	168
E. Diseño experimental	169
F. Variables evaluadas	170
G. Determinación de nitrógeno	170
H. Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores	170
I. Extracción de los compuestos fenólicos	170
J. Análisis de compuestos fenólicos	170
K. Análisis Físico-Químico de los suelos	170
L Análisis estadístico	171
V. Resultados y discusión	172
A. Efecto de la inoculación con PGPR sobre el desarrollo de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA cultivadas bajo condiciones de campo	172

B. Efectos de la inoculación con PGPR sobre el contenido de nitrógeno de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA cultivadas en campo	175
C. Efecto de la inoculación con PGPR sobre parámetros fisiológicos de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA cultivadas bajo condiciones de campo	175
D. Parámetros del componente rendimiento evaluados en plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y cultivadas bajo condiciones de campo	178
E. Efecto de la inoculación con PGPR sobre perfil de compuestos fenólicos en plantas de pimiento Calafyuco INTA cultivadas bajo condiciones de campo	181
Conclusiones generales de la tesis	197
Ideas Proyecto Generadas a partir de la Tesis	200
REFERENCIAS	201
Anexo 1	264



### **ABREVIATURAS EMPLEADAS:**

<b>ACC:</b>	Ácido 1-aminociclopropano-1- Carboxílico
<b>A.C.:</b>	Antes de Cristo
<b>AIA:</b>	Ácido indol acético
<b>ABA:</b>	Ácido abscísico
<b>AJ:</b>	Ácido jasmónico
<b>CV:</b>	Cultivar
<b>DO:</b>	Densidad óptica
<b>D.D.S.:</b>	Días después de la siembra
<b>ERO:</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>g:</b>	Gramo
<b>GAs:</b>	Giberelinas
<b>h:</b>	Hora
<b>ha:</b>	Hectárea
<b>HPLC:</b>	Cromatografía líquida de Alta Eficacia
<b>L:</b>	Litro
<b>LB:</b>	Medio Luria Broth
<b>m:</b>	Metro
<b>MDA:</b>	Malondialdehído
<b>mg:</b>	Miligramo
<b>min:</b>	Minuto
<b>mL:</b>	Mililitro

<b>mm:</b>	Milímetro
<b>mM:</b>	Milimolar
<b>rpm:</b>	Revoluciones por minuto
<b>RSI:</b>	Resistencia sistémica inducida
<b>seg:</b>	Segundo
<b>t:</b>	Tonelada
<b>µL:</b>	Microlitro
<b>UV:</b>	Ultravioleta
<b>UFC:</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>°C:</b>	Grados Celsius
<b>%:</b>	Porcentaje

# CAPÍTULO 1

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### A. Origen del género *Capsicum*

El pimiento fue una de las primeras plantas cultivadas por las culturas precolombinas, para las cuales representaba un valioso condimento y una fuente importante de vitamina C (Eshbaugh, 1970; Carrizo-García et al., 2016). Se estima, por evidencia arqueológica hallada en el centro de México y Perú, que su utilización se remonta a 7000 años A.C. (Do Rego et al., 2016; Naccarato et al., 2016). Los antiguos pobladores de América utilizaron el pimiento entre otras cosas como medicamento, moneda de cambio, material de tributo (Luna-Ruiz et al., 2018; Salehi et al., 2018) e incluso como arma química o castigo, para lo cual hacían inhalar el humo producido por la quema de pimientos pungentes secos, lo que ocasionaba asfixia, tos y lagrimeo en los ojos (Fulton et al., 2017).

Se estima que 6000 años antes de la llegada de los europeos al continente Americano, el maíz y el pimiento comprendían en conjunto un complejo alimenticio utilizado por las culturas precolombinas desde las Bahamas hasta el sur de Perú (Wahyuni et al., 2013).

Después de la conquista de América el pimiento fue llevado por los españoles a Europa para ser utilizado como un sustituto de la pimienta (*Piper nigrum*). En España el cultivo de pimiento se hizo popular debido a que podía ser cultivado en las condiciones agroclimáticas de la península Ibérica, desde aquí el cultivo se expandió a Portugal, posteriormente los portugueses introdujeron el pimiento en sus colonias en la India y África (Pinto et al., 2016).

La domesticación de las especies de *Capsicum* que se cultivan en la actualidad ocurrió hace aproximadamente 800 años, siendo México y Guatemala el centro de domesticación para *C. annuum*, la región amazónica para *C. chinense* y *C.*

*frutescens* y las zonas altas de Bolivia y Perú para *C. baccatum* y *C. pubescens* (Pickersgill, 1969; Chiou & Hastorf, 2014). De igual forma se considera que Brasil es un centro de diversidad genética importante para las especies del género *Capsicum* debido a que presenta una alta tasa de endemismo (Pardey et al., 2006). Se estima que Argentina forma parte del centro de diversidad de *C. baccatum* var. *Baccatum*, esta especie ha sido reportada en la provincia de Córdoba (Hunziker, 1951; Galmarini, 2000).

El pimiento es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia a nivel mundial, se cultiva en América, Europa, Asia, África y en menor medida en Oceanía (FAOStat, 2012). En la actualidad es cada vez más frecuente el uso de la capsaicina con fines médicos empleándose como agente analgésico de uso tópico (Saleh et al., 2018), especialmente útil en padecimientos como la neuralgia trigeminal (Puri et al., 2018).

## **B. El género *Capsicum* spp**

Dentro de la familia de las solanáceas se encuentra el género *Capsicum*, al igual que otros géneros de importancia económica como *Solanum* y *Nicotiana*. En la actualidad los frutos cosechados de *Capsicum*, denominado popularmente como pimientos, ajíes o morrones, revisten gran importancia desde un punto de vista nutricional debido a que contienen cantidades significativas de vitaminas B, C, E y provitamina A (caroteno). Además, posee aceites esenciales, resinas, proteínas, celulosa, principios pungentes, clorofila y elementos minerales importantes en la industria alimentaria y farmacológica (Antonio et al., 2018; Olatunji & Afolayan, 2018; Hernández-Pérez et al., 2020). Como puede observarse en la Figura 1.1 las formas, colores y tamaños de sus frutos son muy variados.



**Figura 1.1.** Frutos del género *Capsicum*. Fuente: Lobato, 2015.

A continuación, se presenta la clasificación taxonómica del género *Capsicum* realizada por Jarret et al. (2019):

**Reino:** Vegetal  
**Tipo:** Fanerógama  
**División:** Spermatophyta  
**Clase:** Dicotiledónea  
**Subclase:** Simpétala o Gamopétala  
**Orden:** Solanales o Tubiflorales  
**Familia:** Solanaceae  
**Género:** *Capsicum*

La gran diversidad de formas de pimientos existentes en las especies cultivadas, así como la diversidad de criterios utilizados en su clasificación hacen que la taxonomía dentro del género *Capsicum* sea compleja (Hayano-Kanashiro et al., 2016). Se estima que el género *Capsicum* está conformado por alrededor de 33 especies silvestres y 5 especies domesticadas, las cuales corresponden a: *C. baccatum*, *C. pubescens*, *C. frutescens*, *C. chinense* y *C. annuum* (USDA, 2011). En base al color de la flor las especies del género *Capsicum* se dividen en dos grandes grupos: el grupo de flores blancas y el grupo de flores moradas (Montes et al., 2010). En el grupo de flores blancas se incluyen las especies domesticadas *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. baccatum* (Van Zonneveld et al., 2015); mientras que el grupo de flores moradas contiene la especie domesticada *C. pubescens*, que pese a no tener un ancestro silvestre conocido, puede formar híbridos fértiles con *C. cardenasii* y *C. eximium* (Sikora & Nowaczyk, 2014).

En general es complejo realizar cruzamientos entre las especies del grupo de flores blancas y el grupo de flores moradas (Galmarini, 2000). Las especies de ambos grupos del género *Capsicum* consumidas por la humanidad se pueden distinguir por caracteres morfológicos como color, tamaño y forma de la corola, forma del cáliz, número de flores por nudo y presencia de constricción anular en la unión del cáliz y el pedicelo, siendo este último carácter especialmente útil para distinguir a *C. chinense* (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Caracteres morfológicos para el reconocimiento de las especies del género *Capsicum* consumidas por la humanidad (Fuente: Montes, 2010).

<b>Especie</b>	<b>Cáliz dentado</b>	<b>Constricción en el cáliz</b>	<b>Color y tamaño de la corola</b>	<b>Flores por nudo</b>	<b>Color y forma de la semilla</b>
<b>Grupo de flores blancas</b>					
<i>C. annuum</i> var. <i>Annuum</i>	Presente	Ausente	Blanca (grande)	1	Amarilla, lisa
<i>C. annuum</i> var. <i>Glabriusculum</i>	Ausente	Ausente	Blanca (pequeña)	1 (2-3)	Amarilla, lisa
<i>C. chinense</i>	Ausente	Presente	Blanca opaca	2-3	Amarilla, lisa
<i>C. frutescens</i>	Ausente	Ausente	Blanca verdosa	2-3	Amarilla, lisa
<i>C. galapagoense</i>	Ausente	Ausente	Blanca	1	Amarilla, lisa
<i>C. baccatum</i> var. <i>Pendulum</i>	Presente	Ausente	Blanca con manchas amarillas-verdosas	1	Amarilla, lisa
<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	Presente	Ausente	Blanca con manchas amarillas-verdosas	2-3	Amarilla, lisa
<i>C. baccatum</i> var. <i>Umbilicatum</i>	Presente	Ausente	Blanca con manchas verdes u ocreas	1	Amarilla, lisa
<i>C. praetermissum</i>	Presente	Ausente	Moradas con manchas verdes	1	Amarilla, lisa
<i>C. chacoense</i>	Presente	Ausente	Blanca	1	Amarilla, lisa
<i>C. tovarii</i>	Presente	Ausente	Violeta a crema con manchas amarillas verdosas	1	Amarilla, lisa
<b>Grupo de flores púrpura</b>					
<i>C. pubescens</i>	Presente	Ausente	Moradas	1 (2-3)	Negra, rugosa
<i>C. eximium</i>	Presente	Ausente	Violácea magenta a blancuzca con máculas amarillentas u ocráceas	1 (2-3)	Amarilla, lisa
<i>C. cardenasii</i>	Presente	Ausente	Moradas (campanulada)	2-3	Amarilla, lisa

### **C. Producción del pimiento y su importancia**

Los pimientos son productos hortícolas de alto valor económico y nutricional, con una gran aceptación en el mercado internacional. La comercialización de pimiento presenta una tendencia en alza debido al incremento de la población mundial, lo cual ha favorecido el aumento de su uso a nivel industrial (Gobie, 2019). En particular en la industria alimenticia se destaca su utilización en estado de polvo, como saborizante y colorante en la preparación de salsas, sopas y embutidos de carne (Baenas et al., 2019). De igual forma en el mercado internacional existe una demanda creciente por los frutos de pimiento; demanda provocada por la prohibición del uso de colorantes sintéticos y por el aumento de los costos en países tradicionalmente productores como España (Kantar et al., 2016).

A nivel global, se considera que en el continente asiático se encuentra más de la mitad de la superficie mundial dedicada a la producción de pimiento, destacándose países como China, Indonesia, Corea, Pakistán y Turquía. Después de Asia, África es el continente con mayor área destinada a la producción de pimiento, seguida por Europa. En América, las superficies más representativas en este cultivo se encuentran en México y Estados Unidos (Zhang et al., 2016; Batiha et al., 2020). La producción de los países de América del sur está básicamente destinada al autoconsumo.

Varias de las especies del género *Capsicum* están presentes en el territorio argentino (Galmarini, 2000). Según Hunziker, dentro de las especies que se cultivan en Argentina se encuentran *C. baccatum*, *C. eximium*, *C. flexuosum* y *C. chacoense*; esta última, distribuida ampliamente en las provincias de Catamarca, La Rioja, Corrientes, Córdoba, Chaco y Formosa (Hunziker, 1998).

En el año 2019 en Argentina se cultivaron alrededor de 10624 ha de pimiento, que representan una producción de 11020 t (FAOSTAT, 2021). La producción de pimiento para pimentón se concentra en el Norte de Argentina, en las provincias de Catamarca (en el Valle de Santa María) y Salta (en los Valles Calchaquíes y Lerma) (Durán et al., 2010). En las provincias de Mendoza y San Juan se concentran las industrias para la producción de conservas de pimiento (Galmarini,

2000). Se estima que en Mendoza se cultivan alrededor de 1246 ha de pimiento, los principales departamentos productores son: Maipú, San Carlos, Tunuyán, San Rafael y Lavalle. La mayor parte del pimiento cultivado en la provincia de Mendoza corresponde al tipo Calahorra, destinado a la industria conservera. En la Figura 1.2 se muestran sus frutos característicos. También se cultiva pimiento tipo 4 cascós para el mercado en fresco y la industria del deshidratado (Roig et al., 2009). Dentro del tipo Calahorra, el cv. Calafyuco INTA, obtenido por el programa de mejoramiento del INTA La Consulta (Galmarini et al., 1991), es resistente a *Phytophthora capsici* Leo., una enfermedad fúngica que ocasiona grandes pérdidas económicas en: las plantaciones de pimiento. Las plantas alcanzan en su estado adulto a los 55 cm de altura, se estima que el ciclo del cultivo es de 115 días, sus frutos son de forma acorazonada, con el ápice terminando en una punta aguda. El peso promedio del fruto es de unos 130 g, es muy carnoso y de sabor dulce, por eso el interés de la industria conservera. Los frutos una vez maduros son de color rojo Figura 1.2.



**Figura 1.2.** Fruto de pimiento del cv. Calafyuco INTA.

#### **D. Ambiente y agricultura**

Para satisfacer la alta demanda de alimentos producto del crecimiento exponencial de la población mundial surgió entre los años 60 y 70 la llamada “revolución verde”. El primer paso de esta revolución consistió en el desarrollo de variedades altamente productivas (trigo, arroz y maíz), resistentes a plagas y enfermedades,



con capacidad para duplicar y hasta triplicar el rendimiento con respecto a las variedades tradicionales. Esto conllevó a que se destinaran grandes superficies a los monocultivos intensivos, altamente dependientes de fertilizantes y pesticidas químicos (Pingali, 2012; Conway & Barbier, 2013). Por este motivo actualmente los cultivos dependen de la utilización de agroquímicos y de la fertilidad del suelo para aumentar su producción. La fertilidad del suelo está relacionada con la disponibilidad de los nutrientes que en él se encuentren. Entre los más importantes podemos mencionar nitrógeno, fósforo y potasio. En suelos con deficiencias de estos elementos se aplican fertilizantes para poder suplirlo, sin embargo, los altos costos de los fertilizantes nitrogenados limitan su uso. Además, se estima que los cultivos absorben entre un 20 a 40% del fertilizante aplicado, el restante se pierde por diversos mecanismos, esto conlleva enormes pérdidas económicas, afectando el medio ambiente, incrementando el efecto invernadero y la pérdida de la diversidad biológica del suelo.

En las últimas décadas se ha tomado conciencia ambiental por el agotamiento de los recursos naturales, particularmente con respecto al uso intensivo de fertilizantes minerales, que han dejado a su paso la contaminación del recurso hídrico y la pérdida de la fertilidad del suelo, ocasionando graves problemas ecológicos, económicos y sociales. Por consiguiente, es necesario encontrar soluciones que permitan consolidar una agricultura sustentable mediante una explotación racional de los recursos naturales y la aplicación de tecnologías adecuadas que garanticen el cuidado del ambiente. En este contexto, es notable la importancia que tienen los biofertilizantes como una alternativa parcial o total a los fertilizantes minerales. Los biofertilizantes son productos que contienen restos vegetales o microorganismos (bacterias u hongos), utilizados en la fertilización y nutrición vegetal. Dentro de los biofertilizantes nos focalizaremos en los bioinoculantes que contienen microorganismos, que al ser inoculados pueden vivir asociados o en simbiosis con las plantas (Maçik et al., 2020). Dentro de este grupo se encuentran los formulados por rizobacterias.

## **E. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal**

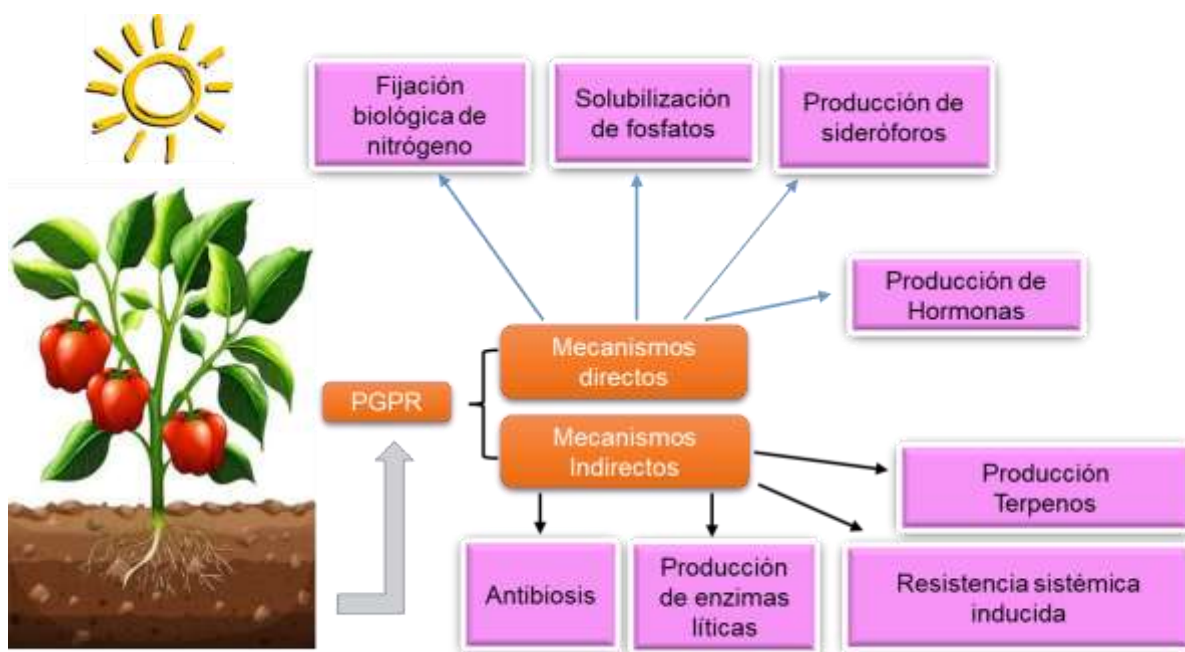
Algunos bioinoculantes están compuestos por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, conocidas como PGPR por sus siglas en inglés (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper & Schroth, 1978). Estos microorganismos pueden promover el crecimiento de las plantas por medio de diferentes mecanismos que analizaremos en detalle en la siguiente sección. Las PGPR constituyen una alternativa sustentable para el manejo de agroecosistemas, esto es debido al bajo costo de implementación e impacto ambiental y al efecto positivo en el rendimiento de diferentes cultivos con importancia económica mundial (Glick, 2012).

Las PGPR son habitantes del suelo y se caracterizan por colonizar la rizósfera de las plantas (Sharma et al., 2017) o pueden ser endofíticas en diferentes órganos como raíces, hojas y tubérculos (Gusain et al., 2019). La rizósfera es la zona de influencia de la raíz en la cual la planta produce una liberación continua de metabolitos, los cuales son utilizados como sustrato por los microorganismos (Lu et al., 2018). Los metabolitos rizosféricos o exudados incluyen aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos fenólicos y proteínas (Philippot et al., 2013). Generalmente las PGPR deben colonizar en forma eficiente la superficie de la raíz para ejercer su efecto benéfico, competir por los nutrientes y el sitio que ocuparán en el sistema radical (Kumari et al., 2018).

## **F. Mecanismos de promoción del crecimiento por las PGPR**

Los mecanismos por los cuales las PGPR pueden mejorar el desarrollo de la planta es, a través de la producción de hormonas o reguladores del crecimiento vegetal o incrementando la disponibilidad de nutrientes esenciales, mejorando la disponibilidad y su absorción. Además, pueden suprimir un amplio espectro de fitopatógenos como bacterias, hongos y nemátodos (Castillo et al., 2015). Para promover el crecimiento y la sanidad de las plantas las PGPR combinan estos

mecanismos, los cuales pueden actuar simultánea o secuencialmente en los diferentes estadios del desarrollo vegetal (Bishnoi, 2015). Estos mecanismos se pueden clasificar como directos e indirectos y pueden observarse en la Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Mecanismos de acción directos e indirectos de las PGPR para la promoción del crecimiento de las plantas.

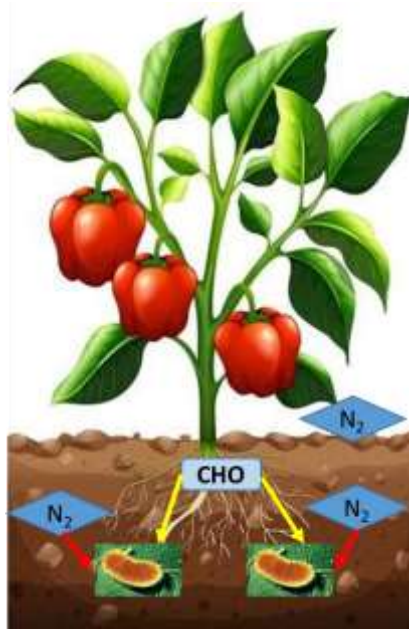
Los mecanismos directos son aquellos en los que las PGPR promueven, en forma directa, el crecimiento de las plantas facilitándoles el acceso a minerales esenciales que se encuentran en el suelo pero que no se encuentran disponibles para las raíces. Generalmente este tipo de mecanismo involucra facilitar la adquisición de recursos o la modulación de los niveles de hormonas vegetales (Glick, 1995). Las PGPR pueden proporcionar a la planta nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo y hierro para lo cual utilizan mecanismos como la fijación Biológica del nitrógeno (FBN), la solubilización de formas insolubles de fósforo inorgánico (Prasad et al., 2015) y la producción de sideróforos para obtención de hierro (Khalid et al., 2015). Además, estas bacterias pueden producir fitohormonas

o reguladores del crecimiento tales como: auxinas (entre ellas el ácido indol acético, AIA) (Yousef et al., 2018), giberelinas (GAs) (Bottini et al., 1989; Kang et al., 2014), ácido abscísico (ABA) (Cohen et al., 2008; Porcel et al., 2014), citocininas (Mehmood et al., 2018), ácido salicílico (Masciarelli et al., 2014), ácido jasmónico (AJ) (Piccoli et al., 2011), etileno y óxido nítrico (Cassán et al., 2014). A continuación, se presentan con más detalle los principales mecanismos directos (secciones F.1 a F.5) e indirectos (secciones F.6 a F.8) implicados en la interacción planta-PGPR.

### **F.1. Fijación biológica de nitrógeno (FBN)**

Se estima que un 79% del nitrógeno del planeta se encuentra en la atmósfera en su estado elemental como  $N_2$ , no obstante, en esta forma no se encuentra metabólicamente disponible para ser absorbido y asimilado por las plantas (Xu et al., 2012). De los macronutrientes minerales, el nitrógeno es el más importante para el desarrollo de las plantas, las cuales lo absorben preferentemente por la raíz bajo las formas iónicas de nitrato ( $NO_3^-$ ) y amonio ( $NH_4^+$ ) (Cameron et al., 2013). El nitrógeno en la planta es un componente esencial de moléculas como proteínas, ácidos nucleicos, hormonas (auxinas y citoquininas) y clorofilas (Krapp, 2015), entre otros. Sin embargo, a pesar de su importancia para el desarrollo de las plantas, es uno de los elementos más deficiente en los suelos (Kraiser et al., 2011).

La FBN es considerada uno de los principales mecanismos por el cual las plantas se benefician de la asociación con microorganismos del suelo (Moreau et al., 2019). El proceso consiste en la conversión del  $N_2$  a  $NH_4^+$ , un compuesto químico asimilable para la planta, como se muestra en la Figura 1.4 (Annan et al., 2012). La transformación de  $N_2$  a nitrógeno disponible es mediada por la enzima nitrogenasa, la cual está compuesta de varias unidades proteicas y requiere de 36 átomos de hierro para conservar su integridad funcional (Zhang et al., 2016).



**Figura 1.4.** Esquema de la FBN por PGPR, las bacterias reciben fuentes de carbono de las plantas (CHO) y a cambio ellas les proveen de  $\text{NH}_4^+$ . Tomada y modificada de Molina-Romero et al., 2015.

La nitrogenasa se encuentra conformada por dos proteínas distintas llamadas dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa, las cuales son metaloenzimas. La dinitrogenasa también contiene molibdeno. En la dinitrogenasa, el hierro y el molibdeno forman parte de un cofactor conocido como *FeMo-Co*, el cual es el centro donde ocurre la reducción real del  $\text{N}_2$  (Purwanto et al., 2016).

## **F.2. Solubilización de fosfatos**

El fósforo es otro macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, este elemento está involucrado en importantes funciones vitales como la división celular, transducción de señales, formación de macromoléculas, producción de azúcares y almidones, síntesis de ácidos nucleicos, fotosíntesis, respiración y formación de aceites (Awasthi et al., 2011; Khan et al., 2014).

La mayor parte del fósforo presente en el suelo no es asimilable para la planta, debido a que se encuentra en formas insolubles (Mitran et al., 2018). El pH del suelo juega un papel importante en la disponibilidad del fósforo. A pH neutro el fósforo tiende a formar complejos insolubles con hierro y aluminio, mientras que en suelos alcalinos se precipita al formar complejos con calcio y magnesio (Kruse et al., 2015). Generalmente la cantidad de fosfato asimilable que contienen las soluciones del suelo son muy pequeñas y van del orden de 0,1 a 1 mg L<sup>-1</sup> de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (Behera et al., 2014). Algunas bacterias tienen la capacidad de solubilizar el fósforo incrementando la disponibilidad de este nutriente para las plantas (Hinsinger et al., 2011). El principal mecanismo de las PGPR para la solubilización del fosfato mineral consiste en la excreción de ácidos orgánicos producidos por el metabolismo de los azúcares, los cuales disminuyen el pH del medio, facilitando la movilidad del fósforo (Abbas-Zadeh et al., 2010). Dentro de los ácidos producidos por los microorganismos los más frecuentes son: adípico, fórmico, fumárico, glicólico, glucónico, indolacético, butírico, oxálico, succínico, málico, malónico, acético, láctico, cítrico, propiónico, succínico y 2-cetoglucónico. Estos ácidos actúan como quelantes de los cationes Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup> y Mg<sup>+2</sup> promoviendo la liberación de fosfatos a partir de compuestos fosfatados insolubles. De estos ácidos los que han sido más estudiados son el glucónico y el 2-cetoglucónico (Paredes & Espinosa, 2010; Goswami et al., 2016; Walia et al., 2017).

La mayoría de los ácidos orgánicos producidos por las PGPR son alifáticos, capaces de modificar el pH provocando la disolución de fosfatos insolubles de los suelos. De igual forma tienen una acción directa sobre la quelación, la precipitación y las reacciones de óxido-reducción de la rizósfera, formando complejos con metales, solubilizando metales y además participando en su transporte (Bhardwaj et al., 2014; Goswami et al., 2016).

De igual forma la excreción de enzimas extracelulares como las fosfatasas catalizadoras de la hidrólisis de ésteres fosfóricos, fitasas y C-P liasas son de gran importancia en la mineralización del fósforo orgánico en el suelo. El fósforo que procede de la materia orgánica presente en el suelo puede ser solubilizado

mediante hidrólisis, por la acción de las enzimas fitasas, que pertenecen a la clase de las fosfohidrolasas. Estas enzimas son las responsables de hidrolizar hasta el 80% del fósforo orgánico que se encuentra en el suelo en forma de hexafosfato de inositol o fitato, el cual es un derivado del mioinositol, el cual constituye una de las principales formas de almacenamiento de fósforo orgánico en las células vegetales (Singh et al., 2020).

Los mecanismos de solubilización de fosfatos por medio de ácidos orgánicos o por la acción de las fosfatasas pueden coexistir dentro de una especie de PGPR, de tal forma que el efecto conjunto de estos dos mecanismos, aumentan la disponibilidad de fósforo en la rizósfera y su absorción por la planta (Faria et al., 2013). Se estima que la utilización conjunta de fósforo de origen mineral y PGPR solubilizadoras de fosfatos podrían disminuir hasta un 50% la cantidad de fósforo mineral aplicado sin afectar el rendimiento de las plantas (Tahir & Aqeel, 2013).

### **F.3. Producción de sideróforos**

El hierro es el micronutriente que las plantas requieren en mayor cantidad, llegando incluso a considerarse como un macronutriente para algunas especies. Las plantas pueden absorber el hierro como ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) pero dada su mayor solubilidad es más fácilmente absorbido como ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Rout & Sahoo, 2015). Sin embargo, su disponibilidad como  $\text{Fe}^{2+}$  en el suelo es baja, debido a la rápida oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  y la posterior formación de compuestos insolubles, principalmente en forma de hidróxidos (Pii et al., 2016).

Algunos microorganismos del suelo tienen la capacidad de producir compuestos de bajo peso molecular denominados sideróforos. Estos compuestos son solubles en disoluciones acuosas a pH neutro y pueden ser fluorescentes. Además, presentan alta afinidad para quelar el hierro del suelo, incrementando la disponibilidad y absorción de hierro por parte de la planta y en algunos casos facilitando el control de organismos fitopatógenos (Parray et al., 2016; Khan et al., 2018). Otras PGPR, utilizando un receptor específico situado en la membrana bacteriana, secuestran el hierro, produciendo un complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforos, de

esta manera el hierro queda inaccesible para los microorganismos que no cuentan con el sistema de asimilación específico para reconocer dicho complejo (Rahimi et al., 2020). Al secuestrar todo o la mayor parte del hierro presente en el suelo, las PGPR convierten a este elemento en un factor limitante para grupos de organismos patógenos dependientes de hierro (Sayyed et al., 2013).

Existen alrededor de 500 tipo de sideróforos diferentes y se dividen en tres familias de acuerdo al grupo funcional característico: hidroxamatos, catecolatos y carboxilatos (Ahmed & Holmström, 2014). La síntesis de sideróforos está modulada por diversos factores ambientales como el pH, los niveles de hierro y sus formas químicas, la presencia de otros elementos traza y un adecuado suministro de carbono, nitrógeno y fósforo (Sivasakthi et al., 2014). Bajo condiciones de deficiencias de hierro la producción de exudados radicales ricos en compuestos fenólicos incrementa la proliferación de microorganismos productores de sideróforos en la rizósfera de las plantas (Jin et al., 2010).

#### **F.4. Reguladores de crecimiento o fitohormonas**

##### **F.4.1. Auxinas**

El AIA es considerado la auxina principal en las plantas superiores. Esta hormona regula múltiples procesos fisiológicos y juega un papel determinante en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las auxinas están implicadas entre otras funciones en la gametogénesis, embriogénesis, incremento del sistema radical, crecimiento de plántulas, formación vascular y desarrollo de la flor (Zhao, 2010).

En bacterias que habitan la rizósfera de las plantas, existen diferentes vías de síntesis de AIA, estando regulada su expresión por factores de transcripción, por la localización de los genes implicados y por la presencia de enzimas que pueden inactivar o metabolizar el AIA (Cavalcante da Silva et al., 2020). Se estima que alrededor del 80% de las bacterias aisladas de la rizósfera son capaces de producir AIA (Iqbal et al., 2016), por lo que se considera un mecanismo común en diferentes géneros y especies de PGPR.



Entre los géneros bacterianos más importantes podemos mencionar *Azospirillum* sp., *Bacillus* sp. y *Azotobacter* sp. (Patil, 2011; García et al., 2017; Bhutani et al., 2018), *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* y *P. chlororaphis* (Dimkpa et al., 2012; Bharucha et al., 2013; Meliani et al., 2017).

Muchas rizobacterias pueden convertir el triptófano exudado por la raíz en auxinas y de esta forma favorecer el crecimiento de la planta (Ambreetha et al., 2018). La producción bacteriana de auxinas modifica la arquitectura de la raíz, aumentando el número de raíces laterales y pelos absorbentes, incrementando la superficie total de la raíz, lo que conlleva a una mayor absorción de minerales del suelo y un incremento en la producción de exudados en las raíces, lo que además favorece la colonización de otras PGPR (Spaepen & Vanderleyden, 2011; Ludwig-Müller, 2015).

#### **F.4.2. Giberelinas**

Las GAs constituyen un gran grupo de ácidos diterpenos tetracíclicos presentes en plantas, en algunos hongos y bacterias (Colebrook et al., 2014). Estas fitohormonas juegan un rol importante en la regulación de diversos procesos fisiológicos en las plantas. Estos procesos incluyen la germinación de semillas, la movilización de las reservas almacenadas en el endosperma, el crecimiento del tallo, la floración, el desarrollo floral y el cuajado de frutos (Gantait et al., 2015). La estructura común de estos reguladores diterpénicos es un esqueleto de 19-20 átomos de carbono. Además, existe una clara relación entre la estructura de las GAs y su efecto biológico. Las GAs pueden trasladarse de las raíces a las partes aéreas de la planta donde los efectos son notables y más cuando las bacterias también producen auxinas que estimulan el sistema radical, mejorando el suministro de nutrientes, lo cual genera un incremento en el desarrollo de la parte aérea (Jha & Saraf, 2015).

Entre las PGPR que producen GAs podemos mencionar: *Azospirillum* spp, *Bacillus* spp, *Acetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum seropedicae* (Bastián et al., 1998; Bottini et al., 2004; Shahzad et al., 2016; Radhakrishnan & Lee, 2016).

Incluso, bajo condiciones de estrés hídrico se ha demostrado que las GAs producidas por *Azospirillum lipoferum* incrementan el desarrollo de las plantas de maíz y contribuyen a la tolerancia al estrés (Cohen et al., 2009).

### **F.4.3. Citocininas**

Las citocininas regulan la citocinesis en las células vegetales, esta fitohormona se encuentra presente en raíces, tallos, hojas, flores, frutos y semillas. El tipo y la actividad de las citocininas difieren notablemente entre diferentes especies de plantas y tejidos, en diferentes etapas de desarrollo y bajo diversas condiciones ambientales (Akhtar et al., 2020). Su síntesis se produce principalmente en las raíces de donde se transporta a otros tejidos para controlar diversos aspectos del desarrollo (Ha et al., 2012). Las citocininas cumplen un rol importante en la fotosíntesis, respiración y en una amplia gama de procesos oxidativos que incluyen la inhibición de la senescencia, crecimiento celular, metabolismo de compuestos secundarios, inhibición de la respiración durante la senescencia y estimulación de la respiración durante el desarrollo (Giron et al., 2013). Además, median las respuestas a factores extrínsecos variables, como la luz, disponibilidad de nutrientes y agua, desempeñando un papel importante en la respuesta al estrés biótico y abiótico. Las PGPR son capaces de sintetizar citocininas en cultivos puros en condiciones *in-vitro*, en el suelo y en asociación con tejidos vegetales donde incrementa los niveles endógenos (Zaheer, 2019).

Las citocininas son producidas tanto por microorganismos patógenos como beneficiosos y se sabe que inducen resistencia en plantas contra infecciones por patógenos (Akhtar et al., 2020). Por lo tanto, las PGPR productoras de citocininas promueven el crecimiento de las plantas de manera similar a la citocininas aplicada de manera exógena. Un nivel más elevado de citocininas en las plantas que los niveles basales, aumenta la resistencia a los patógenos, mientras que la situación inversa, aumenta la susceptibilidad de las plantas a las enfermedades (Akhtar et al., 2020).

#### **F.4.4. Ácido abscísico**

El ABA es un sesquiterpenoide que contiene 15 átomos de carbono. Las plantas sintetizan ABA mediante la vía de los carotenoides utilizando como precursor al  $\beta$ -caroteno. El ABA está implicado en la maduración del embrión, la latencia de las semillas, el cierre estomático, la acumulación de cera cuticular, la senescencia de las hojas, la latencia de las yemas, la inhibición del crecimiento, la división y elongación celular, y la inducción floral. Además, cumple un rol importante en las respuestas frente al estrés ambiental como la sequía, la salinidad, el frío, el ataque de patógenos y la radiación ultravioleta (UV). El ABA también es producido por hongos fitopatógenos y bacterias (Finkelstein, 2013; Chen et al., 2020).

Los primeros reportes de producción de ABA por PGPR fueron realizados mediante radioinmunoensayo (Kolb & Martin, 1985). Más tarde la producción de ABA fue confirmada mediante espectrometría de masas en *A. brasilense* Sp 245 en medios de cultivos cultivo suplementado con NaCl (Cohen et al., 2008) y en *Arthrobacter koereensis* (Piccoli et al., 2011). Posteriormente se confirmó el incremento en los niveles de ABA en plantas silvestres (Col-0) y mutantes de *Arabidopsis thaliana aba 2-1*, (deficientes en la síntesis de ABA), inoculadas con *A. brasilense* Sp 245 confirmando su rol en la tolerancia al estrés hídrico (Cohen et al., 2015). También se conocen otras especies de PGPR que producen ABA como *B. licheniformis* Rt4M10 y *P. fluorescens* Rt6M10 (Salomon et al., 2014).

Además, el ABA se encuentra asociado al incremento del contenido de carbohidratos en las hojas aumentando la producción en diferentes especies de plantas de interés agrícola como trigo, maíz, vid y algodón (Travaglia et al., 2007; Travaglia et al., 2012; Marusig & Tombesi, 2020; Wang et al., 2022).

#### **F.5. Producción de la enzima ACC desaminasa**

El etileno es una fitohormona que actúa como un potente regulador del crecimiento, está implicado en una amplia gama de diferentes repuestas y procesos en el desarrollo de la planta, afectando en bajas concentraciones los

procesos de diferenciación celular y la senescencia de diferentes órganos (Iqbal et al., 2017). En condiciones de estrés biótico o abiótico las plantas incrementan la producción de etileno, bajo la acción de esta fitohormona se detiene el proceso de elongación de la raíz, se acelera la senescencia de flores y la abscisión de frutos (Dubois et al., 2018). Cualquier factor que altere los niveles endógenos de etileno modifica el crecimiento y desarrollo de la planta (Lee & Yoon, 2018).

Para mitigar los efectos adversos producidos por el estrés y el consecuente incremento en la biosíntesis de etileno, las plantas han desarrollado diversas estrategias entre las que se encuentra la simbiosis con las PGPR. Estas son capaces de disminuir los niveles endógenos de etileno, por medio de la acción de la enzima ACC desaminasa, la cual desamina al precursor del etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Glick et al., 1998; Bal et al., 2013). Las PGPR ayudan a disminuir la acumulación de niveles de etileno utilizando los productos ( $\alpha$ -cetobutirato y amonio) como fuente de nitrógeno. De esta forma se restablece un sistema de raíces saludable necesario para hacer frente al estrés ambiental (Glick et al., 1998).

#### **F.6. Producción de antibióticos**

Las PGPR pueden actuar como microorganismos antagonistas contra fitopatógenos mediante la secreción extracelular de diferentes antibióticos (Riaz et al., 2021). Los mecanismos de acción de estos metabolitos incluyen: la inhibición de la síntesis de la pared celular, la desestabilización estructural de la membrana celular y la inhibición de la formación del complejo de iniciación de traducción de los fitopatógenos (Beneduzi et al., 2012). Además, muchos de estos compuestos presentan actividad como antivirales, insecticidas y antihelmínticos (Kumar et al., 2015; Goswami et al., 2016; Kenawy et al., 2019). Algunos ejemplos de rizobacterias productoras de antibióticos corresponden a *P. fluorescens* (Panpatte et al., 2016), *Delftia tsuruhatensis* (Prasannakumar et al., 2015), *Streptomyces venezuelae* (Kannan & Vincent et al., 2011) y *Burkholderia* sp. (Tenorio-Salgado et al., 2013).

## **F.7. Enzimas líticas**

La pared celular de la mayoría de los hongos fitopatógenos está compuesta por quitina ( $C_8H_{13}O_5N$ ), un polímero de glucosa de cadena larga no ramificado. Las cepas de PGPR pueden producir enzimas líticas extracelulares relacionadas con la defensa, las cuales exhiben actividad hiperparasitaria atacando a los hongos patógenos por medio de la excreción de quitinasas que degradan la pared celular (Pathak et al., 2017). Dentro de las enzimas líticas más conocidas se destacan las quitinasas, celulasas,  $\beta$ -1,3, deshidrogenasa,  $\beta$ -glucanasa, lipasas, fosfatasas, pectinoliasas, proteasas, exo y endopoligalacturonasas entre otras (Gupta, et al., 2015; Odoh, 2017). Algunas bacterias del género *Bacillus* como *B. altitudinis* y *B. amyloliquefaciens* son productoras de este tipo de enzimas (Sunar et al., 2015).

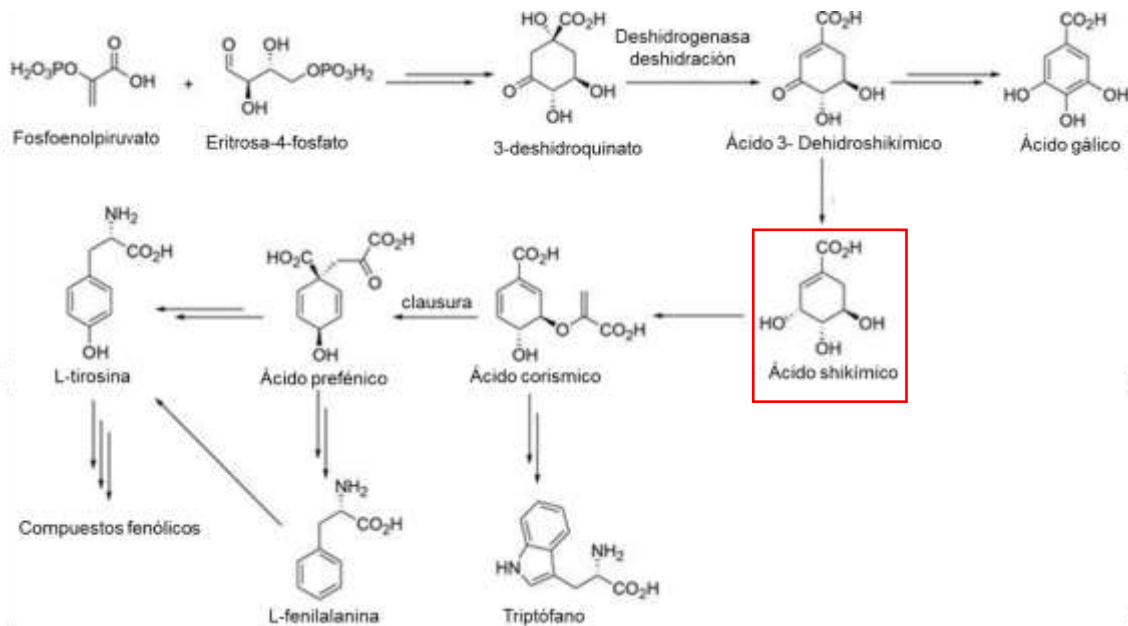
## **F.8. Resistencia sistémica inducida**

La inoculación con PGPR puede inducir en las plantas la síntesis de enzimas y proteínas de defensa, lo que disminuye la gravedad de enfermedades causadas por patógenos infecciosos. Este mecanismo se conoce como “resistencia sistémica inducida” o también denominado por sus siglas en inglés como ISR, (induced systemic resistance) (Singh & Jha, 2016). Otros estudios señalan que diversas PGPR asociadas a la raíz inducen el sistema inmunológico de la planta principalmente a través de la ruta de señalización de ácido jasmónico-etileno. La ISR por PGPR se ha reportado en una variedad de especies de plantas como en *Arabidopsis thaliana*, frijol, clavel, pepino, rábano, tabaco (Kannoja et al., 2019). Entre los metabolitos que participan en la inducción de la ISR en la tesis nos focalizaremos en los compuestos fenólicos.

## **G. Compuestos fenólicos**

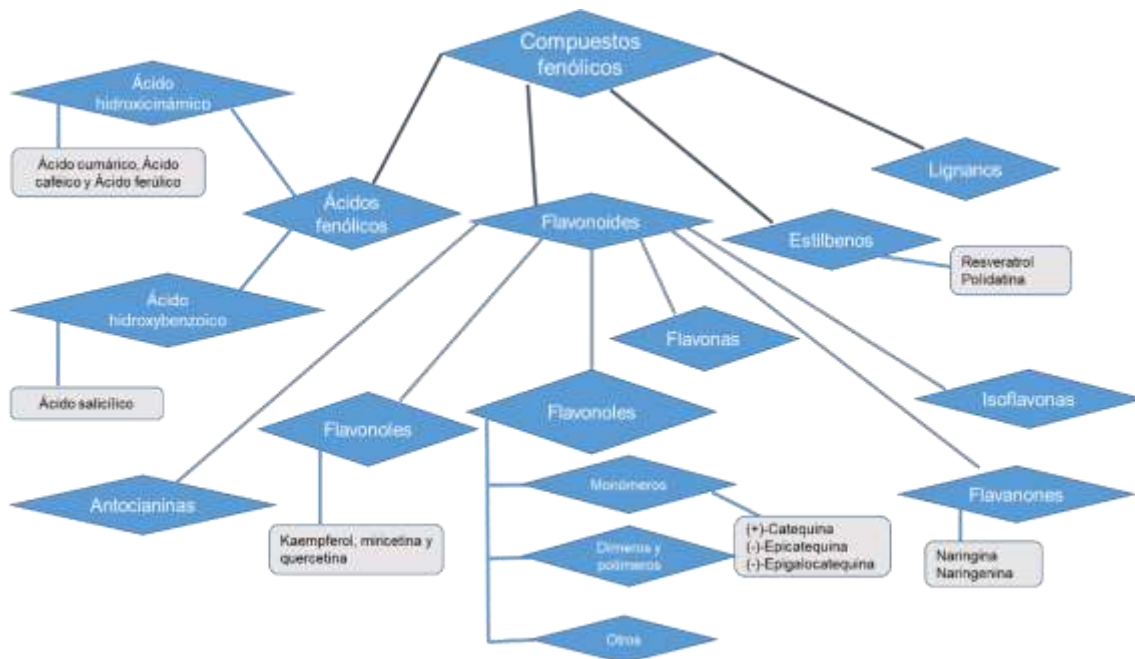
Los compuestos fenólicos son producto del metabolismo secundario de las plantas. Están caracterizados por tener al menos un anillo de benceno y poseer uno o más grupos hidroxilos. Una característica básica de los compuestos fenólicos es su importante actividad antioxidante. Además, algunos compuestos fenólicos pueden tener otras propiedades adicionales como producir cierto efecto inmunológico, poseer efectos antiinflamatorios y presentar actividad antimicrobiana, etc. (Mahfuz et al., 2021).

El ácido shikímico y algunos productos de las vías glicolíticas son los precursores de la síntesis de metabolitos secundarios incluidos los compuestos fenólicos, como se muestra en la Figura 1.5. (Ghosh et al., 2012). Los factores del desarrollo alteran el inicio y la diferenciación de las partes de la planta responsables de la síntesis y el almacenamiento de los metabolitos secundarios. Por otro lado, varios factores extrínsecos también regulan estos procesos. Algunos autores han observado que los entornos fluctuantes modifican la expresión de los genes responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios, lo cual modifica el tipo y la concentración de estos compuestos (Sanchita et al., 2018, Balestrini et al., 2021, Singh et al., 2021). Según la vía de síntesis, hay hasta 100000 metabolitos secundarios presentes en las diferentes especies de plantas. Estos metabolitos se pueden clasificar en tres grandes categorías, como son: terpenos, compuestos nitrogenados y compuestos fenólicos (Balestrini et al., 2021).



**Figura 1.5.** Esquema de las principales vías de síntesis de los compuestos fenólicos, donde se resalta el precursor: ácido shikímico. Tomado y modificado de Al Mamari, 2021.

Los más de 8000 compuestos fenólicos que existen en la naturaleza pueden clasificarse en 4 clases diferentes, de acuerdo a su estructura química básica, como se muestra en la Figura 1.6. En la misma puede verse que ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos representan las principales familias de compuestos fenólicos, muchos de los cuales en la naturaleza se encuentran asociados con mono o polisacáridos (glicosilados) o derivados funcionales como ésteres o metil ésteres (Salas, 2010). El número de compuestos dentro de cada clase puede ser muy variado dependiendo del tejido vegetal.



**Figura 1.6.** Clasificación de los compuestos fenólicos donde podemos apreciar las cuatro familias más importantes y sus derivados.

Los compuestos fenólicos tienen un rol clave como compuestos de defensa bajo condiciones de estrés ambiental, como luz inadecuada (exceso o defecto), estrés salino o por metales pesados, bajas temperaturas, pH desfavorable, infección de patógenos, herbívoros y la deficiencia de nutrientes, que pueden inducir una mayor producción de especies oxidativas en plantas (Lattanzio, 2013).

Con respecto a las funciones que cumplen las diferentes clases de compuestos fenólicos puede mencionarse que, por ejemplo, los ácidos fenólicos tienen funciones estructurales como componentes de la pared celular, mejorar la absorción de nutrientes, facilitar la germinación de semillas bajo estrés abiótico, como moléculas señales en las respuestas de defensa sistémica de las plantas y de mediación en la selección de poblaciones microbianas beneficiosas en la rizósfera (Rivas-San Vicente & Plasencia, 2011; Cheynier et al., 2013).

Los alcoholes fenólicos se consideran una familia importante de compuestos fenólicos por su alto potencial antioxidante. Entre los alcoholes fenólicos más



conocidos se encuentran el hidroxitirosol y el tirosol (El Monfalouti et al., 2012). El tirosol presenta actividad antifúngica contra diferentes fitopatógenos. Además, el poder antioxidante de este compuesto protege a las semillas de la oxidación y mejora la germinación; no obstante, la aplicación exógena de tirosol en plántulas puede limitar el desarrollo cuando se utiliza en altas concentraciones (Macedo et al., 2018; Silva et al., 2021).

Dentro del grupo de los flavonoides puede destacarse su participación en los mecanismos de defensas, en los cuales tienen un rol muy importante en el transporte de auxinas y su oxidación mediada por peroxidasas (Agati et al., 2012). Los flavonoides también son los responsables del color de algunas flores que a su vez puede constituir un mecanismo de defensa contra insectos, ayudan en la germinación de semillas, crecimiento y desarrollo de plántulas y actúan como filtro UV, otorgan resistencia a heladas, etc. (Samanta et al., 2011).

Más de 1000 estilbenoides se han caracterizado estructuralmente en el reino vegetal (Pawlus et al., 2012). Los estilbenoides, han demostrado ejercer una acción protectora contra diversos estreses bióticos y abióticos a los que están sometidas las plantas, por ejemplo, estrés oxidativo (Hammerbacher et al., 2011; Castellano et al., 2014).

### **G.1. Rol de los compuestos fenólicos en la interacción rizobacterias-planta**

Los compuestos fenólicos tienen funciones claves como agentes de señalización entre los microorganismos del suelo y las raíces de las plantas (Lattanzio, 2013). Las PGPR pueden incrementar los niveles de compuestos fenólicos en las plantas (Del Rosario Cappellari et al., 2017). En situaciones de estrés biótico o abiótico la inoculación con PGPR puede modular la expresión de compuestos fenólicos en la planta favoreciendo su desarrollo en condiciones adversas. Los compuestos fenólicos confieren resistencia directa a las plantas que han sido atacadas por

patógenos o que se encuentran bajo condiciones ambientales limitantes (Annapurna et al., 2013; Kannoja et al., 2019).

Las vías de síntesis de los flavonoides son fuertemente inducibles y son especialmente sensibles a los estímulos bióticos, incluidos hongos y bacterias (Capanoglu, 2010; Garcia-Seco et al., 2015). Los estímulos bióticos incluyen a las PGPR, algunas de las cuales son capaces de inducir el metabolismo secundario de las plantas utilizando inductores químicos (Garcia-Seco et al., 2015). Las PGPR pueden provocar alteraciones en las actividades de los exudados de las raíces, particularmente en el perfil de los flavonoides, como se ha visto en cepas de *Azospirillum* (Walker et al., 2012; Verma et al., 2018).

Hay dos mecanismos principales que regulan la secreción de flavonoides por las raíces. El primero es el mecanismo pasivo, el cual básicamente surge por la necesidad de renovación de la raíz, debido al daño y/o descomposición de las células del borde de la raíz. El segundo es el mecanismo activo; el cual se basa en la exudación de flavonoides por las raíces, para lo cual las células de la raíz utilizan un transportador dependiente de ATP que funciona en la secreción de flavonoides hacia la rizósfera. Aunque los genes candidatos implicados en la secreción de flavonoides y otras familias de compuestos fenólicos han sido identificados, los transportadores responsables de la exudación de flavonoides hacia la rizósfera aún no se han determinado (Korenblum et al., 2022).

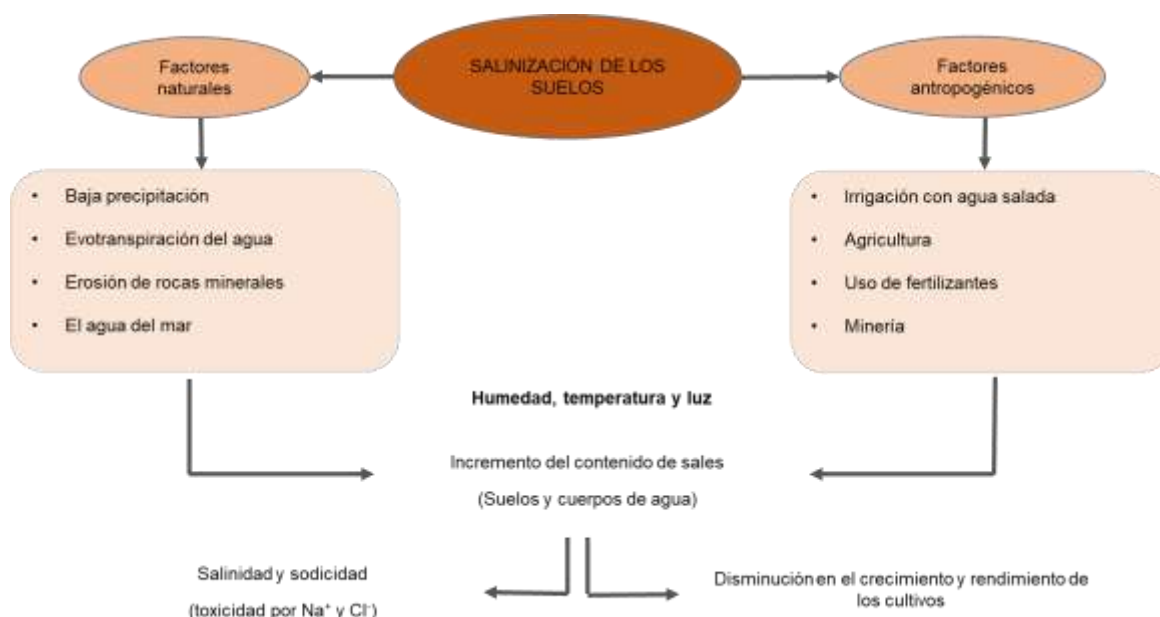
Los compuestos fenólicos exudados por las raíces son importantes para regular la producción de compuestos antifúngicos y de biocontrol producidos por PGPR. Además, PGPR como *Pseudomonas* y *Bacillus* utilizan flavonoides como fuentes de carbono.

## **H. La salinización de los suelos**

La presencia de sales en los suelos afecta el desarrollo y la productividad de los cultivos en todo el mundo, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas. El

proceso de salinización puede ocurrir de forma natural y se origina por la acumulación en el suelo de sales solubles. Sin embargo, las malas prácticas agrícolas como la ausencia de drenajes que permitan disminuir las sales acumuladas, contribuyen a la expansión de las áreas salinizadas.

Aproximadamente un 19,5% de los suelos con malas prácticas de irrigación se encuentran salinizados (Shahid et al., 2018). En la Figura 1.7 se muestran los factores que más contribuyen en la salinización de los suelos. Algunas zonas en las que la salinidad obedece a causa naturales el problema se vé agravado por el uso irracional de fertilizantes y la irrigación con agua salada.



**Figura 1.7.** Factores que contribuyen a la contaminación de los suelos a nivel mundial. Tomado y modificado de Quintal, 2015.

### H.1. Suelos salinos de Argentina

En Argentina existe una gran superficie de suelos afectadas por problemas de salinidad especialmente en las zonas consideradas áridas y semiáridas, ubicadas hacia el este del territorio. Taleisnik & López, (2011) aseguran que Argentina es el tercer país a nivel mundial con mayor cantidad de hectáreas salinizadas. En un trabajo realizado por el INTA y FAUBA, indican que alrededor de un 25 % de las

zonas destinadas a la agricultura de regadío completo (viñedos, cultivos de frutas y hortalizas), se encuentran en suelos afectados por la salinidad antropogénica (FAO and ITPS, 2015; Tozzi et al., 2017). La mayor proporción del suelo afectado por la salinidad se debe al ascenso capilar de sales desde el agua subterránea. A una profundidad de 0-30 cm hay 770403 km<sup>2</sup> de suelos sódicos o salinos-sódicos (27,6% de la superficie del país) y de 30-100 cm hay 1.066.389 km<sup>2</sup> (38,2%) (INTA 2021). En la Tabla 1.2 se muestra el área afectada por la salinidad en cada provincia de Argentina. Como puede observarse, en Mendoza se concentra la mayor superficie de suelos afectados por problemas de salinidad, así como también la mayor superficie de suelos con sistema de irrigación, los cuales pueden verse seriamente afectados por las sales si se presentan deficiencias en los sistemas de drenaje.

**Tabla 1.2.** Áreas salinizadas de Argentina. Tomado de Sánchez et al., (2015).

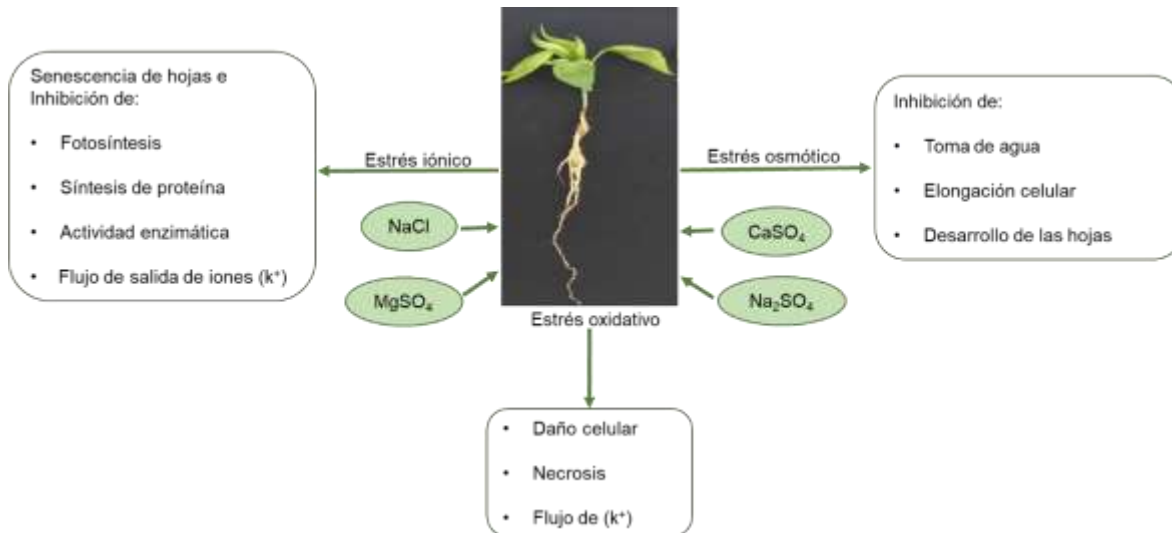
Provincia	Superficie					
	Regada (ha)	%	Afectada por salinidad (ha)	%	Afectada por deficiencia de drenaje (ha)	%
Jujuy	90514	5,9	11500	2,0	10000 (CI)	1,8
Salta	129000	8,4	57791	10,0	17584 (ID)	3,2
Tucumán	140734	9,1	60393	10,3	51941 (CI)	9,4
S. del Estero	54273	3,5	33370	5,7	33370 (ID)*	6,0
Catamarca	26884	1,7	1517	0,3	(ID) o (ID)	-
Córdoba	55863	3,6	3747	0,6	(SI)	-
San Luis	8797	0,6	2436	0,4	2250(ID)	0,4
La Rioja	13456	0,9	1200	0,2	700 (CI)	0,1
Mendoza	443523	28,8	255940	43,8	255310** (ID)	46,0
San Juan	96133	6,2	76566	13,1	55000**	9,9
Chubut	26404	1,7	12646	2,2	20969 (ID)	3,8
Santa Cruz	2000	0,1	(SI)	-	(SI)	-
La Pampa	3964	0,3	1982	0,3	2500 (ID)	0,5
Neuquén	14527	0,9	3938	0,7	4367 (ID)	0,8
Río Negro	117106	7,6	46423	7,9	52975 (ID)	9,5
Buenos Aires	176500	11,6	12500	2,1	43750	7,9
Entre Ríos	56800	3,7	-	-	(SI)	-
Corrientes	52310	3,4	-	-	-	-
Santa Fe	20500	1,3	1600	0,3	4000	0,7
Chaco	4700	0,3	500	0,1	(SI)	-
Formosa	5200	0,4	-	-	-	-
<b>TOTALES</b>	<b>1539188</b>	<b>100</b>	<b>584049</b>	<b>100</b>	<b>554716</b>	<b>100</b>

\* Grado de salinidad variable; \*\* Profundidad freática menor de 2 m; (SI): sin información; (CI): Carece de infraestructura; (ID): Infraestructura deficiente.

## H.2. El estrés salino y su efecto en las plantas

La salinidad es un estrés importante para los cultivos a nivel mundial, afectando alrededor de 45 millones de ha de suelos de regadío, reduciendo considerablemente el potencial productivo de las plantas y la calidad de las cosechas (Machado et al., 2017). Las sales capaces de inducir la salinidad son: NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KCl y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, siendo el NaCl la sal más frecuente en los suelos con problemas de salinidad (Pérez-Labrada et al., 2019).

La salinidad induce tres tipos de estrés en las plantas: osmótico, iónico y oxidativo, como se puede apreciar en la Figura 1.8.



**Figura 1.8.** Componentes principales del estrés salino y sus efectos en las plantas.

### H.2.1. Estrés osmótico

La salinidad disminuye el potencial hídrico de la solución del suelo, esto provoca una disminución de la absorción de agua por parte de las plantas, dando lugar a una disminución de la turgencia celular, lo que ocasiona una reducción de la elongación de raíces y hojas (Muñoz-Mayor et al., 2012; Christou et al., 2013). Un mecanismo de tolerancia al estrés osmótico es la acumulación de solutos compatibles que veremos en la sección H.3.

### H.2.2. Estrés iónico

La toxicidad iónica ocurre por un incremento desproporcionado de las concentraciones de sales al interior de la célula lo que origina una interrupción de diversos procesos celulares incluido el metabolismo. Los iones de sodio en las raíces inhiben la absorción de potasio, el cual es un importante macronutriente

implicado en el proceso de apertura estomática y se estima que regula alrededor de 50 reacciones enzimáticas en las plantas (Roy et al., 2014; Safdar et al., 2019). Mientras que las altas concentraciones de cloruro inhiben la absorción de nitratos, disminuyen la fotosíntesis y ocasionan quemaduras en las hojas (Isayenkov & Maathuis et al., 2019; De Mello Prado, 2021).

### **H.2.3. Estrés oxidativo**

Las plantas bajo condiciones de salinidad experimentan una serie de cambios químicos y fisiológicos dentro de los cuales uno de los más importantes es el estrés oxidativo caracterizado por la sobreproducción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO más reconocidas en las plantas por su acción dañina sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos son: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ). La producción de ERO se concentra principalmente en los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas (Hossain & Dietz, 2016; Zhang et al., 2016). Las ERO catalizan los eventos de señalización del catión calcio e incrementan la fuga de iones potasio desencadenando los eventos de muerte celular programada (Demidchik, 2015).

### **H.3. Acumulación de solutos compatibles**

Bajo las condiciones de estrés salino las plantas inducen importantes cambios fisiológicos, anatómicos y bioquímicos. Uno de los cambios más importantes es la acumulación de compuesto de bajo peso molecular denominados solutos compatibles como la prolina, betaína, polioles y azúcares solubles, los cuales permiten mantener el equilibrio osmótico a nivel celular. De igual forma, los solutos compatibles estabilizan el funcionamiento del fotosistema II, protegen a nivel estructural a las enzimas y proteínas, mantienen la integridad de la membrana, ayudan a eliminar las ERO y reducen la pérdida de  $K^+$  (Mohammadkhani et al., 2014; Neelapu et al., 2015).

En las plantas bajo estrés salino la prolina actúa como un osmoprotector aliviando los efectos deletéreos del estrés oxidativo y osmótico. La salinidad induce la acumulación de prolina en el citosol desde donde regula el potencial redox celular, garantizando la estabilidad estructural del plasmalema.

Una consecuencia del estrés oxidativo es la peroxidación de lípidos donde se produce el deterioro oxidativo de los lípidos poliinsaturados. La oxidación de los lípidos de la membrana expuestos a los radicales superóxidos, da como producto el malondialdehído (MDA), considerado un producto citotóxico y un indicador de la producción de radicales libres que conllevan al daño tisular (Shahnaz et al., 2011; Li et al., 2013).

#### **H.4. Rol de las PGPR en la tolerancia de las plantas a la salinidad**

Las PGPR mitigan el efecto adverso del estrés salino por medio de varios mecanismos. Entre los más estudiados podemos mencionar: 1) la reducción de los niveles de etileno por medio de la producción de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) o ACC desaminasa (descrita previamente); 2) disminuir los niveles de ERO por medio de la producción de enzimas antioxidantes como SOD, POX y CAT; 3) incrementando la producción de solutos compatibles como prolina, glutamato y trehalosa; 4) aumentando la producción de AIA y de otros reguladores del crecimiento como GAs y ABA; 4) activación de los mecanismos directos e indirectos asociados con la promoción del crecimiento (Arora et al., 2012).

La tolerancia a la salinidad mediada por PGPR es un proceso complejo e implica la modulación de la señalización de ABA, el cual está implicado en el alivio del estrés osmótico inducido por las sales, debido a que promueve el cierre de estomas para minimizar la pérdida de agua, además media la activación de genes que aumentan la tolerancia al estrés salino (Kang et al., 2014; Bharti et al., 2016). También incrementan el contenido de compuestos fenólicos, los cuales desempeñan un papel importante en la protección contra las ERO debido a su potente actividad antioxidante. El incremento en el contenido de compuestos



fenólicos está directamente relacionado con la intensidad del estrés salino, el tipo de sal aplicada y la cepa PGPR inoculada (Ayuso-Calles et al., 2020). También los glucósidos de quercetina juegan un rol importante en la eliminación de radicales hidroxilos formados en el citosol en plantas bajo salinidad (Ismail et al., 2015).

## II. HIPÓTESIS

Los antecedentes detallados anteriormente permiten plantear las siguientes hipótesis:

1. La inoculación con las PGPR acelera la germinación, el crecimiento, la acumulación de biomasa y modifica el perfil de compuestos fenólicos en plántulas de pimiento.
2. La inoculación con las PGPR incrementa el crecimiento y el desarrollo de los plantines de pimiento disminuyendo el uso de fertilizantes químicos.
3. La inoculación con PGPR incrementa el crecimiento y desarrollo de la planta de manera similar al efecto de los fertilizantes químicos.
4. Las PGPR promueven la tolerancia de plantas de pimiento sometidas a estrés salino por NaCl y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .
5. La inoculación con PGPR promueve el crecimiento, desarrollo y la producción de plantas de pimiento cultivadas a campo.

### III. OBJETIVOS

**A. OBJETIVO GENERAL:** Evaluar el efecto de las bacterias promotoras del crecimiento sobre plantines y la producción en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* cv. Calafyuco INTA) para industria en Mendoza.

#### **B. OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

1. Evaluar *in vitro* el efecto de la inoculación con PGPR en la germinación, promoción del crecimiento y perfil de compuestos fenólicos de plántulas de pimiento Calahorra (cv. Calafyuco INTA).

2. Evaluar durante el crecimiento de plantines de pimiento Calahorra (cv. Calafyuco INTA) los cambios en la morfología, el contenido de nitrógeno y los cambios en el perfil de compuestos fenólicos producidos por la inoculación de cuatro cepas PGPR nativas para seleccionar las cepas más efectivas comparadas con un fertilizante comercial.

3. Estudiar en plantas de pimiento Calahorra (cv. Calafyuco INTA) inoculadas con PGPR los cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos y compararlas con plantas fertilizadas y sin fertilizar.

4. Evaluar bajo condiciones de estrés salino el crecimiento, los cambios bioquímicos, fisiológicos y en el perfil de compuestos fenólicos de las plantas de

pimiento Calahorra (cv. Calafyuco INTA) inoculadas con las cepas de PGPR más promisorias.

**5.** Evaluar en plantas de pimiento Calahorra (cv. Calafyuco INTA) cultivadas en condiciones de campo los cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, del perfil de compuestos fenólicos y del componente rendimiento producidos por la inoculación con dos cepas PGPR nativas 42P4 y 60I1.

## **CAPITULO 2: Evaluación *in vitro* del efecto de las PGPR en la germinación, promoción del crecimiento y perfil de compuestos fenólicos de semillas de pimiento Calahorra (cv. Calafyuco INTA)**

### **I. Introducción**

Las semillas de la mayor parte de las plantas, una vez que alcanzan la madurez fisiológica, entran en un período de latencia que provoca un retraso de la germinación, que puede durar desde unos meses hasta varios años. La germinación sólo ocurre cuando las condiciones ambientales favorables facilitan la reactivación del metabolismo celular (Graeber et al., 2012). En la producción agrícola, la transición de la latencia a la germinación de la semilla es un paso esencial, dado que una buena germinación de la semilla determina las condiciones para el posterior establecimiento de las plantas en campo, lo que garantiza un óptimo desarrollo del cultivo (Shu et al., 2016).

La germinación y emergencia de las semillas de pimiento es lenta y no uniforme (Samarah et al., 2016). En la germinación de la semilla después de la emergencia de la radícula, durante la fase de crecimiento, las plántulas pueden resultar dañadas por contaminación microbiana, estrés ambiental o falta de nutrientes. Esto hace necesario desarrollar un mecanismo de defensa a través de la síntesis de metabolitos secundarios, incluidos los compuestos fenólicos (Duenas et al., 2009; Lopez-Martinez et al., 2009).

Durante la germinación de las semillas, la síntesis de compuestos fenólicos puede ocurrir a través de las vías oxidativas de pentosa fosfato, glucolítica y shikimato, y el aminoácido aromático se puede convertir en ácido fenólico en el citosol (Sharma et al., 2016). Posteriormente, los ácidos fenólicos pueden ser convertidos en flavonoides, estilbenos y derivados cumarínicos. Los compuestos fenólicos se pueden unir con polisacáridos, proteínas y lípidos, después de eso, son

almacenados en la pared celular o en las vacuolas (Shahidi & Yeo, 2016). Estas macromoléculas son hidrolizadas por enzimas que liberan compuestos fenólicos de su forma ligada (Paucar-Menacho et al., 2017). Luego, los compuestos fenólicos se utilizan para eliminar los radicales libres o actúan como intermediarios de compuestos señales (Xu et al., 2019).

Las concentraciones de compuestos fenólicos son modificadas por el ambiente en el cual se produce la germinación y de acuerdo al genotipo de la semilla (Xu et al., 2019). Además, los compuestos fenólicos también son componentes importantes de la raíz de la planta, debido a que son exudados para regular el microbioma del suelo. Los exudados de las raíces cumplen un rol importante en la interacción que se presenta en la rizósfera, entre las raíces de las plantas y los microorganismos (Zhalnina et al., 2018).

Generalmente los compuestos fenólicos aumentan en condiciones de estrés promoviendo el sistema de defensa de la planta, estimulando la resistencia sistémica inducida (RSI), de igual forma, los compuestos fenólicos pueden repeler microorganismos patógenos debido a su acción como agentes protectores o inhibidores. Sin embargo, estos compuestos también se liberan por las raíces, donde actúan como metabolitos intermediarios o moléculas de señalización para atraer microorganismos benéficos.

En otras situaciones, la concentración de compuestos fenólicos se incrementa posteriormente a la inoculación con microorganismos benéficos, pero no como una señal de estrés, sino como una señal de aumento de resistencia y mejora del microbioma (Singh et al., 2014). El microbioma del suelo es un consorcio de distintos tipos de microorganismos, que incluyen a las PGPR. Estas son definidas generalmente como bacterias colonizadoras de la rizósfera que estimulan el crecimiento de las plantas y/o suprimen los patógenos del suelo (Kloepper et al., 1991; Bhat et al., 2020; Li et al., 2020).

Las semillas de pimiento tienen cantidades significativas de compuestos fenólicos unidos a diferentes tipos de azúcares (Ornelas-Paz et al., 2010). Existe escasa información sobre la señalización química que se produce durante la colonización

de las raíces de las plantas de pimiento por las PGPR. Específicamente, el efecto de las PGPR durante la germinación de semillas y su cambio en el perfil de compuestos fenólicos ha sido poco estudiado. Por lo tanto, comprender el papel de los compuestos fenólicos en la germinación de semillas de pimiento inoculadas con rizobacterias nos brindará información importante sobre la aplicación práctica de PGPR en la producción agrícola. Con este conocimiento se pueden desarrollar bioformulaciones basadas en compuestos fenólicos específicos que faciliten el éxito en el proceso de colonización de las raíces por las PGPR y la consecuente estimulación del desarrollo de las plantas.

En estudios previos se seleccionaron PGPR aisladas de la rizósfera y raíces de plantas de tomate de parcelas productivas situadas en la provincia de Mendoza, Argentina. Estas PGPR nativas se seleccionaron considerando su efectividad para fijar nitrógeno, solubilizar fosfato, producir sideróforos y ácido indol acético (Pérez-Rodríguez et al., 2020). La inoculación con PGPR nativas en zonas semiáridas, facilita la colonización exitosa de la raíz debido a que estos microorganismos se encuentran adaptados a las condiciones ambientales de la zona, así al momento de llegar al campo se optimiza la interacción planta-PGPR (Pérez-Rodríguez et al., 2020).

En esta tesis evaluamos el impacto de las cepas nativas *Enterobacter* 64S1, *Pseudomonas* 42P4, *Cellulosimicrobium* 60I1 y *Ochrobactrum* 53F en la germinación de semillas y el cambio en los perfiles de compuestos fenólicos en plántulas de pimiento. Nuestra hipótesis es que la inoculación con estas cepas producen cambios en el perfil de compuestos fenólicos relacionados con RSI y potencian el proceso de germinación.

## II. Objetivo específico

1. Evaluar *in vitro* el efecto de la inoculación con PGPR en la germinación, promoción del crecimiento y perfil de compuestos fenólicos de plántulas de pimiento Calahorra (cv. Calafyuco INTA).

## III. Hipótesis

1. La inoculación con PGPR acelera la germinación, el crecimiento, la acumulación de biomasa y modifica el perfil de compuestos fenólicos en plántulas de pimiento.

## IV. Materiales y métodos

**A. Material vegetal:** se emplearon semillas de *Capsicum annuum* cv. Calafyuco INTA gentilmente suministradas por el Dr. Claudio Galmarini (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA-La Consulta).

**B. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal:** las bacterias utilizadas son provenientes del cepario del Laboratorio de Microbiología y Fisiología Agrícola, Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM). Se utilizaron las cepas PGPR *Cellulosimicrobium* 60I1 (60I1), *Ochrobactrum* 53F (53F), *Enterobacter* 64S1 (64S1) y *Pseudomonas* 42P4 (42P4) aisladas de la rizósfera y raíces de plantas de tomate de parcelas productivas de Mendoza-Argentina (Pérez-Rodríguez et al., 2020). El preinóculo se preparó haciendo crecer las cepas 60I1, 53F, 64S1, 42P4 y *Azospirillum brasilense* Az39 (Az39, cepa de referencia utilizada como bioinoculante en Argentina), en medio rico LB (Luria Broth, Sigma Chem. Co.). Cada cultivo creció durante 24-48 h a 28°C hasta alcanzar una



DO<sub>540</sub>=1.2. Para preparar el inoculo se hicieron crecer 500 µL de preinóculo en 50 mL de LB durante 24 h a 28°C.

**C. Germinación de las semillas:** las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 20% por 1 min y posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de desinfectante. Las semillas se sembraron en cajas de Petri estériles que contenían una mezcla de agar-agua al 2%.

**D. Diseño experimental:** se estableció un diseño completamente aleatorizado de 6 tratamientos, con tres repeticiones de 10 semillas cada uno. Cada semilla se inoculó con 10 µL de la cepa correspondiente ( $1 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>). Los tratamientos fueron:

- T1.** Semillas inoculadas con 42P4.
- T2.** Semillas inoculadas con 60I1.
- T3.** Semillas inoculadas con 64S1.
- T4.** Semillas inoculadas con 53F.
- T5.** Semillas inoculadas con Az39.
- T6.** Semillas sin inocular (Control).

Las semillas germinaron en una cámara de crecimiento a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  en condiciones de oscuridad. En este experimento se siguieron los criterios de germinación y evaluación de semillas propuestos por la International Testing Association (ISTA, 2004).

Se registró el número de semillas germinadas diariamente. Cada 12 h se tomaron fotografías utilizando el software Micrometrics SE premium con una cámara digital (Nikon SMZ800) en la lupa. La longitud y el diámetro de la radícula se determinaron con el software Image Pro Plus. El índice de vigor se calculó multiplicando el porcentaje de germinación por la longitud de la plántula (Abdul & Anderson, 1973).

**E. Confrontación de bacterias *in-vitro*:** el ensayo consistió en enfrentar dos bacterias diferentes en una misma placa de medio LB para evaluar el posible

antagonismo entre las mismas. Se sembraron 5  $\mu\text{L}$  de cada bacteria (cultivo en fase exponencial) a 20 mm del extremo de la placa y a la misma distancia la otra cepa en dirección opuesta. Las placas se incubaron en estufa a 28°C y se registró el tamaño de la colonia a las 72 horas.

**F. Extracción de compuestos fenólicos libres y ligados:** los compuestos fenólicos se extrajeron de acuerdo con el procedimiento previamente reportado por Kim y colaboradores (Kim et al., 2018). El procedimiento se puede describir brevemente de la siguiente manera: para compuestos fenólicos libres, se pesó 1 g de semillas y plántulas previamente liofilizado. Posteriormente se mezcló en un tubo de centrifuga con 10 mL de etanol frío. Luego, el tubo se colocó en un baño ultrasónico con hielo durante 10 min y se centrifugó por 10 min (2500 g), el sobrenadante obtenido se evaporó en un rotavapor a 40°C. El residuo se redisolvió en 1 mL de solución acuosa al 0,1% (v/v) de ácido fórmico. Para extraer los compuestos fenólicos ligados se añadieron 2 mL de hidróxido de potasio 6 M al sedimento obtenido en la extracción de compuestos fenólicos libres y se colocó en un baño ultrasónico durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó por 10 min a 2500 g y al sobrenadante obtenido se lo evaporó en un rotavapor a 40°C, redisolviéndolo con 2 mL de acetato de etilo.

**G. Análisis de compuestos fenólicos:** los extractos obtenidos como se detalló en el punto F, libres y ligados, se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución con el sistema Dionex UltiMate 3000 (California, EEUU), equipado con un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Se utilizó una columna Kinetex C18 de fase reversa (3,0 x 100 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ ) Phenomenex (Torrance, CA, EEUU) a 35°C. Las fases móviles fueron agua ultrapura con ácido fórmico al 0,1% (v/v) (fase A) y acetonitrilo (fase B). La separación de analitos se realizó usando el siguiente gradiente: 0-1,7 min, 5% de B; 1,7-10 min, 30% de B; 10-13,5 min, 95% de B; 13,5-15 min, 95% de B; 15-16 min, 5% de B; 16-19, 5% B. El caudal se fijó constante en 0,8 mL  $\text{min}^{-1}$  durante todo el proceso, y el volumen de inyección fue de 5  $\mu\text{L}$ . La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos bajo estudio presentes en los extractos se basó en la comparación de los tiempos de retención

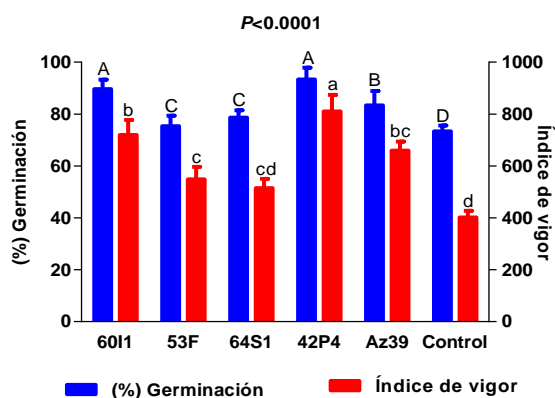
( $t_R$ ) y el valor máximo de absorbancia de los picos detectados en las muestras de interés con los obtenidos mediante la inyección de estándares puros. Las longitudes de onda de trabajo para las diferentes familias de analitos fueron 254 nm, 280 nm, 320 nm y 370 nm. Se utilizó el software Chromeleon 7.1 para controlar todos los parámetros de adquisición del sistema HPLC-DAD y también para procesar los datos obtenidos.

**H. Análisis estadístico:** los datos se procesaron mediante análisis de varianza seguido por un test de Duncan. Para las medidas repetidas en el tiempo se ajustó un modelo lineal mixto. El modelo incluyó efectos fijos de tratamiento, tiempo y sus interacciones. Como efecto aleatorio se incluyó la unidad experimental. El análisis de la varianza indicó diferencias significativas entre tratamientos e interacción tratamiento-tiempo  $P$ -value < 0,0001. Se utilizó el software estadístico InfoStat (InfoStat version 2018v. Grupo InfoStat, Argentina).

## V. Resultados y discusión

### A. Efecto de la inoculación sobre la germinación de las semillas

La inoculación mejoró significativamente la germinación y el vigor de las semillas de pimiento. Sin embargo, el incremento fue diferente con cada cepa bacteriana. Todas las rizobacterias aumentaron la germinación de las semillas hasta un 20% con respecto al Control (ver Figura 2.1). El mayor aumento del índice de vigor se observó con las cepas 42P4 y 60I1, que registraron un índice vigor de 810 y 719, respectivamente, mientras que en el Control, el índice de vigor fue de 400.



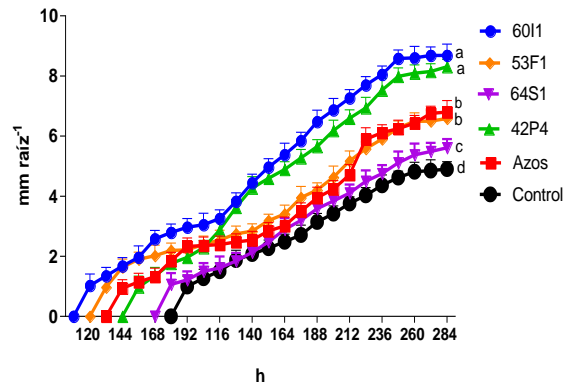
**Figura 2.1.** Efectos de las inoculaciones con rizobacterias sobre el porcentaje de germinación de semillas de pimiento y el índice de vigor a los 15 días posteriores a la germinación en condiciones *in vitro*. Las letras minúsculas corresponden al análisis estadístico del índice de vigor. Las letras mayúsculas corresponden al análisis estadístico del porcentaje de germinación (%). Letras diferentes indican diferencias significativas. Tratamientos: 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 53F: *Ochrobactrum* 53F; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; Az39: *Azospirillum brasilense* Az39 y Control (sin bacterias).

Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los informados por otros autores. Se han reportado mejoras similares en el índice de vigor y en la longitud de la radícula en semillas de maíz inoculadas con cepas de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. (Kifle & Laing, 2016); en espinaca y trigo donde la inoculación con PGPR aumentó la longitud de las plántulas y de las raíces junto

con el índice de vigor durante el periodo de germinación (Chowdhury & Sengpta, 2016; Prasad et al., 2017). Este efecto positivo de las PGPR en la germinación de semillas, en parte podría estar vinculado con la capacidad bacteriana de producir o modificar las hormonas vegetales, incluidas las GAs, que desempeñan un papel clave en la germinación (Amogou et al., 2018).

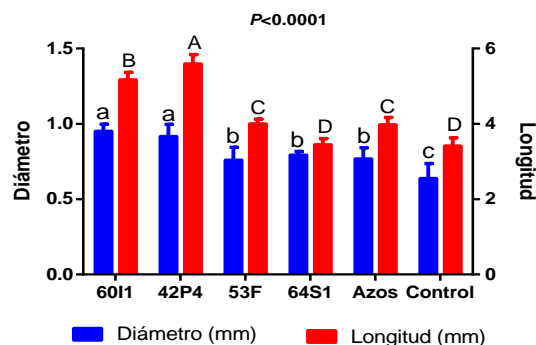
## **B. Efecto de la inoculación con PGPR sobre el crecimiento de plántulas de pimiento**

El efecto de la inoculación sobre el crecimiento de las plántulas se estudió en cajas de Petri estériles. La inoculación de las semillas de pimiento con las diferentes cepas bacterianas en estudio incrementó la longitud de las plántulas. Además, la cinética de crecimiento de las plántulas fue diferente para los distintos tratamientos. A los 12 días después de la germinación la cepa 42P4, 60I1, 53F, Az39 y 64S1 se diferenciaron del Control. Los mayores incrementos los presentaron las cepas 42P4 y 60I1 a las 248 horas después de la inoculación, como puede observarse en la Figura 2.2. Además, la cepa 60I1 aceleró 72 h el inicio de la germinación, mientras que la cepa 42P4 36 h. El efecto benéfico de las PGPR sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas ha sido demostrado en numerosas ocasiones en condiciones de crecimiento controladas en una amplia gama de especies de hortalizas como tomate, cebolla, lechuga y zanahoria (Moustaine et al., 2017; Türk et al., 2017; Stamenov et al., 2018).

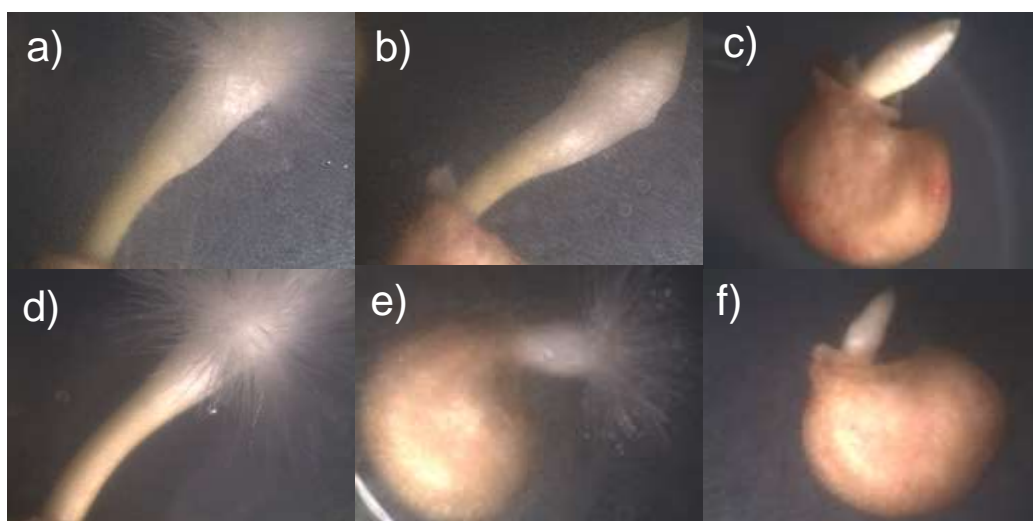


**Figura 2.2.** Tasa de crecimiento de las plántulas de pimienta (longitud). Tratamientos 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 53F: *Ochrobactrum* 53F; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; Az39: *Azospirillum brasilense* Az39 y control (sin bacterias). Para el análisis se utilizó un modelo lineal mixto. El modelo incluyó efectos fijos de tratamiento, tiempo y sus interacciones. La unidad experimental se incluyó como efecto aleatorio. Letras diferentes indican diferencias significativas

En el estudio de inoculación de las semillas de pimienta con cepas bacterianas se observó un aumento en la longitud y diámetro de la radícula. Como puede verse en las Figuras 2.3 y 2.4 los mayores incrementos se observaron en los tratamientos con 42P4, 60I1, 53F y Az39. Las cepas 60I1 y 42P4 fueron las más efectivas para aumentar la longitud de la radícula (152% y 164%, respectivamente) y el diámetro (150% y 144%, respectivamente). La cepa 64S1 mostró un comportamiento similar al Control. Varios estudios han observado que la influencia de las PGPR en ocasiones es específica de un cultivo o nicho, o sus beneficios son limitados debido a la variabilidad climática (Rana et al., 2011). En esta investigación nuestro objetivo se centró en seleccionar *in vitro* las cepas con mayor capacidad de promover la germinación y el crecimiento de semillas de pimienta. Es posible que la cepa 64S1 muestre un mayor potencial como PGPR en otra especie vegetal (como en tomate) bajo otras condiciones de cultivo (Pérez-Rodríguez et al., 2020).



**Figura 2.3:** Diámetro longitud de la radícula de plántulas de pimienta 284 h después de la inoculación. Las letras minúsculas corresponden al análisis estadístico del diámetro. Las letras mayúsculas corresponden al análisis estadístico de la longitud. Letras diferentes indican diferencias significativas. Tratamientos: 6011: *Celulosimicrobium* 6011; 53F: *Ochrobactrum* 53F; Az39: *Azospirillum brasilense* Az39; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 64S1: *Enterobacter* 64S1 y Control (sin bacteria).

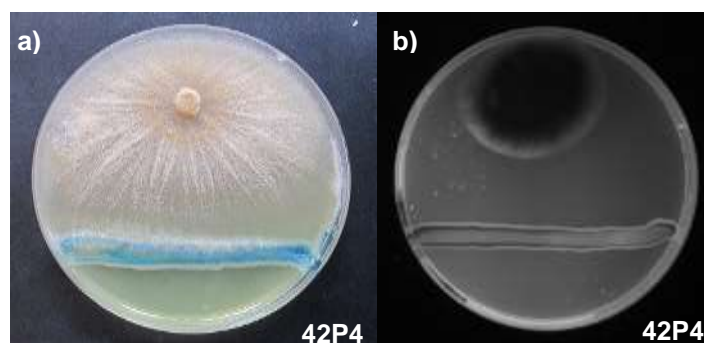


**Figura 2.4:** Radícula de las semillas de pimienta 284 h después de la inoculación con a) 6011: *Celulosimicrobium* 6011; b) 53F: *Ochrobactrum* 53F; c) Az39: *Azospirillum brasilense* Az39; d) 42P4: *Pseudomonas* 42P4; e) 64S1: *Enterobacter* 64S1 y f) Control (sin bacterias). Nivel de aumento 40X.

La efectividad de las cepas 42P4, 6011, 53F y Az39 en nuestro estudio puede atribuirse a la capacidad de las PGPR para producir el AIA. La producción bacteriana de fitohormonas modifica la arquitectura de la raíz, aumentando el

número de raíces laterales y pelos absorbentes, incrementando la superficie total de la raíz, lo que conlleva a una mayor absorción de minerales (Spaepen & Vanderleyden, 2011) y de nutrientes (Khalid et al., 2004; Amogou et al., 2018). En trabajos previos se ha reportado la producción de AIA en cepas de *Cellulosimicrobium* sp., lo cual estimuló significativamente la germinación y alargamiento de plántulas de cebada hasta un 185% (Nabti et al., 2014). Las cepas empleadas en el presente trabajo, (60I1, 53F, 42P4 y 64S1) producen AIA en condiciones *in vitro*, e incrementan el peso seco del sistema radical en plantines de tomate (Pérez Rodríguez et al., 2020).

La cepa de 42P4 fue la más efectiva promoviendo el desarrollo de la raíz. Además, esta cepa produce un pigmento que podría ser pioverdina en medio agar papa glucosado deficiente de hierro e inhibe el crecimiento de *Fusarium oxisporum* (Figura 2.5, resultado propio no incluido en la tesis). La pioverdina es un tipo de sideróforo producido por algunas cepas de *Pseudomonas* sp. (Hazotte et al., 2018). Este pigmento ha demostrado promover el alargamiento de las raíces laterales en pepinos cultivados en condiciones de esterilidad (De Bellis & Ercolani, 2001), la longitud de la radícula en semillas de maíz inoculadas con *Pseudomonas cichorii* y *P. putida* (Amogou et al., 2018) y de incrementar el crecimiento de las plantas de trigo inoculadas con la cepa *Providencia* sp (Rana et al., 2011).



**Figura 2.5:** La cepa 42P4 produciendo un pigmento del tipo pioverdina en medio agar papa glucosado (APG). a) La cepa 42P4 inhibiendo el crecimiento del fitopatógeno *Fusarium oxisporum*, b) Fotografía de la cepa 42P4 en medio APG bajo luz UV (Tomado de Lobato et al., 2019).



### C. Prueba de compatibilidad entre las bacterias

La prueba de compatibilidad bacteriana entre las 5 PGPR se evaluó para desarrollar mezclas microbianas para la coinoculación debido a que los consorcios suelen funcionar igual o mejores que las cepas individualmente. Para confirmar si la presencia de una bacteria modifica el crecimiento de otra rizobacteria, evaluamos el crecimiento de las colonias en condiciones *in vitro*. Los resultados mostraron que la cepa 53F no modificó su crecimiento en presencia de otras cepas. Mientras que 60I1 y 42P4 disminuyeron el tamaño de la colonia frente a 64S1 y a Az39. La cepa 64S1 disminuyó su crecimiento en presencia de 60I1 y 42P4. El tamaño de la colonia de Az39 se vio afectado por todas las cepas con excepción de 64S1 como se muestra en la Tabla 2.1.

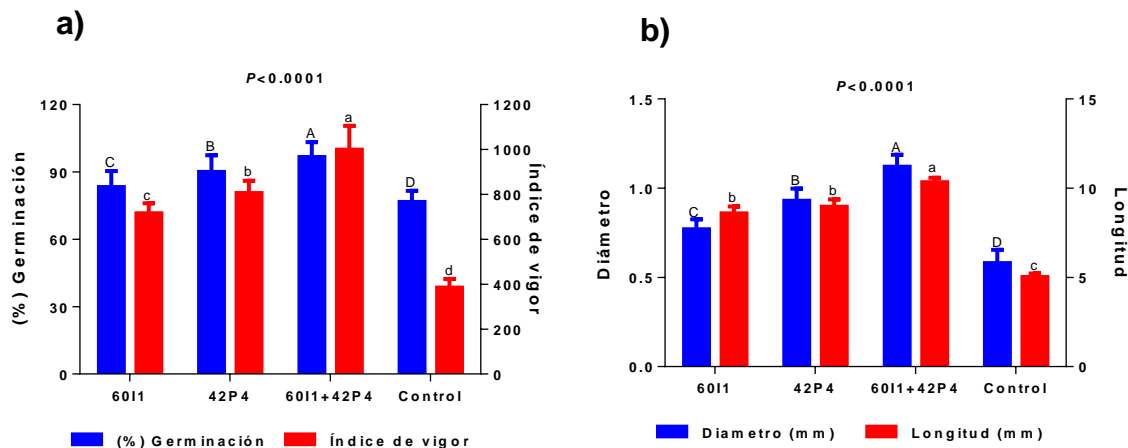
**Tabla 2.1.** Diámetro de la colonia (mm) del ensayo *in vitro* en placas de Petri, de las cepas: 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 53F: *Ochrobactrum* 53F; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; Az39: *Azospirillum brasilense* Az39

	<b>60I1</b>	<b>53F</b>	<b>64S1</b>	<b>42P4</b>	<b>Az39</b>
<b>60I1</b>	8,41a	8,07a	5,39c	8,23a	6,99b
<b>53F</b>	7,02a	7,11a	6,68a	6,88a	6,87a
<b>64S1</b>	8,62b	9,10a	9,30a	8,37b	9,20a
<b>42P4</b>	7,36a	7,02ab	6,75bc	7,42a	6,52c
<b>Az39</b>	5,69c	6,13bc	6,58ab	5,97bc	6,92a

Letras diferentes indican diferencias significativas.

### D. Efectos del consorcio sobre la germinación y el vigor de las semillas

Teniendo en cuenta que las cepas más prominentes fueron 42P4 y 60I1 en el ensayo de germinación y conociendo que pueden crecer juntas sin modificar su crecimiento, verificamos el efecto de la combinación (42P4 + 60I1) sobre la germinación de semillas. El consorcio mejoró significativamente el porcentaje de germinación de las semillas y el índice de vigor, así como también la longitud y el diámetro de la radícula con respecto a la inoculación individual (42P4 o 60I1) y sobre el Control no tratado como puede observarse en la Figura 2.6.



**Figura 2.6:** Efecto de las inoculaciones con las cepas 60I1 y 42P4 solas y combinadas (60I1+42P4) en: (a) porcentaje de germinación de semillas de pimiento e índice de vigor a los 15 días después de la germinación bajo condiciones *in vitro*; y, (b) diámetro y longitud de la radícula de pimiento 284 h después de la inoculación. Tratamientos: 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 60I1 + 42P4 (consorcio) y Control (sin bacterias). Diferentes letras indican diferencias significativas. Las letras minúsculas corresponden al análisis estadístico del índice de vigor y longitud. Las letras mayúsculas corresponden al porcentaje de germinación y el diámetro.

Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por otros autores, quienes encontraron que la coinoculación de *P. putida* en consorcio con otras PGPR incrementó la biomasa, el rendimiento y el contenido de macronutrientes y micronutrientes en plantas de tomate (He et al., 2019). Se ha demostrado que la coinoculación de diferentes PGPR tiene un efecto aditivo promotor del crecimiento en las plantas, de esta manera, la coinoculación de PGPR con diferentes funciones biológicas se considera una estrategia económicamente viable y ambientalmente sostenible para mejorar el rendimiento de los cultivos (Muthukumar & Udaiyan, 2018; Zeffa et al., 2020).

Las pruebas de compatibilidad con nuestras cepas mostraron que pueden crecer juntas; por lo que fue factible implementar el consorcio de cepas 60I1 + 42P4 para inocularlas juntas y posteriormente estudiar el efecto de la coinoculación sobre los compuestos fenólicos.

## **E. Perfil de compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos libres y ligados de semillas no germinadas, plántulas no inoculadas (Control) e inoculadas con diferentes PGPR se muestran en la Tabla 2.2. Se cuantificaron 25 compuestos que se agrupan en cuatro familias según su estructura química (alcoholes fenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenoides). Los resultados de este estudio mostraron una mayor concentración de compuestos fenólicos libres respecto a los compuestos fenólicos ligados en todos los tratamientos. En las semillas no germinadas, los niveles de compuestos fenólicos fueron menores que en las plántulas no inoculadas, excepto para los ácidos fenólicos totales y los estilbenoides ligados donde los niveles fueron mayores que en el tratamiento Control.

Los perfiles de compuestos fenólicos de semillas y plántulas germinadas fueron diferentes, como se ha reportado en otras especies (Kim et al., 2018). Las concentraciones de compuestos fenólicos ligados son inferiores a las de compuestos fenólicos libres en todos los tratamientos, debido a que en el proceso de germinación aumenta la actividad metabólica. La suma de compuestos fenólicos libres fue mayor en las plántulas inoculadas con 60I1, 42P4 y en el consorcio con respecto al Control. Sin embargo, las semillas no germinadas y las plántulas que germinaron sin bacterias tenían contenidos similares de compuestos fenólicos ligados.

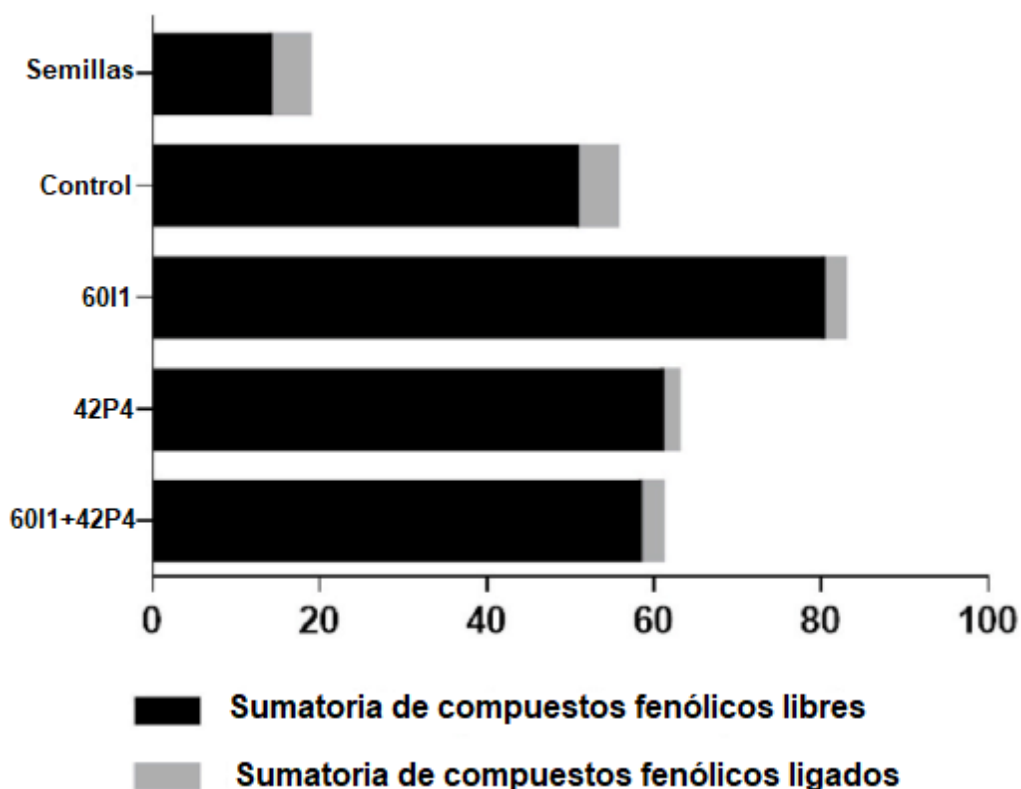


Figura 2.7. Sumatoria de compuestos fenólicos libres y ligados en cada tratamiento. Tratamientos: semilla (semilla sin germinar); control (plántula sin bacterias); plántulas inoculadas con 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 60I1+42P4 (consorcio).

Asimismo, las plántulas inoculadas con PGPR tuvieron menores concentraciones de compuestos fenólicos ligados que las plántulas germinadas sin bacterias y todos los tratamientos con PGPR mostraron el mismo comportamiento. Por consiguiente, es posible que las plántulas inoculadas podrían metabolizar los compuestos fenólicos ligados disminuyendo los niveles a la mitad o menos. Durante el proceso de germinación, se produce la síntesis de enzimas y la modificación de las semillas, que ocurren por la transformación enzimática de los compuestos fenólicos ligados aumentando los compuestos fenólicos libres, lo que explica los resultados encontrados con la inoculación. Un comportamiento similar fue reportado en soja donde el contenido de compuestos fenólicos libres aumentó después de seis días de germinación (Guzmán-Ortiz et al., 2017). Se encontraron

importantes diferencias entre los perfiles de compuestos fenólicos en tratamientos inoculados y sin inocular.

**Tabla 2.2.** Perfil de compuestos fenólicos libres y ligados observados en semillas y plántulas de pimiento inoculadas con las PGPR en estudio. Los resultados cuantitativos están expresados en mg g<sup>-1</sup> de materia seca.

Compuesto	Semillas	Control	60I1	42P4	60I1+42P4
<b>Compuestos fenólicos libres</b>					
<b>Alcoholes fenólicos simples</b>					
OH-Tirosol	0,11±0,05c	1,29±0,23ab	1,74±0,96a	0,64±0,05bc	0,49±0,08 bc
Tirosol	n.d.*	n.d.*	17,94±2,72a	n.d.*	10,07±0,27b
<b>∑Alcoholes fenólicos simples</b>	<b>0,11±0,05d</b>	<b>1,29±0,23c</b>	<b>19,68±2,88a</b>	<b>0,64±0,05c</b>	<b>10,56±0,28b</b>
<b>Flavonoides</b>					
(-)-Galocatequina	0,01±0,01c	10,72±0,83b	10,36±0,88b	14,09±1,10a	11,05±2,26b
(-)-Galato de galocatequina	0,93±0,10b	1,35±0,11a	0,68±0,14c	n.d.*	n.d.*
(-)-Galato de epigalocatequina	n.d.*	n.d.*	0,48±0,10	n.d.*	n.d.*
Kaempferol	1,00±0,07a	n.d.*	0,41±0,00b	n.d.*	n.d.*
Kaempferol-3-glucósido	n.d.*	n.d.*	3,91±0,81a	4,18±0,63a	4,00±0,74a
Quercetina	n.d.*	n.d.*	0,57±0,02a	0,57±0,01a	0,56±0,01b
Quercetina-3-galactósido	0,56±0,07ab	0,19±0,02c	0,80±0,35a	n.d.*	0,37±0,01bc
Quercetina-3-glucósido	4,87±0,34b	9,70±0,21a	3,60±0,89b	4,80±0,44b	2,60±0,49b
Astilbina	n.d.*	0,62±0,00a	0,06±0,02b	0,08±0,02b	0,08±0,03b
Rutina	0,23±0,06a	0,02±0,01b	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Miricetina	n.d.*	n.d.*	n.d.*	0,44±0,01	n.d.*
Naringina	n.d.*	0,14±0,02	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Naringenina	n.d.*	0,29±0,02a	0,13±0,01b	n.d.*	n.d.*
(+)-Catequina	n.d.*	0,18±0,01c	0,25±0,02c	0,35±0,01a	0,28±0,03b
Floridzina	5,38±1,06a	0,20±0,00b	0,78±0,45b	0,15±0,03b	0,17±0,03b

<b>∑Flavonoides</b>	<b>12,98±1,12c</b>	<b>23,41±0,86a</b>	<b>22,03±1,60ab</b>	<b>24,66±1,34a</b>	<b>19,11±2,42b</b>
<b>Ácidos fenólicos</b>					
Ácido cinámico	0,18±0,02a	0,07±0,06b	0,09± 0,01b	0,08±0,00b	n.d.
Clorogénico + Ácidos cafeicos	0,30±0,05d	5,80±2,72c	16,25±0,13a	11,76±3,92b	6,05±1,34c
Ácido gálico	n.d.	3,37±0,12b	5,59±1,60a	3,05±0,63b	2,08±0,14c
Ácido ferúlico	n.d.	0,44±0,01a	0,12±0,00b	n.d.	n,d.
Ácido siríngico	0,16±0,01a	0,09±0,00b	n.d.	n.d.	n.d.
Ácido p-cumárico	0,13±0,01b	n.d.	0,26±0,11a	0,25±0,07ab	0,18±0,02ab
<b>∑Ácidos fenólicos</b>	<b>0,77±0,05d</b>	<b>9,77±2,72c</b>	<b>22,31±1,60a</b>	<b>15,14±3,97b</b>	<b>8,31±1,34c</b>
<b>Estilbenoides</b>					
Piceatanol	n.d.	0,35±0,03c	0,49±0,07b	0,54±0,07ab	0,64±0,03a
trans-resveratrol	n.d.	n.d.	n.d.	0,06±0,01	n.d.
Polidatina	n.d.	15,79±0,31b	16,08±2,5b	20,30±0,28a	19,50±0,55a
<b>∑Estilbenoides</b>	<b>n.d.</b>	<b>16,14±0,311b</b>	<b>16,57±2,50b</b>	<b>20,90±0,28a</b>	<b>20,14±0,55a</b>
<b>∑Compuestos fenólicos libres</b>	<b>13,86±1,58d</b>	<b>50,61±3,08c</b>	<b>80,01±3,66a</b>	<b>60,74±4,19b</b>	<b>58,12±3,10b</b>
<b>Compuestos fenólicos ligados</b>					
<b>Alcoholes fenólicos simples</b>					
Tirosol	n.d.	n.d.	<b>0.66±0.34 a</b>	n.d.	<b>0.45±0.12a</b>
<b>Flavonoides</b>					
(-)-Gallocatequina	0,26±0,13c	3,77±0,28a	0,76±0,08bc	0,92±0,45b	0,63±0,37bc
(-)-Galato de gallocatequina	0,45±0,05a	n.d.	n.d.	0,41±0,03ab	0,38±0,03b
(-)-Epigallocatequina	n.d.	n.d.	0,47±0,00ab	0,30±0,03b	0,67±0,24a
(-)-Galato de epigallocatequina	0,66±0,15a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kaempferol-3-glucósido	0,41±0,18a	0,10±0,01b	n.d.	n.d.	n.d.

Quercetina-3-galactósido	0,13±0,06a	0,14±0,01a	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Quercetina-3-glucósido	0,91±0,26a	0,33±0,07b	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Astilbina	n.d.*	n.d.*	0.01	n.d.*	n.d.*
Rutina	0,13±0,01a	0,14±0,01a	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Miricetina	n.d.*	n.d.*	0.37	n.d.*	n.d.*
Naringina	0,10±0,01a	n.d.*	0,11±0,02a	n.d.*	n.d.*
<b>∑Flavonoides</b>	<b>3,16±0,38b</b>	<b>4,38±0,28a</b>	<b>1,72±0,08c</b>	<b>1,63±0,45c</b>	<b>1,68±0,44c</b>
<b>Ácidos fenólicos</b>					
Ácido cinámico	0,13±0,03a	0,11±0,01a	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Ácido clorogénico + Ácido cafeico	n.d.*	0,18±0,02b	0,02±0,01c	n.d.*	0,23±0,04a
Ácido gálico	0,76±0,63a	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Ácido ferúlico	0,13±0,03a	0,13±0,02a	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Ácido siríngico	n.d.*	n.d.*	n.d.*	0,11±0,01a	0,10±0,01a
<b>∑Ácidos fenólicos</b>	<b>1,02±0,63a</b>	<b>0,42±0,03b</b>	<b>0,02±0,01c</b>	<b>0,11±0,01c</b>	<b>0,33±0,04b</b>
<b>Estilbenoides</b>					
Piceatanol	0,38±0,12a	n.d.*	0,21±0,01b	0,21±0,01b	0,20±0,01b
trans-resveratrol	0,11±0,05a	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*
<b>∑Estilbenoides</b>	<b>0,49±0,13a</b>	<b>n.d.*</b>	<b>0,21±0,01b</b>	<b>0,21±0,01b</b>	<b>0,20±0,01b</b>
<b>∑Compuestos fenólicos ligados</b>	<b>4,67±0,74a</b>	<b>4,80±0,28a</b>	<b>2,61±0,081b</b>	<b>1,95±1,63c</b>	<b>2,66±0,44b</b>

Letras diferentes indican diferencias significativas (por fila). Los resultados vienen dados por el valor medio (n = 3; tres determinaciones independientes, incluida la extracción y la posterior inyección) ± desviación estándar. \*: no detectable.



Como alcoholes fenólicos identificamos hidroxitirosol y tirosol. El hidroxitirosol solo se encontró en forma libre y las concentraciones en plántulas no inoculadas y plántulas inoculadas con 60I1 fueron similares (1,29 y 1,74 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente) mientras que en plántulas inoculadas con 42P4 o 60I1 + 42P4 los niveles fueron la mitad o menos (0,64 y 0,49 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente). El tirosol libre y ligado solo se detectó en plántulas inoculadas con 60I1 (17,94 y 0,66 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente) o 60I1 + 42P4 (10,07 y 0,45 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente).

Como alcoholes fenólicos simples libres, el tirosol fue el más abundante y estuvo presente en 60I1 y en menor concentración en el tratamiento 60I1 + 42P4. Como mencionamos previamente, el tirosol ligado se determinó solo en estos dos tratamientos. Macedo et al., (2018) reportaron que la aplicación de tirosol sobre la germinación de semillas de trigo permite un mayor ablandamiento de las membranas celulares, lo que facilita la entrada de agua y solutos al interior de la célula, y consecuentemente el aumento del crecimiento de las plántulas. Además, el tirosol presenta actividad antifúngica y es un poderoso antioxidante (Slininger et al., 2004; Liebgott et al., 2009).

En nuestro estudio, el mayor incremento en el crecimiento de las plántulas se observó en el tratamiento con mayor nivel de tirosol. Esto podría estar mostrando que el tirosol es un metabolito producido por la 60I1, este comportamiento ya se ha informado para otras familias de bacterias, incluidas las promotoras del crecimiento (Slininger et al., 2004). Por lo tanto, los tratamientos con esta bacteria han mostrado una mejora en la tasa de germinación y el índice de vigor.

En la familia de los flavonoides, se identificaron y cuantificaron los siguientes compuestos: galocatequina, galato de galocatequina, galato de epigallocatequina, kaempferol, kaempferol-3-glucósido, quercetina, quercetina-3-galactósido, quercetina-3-glucósido, astilbina, rutina, miricetina, naringina, naringenina y catequina. Los niveles más altos en esta familia correspondieron a galocatequina libre y ligada seguida de quercetina-3-glucósido. Sin embargo, los perfiles de flavonoides fueron diferentes en plántulas inoculadas y sin inocular.

Aunque los flavonoides libres totales fueron similares en las plántulas inoculadas y sin inocular, los flavonoides ligados totales difirieron significativamente. La 42P4 mostró la mayor concentración de flavonoides libres totales ( $24,66 \text{ mg g}^{-1}$ ) seguido del Control ( $23,41 \text{ mg g}^{-1}$ ), 60I1 ( $22,03 \text{ mg g}^{-1}$ ), 60I1 + 42P4 ( $19,11 \text{ mg g}^{-1}$ ) y semillas ( $12,98 \text{ mg g}^{-1}$ ). El Control mostró el mayor contenido de flavonoides totales ( $4,38 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que el contenido de flavonoides totales se distribuyó uniformemente en los tratamientos inoculados 60I1 ( $1,72 \text{ mg g}^{-1}$ ), 42P4 ( $1,63 \text{ mg g}^{-1}$ ) y 60I1 + 42P4 ( $1,68 \text{ mg g}^{-1}$ ). En todos los tratamientos se encontraron galocatequina libre y ligada, así como quercetina-3-glucósido libre. El resto de los compuestos se identificaron solo en algunos tratamientos (rutina y naringina en el Control, kaempferol y galato de epigallocatequina en 60I1 o miricetina en 42P4).

La galocatequina fue el flavonoidemás abundante tanto en su forma libre como ligado; sin embargo, la galocatequina libre aumentó con el tratamiento con 42P4, mientras que la galocatequina ligada en el Control fue de 4 a 5 veces mayor que en las plántulas inoculadas. Por consiguiente, es posible que en los tratamientos inoculados, los flavonoides ligados fueron metabolizados por las bacterias.

En el tratamiento Control también los niveles de quercetina-3-glucósido libre fueron similares a los niveles de galocatequina libre, pero en las plántulas inoculadas se mostraron niveles menores que controlan y aumentan los derivados de kaempferol (kaempferol-3-glucósido) y quercetina (quercetina-3-galactósido) mostrando que los tratamientos inoculados inducen algunas enzimas en el metabolismo de los flavonoles. Estos compuestos que se encuentran en plantas inoculadas tienen actividad microbiana anti-patógena que podría proteger a la planta del estrés biótico (Martin-Rivilla et al. 2020).

Además, la naringina libre, la naringenina y la rutina están presentes en el Control, mientras que no son detectables en los tratamientos inoculados, excepto la naringenina libre y ligada, que se detectó en baja concentración en el tratamiento 60I1. La naringenina es un precursor flavonoide de los compuestos mencionados anteriormente. De esta manera, la naringenina podría ser utilizada como fuente de carbono por las PGPR durante la germinación pero de manera diferente según el

tratamiento con 6011 o 42P4. Se han reportado resultados similares en maní donde los flavonoides naringina y rutina disminuyeron 7,5% y 75,8% respectivamente en plantas inoculadas (Cesari et al., 2019).

Por otro lado, Jain & Gupta, (2003) informaron que la adición de naringenina 100  $\mu$ M al medio de crecimiento de las plantas aumentó el porcentaje de raíces laterales colonizadas por PGPR en plantas de arroz. En *Arabidopsis thaliana*, las plantas tratadas con naringenina mejoran la colonización de PGPR en las raíces. La naringenina es un sustrato importante para la biosíntesis de flavonoides y se usa muy temprano en diferentes vías biosintéticas de las plantas (O'Callaghan et al., 2001). Incluso, en condiciones de estrés hídrico, las plantas de maní modifican el patrón de moléculas exudadas por las raíces, aumentando los niveles de naringenina, ácido oleico, ácido cítrico y láctico. Estos exudados promueven la movilidad bacteriana, la quimiotaxis y la unión de las PGPR a las raíces del maní (Cesari et al., 2019).

Los resultados presentados en este estudio refuerzan la hipótesis de que los flavonoides como la naringenina juegan un papel importante en la quimiotaxis que media la colonización de las raíces de pimiento por PGPR. Además, los compuestos ligados (rutina, quercetina-3-galactósido, quercetina-3-glucósido y kaempferol-3-glucósido) no se detectaron en plántulas inoculadas. Estos resultados confirman que nuestras cepas utilizan estos compuestos como fuente de carbono principalmente. Pillai & Swarup, (2002) y Chaparro et al., (2013) informaron resultados similares con *P. putida* que cataboliza los flavonoides como quercetina para su uso como fuente nutricional. Además, otros estudios han demostrado que las raíces de las plantas secretan flavonoides que actúan como señales en las rizobacterias y tienen influencia en el éxito de la interacción planta-PGPR, mejorando la colonización de las raíces y regulando la expresión de propiedades beneficiosas para la planta (Droge et al., 2013). La rutina y el kaempferol-3-glucósido se encuentran entre los primeros compuestos liberados por las raíces para mediar la interacción con microorganismos en la rizósfera (Badri & Vivanco, 2009).

Como ácidos fenólicos, se cuantificaron ácido cinámico, ácido clorogénico + ácido cafeico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido siríngico y ácido p-cumárico. El tratamiento 60I1 mostró altas concentraciones de ácidos fenólicos libres totales  $22,31 \text{ mg g}^{-1}$ . Entre los ácidos fenólicos libres cuantificados, el ácido gálico fue el más abundante en el 60I1 ( $5,59 \text{ mg g}^{-1}$ ) y en plántulas del Control ( $3,37 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que en plántulas con 60I1 o con 42P4 la mayor concentración se encontró para la suma de los ácidos clorogénico + cafeico ( $16,25$  y  $11,76 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente). El ácido cinámico fue el menos abundante en todos los tratamientos.

Se cuantificó el grupo estilbenoide, que consiste en polidatina, piceatanol y trans-resveratrol. En las semillas no se detectó ninguno de los tres compuestos, mientras que la polidatina y el piceatanol se distribuyeron uniformemente en los otros tratamientos. El compuesto más abundante fue la polidatina, pero solo se detectó en forma libre y su concentración fue mayor en plántula con 42P4 o 60I1 + 42P4.

Los resultados obtenidos luego de la inoculación *in vitro* de las semillas de pimiento con las cepas PGPR demuestran un incremento significativo en el porcentaje de germinación, índice de vigor, longitud y diámetro de la radícula. Las cepas 42P4 y 60I1 modifican el perfil de los compuestos fenólicos libres y ligados, proporcionando información valiosa para dilucidar el rol que desempeñan los alcoholes fenólicos simples, flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenoides en la interacción plántula-PGPR. No obstante, es necesario estudiar el efecto de la inoculación en condiciones *in vivo*, por lo cual se propone abordar en el siguiente capítulo el efecto de la inoculación con las PGPR sobre plantines de pimiento, en bandejas alveoladas simulando las condiciones de producción de plantines de los viveros comerciales.

## **CAPITULO 3: Evaluación del efecto de la inoculación de plantines de pimiento cultivar Calafyuco INTA con PGPR nativas**

### **I. Introducción**

La producción de plantines de hortalizas en bandejas alveoladas es un requerimiento en la agricultura moderna, debido a que permite la obtención de plantines a gran escala en superficies más pequeñas. Además, esa producción puede realizarse cerca de los grandes epicentros hortícolas, favoreciendo la disposición de cultivos en una época más temprana. De esta forma, se mejora la planificación de las siembras, disminuyendo las cuantiosas pérdidas por patógenos del suelo y ganando tiempo, por llevar al campo plantas con estructuras preformadas. Lo expuesto se traduce en una producción más rentable (Bharathi et al., 2014; Behera et al., 2019; Desai et al., 2020).

La producción industrial de plantines de pimiento constituye un factor clave para suplir la alta demanda de los horticultores de la región de Cuyo. La obtención de plantines es una etapa importante para el establecimiento de una buena plantación, dado que un plantín de buena calidad garantiza el éxito del cultivo, asegurando el debido desarrollo de las plantas y un óptimo rendimiento en la etapa productiva.

La industria señala que un plantín de calidad debe ser vigoroso, estar libre de plagas y con un buen desarrollo radical. La morfología radical es uno de los parámetros más importantes para obtener plantines de calidad, por lo general el horticultor espera un plantín con un buen desarrollo de raíces, debido a que esto determina la supervivencia al momento del trasplante. El mayor volumen del sistema radical confiere a los plantines, una mayor capacidad de absorción de nutrientes, un mejor anclaje al momento del trasplante y un aumento de la

capacidad exploratoria de la raíz (Ghanem et al., 2011; Qiang-Sheng et al., 2011; Parađiković et al., 2019).

Producir plantines de calidad no es una tarea fácil, debido a que se requiere ajustar diversos factores que influyen directamente en el crecimiento y desarrollo del plantín. La calidad del sustrato es el factor más importante, debido a que este constituye el medio de crecimiento y desarrollo, asegurando su anclaje y soporte radical, garantizando el suministro de agua, nutrientes y oxígeno (Zhang et al., 2012; Becherescu et al., 2016).

Los productores hortícolas de la Región de Cuyo utilizan comúnmente turba y perlita como sustrato inerte para la elaboración de los plantines de pimiento. La baja disponibilidad de nutrientes en estos sustratos hace indispensable la aplicación exógena de fertilizantes minerales. Sumado a lo anterior es importante señalar que el sistema radical de estos plantines carece de relación con los microorganismos nativos del suelo, privando al plantín de las interacciones complejas que tienen lugar en la rizósfera, en la cual las raíces secretan al medio exudados ricos en compuestos orgánicos y los microorganismos benéficos del suelo estimulan el desarrollo del sistema radical (Parmar & Dufresne, 2011; Bakker et al., 2013; Prashar et al., 2014).

Las bacterias son los microorganismos más abundantes del suelo, por lo cual es de suma importancia identificar, caracterizar y biofertilizar los plantines con aquellas bacterias que estimulan el desarrollo del sistema radical (Hermans et al., 2017; Delgado-Baquerizo et al., 2018). Dentro del grupo de las bacterias benéficas se destacan las PGPR (como se mencionó anteriormente), las cuales son parte de la población de microorganismos residentes en las raíces de las plantas como epífitas o endofíticas (Singh et al., 2018). Estos microorganismos también pueden actuar por competencia, ocupando sitios y haciéndolos inaccesibles para los patógenos (Jeyanthi & Kanimozhi, 2018).

Las PGPR pueden ser utilizadas para el tratamiento de los plantines incorporándolas al sustrato de plantación, los beneficios de la inoculación se pueden observar por medio de un aumento de la materia seca, reducción del

tiempo de aclimatación y mayor sobrevivencia de los plantines en el campo (Jha & Saraf, 2015; Grobelak et al., 2015). De igual forma, los inoculantes microbianos son más seguros que los fertilizantes minerales y que los productos fitosanitarios, además presentan menor costo de producción, riesgo de contaminación ambiental y para la salud humana (Goswami et al., 2016). La biofertilización a partir de PGPR tiene la ventaja de ser efectiva debido a que al ser microorganismos vivos pueden multiplicarse y sus poblaciones pueden ser reguladas por los microorganismos preexistentes en el suelo (Beneduzi et al., 2012).

En la rizósfera hay una serie de moléculas orgánicas que regulan la quimiotaxis entre las raíces de los plantines y las PGPR. Dentro de este grupo de moléculas sobresalen los compuestos fenólicos, los cuales son parte del metabolismo secundario de las plantas y sus niveles dentro del plantín pueden estar regulados por las interacciones que se dan en la rizósfera (Feng et al., 2018). Diversos estudios basados en técnicas colorimétricas reportan un aumento de los compuestos fenólicos en plantas inoculadas con PGPR (Del Rosario Cappellari et al., 2017; Pii et al., 2017; Pagnani et al., 2018; Rahimi et al., 2020). Sin embargo, se desconoce en la interacción plantín-PGPR, el rol específico de las distintas familias y compuestos fenólicos y cómo se modifican los mismos durante esta interacción.

Dada la importancia de la producción de plantines de pimiento a nivel industrial en la provincia de Mendoza, planteamos el siguiente objetivo específico:

## **II. Objetivo específico**

2. Evaluar durante el crecimiento de plantines de pimiento Calahorra (cv. Calafyuco INTA) los cambios en la morfología, el contenido de nitrógeno y los cambios en el perfil de compuestos fenólicos producidos por la inoculación de cuatro cepas PGPR nativas para seleccionar las cepas más efectivas comparadas con un fertilizante comercial.

### III. Hipotesis

2. La inoculación con PGPR incrementa el crecimiento y el desarrollo de los plantines de pimiento disminuyendo el uso de fertilizantes químicos.

### IV. Materiales y métodos

**A. Material vegetal:** se emplearon semillas de *Capsicum annuum* cv. Calafyuco INTA gentilmente suministradas por el Dr. Claudio Galmarini (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA-La Consulta).

**B. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal:** las rizobacterias se hicieron crecer de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 2 del presente trabajo de Tesis.

**C. Germinación de las semillas:** las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 20% por 1 min y posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de desinfectante. Las semillas se sembraron en bandejas plantineras con un alvéolo de 4,20 cm que contenían sustrato estéril (Kekkila, turba Sphagnum, Finlandia) y se trasladaron a cámara de crecimiento con  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$  y fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Se suministró riego con agua destilada manteniendo el sustrato en capacidad de campo.

**D. Diseño experimental:** se estableció un diseño completamente aleatorizado de 6 tratamientos, con tres repeticiones de 10 semillas cada uno. Después de la aparición del primer par de hojas verdaderas cada plántula se inoculó con 10  $\mu\text{L}$  de la cepa correspondiente al tratamiento. Los tratamientos fueron los siguientes:

- T1.** Plantines fertilizados con Hakaphos® 7-12-40 (N-P-K).
- T2.** Plantines inoculados con 42P4.
- T3.** Plantines inoculados con 60I1.



- T4.** Plantines inoculados con 64S1.
- T5.** Plantines inoculados con 53F.
- T6.** Control, plantines inoculados con medio LB.

**E. Variables evaluadas:** a los 55 días desde la fecha de siembra (d.d.s.), se colectaron los plantines y se evaluaron parámetros de crecimiento (área foliar, peso seco de la parte aérea y de la raíz) y se colectó material para las determinaciones bioquímicas (pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores). Las determinaciones del peso seco se realizaron en estufa a 70°C durante 72 h. Para calcular el área foliar se tomaron fotografías y se procesaron con el software Micrometrics SE Premium. En la Figura 3.1 se muestra una foto del crecimiento de un plantín en el momento de la siembra. Como puede observarse el sistema radical ocupa todo el tamaño de la celda.



Figura 3.1. Sistema radical de un plantín de pimiento listo para ser trasplantado a campo.

**F. Determinación de nitrógeno:** se secaron muestras de hojas en estufa a 70°C durante 72 h hasta llegar a peso seco, posteriormente se molieron con mortero y se realizó la determinación del contenido de nitrógeno por Micro Kjeldahl como describen Guebel et al. (1991).

**G. Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores:** las determinaciones de pigmentos fotosintéticos se realizaron espectrofotométricamente como describen en Chapelle et al. (1992) con modificaciones de Cohen et al. (2015), utilizando discos de 1 cm<sup>2</sup> de diámetro de muestras de hojas de plantines de 55 d.d.s. para las determinaciones de clorofilas y carotenoides, se colocó 1 disco en 5 mL de dimetilsulfóxido en tubos de 15 mL. Posteriormente se incubaron en baño termostático a 70°C durante 45 min en oscuridad. La absorbancia se determinó a 665, 649 y 480 nm en cubetas de vidrio, utilizando dimetilsulfóxido como blanco, empleando un espectrofotómetro (Varian CARY 50 Conc UV-Visible, Varian Inc., Mulgrave, Australia). Para expresar los resultados en peso seco los discos de 1 cm<sup>2</sup> se secaron a 60°C durante 48 h y se pesaron. Los niveles de clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides se calcularon como se describe a continuación:

Fórmulas: Wellburn (1994)

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g}) = 12,19 \text{ DO}_{665} - 3,45 \text{ DO}_{649}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g}) = 12,99 \text{ DO}_{649} - 5,32 \text{ DO}_{665}$$

$$\text{Clorofila Total } (\mu\text{g}) = \text{Clorofila a} + \text{Clorofila b}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g}) = \frac{(1000 \text{ DO}_{480} - 2,14 \text{ Clorofila a} - 70,16 \text{ Clorofila b})}{220}$$

Las determinaciones de pigmentos no fotosintéticos (antocianinas) se realizó en base a la técnica descrita por Mazza et al., (1999). Para ello, dos discos de hojas (1 cm<sup>2</sup> cada uno) fueron sumergidos en 5 mL de metanol:HCl (99:1) y se los dejó por 48 h a -20°C en oscuridad. Luego se midió la absorbancia de los extractos a 546 nm para la determinación de antocianinas. Se utilizó un espectrofotómetro Cary-50 UV-Vis (Varian Inc., Mulgrave, Australia) y cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. El blanco se realizó con el solvente de extracción sin la muestra.

**H. Extracción de compuestos fenólicos para su perfil por HPLC:** Los compuestos fenólicos se extrajeron de acuerdo con el procedimiento previamente reportado por Moussi y colaboradores (Moussi et al., 2015), el procedimiento se puede describir brevemente de la siguiente manera: se pesaron 0,5 g de hojas previamente liofilizadas. Posteriormente se mezclaron en un tubo de centrifuga con 5 mL de etanol y se extrajeron 10 min en un baño ultrasónico. Luego se centrifugó (2500 g durante 10 min) y el sobrenadante obtenido se evaporó a sequedad en un rotavapor a 40°C, el residuo fue redissuelto en 1 mL de ácido fórmico al 0,1% (v / v).

**I. Análisis de compuestos fenólicos:** El perfil de compuestos fenólicos en los extractos de hojas de los diferentes tratamientos se realizó mediante cromatografía líquida, acoplado a detectores de arreglos de diodos y fluorescencia (HPLC-DAD-FLD) (Dionex UltiMate 3000, California, USA). Se utilizó una columna Kinetex C<sub>18</sub> de fase inversa (3,0 x 100 mm, 2,6 µm) Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.) a 35°C. Las fases móviles fueron agua ultrapura con ácido fórmico al 0,1% (v/v) (fase A) y acetonitrilo (fase B). La separación de analitos se realizó usando el siguiente gradiente: 0-1,7 min, 5% de B; 1,7-10 min, 30% de B; 10-13,5 min, 95% de B; 13,5-15 min, 95% de B; 15-16 min, 5% de B; 16-19, 5% B. El caudal se fijó constante en 0,8 mL min<sup>-1</sup> durante todo el proceso, y el volumen de inyección fue de 5 µL.

**J. Análisis estadístico:** Los datos se procesaron mediante análisis de varianza seguido por un test de Duncan. Para las medidas repetidas en el tiempo se ajustó un modelo lineal mixto. El modelo incluyó efectos fijos de tratamiento, tiempo y sus interacciones. Como efecto aleatorio se incluyó la unidad experimental. Se utilizó el software estadístico InfoStat (InfoStat versión 2018v. Grupo InfoStat, Argentina). Para la construcción de los gráficos se empleó el software GraphPad Prism 7, San Diego, CA.

## V. Resultados y discusión

### A. Efecto de la inoculación sobre el crecimiento de plántulas de pimiento

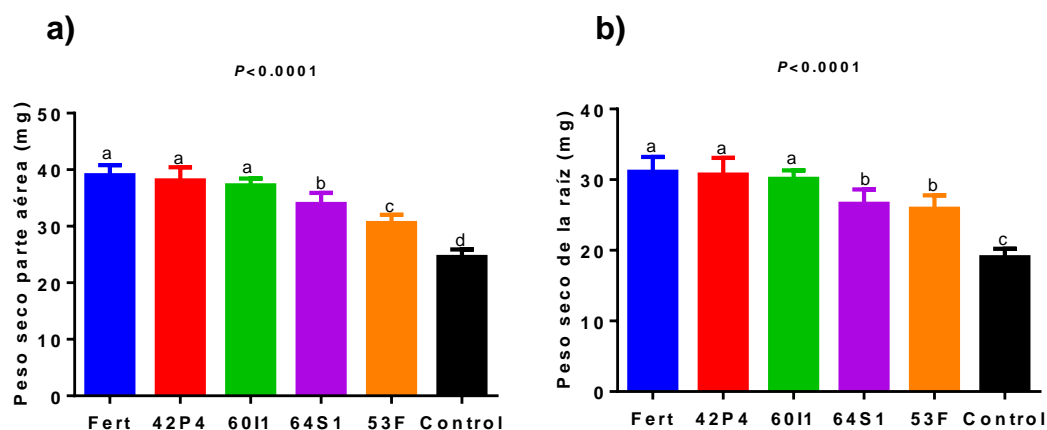
La inoculación de plántulas de pimiento con las PGPR nativas incrementó el crecimiento de los plántulas como se observa en la Figura 3.2 tanto de la parte aérea como del sistema radical.



**Figura 3.2.** Plántulas de pimiento a los 25 días después del tratamiento con a) Fertilizado; b) *Pseudomonas* 42P4; c) *Cellulosimicrobium* 60I1; d) *Ochrobactrum* 53F; e) *Enterobacter* 64S1 y f) Control (sin bacteria).

La inoculación incrementó el peso seco de la parte aérea y de la raíz (Figura 3.3). Los tratamientos fertilizado, 42P4 y 60I1 incrementaron la biomasa aérea con respecto al Control 59%, 55% y 52% como puede verse en la Figura 3.2 a. Las cepas 64S1 y 53F estimularon en menor medida el desarrollo de la parte aérea de los plántulas con respecto al tratamiento Fertilizado, sin embargo, se diferenciaron del Control sin inocular.

La inoculación con las cepas 42P4 y 60I1 mejoraron la acumulación de biomasa en el sistema radical de forma similar al tratamiento Fertilizado, incrementando 62% y 59% el peso seco de la raíz con respecto al Control (Figura 3.2 b). Las cepas 64S1 y 53F mostraron un comportamiento parecido e incrementaron el peso seco de la raíz más del 30%.



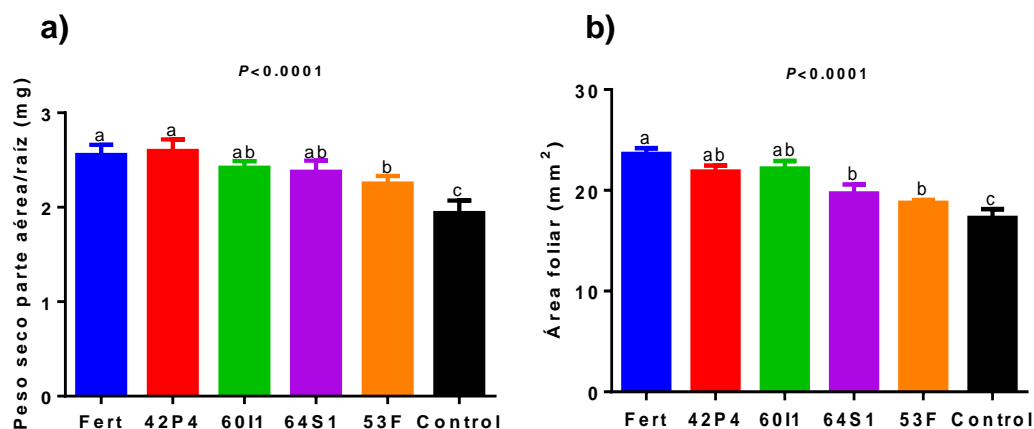
**Figura 3.3:** a) Peso seco de la parte aérea y, b) peso seco de la raíz de plantines de pimienta tratados con: Fert: Fertilizado; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 6011: *Cellulosimicrobium* 6011; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 53F: *Ochrobactrum* 53F y Control (sin bacteria) Letras diferentes indican diferencias significativas.

Se considera que un plantín está listo para el trasplante cuando sus raíces llenan completamente la celda. Obtener un mejor desarrollo radicular en forma rápida implicaría reducir el tiempo de ocupación del invernáculo y por lo tanto, reducir el costo de la producción de los plantines. El mayor volumen de la raíz mejora el anclaje al momento del trasplante, lo que reduce la incidencia de volcamiento por acción del viento, además los plantines con una mayor cantidad de pelos radiculares aumentan la capacidad de absorción de nutrientes y agua incrementando la tasa de crecimiento del plantín, favoreciendo una mayor exploración del suelo lo que amplía el área de influencia de los exudados radiculares que median la interacción con microorganismos benéficos de la rizósfera.

Nuestros resultados concuerdan con los informados por otros autores que han reportado que las inoculaciones con diversas PGPR han incrementado el peso seco de la raíz y el contenido de nutrientes de plantines de avena (*Avena sativa*), alfalfa (*Medicago sativa*), pepino (*Cucumis sativus*), cilantro (*Coriandrum sativum* L.) y repollo (*Brassica oleracea*) (Li et al., 2020; Warwate et al., 2017; Metin et al., 2014). Además de modificar el peso seco, la inoculación con *P. fluorescens* en

plantas de arroz modifica las raíces a nivel morfoanatómico, aumentando el número de polos de protoxilema, los elementos vasculares del metaxilema, el diámetro de las raíces y el grosor de la corteza, induciendo una expansión del 2% del espacio aerénquima (Rêgo et al., 2014).

En nuestro estudio, la relación del peso seco de la parte aérea y de la raíz, muestra un comportamiento similar para todos los tratamientos inoculados y el Fertilizado, los cuales se diferenciaron del Control como se muestra en la Figura 3.4 a, lo que demuestra que el Control distribuye más materia a la parte aérea. Con respecto al área foliar, se observó un incremento en los tratamientos inoculados con las cepas bacterianas con respecto al Control. Las cepas 6011 y 42P4 fueron las más efectivas, incrementado el área foliar 28% y 27%, respectivamente con relación al Control sin inocular (Figura 3.4 b).

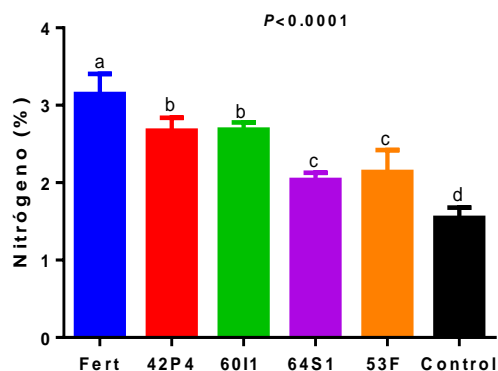


**Figura 3.4. a)** Relación del peso seco de la parte aérea y la raíz y, **b)** área foliar de plantines de pimiento tratados con: Fert: Fertilizado; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 6011: *Cellulosimicrobium* 6011; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 53F: *Ochrobactrum* 53F y Control (sin bacteria). Diferentes letras indican diferencias significativas.

Se han demostrado en distintos estudios los efectos benéficos sobre el desarrollo y crecimiento de las plantas de PGPR aisladas de la rizósfera de diferentes cultivos como acelga y caña de azúcar (Ogugua et al., 2016; Santos et al., 2018; Moncada et al., 2021). Los resultados presentados en este estudio confirman que el efecto de promoción de crecimiento vegetal es una característica de determinados géneros y especies de rizobacterias presentes en el suelo. En este sentido es importante aclarar que los géneros bacterianos que han tenido efecto promotor en este estudio, han sido descritos con anterioridad por otros autores como PGPR. No obstante, es muy importante señalar que las distintas cepas parecen utilizar distintos mecanismos para promover el crecimiento, debido a que el efecto benéfico observado tras la inoculación varía entre las diferentes cepas y las estructuras del plantín lo que se refleja en el incremento de biomasa. Al respecto, los resultados indican que la cepa 42P4 produce un aumento proporcional entre el sistema radical y la parte aérea similar al que se presenta en los plantines fertilizados, mientras que esta relación presenta diferencias cuando se observa el comportamiento de las cepas 60I1, 64S1 y 53F (Figura 3.2 y 3.3). Estos resultados se correlacionan con lo reportado previamente donde la cepa 42P4 es una eficiente solubilizadora de diferentes fuentes de fosfatos, fijadora de nitrógeno y productora de AIA (Pérez Rodríguez et al., 2020). Sin embargo, la cepa 64S1 que presenta características similares y promueve el crecimiento de plantines de tomate, no es tan efectiva en la promoción de estos parámetros en plantas de pimiento.

El contenido de nitrógeno en hojas fue mayor en los plantines fertilizados e inoculados con las PGPR con respecto al Control, como se puede observar en la Figura 3.5. Las cepas bacterianas 60I1 y 42P4 fueron las más efectivas incrementando el contenido de nitrógeno en 74% y 73% respectivamente, comparado con el Control. Las cepas 64S1 y 53F mostraron un comportamiento similar incrementando el contenido de nitrógeno hasta en un 38% con respecto al Control. El nitrógeno es un macronutriente esencial para el desarrollo óptimo de plantines de pimiento debido a que forma parte de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. Un mayor contenido de nitrógeno está directamente relacionado

como una mayor tasa de crecimiento de los plantines. En las plantas Control se presenta un menor desarrollo posiblemente por la disminución de nitrógeno, lo que da como resultados plantines de menor tamaño como se observa en la Figura 3.3. Resultados similares han sido reportados en plantas de arroz, macadamia y tomate inoculadas con PGPR (Ghaffari et al., 2018; Gallart et al., 2021; Yuan et al., 2021).



**Figura 3.5.** Contenido de nitrógeno en hojas de plantines de pimienta 25 días después del tratamiento con Fert: Fertilizado; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 53F: *Ochrobactrum* 53F y Control (sin bacteria).

## **B. Efecto de la inoculación sobre la acumulación de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores**

Los efectos de la inoculación con PGPR en el contenido de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores se muestran en la (Tabla 3.1). La mayor concentración de clorofila se encontró en el tratamiento fertilizado y en los tratamientos inoculados con las PGPR, excepto para el tratamiento con la cepa 53F donde el contenido fue significativamente menor y presentó un comportamiento similar al Control sin inocular. Este comportamiento fue el mismo tanto para la clorofila a, b y clorofila total. La inoculación con las cepas 64S1, 60I1 y 42P4 incrementaron el contenido de clorofila total entre un 25% - 25%, con respecto al Control. Estos resultados permiten inferir que la inoculación con las PGPR nativas mejora la capacidad fotosintética de los plantines de pimienta. Sin



embargo, las concentraciones de carotenoides no mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Con respecto a los pigmentos no fotosintéticos, no se observó diferencias significativas con respecto a los niveles de antocianinas entre los diferentes tratamientos. Estos últimos resultados son esperables debido a que los plantines no están estresados, situación que incrementaría los niveles de los mismos.

**Tabla 3.1.** Clorofila a, Clorofila b, Clorofila total, carotenoides y antocianinas (OD<sub>546</sub>) de plantines de pimiento 25 días después del tratamiento con: Fert: Fertilizado; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 53F: *Ochrobactrum* 53F y Control (sin bacteria).

Tratamientos	Clorofila a ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )	Clorofila b ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )	Clorofila Total ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )	Carotenoides ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )	Antocianinas ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ )
<b>Fertilizado</b>	4,03±0,67a	1,90±0,18a	5,93±0,69a	1,20±0,17a	0,12<0,01a
<b>42P4</b>	4,10±0,80a	1,78±0,22a	5,88±0,82a	1,22±0,28a	0,12<0,01a
<b>60I1</b>	3,95±0,55a	1,86±0,25a	5,81±0,60a	1,17±0,25a	0,10<0,01a
<b>64S1</b>	3,98±0,84a	1,92±0,22a	5,90±1,01a	1,12±0,11a	0,11<0,01a
<b>53F</b>	4,01±0,97a	1,27±0,29b	5,28±1,01ab	1,22±0,14a	0,10<0,01a
<b>Control</b>	3,75±0,62b	0,96±0,19b	4,71±0,64b	1,15±0,23a	0,10<0,01a

Letras diferentes indican diferencias significativas por columna.

El incremento en el contenido total de clorofila ha sido reportado en **cultivos** de arroz, soja, pimiento y pepino inoculados con diferentes PGPR (Bal et al., 2013; Abbasi et al., 2013; Alkahtani et al., 2020; Khan et al., 2018), y está directamente relacionado con una mayor tasa fotosintética que se traduce en aumento de fotoasimilados.

### **C. Efecto de la inoculación sobre el perfil de compuestos fenólicos en tejido foliar de plantines de pimiento Calafyuco INTA**

A pesar de la evidencia relacionada con el incremento de los compuestos fenólicos totales en diferentes especies de plantas inoculadas con diferentes PGPR, no existe al momento información sobre el perfil de compuestos fenólicos

en plantas de pimiento tratadas con rizobacterias. Esto puede explicarse como una consecuencia del poder limitado de las técnicas colorimétricas para discriminar los compuestos fenólicos dentro de las distintas familias. Teniendo en cuenta este antecedente, a continuación, exploramos las modificaciones en el perfil de compuestos fenólicos por HPLC en la fisiología y el desarrollo de plantines de pimiento inoculados con las cepas PGPR nativas más efectivas (42P4 y 60I1) en la promoción del crecimiento.

El perfil de los compuestos fenólicos en plantines de pimientos no inoculados (Control), inoculados con las cepas 42P4 y 60I1, y plantines Fertilizados se muestran en la Tabla 3.2. Se identificaron 24 compuestos fenólicos que se agrupan en cuatro familias según su estructura química: alcoholes fenólicos, flavonoides, ácido fenólico y estilbenoides. Los resultados de este estudio muestran que la sumatoria de los compuestos fenólicos entre los diferentes tratamientos fue mayor en el tratamiento Control, seguido por el tratamiento Fertilizado, el inoculado con la cepa 42P4 y por último el tratamiento 60I1. Si bien se observó diferencias entre los tratamientos entre cada una de las familias las mayores diferencias se observaron en los niveles de los compuestos que pertenecen a la familia de los flavonoides.

**Tabla 3.2.** Resultados cuantitativos de compuestos fenólicos, expresados en mg g<sup>-1</sup> de materia seca, obtenidos de plantines de pimiento Control, inoculados con las cepas 42P4 y 6011, y Fertilizado.

Compuesto	Control	6011	42P4	Fertilizado
<b>Compuestos fenólicos</b>				
<b>Alcoholes fenólicos simples</b>				
Hidroxitirosol	1,37±0,18a	1,11±0,12a	0,27±0,02b	0,41±0,08b
Tirosol	0,55±0,00a	0,30±0,04b	0,41±0,01b	0,38±0,08b
<b>∑Alcoholes fenólicos simples</b>	<b>1,92±0,18a</b>	<b>1,41±0,04a</b>	<b>0,68±0,01b</b>	<b>0,79±0,11b</b>
<b>Flavonoides</b>				
(+)-Catequina	0,10±0,04c	0,26±0,01b	0,47±0,09a	0,31±0,05b
(-)-Epicatequina	0,16±0,01a	n,d,*	0,11±0,01b	0,12±0,01a
Rutina	1,37±0,15b	0,19±0,05c	2,22±0,12a	0,18±0,03c
(-)-Galato de galocatequina	7,89±0,86b	21,41±1,46a	23,71±0,77a	23,30±1,01a
(-)-Epigallocatequina	3,71 ±0,96a	1,08±0,18b	2,55±0,19a	2,51±0,18a
(-)-Galato de epigallocatequina	8,12±1,57a	4,15±0,31b	2,64±0,16c	2,95±0,18c
Quercetina	0,47±0,01b	0,42±0,02b	8,93±1,24a	8,79±0,15a
Astilbina	2,26± 0,35b	n,d,*	3,92±0,27a	n,d,*
Naringina	2,01±0,20c	n,d,*	25,65±0,04a	18,92±0,97b
Naringenina	n,d,*	n,d,*	0,22±0,01a	0,22±0,02a
Miricetina	3,99±0,01c	1,99±0,30d	6,73±0,32b	10,18±0,16a
Floridzina	1,26±0,10a	n,d,*	n,d,*	n,d,*
Procianidina B1	n,d,*	n,d,*	n,d,*	8,10±0,33a
<b>∑Flavonoides</b>	<b>30,05±4,23b</b>	<b>29,49±2,30b</b>	<b>76,90±0,33a</b>	<b>72,61±2,08a</b>
<b>Ácidos fenólicos</b>				
Ácido gálico	48,87±6,40a	n,d,*	n,d,*	4,98±0,33b
Ácido siríngico	0,12±0,01c	0,14±0,00c	0,40±0,00b	0,55±0,06a
Ácido cinámico	20,73±1,59b	5,46±0,65c	21,63±0,52b	25,66±1,65a
Ácido p-cumárico	2,10±0,04a	0,34±0,01b	n,d,*	0,41±0,13b
Ácido ferúlico	n,d,*	0,18±0,03b	n,d,*	4,34±0,38a
<b>∑Ácidos fenólicos</b>	<b>71,82±6,59a</b>	<b>6,12±0,65c</b>	<b>22,03±0,52b</b>	<b>35,94±1,73b</b>
<b>Estilbenoides</b>				
Polidatina	21,02±2,81a	1,33±0,11c	1,96±0,23c	4,83±0,19b
Trans-resveratrol	3,10±0,23b	1,65±0,09c	n,d,*	6,13±0,44a
E-viniferin	n,d,*	n,d,*	0,39±0,03a	0,45±0,06a
Pteroestilbeno	1,81±0,15a	1,25±0,19c	1,50±0,19b	2,00±0,16a
<b>∑Estilbenoides</b>	<b>25,93±2,82a</b>	<b>4,23±0,23c</b>	<b>3,85±0,29c</b>	<b>13,41±0,50b</b>
<b>∑Compuestos fenólicos totales</b>	<b>130,97±15,77a</b>	<b>41,22±3,46c</b>	<b>103,66±1,75b</b>	<b>125,67±4,23ab</b>

Letras diferentes indican diferencias significativas (por fila). Los resultados vienen dados por el valor medio (n = 3; tres determinaciones independientes, incluida la extracción y la posterior inyección) ± desviación estándar. \* no detectable.

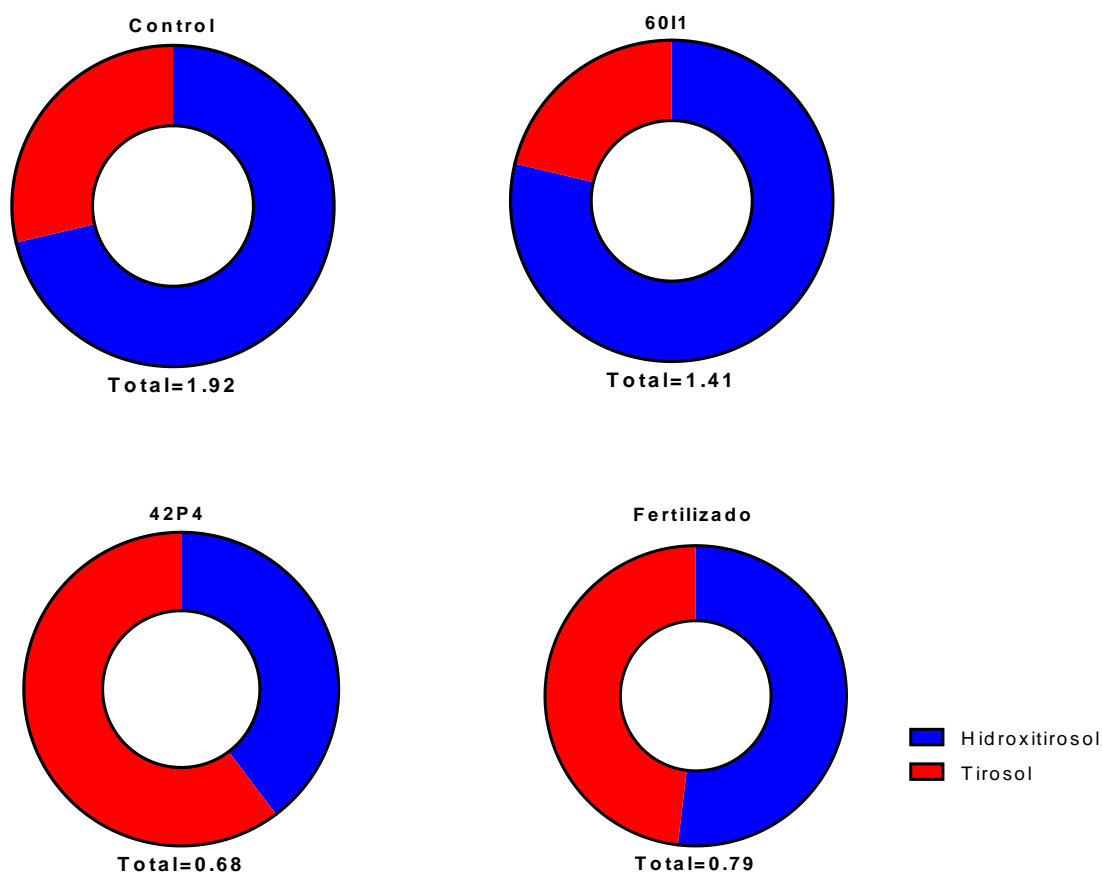
Para facilitar el análisis de los resultados se realizaron gráficos circulares para cada una de las familias de compuestos fenólicos (alcoholes fenólicos simples, flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenoides). Este tipo de gráficos es una representación relativa del total de compuestos de cada familia y cada porción representa la abundancia de un compuesto dentro de su familia.

Como alcoholes fenólicos identificamos hidroxitirosol y tirosol. La concentración de ambos compuestos fue mayor en el tratamiento Control con respecto a los tratamientos inoculado y Fertilizado, que fueron similares. Como se muestra en la Figura 3.6.

La concentración de hidroxitirosol en el Control fue de  $1,37 \text{ mg g}^{-1}$  que fue similar al tratamiento 60I1 ( $1,11 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que en plantines inoculados con 42P4 y Fertilizados los niveles fueron una tercera parte o menos ( $0,27$  y  $0,41 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente). El hidroxitirosol puede actuar como un inhibidor del crecimiento de las raíces en varias especies de interés agrícola (Date et al., 2021). En esta investigación es posible que la mayor concentración de hidroxitirosol en el tratamiento control haya limitado el desarrollo radical de los plantines de pimiento como se muestra en las Figuras 3.1 b y 3.3. Dada esta limitación para la absorción de nutrientes, en los plantines Control también se observó una menor concentración de nitrógeno en las hojas, como se puede observar en la Figura 3.4. Todo esto puede haber ocasionado un menor desarrollo de la parte aérea y menores contenidos de clorofila, restringiendo el proceso de fotosíntesis y por consiguiente la producción de fotoasimilados.

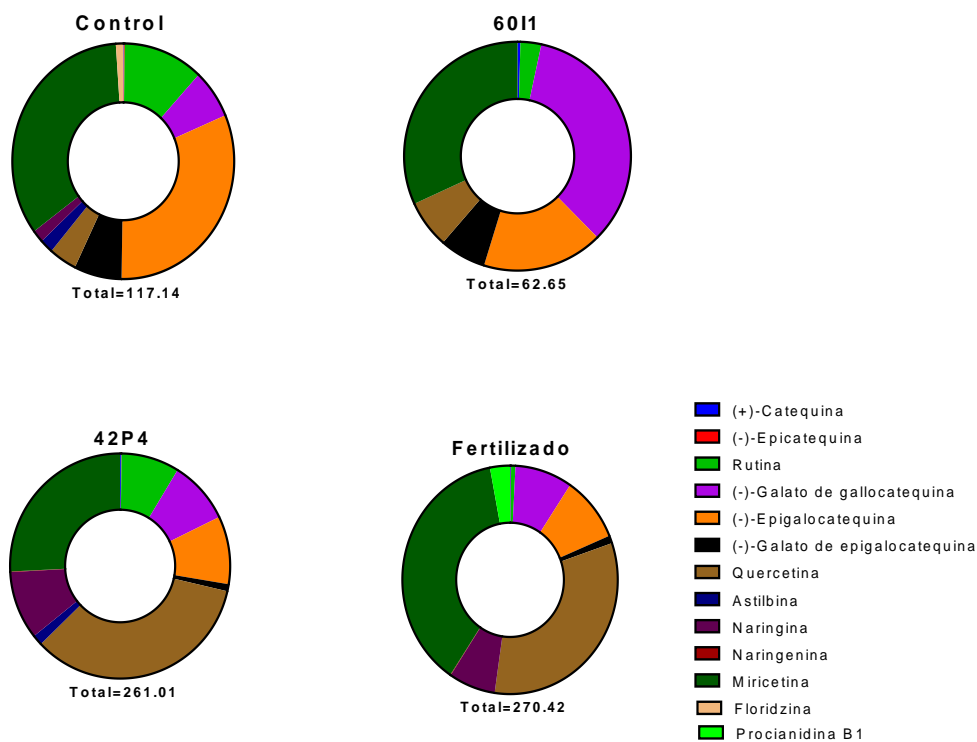
La concentración de tirosol en el tratamiento Control fue de  $0,55 \text{ mg g}^{-1}$ , mientras que en los demás tratamientos fue menor ( $0,30$ ;  $0,41$  y  $0,38 \text{ mg g}^{-1}$ , en la 60I1, 42P4 y Fertilizado respectivamente). Como se muestra en la Figura 3.5, en el tratamiento Control y en el inoculado con la cepa 60I1 la concentración de hidroxitirosol fue mayor que la de tirosol, mientras que en el tratamiento Fertilizado

las concentraciones de ambos compuestos fueron similares. Sin embargo, en el tratamiento 42P4 hubo una mayor concentración de tirosol lo que nos indica un metabolismo diferente entre los tratamientos. El tirosol es un potente antioxidante capaz de proteger a las semillas incrementando el porcentaje de germinación (Macedo et al., 2018). Sin embargo, en dosis altas este compuesto puede restringir el crecimiento de los plántines (Silva et al., 2021). Lo anterior puede explicar por qué en este trabajo el tratamiento Control que presentó la mayor concentración de tirosol también mostró un menor contenido de clorofila y de nitrógeno lo que conllevó a un crecimiento limitado de las raíces y de la parte aérea como se explicó previamente.



**Figura 3.6.** Contenido de alcoholes fenólicos simples detectados en plántines de pimiento cultivados en bandejas e inoculados con las PGPR en estudio. Tratamientos: Control (sin bacterias); 6011: *Cellulosimicrobium* 6011; 42P4: *Pseudomonas* 42P4 y Fertilizado.

En la familia de los flavonoides, se identificaron y cuantificaron los siguientes compuestos: (+)-catequina, (-)-epicatequina, rutina, (-)-galato de galocatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-galato de epigallocatequina, quercetina, astilbina, naringina, naringenina, miricetina, floridzina, procianidina B1, como se muestra en la Tabla 3.2. La Figura 3.6, nos permite apreciar que los perfiles de flavonoides fueron diferentes en el tratamiento Fertilizado, inoculados y en el Control. La sumatoria total de flavonoides en el tratamiento Fertilizado ( $72,61 \text{ mg g}^{-1}$ ), no se diferenció del tratamiento inoculado con la cepa 42P4 ( $76,90 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que en el tratamiento Control la concentración de flavonoides totales fue menos de la mitad ( $33,05 \text{ mg g}^{-1}$ ). Sin embargo, el tratamiento 6011 fue el que presentó menor concentración de flavonoides ( $29,49 \text{ mg g}^{-1}$ ).



**Figura 3.7.** Contenido de flavonoides cuantificados en plantines de pimienta cultivados en bandejas e inoculados con las PGPR en estudio. Tratamientos: Control (sin bacterias); 6011: *Cellulosimicrobium* 6011; 42P4: *Pseudomonas* 42P4 y Fertilizado.

Como puede observarse en la Figura 3.7, los compuestos más abundantes en la familia de los flavonoides fueron la naringina y (-)-galato de galocatequina, sin embargo, las concentraciones de naringina fueron significativamente diferentes en cada tratamiento donde en el tratamiento Fertilizado e inoculados con 42P4 se encontraron concentraciones de 18,92 mg g<sup>-1</sup> y 25,65 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente. Los niveles de quercetina fueron más elevados en el tratamiento 42P4 y Fertilizado (8,93 y 8,79 mg g<sup>-1</sup>, respetivamente); mientras que, en el Control y 60I1, las concentraciones fueron significativamente más bajas. Del análisis de la Figura 3.5, podemos resaltar que en el Control los compuestos más abundantes fueron (-)-galato de epigalocatequina y (-)-galato de galocatequina. Lo que confirma nuevamente que la cepa 42P4 se comporta de forma similar al tratamiento Fertilizado. Sin embargo, en el tratamiento 60I1 el más abundantes fue también el (-)-galato de galocatequina. Estos resultados indican que los tratamientos inoculados con las cepas 42P4 y 60I1 se comportan de forma diferente respecto al metabolismo de compuestos fenólicos.

La naringenina es considerada un importante precursor de otros flavonoides (Liu, et al., 2021). En este estudio sólo se detectó y cuantificó en los tratamientos 42P4 y Fertilizado (0,22 y 0,22 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente). Por este motivo es posible que la cepa 42P4 promueva la producción de naringenina para aumentar así la síntesis de otros flavonoides en los plantines en pleno desarrollo. Confirma esta hipótesis que las concentraciones de naringina también fueron mayores en el tratamiento 42P4 25,65 mg g<sup>-1</sup>, seguido del tratamiento Fertilizado 18,92 mg g<sup>-1</sup> y el Control 2,01mg g<sup>-1</sup>.

Podemos resaltar que en este estudio las plantas inoculadas con la cepa 42P4 presentaron mayores concentraciones de (+)-catequina (0,47 mg g<sup>-1</sup>), seguido por el tratamiento Fertilizado y el Control (0,31 y 0,10 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente). El rol de la (+)-catequina en las plantas sigue siendo controvertido, lo que sí está claro es que la respuesta no es la misma entre diferentes especies de plantas (Bais et al. 2010). Se ha demostrado que la aplicación exógena de catequina aumenta la

acumulación de biomasa, el área foliar, el grosor de la hoja, la tasa fotosintética neta, la conductancia estomática y la concentración de AIA en *Arabidopsis thaliana* (Rani et al. 2011), alivia el estrés oxidativo (Yiu et al. 2011) y la aclimatación al frío (Ding et al. 2019). Los datos obtenidos en la presente investigación permiten sugerir que la cepa 42P4 estimula la producción de (+)-catequina lo que induce una respuesta positiva en el crecimiento y en la acumulación de pigmentos fotosintéticos. Resultados similares se observaron en un estudio en el que plantas de té inoculadas con *Bacillus megaterium* donde demostraron un incremento en la concentración de catequinas y otros compuestos como peroxidasa, quitinasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa y fenilalanina amoniaco-liasa (Chakraborty et al., 2015).

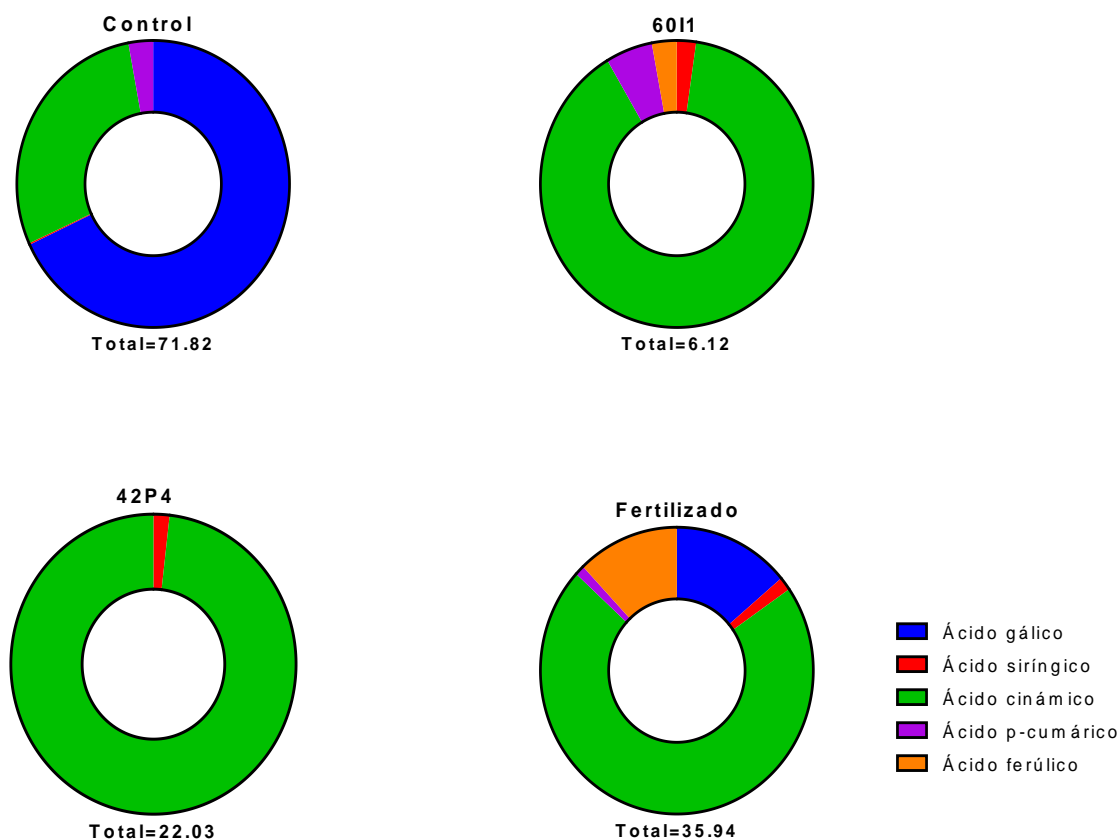
Otra diferencia importante encontrada en esta investigación en el tratamiento Control, está relacionada a las concentraciones de (-)-galato de epigallocatequina que fueron mayores ( $8,12 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que los tratamientos Fertilizado y 42P4 presentaron menores concentraciones ( $2,95$  y  $2,64 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente). Este compuesto tiene una gran capacidad antioxidante, sin embargo, se ha demostrado que concentraciones de ( $0,5 \text{ mM}$  y  $1,0 \text{ mM}$ ) aplicadas a semillas de tomate reducen la tasa de germinación y la acumulación de biomasa en los plantines porque modifica la actividad antioxidante y la relación  $\text{GA}_3/\text{ABA}$  (Ahammed et al., 2020). Sin embargo, dosis menores de (-)-galato de epigallocatequina incrementan la germinación de semillas y el crecimiento de plantines de tomate sometidos a estrés (Ahammed et al., 2018; Li et al., 2019). Por lo cual, se puede sugerir que la cepa 42P4 actúa modificando o modulando los niveles de (-)-galato de epigallocatequina favoreciendo la acumulación de biomasa e incrementando los contenidos de pigmentos fotosintéticos de manera similar al tratamiento Fertilizado.

Las concentraciones de (-)-epigallocatequina fueron más altas en el Control  $3,71 \text{ mg g}^{-1}$ , mientras que los tratamientos 42P4 y Fertilizado presentaron concentraciones similares ( $2,55$  y  $2,51 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente). Sin embargo, el



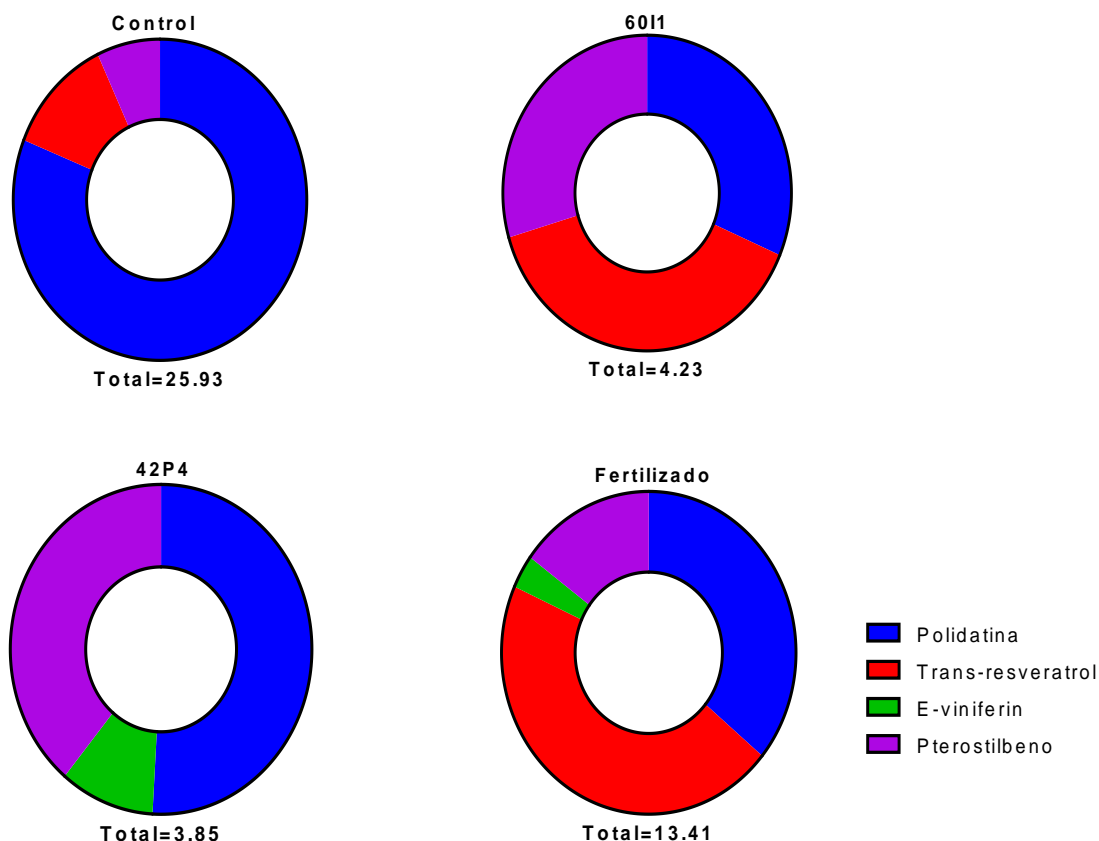
(-)-galato de galocatequina mostró un comportamiento inverso donde el Control presentó la menor concentración ( $7,89 \text{ mg g}^{-1}$ ).

En la familia de los ácidos fenólicos la mayor concentración total se encontró en el tratamiento Control ( $71,82 \text{ mg g}^{-1}$ ), seguido por el Fertilizado ( $35,94 \text{ mg g}^{-1}$ ) y 42P4 ( $22,03 \text{ mg g}^{-1}$ ) que no mostraron diferencias significativas entre ellos. Mientras que la menor concentración se encontró en el tratamiento de la 60I1. Como se muestra en la Figura 3.8, el ácido gálico se encontró en una mayor concentración en el Control ( $48,87 \text{ mg g}^{-1}$ ), seguido por el tratamiento Fertilizado donde fue bastante menor ( $4,98 \text{ mg g}^{-1}$ ) y en los tratamientos 60I1 y 42P4 no se detectó ácido gálico. El ácido cinámico fue el compuesto más abundante en los tratamientos Fertilizado e inoculados con 60I1 y 42P4, mientras que se encontró en menor concentración en el tratamiento Control. En el Fertilizado fue donde se encontró el mayor número de compuestos diferentes, seguido por el Control, la 60I1 y la 42P4 que mayoritariamente solo produjo ácido cinámico. Sin embargo, existen reportes que la inoculación con diferentes cepas de *Pseudomonas* incrementa el contenido de ácidos fenólicos con respecto al Control en plantas infectadas con patógenos (Singh et al., 2003; Singh et al., 2012).



**Figura 3.8.** Contenido de ácidos fenólicos cuantificados en plantines de pimienta cultivados en bandejas e inoculados con las PGPR en estudio. Tratamientos: Control (sin bacterias); 6011: *Cellulosimicrobium* 6011; 42P4: *Pseudomonas* 42P4 y Fertilizado.

En esta investigación la mayor concentración de la familia estilbenoides se encontraron en el tratamiento Control (25,93 mg g<sup>-1</sup>), seguido por el tratamiento Fertilizado (13,41 mg g<sup>-1</sup>) y el inoculado con la cepa 42P4 (3,85 mg g<sup>-1</sup>), y nuevamente encontramos el menor valor en los plantines inoculados con la cepa 6011, como se muestra en la Figura 3.9.



**Figura 3.9.** Contenido de estilbenoides cuantificados en plantines de pimiento cultivados en bandejas e inoculados con las PGPR en estudio. Tratamientos: Control (sin bacterias); 6011: *Cellulosimicrobium* 6011; 42P4: *Pseudomonas* 42P4 y Fertilizado.

El conocimiento actual de los estilbenoides en algunas solanáceas es limitado. En la familia de las solanáceas a la que pertenece el pimiento se ha reportado resveratrol en el hollejo de diferentes cultivares de tomate (Ragab et al., 2006; Riviere et al., 2012). Los genes que codifican la estilbeno sintasa, es una familia multigénica y están presentes en varios taxones, por consiguiente, la expresión diferencial de genes presentes en un ancestro común a lo largo de la evolución podría haberse perdido o desactivado total o parcialmente en algunas especies, mientras que en otras especies se expresaron los mismos genes como estrategia de defensa ante condiciones ambientales adversas (Larsson, 2007; Riviere et al., 2012). En plantas de pimiento sometidas a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> se han

identificado algunos genes expresados diferencialmente involucrados en la biosíntesis de estilbenoides (Zhang et al., 2020). La presencia de estilbenoides libres (piacetanol, trans resveratrol y polidatina) y ligados (piacetanol y trans resveratrol) en semillas de pimiento recién germinadas fue reportada en el Capítulo 2 de esta tesis (Lobato et al., 2021).

En el presente estudio también se cuantificó polidatina, las mayores concentraciones correspondieron al Control (21,02 mg g<sup>-1</sup>), mientras que en los tratamientos 42P4 y Fertilizado las concentraciones no superaron el 24% con respecto al Control. Las altas concentraciones de polidatina en el Control contrastan con las bajas concentraciones de trans-resveratrol (3,10 mg g<sup>-1</sup>). La polidatina es un glucósido del resveratrol, es posible que las bajas concentraciones de trans-resveratrol en el Control se deban a que este compuesto se encuentra en forma glicosilada como polidatina. Mientras que en el tratamiento inoculado con la cepa 42P4 se catabolizó la polidatina a trans-resveratrol, el cual por medio de oxidación dio otro tipo de estilbenoides como e-viniferina y pteroesstilbeno. Se ha reportado que la cepa de *Bacillus natto* pueden inducir la transformación de la polidatina de *Pediomelum cuspidatum* en resveratrol (Fan et al., 2021).

En el presente estudio, la desviación de los fotoasimilados producto del metabolismo primario hacia la síntesis de estilbenoides parece ser una estrategia que limita el crecimiento y desarrollo de los plantines no inoculados, es posible que la turba como sustrato inerte y pobre en nutrientes induzca a las plantas a producir estilbenoides. Se sabe que la producción de estilbenoides en las plantas es un mecanismo de defensa que está reservado para superar el ataque de insectos y patógenos, aunque su síntesis también se puede inducir en respuesta a una amplia gama de factores de estrés bióticos y abióticos, particularmente dentro de las hojas (Riviere et al., 2012).

La floridzina solo se detectó en el Control con una concentración de 1,26 mg g<sup>-1</sup>. La presencia de floridzina en el tratamiento Control puede estar relacionada con

susceptibilidad al ataque de insectos. Por otra parte, se sabe que la florigenina estimula la producción de enzimas AIA oxidasas involucradas en la degradación de las auxinas (Grochowska & Czurzyńska, 1979) e inhibe el crecimiento y disminuye del contenido de clorofila (Gosch et al., 2010; Nicola et al., 2016). Este efecto deletéreo sobre las auxinas puede ayudar a explicar por qué en este estudio las plantas Control presentaron menor desarrollo que las plantas inoculadas con las PGPR en las cuales no se detectó florigenina. Además, la florigenina es degradada con facilidad por los microorganismos del suelo (Stanišić et al., 2018). Lo que explica por qué no fue detectada en los tratamientos inoculados con las PGPR.

Los resultados obtenidos tras la inoculación de plantines de pimiento cv. Calafyuco INTA con las cepas PGPR demuestran una mejora significativa en el área foliar, contenido de nitrógeno, contenidos de clorofila a y total, así como en el peso seco de la parte aérea y de la raíz. El efecto de la inoculación con las PGPR es similar al producido por la aplicación de un fertilizante de origen mineral. Además, la inoculación modificó los niveles de compuestos fenólicos en los plantines, las mayores diferencias se observaron en los niveles de los compuestos que pertenecen a la familia de los flavonoides, muchos de los cuales favorecen el crecimiento de los plantines.

No obstante, es necesario estudiar el efecto de la inoculación en condiciones de invernáculo, por lo cual se propone abordar en el siguiente capítulo el efecto de la inoculación con las PGPR sobre plantas de pimiento cultivadas en macetas para realizar un seguimiento completo durante el desarrollo fenológico de las plantas y estudiar algunos aspectos relacionados con el componente rendimiento.

## **CAPITULO 4: Evaluación del efecto de la inoculación de plantas de pimiento cultivar Calafyuco INTA con PGPR nativas**

### **I. Introducción**

En cada etapa de desarrollo, las plantas deben redistribuir los nutrientes en diferentes órganos. Durante la etapa denominada desarrollo vegetativo y hasta alcanzar la madurez reproductiva se producen una serie de cambios que están bien documentados. Si bien el más obvio de los cambios es la aparición de flores, también cambia la morfología y fisiología de las hojas y los brotes vegetativos (Poethig, 2010).

Como se mencionó en los capítulos anteriores, existen numerosos reportes sobre el efecto benéfico de las PGPR para mejorar el crecimiento, vigor, sanidad, establecimiento y rendimiento de diferentes especies hortícolas (Porcel et al., 2014). La biofertilización con PGPR es considerada en la actualidad como una alternativa prometedora a los fertilizantes químicos o inorgánicos, constituyendo una poderosa herramienta en la agricultura orgánica y la restauración de suelos degradados (De-Bashan et al., 2012; Gouda et al., 2018).

Además, las PGPR nativas tienen la capacidad de aliviar las tensiones ambientales a las que frecuentemente están sometidas las plantas, debido a que suelen adaptarse fácilmente a las condiciones locales de los suelos de donde fueron aisladas, soportando el estrés ambiental ocasionado por gradientes extremos de temperatura, altas concentraciones de sales en el suelo y estrés hídrico (Grover et al., 2011; Cordero et al., 2018; Pérez-Rodríguez et al., 2021).

Para utilizar cepas de PGPR nativas como inoculantes se debe realizar un proceso largo y complejo, el cual podemos resumir en los siguientes pasos: 1) aislamiento, 2) selección, 3) caracterización y 4) identificación taxonómica de las bacterias. Posteriormente se realizan ensayos en condiciones de laboratorio para finalmente probarlas bajo condiciones controladas caracterizando los efectos

benéficos atribuibles a las cepas bacterianas en su interacción con las plantas (Tabassum et al., 2017).

En los capítulos anteriores se estudiaron los cambios producidos en la morfología, fisiología y perfil de compuestos fenólicos en semillas y plantines de pimiento inoculados con diferentes PGPR. En este capítulo se abordará el efecto de la inoculación en plantas cultivadas en macetas y en invernáculo. En este contexto, el cultivo de plantas en invernáculos ofrece la posibilidad de controlar la intensidad, uniformidad y frecuencia de los factores que afectan el desarrollo de las plantas y garantiza una óptima distribución espacial de los tratamientos experimentales.

## **II. Objetivo específico**

**3.** Estudiar en plantas de pimiento Calahorra (cv. Calafyuco INTA) inoculadas con PGPR los cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos y compararlas con plantas fertilizadas y sin fertilizar.

## **III. Hipótesis**

**3.** La inoculación con PGPR incrementa el crecimiento y desarrollo de la planta de manera similar a como lo hacen los fertilizantes químicos.

## **IV. Materiales y métodos**

**A. Material vegetal:** se emplearon semillas de *Capsicum annuum* cv. Calafyuco INTA gentilmente suministradas por el Dr. Claudio Galmarini (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA-La Consulta).

**B. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal:** las cepas utilizadas fueron: *Cellulosimicrobium* 60I1 (60I1), *Ochrobactrum* 53F (53F), *Enterobacter* 64S1 (64S1) y *Pseudomonas* 42P4 (42P4). Las rizobacterias se hicieron crecer de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 2 de la presente tesis.

**C. Germinación de las semillas:** las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 20% por 1 min y posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de desinfectante. Las semillas se sembraron en bandejas que contenían sustrato estéril (Kekkila, turba Sphagnum, Finlandia) y se trasladaron al invernáculo con una temperatura de (24-26 °C de temperatura media diaria, 14 horas de luz y 10 de oscuridad, y 700-750  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad de luz). Posteriormente, cuando los plantines presentaron el primer par de hojas verdaderas se inocularon con la cepa correspondiente a cada tratamiento y a los 25 días después de la inoculación se trasplantaron a macetas de (30 L) que contenían una mezcla de 50% de sustrato y 50% de arena.

**D. Diseño experimental:** se estableció un diseño completamente aleatorizado de 6 tratamientos, con tres repeticiones de 10 semillas cada uno. Después de la aparición del primer par de hojas verdaderas cada plántula se inoculó con 1000  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) de medio conteniendo la cepa correspondiente al tratamiento. Los tratamientos fueron los siguientes:

- T1.** Plantas fertilizadas con Hakaphos® 7-12-40.
- T2.** Plantas inoculadas con 42P4.
- T3.** Plantas inoculadas con 60I1
- T4.** Plantas inoculadas con 64S1.
- T5.** Plantas inoculadas con 53F.
- T6.** Control, plantas inoculadas con medio LB.

**E. Variables evaluadas:** a los 75 d.d.s. se evaluaron los siguientes parámetros morfológicos: altura de la planta y diámetro del tallo. Para calcular el área foliar se tomaron fotografías y se procesaron con el software Micrometrics SE Premium. A los 90 d.d.s. se determinaron los siguientes parámetros fisiológicos: conductancia



estomática fue determinada con un porómetro (Decagon Devices, Model SC-1, USA), la eficiencia máxima del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) fue determinado con un fluorómetro (Hansatech Instruments LTD), el índice de clorofila (SPAD) se determinó con un medidor de contenido de clorofila (SPAD-502, Konica Minolta sensing). Se colectaron hojas para las determinaciones posteriores de nitrógeno, pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores. Al momento de la floración se determinó el número de flores por planta y los días a floración. A los 110 días se determinaron los parámetros de producción: número de frutos por planta, peso, longitud y diámetro de los frutos. Finalmente se colectaron las plantas y se evaluó el peso seco de la parte aérea y de la raíz..

**F. Determinación de nitrógeno:** se realizó siguiendo la misma metodología descrita en el Capítulo 3 del presente trabajo de tesis.

**G. Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores:** las determinaciones se realizaron espectrofotométricamente como se describe en el capítulo 3 de la presente tesis.

**H. Extracción de compuestos fenólicos:** los compuestos fenólicos se extrajeron de acuerdo con el procedimiento previamente descrito en el Capítulo 3.

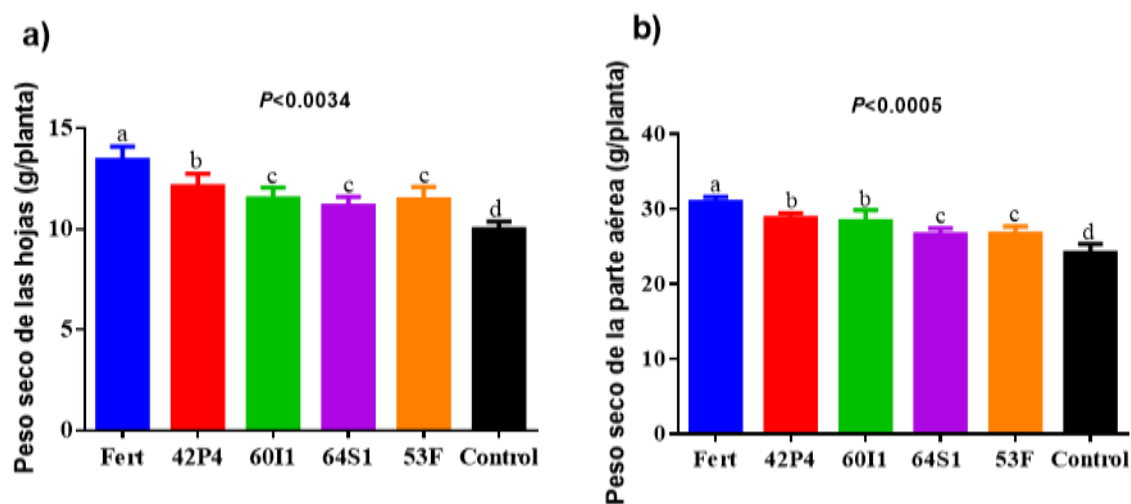
**I. Análisis de compuestos fenólicos:** el perfil de compuestos fenólicos en los extractos de hojas de los diferentes tratamientos se realizó utilizando la misma metodología descrita previamente en el Capítulo 3.

**J. Análisis estadístico:** los datos se procesaron mediante análisis de varianza seguido por un test de Duncan. Se utilizó el software estadístico InfoStat (InfoStat versión 2018v. Grupo InfoStat, Argentina). Para la construcción de los gráficos se empleó el software GraphPad Prism 7, San Diego, CA.

## V. Resultados y discusión

### A. Efecto de la inoculación con PGPR sobre el desarrollo de plantas de pimiento cultivadas en macetas bajo condiciones de invernáculo

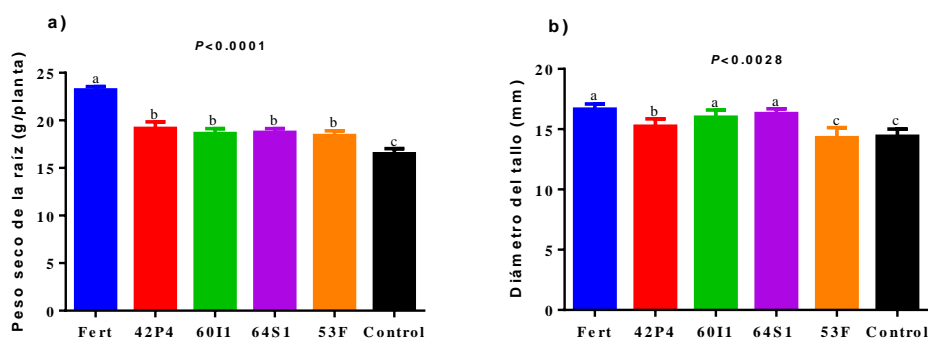
La inoculación de plantines de pimiento con las diferentes rizobacterias en estudio incrementó el peso seco de las hojas y de la parte aérea de las plantas (hojas más tallos), como se muestra en la Figura 4.1. El mayor incremento de estas variables se observó en el tratamiento Fertilizado, seguido por la cepa 42P4, y posteriormente las cepas 60I1, 64S1 y 53F que se diferenciaron del Control sin inocular. Resultados similares se evidenciaron en la etapa de plantín y además han reportado en otras investigaciones en las cuales PGPR de distintos géneros han aumentado de forma significativa la materia seca en cultivos como kiwi, garbanzo y maíz (Erturk et al., 2010; Karnwal & Kumar, 2012; Amogou et al., 2018; Gaurav & Pallavi, 2020).



**Figura 4.1.** a) Peso seco de las hojas y, b) Peso seco de la parte aérea de plantas de pimiento cultivadas en macetas y tratadas con: Fert: Fertilizado; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 53F: *Ochrobactrum* 53F y Control (sin bacteria). Letras diferentes indican diferencias significativas.

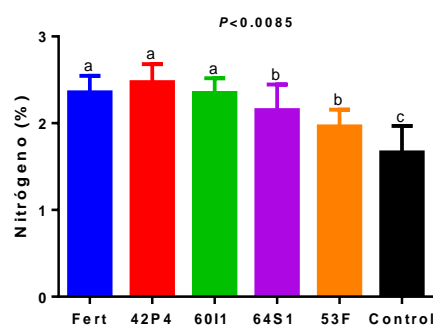
De igual forma, se observó un incremento en el peso seco de la raíz y el diámetro del tallo, como se muestra en la Figura 4.2 a y b. Todas las cepas de PGPR inoculadas incrementaron el peso seco de la raíz en igual magnitud, diferenciándose del tratamiento Control, observándose los mayores incrementos en el tratamiento Fertilizado. Resultados similares relacionados al aumento del peso seco de la raíz se han informado con el uso de PGPR en diferentes cultivos como albahaca, tomate, arroz y trigo (Ordookhani et al., 2011; Zare et al., 2011; Sharafzadeh, 2012; Sen & Chandrasekhar, 2014; Naili et al., 2018).

Los tratamientos Fertilizado, 64S1 y 60I1 incrementaron el diámetro del tallo de las plantas (16, 13y 11%, respectivamente), seguidos por la inoculación con la cepa 42P4. El incremento en este parámetro es importante porque está relacionado con el vigor de la planta. Sin embargo, la cepa 53F no modificó el diámetro del tallo que fue similar al Control. En un estudio en plantas de maíz y girasol inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas* sp también se reportó un incremento en el diámetro del tallo que concuerda con los resultados encontrados en la inoculación con las cepas 64S1, 60I1 y 42P4. Además, informaron el incremento de otros parámetros vegetativos como la biomasa de los brotes y la altura de las plantas (Abbaszadeh-Dahaji et al., 2021).



**Figura 4.2.** a) Peso seco de la raíz y, b) Diámetro del tallo, de plantas de pimiento cultivadas en macetas y tratadas con: Fert: Fertilizado; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 53F: *Ochrobactrum* 53F y Control (sin bacteria). Letras diferentes indican diferencias significativas.

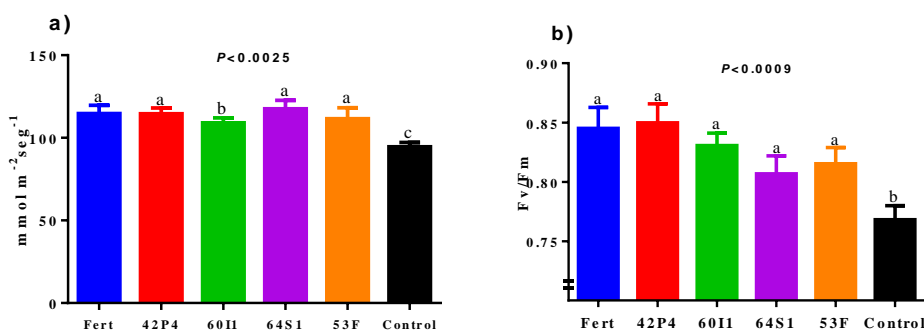
Con respecto a los resultados obtenidos del contenido de nitrógeno se observa que las hojas con mayor contenido correspondieron a los tratamientos inoculados con las PGPR y al Fertilizado con respecto al Control (sin inocular), como se muestra en la Figura 4.3. Los tratamientos 42P4 y 6011 mostraron la mayor concentración de nitrógeno, superando al Control (48% y 41% respectivamente), mostrando un comportamiento similar al tratamiento Fertilizado. Las plantas inoculadas con las cepas 64S1 y 53F superaron al control (29% y 18%, respectivamente). El nitrógeno es un nutriente esencial para el desarrollo vegetativo de las plantas, debido a que se encuentra directamente relacionado con la calidad y cantidad de tallos y hojas necesarios para el llenado de frutos en la etapa productiva. El uso de las PGPR en estudio permitiría realizar la fertilización nitrogenada de forma eficiente y contribuiría a reducir los elevados costos de la fertilización mineral en los cultivos de pimiento. Estos resultados concuerdan con lo publicado por otros autores en cultivos de trigo, remolacha, arveja y batata (Dal Cortivo et al., 2017; Artyszak & Gozdowski, 2020; Ejaz et al., 2020; Yasmin et al., 2020).



**Figura 4.3.** Contenido de nitrógeno en hojas de plantas de pimiento cultivadas en macetas, a los 60 días después del tratamiento con Fert: Fertilizado; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 6011: *Cellulosimicrobium* 6011; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 53F: *Ochrobactrum* 53F y Control (sin bacteria). Letras diferentes indican diferencias significativas.

## B. Efecto de la inoculación con PGPR sobre parámetros fisiológicos de plantas de pimiento cultivadas en macetas bajo condiciones de invernáculo

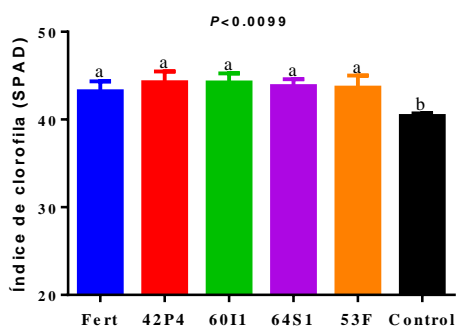
La inoculación con PGPR modificó los parámetros fisiológicos en las plantas de pimiento como se muestra la Figura 4.4 a y b. Los tratamientos 64S1, 42P4, Fertilizado, 53F y 60I1 incrementaron la conductancia estomática (24; 21; 21; 18 y 15%, respectivamente) con respecto al Control. Una mayor conductancia estomática con frecuencia está asociada a una mayor tasa de fotosíntesis. Resultados similares se encontraron en plantas de arroz inoculadas con *P. koreensis* y *Bacillus coagulans* (Hafez et al., 2019). La eficiencia del fotosistema II en este estudio se incrementó de forma similar en los tratamientos inoculados y en el Fertilizado, superando al Control hasta en un 10%. Estos resultados pueden ser observados en la Figura 4.4 b. Se han reportado mejoras significativas en la eficiencia del fotosistema II y la fotosíntesis en plantas de *Capsicum chinense* inoculadas con *Bacillus cereus*, *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* (Samaniego-Gómez et al., 2016).



**Figura 4.4.** a) Conductancia estomática y, b) eficiencia del fotosistema II de plantas de pimiento cultivadas en macetas y tratadas con: Fert: Fertilizado; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 53F: *Ochrobactrum* 53F y Control (sin bacteria). Letras diferentes indican diferencias significativas.

El aumento del fotosistema II y el índice de clorofila están estrechamente relacionados con una mejor nutrición nitrogenada de la planta. En este caso las

plantas inoculadas con bacterias y el tratamiento Fertilizado presentaron un mayor índice de clorofila que el tratamiento Control, como se muestra en la Figura 4.5. El tratamiento 42P4 presentó el mayor incremento del índice de clorofila (10 %) superando al Control. Resultados similares se encontraron tras la inoculación de *Brachiaria brizantha* con las PGPR *P. fluorescens* y *Burkholderia pyrrocinia* las cuales solas y combinadas incrementaron el índice de clorofila 14 días después de la emergencia de las plántulas (Lopes et al., 2018).



**Figura 4.5:** Índice de clorofila de plantas de pimiento cultivadas en macetas y tratadas con: Fert: Fertilizado; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 53F: *Ochrobactrum* 53F y Control (sin bacteria). Letras diferentes indican diferencias significativas.

Los contenidos de pigmentos fotosintéticos (clorofila a y total), así como los carotenoides fueron mayores en todos los tratamientos inoculados y en el Fertilizado con respecto al Control como se muestra en la Tabla 4.1. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en las determinaciones de conductancia estomática, eficiencia fotosintética y con el índice de clorofila presentados anteriormente. Resultados similares se encontraron en plantas de *Salvia officinalis* inoculadas con *A. lipoferum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*, donde los resultados indicaron un incremento significativo en el contenido de clorofila a y total, así como en el área foliar y el número de ramas florales (Anbi et al., 2020).

La inoculación no modificó los niveles de carotenoides ni de antocianinas, y estos resultados son similares a los encontrados en la etapa de plantín.

**Tabla 4.1:** Clorofila a, clorofila b, clorofila total, carotenoides, compuestos fenólicos totales (OD<sub>305</sub>) y antocianinas (OD<sub>546</sub>) de plantas de pimiento 90 días después de tratadas con: Fertilizado; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 53F: *Ochrobactrum* 53F y Control (sin bacteria).

Tratamientos	Clorofila a $\mu\text{g mg}^{-1}$	Clorofila b $\mu\text{g mg}^{-1}$	Clorofila total $\mu\text{g mg}^{-1}$	Carotenoides $\mu\text{g mg}^{-1}$	Antocianinas $\mu\text{g mg}^{-1}$
<b>Fertilizado</b>	5,03±0,58a	2,10±0,25a	7,13±0,63a	1,58±0,19a	0,34<0,01a
<b>42P4</b>	5,00±0,36a	2,08±0,23a	7,08±0,42a	1,36±0,11a	0,32<0,01a
<b>60I1</b>	4,98±0,65a	2,01±0,32a	7,11±0,72a	1,42±0,08a	0,29<0,01a
<b>64S1</b>	5,01±0,47a	2,04±0,18a	7,05±0,50a	1,45±0,10a	0,30<0,01a
<b>53F</b>	5,01±0,56a	2,07±0,28a	7,08±0,62a	1,38±0,16ab	0,33<0,01a
<b>Control</b>	4,32±1,21b	2,00±0,30a	6,32±1,24b	1,17±0,14b	0,32<0,01a

Letras diferentes indican diferencias significativas por columna.

Otro parámetro que suele ser modificado con la inoculación con PGPR son los días a floración. En esta tesis, la inoculación no modificó los días a floración y todos los tratamientos comenzaron a florecer en el mismo período. Sin embargo, en cuanto al número de flores por planta todos los tratamientos se diferenciaron del Control excepto el tratamiento 64S1. El tratamiento con mayor número de flores fue el Fertilizado, seguido en orden descendiente por los tratamientos 42P4, 60I1, 53F y Control, como se muestra en la Tabla 4.2.

Un mayor número de flores se encuentra relacionado con una mayor probabilidad de cuajado de frutos lo que se asocia con un incremento del rendimiento. Resultados similares se han reportaron tras la inoculación con distintas PGPR en plantas de crisantemo (Kumari et al., 2016), mora (Robledo-Buriticá et al., 2018) y tomate cherry (Aini et al., 2019).

El número de frutos por planta fue similar para los tratamientos Fertilizado, 42P4, 60I1 y 64S1, los cuales se diferenciaron del Control. Los frutos más largos se registraron en los tratamientos Fertilizado, 42P4 y 60I1 superando al Control (en 9,01; 8,39 y 8,06%, respectivamente). Los frutos con mayor diámetro se encontraron en los tratamientos 64S1, 42P4 y 53F con aumentos de 9,14; 7,47 y

6,16% respectivamente, con respecto al Control. Los frutos con mayor peso seco correspondieron a los tratamientos Fertilizado, 42P4, 60I1 y 53F con aumentos que superaron al Control (67,42; 44,88; 42,42 y 37,50% respectivamente).

Los resultados encontrados en esta tesis están validando la efectividad de la inoculación con PGPR nativas de Mendoza en pimiento. De acuerdo con estos resultados las cepas más efectivas para incrementar los parámetros del rendimiento fueron 42P4, 60I1, 53F y 64S1. El incremento en el número y el peso de los frutos también ha sido reportado en plantas de fresa inoculadas con cepas PGPR (Ipek et al., 2014; Kurokura et al., 2017).

**Tabla 4.2:** Efecto de las cepas PGPR sobre el rendimiento de plantas de pimiento cultivadas en macetas bajo condiciones de invernáculo. Tratamientos: Fertilizado; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 53F: *Ochrobactrum* 53F y Control (sin bacterias).

Tratamientos	Días a floración	N° Flores/ Planta	N° Frutos/ planta	Largo del fruto	Diámetro del fruto	Peso seco del fruto (g)
<b>Fertilizado</b>	90,00	15,20±1,67a	7,96±0,77a	94,10±4,09a	60,98±2,22b	8,84±1,06a
<b>42P4</b>	90,00	14,36±1,62a	7,20±0,48a	93,57±3,46a	62,86±2,25a	7,65±0,99a
<b>60I1</b>	90,00	14,53±1,54a	7,42±0,53a	93,28±3,85a	60,35±2,20b	7,52±1,04a
<b>64S1</b>	91,00	11,18±1,49b	7,00±0,51a	89,13±2,54ab	63,84±2,91a	6,97±0,98b
<b>53F</b>	90,00	13,15±1,28a	5,98±0,39b	92,56±4,24a	62,11±2,23a	7,26±1,02a
<b>Control</b>	91,00	10,76±1,23b	5,67±0,36b	86,32±3,20b	58,49±1,90c	5,28±0,97c

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas por columna.

### C. Análisis de componentes principales (ACP)

Para evaluar el comportamiento de cada cepa en función de los parámetros evaluados se realizó un ACP seleccionando aquellos componentes principales (CP), que tuvieron valores (V) mayores a uno, como se muestra en la Tabla 4.3, y en cada componente se extrajeron las variables que presentaron un mayor peso, ver Tabla 4.4. El 98% de la variabilidad fue explicada por los primeros cuatro CP. El primer CP explicó el 76%, el segundo CP 12%, el tercero CP 6% y el cuarto CP



el 4%, como se muestra en la Tabla 4.3. Las variables que más contribuyeron a explicar la variabilidad en los CP1 y CP2 se muestran en la Tabla 4.4.

Los autovectores e1 y e2 reportados muestran los coeficientes con que cada variable original fue ponderada para conformar los CP1 y CP2. Las variables que más aportaron para la construcción del CP1 fueron peso seco del fruto, clorofila total, carotenoides, eficiencia del fotosistema II, clorofila total, clorofila a, peso seco aéreo, largo del fruto, peso seco de la raíz, peso seco de hojas, número de frutos e índice de clorofila. Las variables con más importancia para la construcción del CP2 fueron diámetro del fruto, conductancia estomática y número de flores como se muestra en la Tabla 4.4.

**Tabla 4.3.** Autovalores del análisis de componentes principales del efecto de las cepas de PGPR sobre parámetros evaluados en plantas de pimiento cultivadas en macetas bajo condiciones de invernáculo.

Lambda	Valor	Proporción	Proporción acumulada
1	12,85	0,76	0,76
2	2	0,12	0,87
3	0,99	0,06	0,93
4	0,76	0,04	0,98
5	0,4	0,02	1

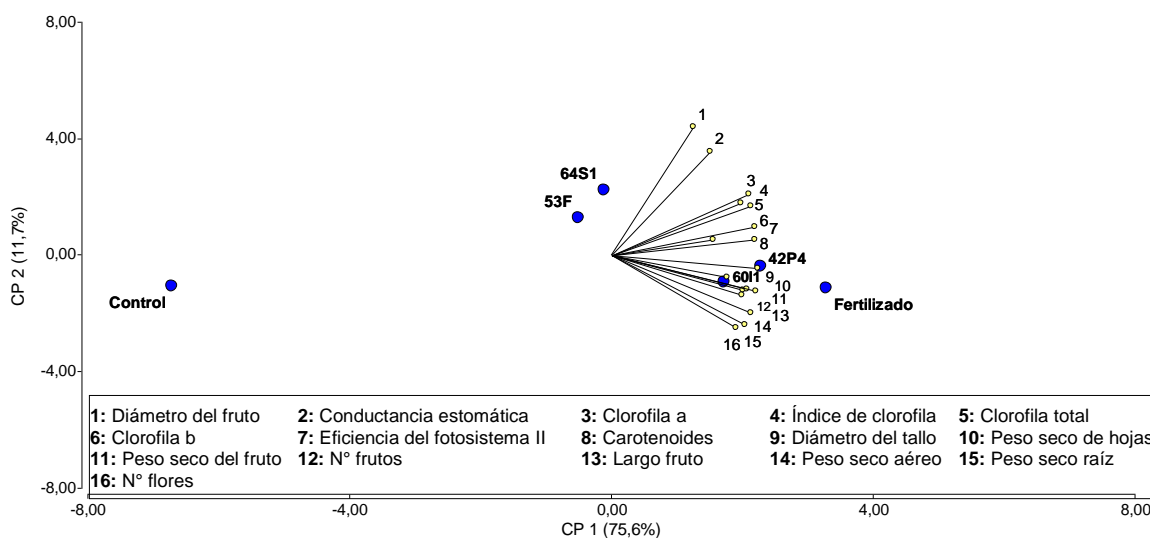
**Tabla 4.4.** Autovectores del análisis de componentes principales del efecto de las cepas de PGPR sobre parámetros evaluados en plantas de pimiento cultivadas en macetas bajo condiciones de invernáculo.

<b>Variables</b>	<b>e1</b>	<b>e2</b>
Peso seco de hojas	<b>0,25</b>	-0,15
Peso seco aéreo	<b>0,26</b>	-0,14
Peso seco raíz	<b>0,25</b>	-0,19
Diámetro del tallo	0,22	-0,1
Conductancia estomática	0,19	<b>0,44</b>
Eficiencia del fotosistema II	<b>0,27</b>	0,06
Índice de clorofila	<b>0,24</b>	0,15
Clorofila a	<b>0,26</b>	0,18
Clorofila b	0,19	0,06
Clorofila total	<b>0,26</b>	0,21
Carotenoides	<b>0,27</b>	-0,06
Compuestos fenólicos totales	<b>0,27</b>	0,12
Número de flores	0,23	<b>-0,31</b>
Número de frutos	<b>0,24</b>	-0,17
Largo del fruto	<b>0,25</b>	-0,14
Diámetro del fruto	0,15	<b>0,54</b>
Peso seco del fruto	<b>0,27</b>	-0,15

Como puede verse en la Figura 4.6, las variables que integran los CP1 y CP2 separan los tratamientos Fertilizado, 42P1 y 60I1 en un grupo, mientras que los tratamientos 53F3 y 64S1 conforman otro grupo y por último se encuentra el tratamiento Control separado de los demás tratamientos. Esto indica que la inoculación con las PGPR 42P4 y 60I1 permiten obtener resultados similares a los encontrados con la fertilización química.

Resultados similares fueron reportados en plantas de *Cannabis sativa* donde la inoculación con las cepas PGPR incrementó el crecimiento de las plantas, el contenido de compuestos fenólicos totales y de cannabinoides obteniendo resultados iguales a los inducidos por la fertilización inorgánica recomendada (Pagnani et al., 2018). Adesemoye et al., (2008) informaron que la inoculación de plantas de maíz con la cepa PGPR *Bacillus* sp. incrementó el rendimiento de granos de forma similar al tratamiento fertilizado con nitrato de amonio. Resultados

similares fueron encontrados en trigo con *Azospirillum* sp. (Turan et al., 2010) y en cártamo (Nosheen et al., 2018).



**Figura 4.6.** Biplot del análisis de componentes principales del efecto de las cepas PGPR sobre parámetros evaluados en plantas de pimienta cultivadas en macetas bajo condiciones de invernáculo. Tratamientos: Fertilizado; 42P4: *Pseudomonas* 42P4; 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 64S1: *Enterobacter* 64S1; 53F: *Ochrobactrum* 53F y Control (sin bacterias). Letras diferentes indican diferencias significativas.

#### D. Efecto de la inoculación con PGPR sobre perfil de compuestos fenólicos de plantas de pimienta

Se evaluaron los cambios en el perfil de compuestos fenólicos entre los tratamientos Control, 60I1, 42P4 y Fertilizado. Se cuantificaron 18 compuestos que se agrupan en cuatro familias según su estructura química: alcoholes fenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenoides, como se muestra en la Tabla 4.5. Los resultados mostraron una mayor concentración de la sumatoria de compuestos fenólicos en las plantas tratadas con 42P4, que no tuvo diferencias significativas con el tratamiento Fertilizado, y ambos se diferenciaron del Control y del tratamiento 60I1.

**Tabla 4.5.** Perfil de compuestos fenólicos observados en plantas de pimiento cultivadas en macetas e inoculadas con las PGPR en estudio. Los resultados cuantitativos están expresados en mg g<sup>-1</sup> de materia seca.

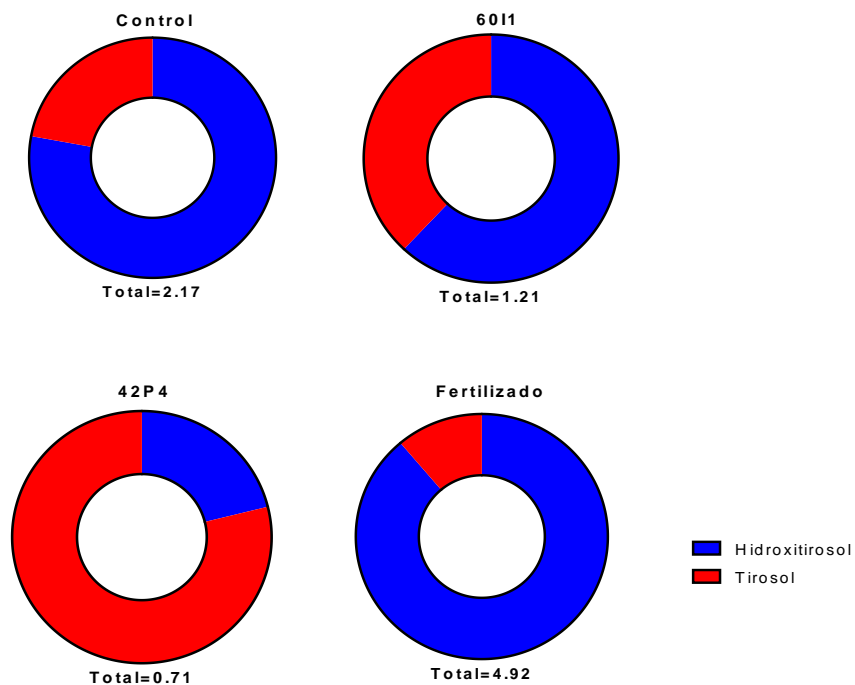
Compuesto	Control	60I1	42P4	Fertilizado
<b>Compuestos fenólicos</b>				
<b>Alcoholes fenólicos simples</b>				
Hidroxitirosol	1,69±0,26b	0,75±0,08c	0,15±0,01c	4,37±0,26a
Tirosol	0,48±0,10a	0,46±0,08a	0,56±0,08a	0,55±0,02a
<b>∑Alcoholes fenólicos simples</b>	<b>2,17±0,27b</b>	<b>1,21±0,11c</b>	<b>0,71±0,08c</b>	<b>4,92±0,26a</b>
<b>Flavonoides</b>				
(+)-Catequina	n,d,*	n,d,*	0,82±0,28	n,d,*
Rutina	0,92±0,28c	0,15±0,01b	2,93±0,03a	2,95±0,08a
(-)-Galato de galocatequina	12,15±1,07c	15,61±2,34b	35,98±2,42a	30,95±2,69a
(-)-Galato de epigalocatequina	4,14±0,25b	0,65±0,06c	8,25±0,23a	0,69±0,06c
Quercetina	0,68±0,16c	0,78±0,09c	15,97±0,31a	11,13±0,36b
Astilbina	n,d,*	n,d,*	8,85±0,96b	25,80±1,69a
Naringina	24,66±0,57c	32,91±1,80b	54,93±3,37a	68,68±3,24a
Naringenina	n,d,*	n,d,*	0,39±0,04	0,36±0,06
Miricetina	3,03±0,23b	2,28±0,19b	10,31±0,96a	11,43±1,28a
Procianidina B1	n,d,*	n,d,*	2,14±1,02	n,d,*
<b>∑Flavonoides</b>	<b>45,58±2,07c</b>	<b>52,38±4,48c</b>	<b>140,55±2,31b</b>	<b>151,99±0,53a</b>
<b>Ácidos fenólicos</b>				
Ácido cinámico	8,31±0,30b	3,35±0,66c	32,07±4,45a	28,92±2,62a
Ácido p-cumárico	0,83±0,57a	0,20±0,02c	0,32±0,10c	0,44±0,00b
Ácido ferúlico	n,d,*	1,95±0,23c	7,24±0,45a	6,60±0,21b
<b>∑Ácidos fenólicos</b>	<b>9,14±0,64b</b>	<b>5,5±0,69c</b>	<b>39,63±4,47a</b>	<b>35,96±2,62a</b>
<b>Estilbenoides</b>				
Polidatina	10,83±1,77a	0,81±0,08c	2,68±0,19b	3,62±0,25b
Trans-resveratrol	3,28±0,94b	3,36±0,25b	7,89±2,37a	3,99±0,64b
Pteroesstilbeno	2,05±0,25a	1,89±0,51a	1,40±0,21b	1,63±0,12b
<b>∑Estilbenoides</b>	<b>16,16±2,01a</b>	<b>6,06±0,57c</b>	<b>11,97±2,38b</b>	<b>9,24±0,69b</b>
<b>∑Compuestos fenólicos totales</b>	<b>73,02±5,58b</b>	<b>65,13±5,22b</b>	<b>192,83±0,63a</b>	<b>202,81±3,02a</b>

Letras diferentes indican diferencias significativas (por fila). Los resultados vienen dados por el valor medio (n = 3; tres determinaciones independientes, incluida la extracción y la posterior inyección) ± desviación estándar. \*: no detectable.

Para una mejor interpretación de los resultados se realizaron gráficos circulares para cada una de las familias de compuestos fenólicos estudiadas, es decir alcoholes fenólicos simples, flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenoides. En este tipo de gráficos cada porción representa la abundancia de un compuesto fenólico dentro de cada familia.

En plantas cultivadas en condiciones de invernáculo, la mayor concentración de alcoholes fenólicos simples (hidroxitirosol y tirosol) se encontró en el tratamiento Fertilizado ( $4,92 \text{ mg g}^{-1}$ ), seguido por el Control ( $2,17 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que los tratamientos de inoculación mostraron un comportamiento similar sin diferencias significativas, como se muestra en la Tabla 4.5.

En la Figura 4.7, donde podemos observar la presencia relativa de cada compuesto, siendo el más abundante el hidroxitirosol ( $4,37 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que la menor concentración del mismo se encontró en el tratamiento 42P4 ( $0,15 \text{ mg g}^{-1}$ ). No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de tirosol entre los tratamientos; sin embargo, en el tratamiento 42P4 el tirosol fue más abundante que el hidroxitirosol.



**Figura 4.7:** Contenido de alcoholes fenólicos simples determinados en plantas de pimienta cultivadas en macetas tratadas con las PGPR en estudio. Tratamientos: Control (sin bacterias); 6011: *Cellulosimicrobium* 6011; 42P4: *Pseudomonas* 42P4 y Fertilizado.

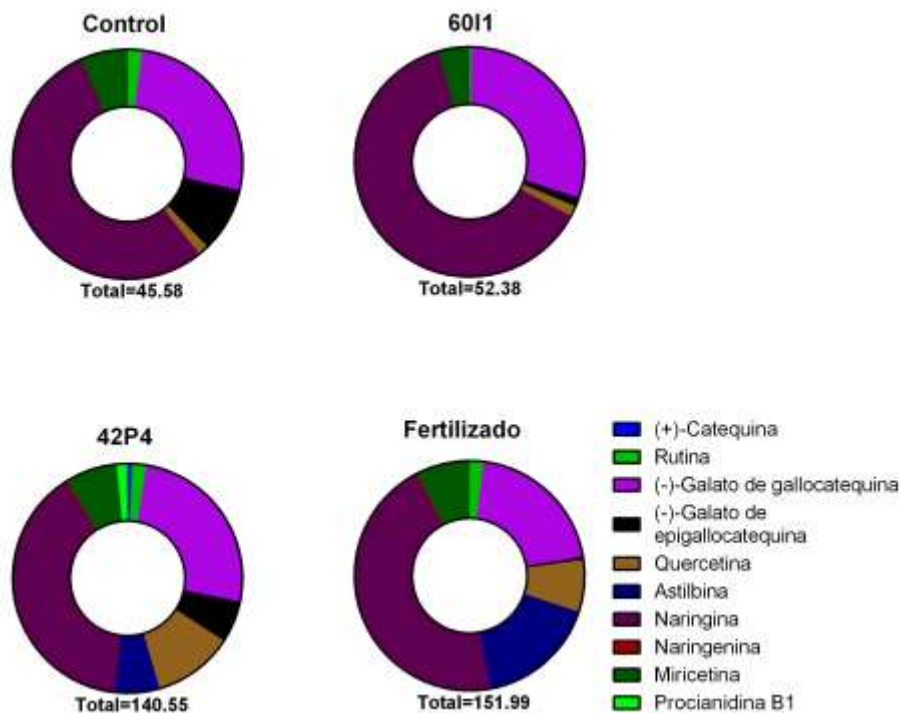
En la familia de los flavonoides, se identificaron y cuantificaron los siguientes compuestos: (+)-catequina, rutina, (-)-galato de galocatequina, (-)-galato de epigallocatequina, quercetina, astilbina, naringina, naringenina, miricetina y procianidina B1. Los perfiles de flavonoides fueron diferentes para cada tratamiento. La mayor concentración de flavonoides totales la presentó el tratamiento Fertilizado (152,71 mg g<sup>-1</sup>) que se diferenció del resto de los tratamientos, seguido por el 42P4 (140,55 mg g<sup>-1</sup>), el 6011 (52,38 mg g<sup>-1</sup>) y Control (45,58 mg g<sup>-1</sup>).

Como se muestra en la Figura 4.8 los niveles más altos en esta familia correspondieron a la naringina en los tratamientos Fertilizado (68,68 mg g<sup>-1</sup>) y 42P4 (54,93 mg g<sup>-1</sup>). En esta investigación los compuestos más abundantes en el

Control fueron también la naringina y (-)-galato de galocatequina. En el tratamiento inoculado con 60I1 los compuestos más abundantes fueron también la naringina y (-)-galato de galocatequina. Mientras que en los tratamientos 42P4 y Fertilizado fueron (-)-galato de galocatequina, quercetina y miricetina. Lo que confirma que el tratamiento inoculado con la cepa 42P4 se comportan de forma similar al tratamiento Fertilizado que son los que presentan mayor concentración y variedad de estos compuestos.

En este estudio la abundancia de flavonoides en las plantas inoculadas con la cepa 42P4 puede estar relacionada con una efectiva colonización del sistema radical por parte de las bacterias. Está bien documentado el rol de los flavonoides en la señalización que media la colonización de las raíces por las PGPR (Mierziak et al., 2014). Se han reportado incrementos en los niveles de flavonoides en plantas inoculadas de maíz estresadas por cromo (Islam et al., 2016) y en plantas de tomate estresadas por cadmio (Khanna et al., 2019).

En esta investigación, los altos niveles de quercetina y naringenina en el tratamiento 42P4 parecen indicar que las plantas de pimiento acumulan este compuesto en las hojas, mientras que en los demás tratamientos no inoculados es posible que la quercetina esté siendo exudada por la raíces. Otros autores han encontrado un comportamiento similar en plantas de soja en presencia de la PGPR *Chryseobacterium balustinum* (Dardanelli et al., 2010).



**Figura 4.8:** Contenido de flavonoides cuantificados en plantas de pimienta cultivadas en macetas tratadas con las PGPR en estudio. Tratamientos: Control (sin bacterias); 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 42P4: *Pseudomonas* 42P4 y Fertilizado.

Como ácidos fenólicos, se cuantificaron ácido cinámico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico. La mayor concentración total de ácidos fenólicos fue cuantificada en el tratamiento 42P4 (39,63 mg g<sup>-1</sup>) que no se diferenció del Fertilizado (35,96 mg g<sup>-1</sup>), seguido por el Control (9,14 mg g<sup>-1</sup>) y 60I1 (5,5 mg g<sup>-1</sup>) como se muestra en la Figura 4.9. Estos compuestos pueden actuar como potentes antifúngicos mejorando la respuesta de las plantas de pimienta frente al ataque de fitopatógenos. Estos resultados concuerdan, con estudios realizados en condiciones *in vitro* donde observaron incrementos en estos compuestos al enfrentar cepas de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* en presencia del patógeno *Sclerotium rolfsii*, el cual es un importante fitopatógeno en cultivos de pimienta (Singh et al., 2012). *P. fluorescens* incremento 19,5 veces los niveles de ácido cinámico en plantas inoculadas de *Cicer arietinum* para controlar la infección de *Sclerotium rolfsii* (Sarma et al., 2002). Resultados similares han sido encontrados



en plantas de membrillo inoculadas con la PGPR *Microccucuce yunnanensis* (Rahimi et al., 2020).

Los tratamientos 42P4 y Fertilizado mostraron altas concentraciones de ácido cinámico y ferúlico, ambos compuestos tienen actividad antifúngica. En el tratamiento 60I1 también se detectó la presencia de ácido ferúlico, mientras que en el Control no fue detectado. Si bien en el Control se encontró la mayor concentración de ácido p-cumárico ( $0,83 \text{ mg g}^{-1}$ ) estos niveles están en muy pequeñas concentraciones si los comparamos con los otros ácidos fenólicos.

En este estudio, el tratamiento inoculado con la cepa 42P4 presentó la mayor concentración de ácido ferúlico. En otro estudio Sarma & Singh (2003) reportaron que dentro los ácidos fenólicos, el ácido ferúlico es el más importante con acción antifúngica contra *Sclerotium rolfsii* (Sarma & Singh, 2003). La presencia de ácido ferúlico indica que las PGPR no solo promueven el crecimiento, sino que además inhiben la entrada de fitopatógenos y tienen la capacidad de inducir resistencia en las plantas (Singh et al., 2012).



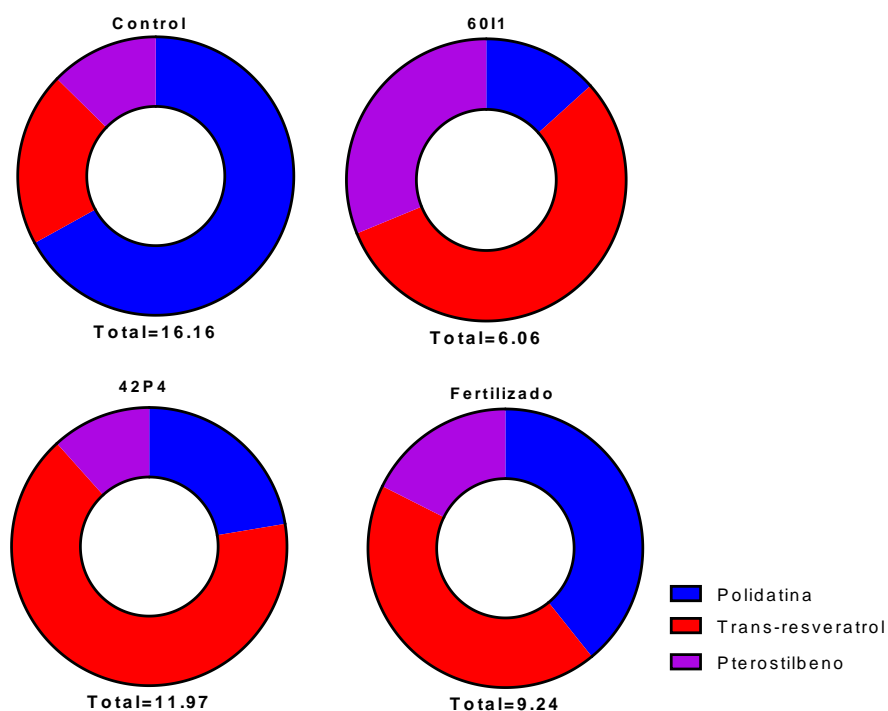
**Figura 4.9:** Contenido de ácidos fenólicos cuantificados en plantas de pimienta cultivadas en macetas tratadas con las PGPR en estudio. Tratamientos: Control (sin bacterias); 6011: *Cellulosimicrobium* 6011; 42P4: *Pseudomonas* 42P4 y Fertilizado.

En la familia de los estilbenoides se cuantificaron polidatina, trans-resveratrol y pterostilbeno. La mayor concentración de estilbenoides se encontró en el tratamiento Control (16,16 mg g<sup>-1</sup>) que se diferenció significativamente del tratamiento 42P4 (11,97 mg g<sup>-1</sup>) y del Fertilizado (9,24 mg g<sup>-1</sup>) que fueron similares; y ambos se diferenciaron del tratamiento 6011 (6,06 mg g<sup>-1</sup>) como se muestra en la Tabla 4.5. La concentración total de estilbenoides mostró un comportamiento similar en los tratamientos 42P4 y Fertilizado como se muestra en la Figura 4.10. En el Control el compuesto más abundante fue la polidatina, mientras que en el tratamiento 42P4 fue el trans-resveratrol.

En este estudio las mayores concentraciones de trans-resveratrol en el tratamiento 42P4 pueden estar beneficiando la sanidad de las plantas de pimienta. Trans-resveratrol interviene en la respuesta de las plantas frente al ataque de hongos,

además a partir del trans-resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) se produce la síntesis de otros estilbenoides de gran importancia como piceidos y pterostilbenos que son, respectivamente glucósidos y dimetilados derivados del resveratrol, los cuales contribuyen con el sistema de defensas de las plantas (Wani et al., 2018).

Resultados similares se reportaron en otra investigación donde plantas de vid inoculadas con *Paraburkholderia phytofirmans* modulan los niveles de estilbenoides (Miotto-Vilanova et al., 2019).



**Figura 4.10:** Contenido de estilbenoides cuantificados en plantas de pimiento cultivadas en macetas tratadas con las PGPR en estudio. Tratamientos: Control (sin bacterias); 6011: *Cellulosimicrobium* 6011; 42P4: *Pseudomonas* 42P4 y Fertilizado.

Con los resultados encontrados en este capítulo se puede resumir que las PGPR nativas inoculadas sobre plantines de pimiento Calafyuco INTA bajo condiciones de invernáculo incrementan el crecimiento de la planta, el diámetro del tallo, el área foliar, el contenido de clorofila a y total, la eficiencia del fotosistema II y los parámetros relacionados con el componente rendimiento. Los resultados

obtenidos sugieren que la inoculación de plantas de pimiento con PGPR modifican el perfil de los compuestos fenólicos y los cambios encontrados dependen de la cepa bacteriana. *Pseudomonas* 42P4 mostró los mayores incrementos de compuestos fenólicos mostrando un comportamiento similar al tratamiento Fertilizado. Para confirmar la efectividad de las cepas se decidió realizar un estudio en invernáculo en condiciones de salinidad para evaluar si estos compuestos estaban involucrados en la respuesta frente a estrés abiótico.

## **CAPITULO 5: Evaluación del efecto del estrés salino en plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR nativas**

### **I. Introducción**

La salinidad de los suelos se encuentra entre los principales factores abióticos que causan estrés en las plantas. Una alta concentración de sales en la zona de las raíces afecta a la mayoría de las funciones limitando la acumulación de biomasa y disminuyendo considerablemente la productividad de los cultivos. La sensibilidad de las plantas a la salinidad es muy variable y depende de la capacidad para desarrollar mecanismos fisiológicos que ayuden a disminuir los efectos deletéreos de las sales (Hussein et al., 2010; Giorio et al., 2020).

Las respuestas de las plantas al estrés por cloruro de sodio (NaCl) incluyen la exclusión y compartimentación del sodio y el cloruro (Wu, 2018). Así como la activación de diversos mecanismos que regulan la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (Roy, 2014). De igual forma, el ajuste hormonal facilita la defensa de las plantas al estrés salino. No obstante, la mayor parte de las investigaciones de salinidad se centran en el efecto del NaCl y existen menos estudios sobre el efecto de otras sales que también afectan el desarrollo de las plantas.

No existe un consenso con respecto a la capacidad de tolerancia del pimiento al estrés salino. En la década de 1990 el pimiento era considerado un cultivo moderadamente sensible a la salinidad (Maas, 1990). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que existe un rango amplio de tolerancia a la salinidad en diferentes cultivares de *Capsicum annuum* (Chartzoulakis & Klapaki, 2000; Ruggiero et al., 2019; Giorio et al., 2020). El desarrollo de variedades

mejoradas tolerantes a la salinidad es imperativo en los programas de mejoramiento genético, sin embargo, a pesar de los grandes avances en los campos de la genética y la biología molecular, solo unos pocos determinantes genéticos importantes de la tolerancia a la salinidad han sido identificados, por lo cual la liberación comercial de variedades tolerantes ha sido limitada (Munns & Tester, 2008; Schubert et al., 2009; Hahm et al., 2017). Por consiguiente, es necesario estudiar otras alternativas para abordar la tolerancia a la salinidad que facilite el cultivo de pimiento en suelos afectados.

El cultivar de pimiento Calafyuco INTA es una variedad mejorada que tiene una amplia aceptación por parte de los horticultores de Mendoza, particularmente por su resistencia a *Phytophthora capsici*, un importante patógeno en cultivos de pimiento. Algunos autores han sugerido que los mecanismos que regulan la respuesta al estrés salino son menos eficientes en las variedades mejoradas de uso comercial con respecto a parientes silvestres o variedades locales que no han sido cultivadas por rasgos comerciales (Morton et al., 2019). Esto se encuentra asociado a que en el proceso de mejoramiento se ha favorecido la selección de rasgos asociados al alto rendimiento en detrimento de la resiliencia ante condiciones de estrés salino (Fita et al., 2015; Giorio et al., 2020). Sin embargo, no existe reporte en la literatura respecto al comportamiento del cv. Calafyuco INTA a la salinidad.

Recientemente se ha considerado el uso de PGPR como una herramienta para mejorar la respuesta de las plantas al estrés salino. Los distintos mecanismos para la promoción del crecimiento, la estimulación de la producción de solutos compatibles y la disminución de los daños asociados a la peroxidación de lípidos de las membranas celulares, son algunos de los beneficios más destacados de las PGPR inoculadas en plantas sometidas a estrés por salinidad (Dehghani Bidgoli et al., 2019; Bharti & Barnawal, 2019; Bhat et al., 2020). Sin embargo, se desconoce el rol que juegan otros metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos en la interacción planta-salinidad-rizobacteria.

En este contexto, mejorar la tolerancia de las plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA al estrés salino sería un paso importante para facilitar el cultivo en zonas afectadas por la salinidad en la provincia de Mendoza. Por este motivo, el objetivo de este capítulo fue estudiar los cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, profundizando en el estudio del perfil de compuestos fenólicos, producidos por el estrés salino sobre plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR nativas.

## II. Objetivo específico

4. Evaluar bajo condiciones de estrés salino el crecimiento, los cambios bioquímicos, fisiológicos y en el perfil de compuestos fenólicos de las plantas de pimiento Calahorra (cv. Calafyuco INTA) inoculadas con las cepas de PGPR más promisorias.

## III. Hipótesis

4. Las PGPR promueven la tolerancia de plantas de pimiento sometidas a estrés salino por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## IV. Materiales y métodos

**A. Material vegetal:** se emplearon semillas de *Capsicum annuum* cv. Calafyuco INTA gentilmente suministradas por el Dr. Claudio Galmarini (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA-La Consulta).

**B. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal:** las cepas utilizadas fueron: *Cellulosimicrobium* 6011 (6011), *Ochrobactrum* 53F (53F), *Enterobacter* 64S1 (64S1) y *Pseudomonas* 42P4 (42P4). Las rizobacterias se hicieron crecer de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 2 de la presente tesis.

**C. Germinación de las semillas:** las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 20% por 1 min y posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de desinfectante. Las semillas se sembraron en bandejas que contenían sustrato estéril (Kekkila, turba Sphagnum, Finlandia) y se trasladaron al invernáculo. Posteriormente, cuando los plantines presentaron el primer par de hojas verdaderas se inocularon con la cepa correspondiente a cada tratamiento y a los 25 días después de la inoculación se trasplantaron a macetas (30 L) que contenían turba.

**D. Ensayo para evaluar la dosis-respuesta de pimiento cv. Calafyuco INTA a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y sulfato de sodio:** se realizó un ensayo para seleccionar la dosis de cloruro de sodio (NaCl) y sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) adecuada para disminuir su crecimiento y evaluar la respuesta del cv. Calafyuco INTA. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

- T1.** Plantas sin tratar (Control).
- T2.** Plantas tratadas con 100 mM NaCl.
- T3.** Plantas tratadas con 150 mM NaCl.
- T4.** Plantas tratadas con 200 mM NaCl.
- T5.** Plantas tratadas con 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- T6.** Plantas tratadas con 150 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- T7.** Plantas tratadas con 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**D.1. Variables evaluadas en el ensayo de dosis respuesta de pimiento cv. Calafyuco INTA a NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:**

A los 35 días después del trasplante se evaluaron parámetros de crecimiento (altura de la planta, longitud de la raíz, diámetro del tallo, peso seco de la parte aérea y de la raíz), además se calculó el porcentaje de supervivencia de las plantas y el índice de SPAD. Se determinó en hojas el contenido de pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores como fue detallado en el capítulo 3 de esta tesis.



**E. Ensayo para evaluar el efecto de la inoculación con PGPR en plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA sometidas a estrés salino por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** se estableció un diseño completamente aleatorizado de 9 tratamientos, con tres repeticiones de 10 semillas cada uno. Después de la aparición del primer par de hojas verdaderas cada plántula se inoculó con 1000 µL de medio conteniendo la cepa correspondiente al tratamiento. Se aplicó un tratamiento de 100 mL de 150 mM NaCl o 100 mL de 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, para generar el estrés salino deseado (de acuerdo a los ensayos previamente descritos). Los tratamientos fueron los siguientes:

- T1.** Plantas Control.
- T2.** Plantas Control + 150 mM NaCl.
- T3.** Plantas Control + 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- T4.** Plantas inoculadas con 60I1.
- T5.** Plantas inoculadas con 60I1 + 150 mM NaCl.
- T6.** Plantas inoculadas con 60I1 + 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- T7.** Plantas inoculadas con 42P4.
- T8.** Plantas inoculadas con 42P4 + 150 mM NaCl.
- T9.** Plantas inoculadas con 42P4 + 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**E.1. Variables evaluadas en el ensayo de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y sometidas a estrés salino por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** en las plantas inoculadas con las PGPR y sometidas a estrés por salinidad, a los 75 días después de la fecha de siembra, se recolectaron las plantas y se evaluaron parámetros de crecimiento (altura de la planta, longitud de la raíz, peso seco de la parte aérea y de la raíz). Además, se evaluó la conductancia estomática y el índice de SPAD. Se tomaron muestras de hojas para analizar el contenido de nitrógeno, pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores, y determinar el perfil de los compuestos fenólicos como fue detallado en el capítulo 3 de esta tesis. La conductividad eléctrica del sustrato

se determinó usando un conductímetro (OHAUS ST3100M-F) de acuerdo a la metodología descrita por Pérez-Rodríguez et al., 2022.

**E.1.1. Determinación de nitrógeno:** se realizó siguiendo la misma metodología descrita en el Capítulo 3 del presente trabajo de tesis.

**E.1.2. Determinación de MDA:** las determinaciones de MDA se realizaron de acuerdo con el protocolo descrito por Heath & Packer (1968). Se molieron 0,1 g de muestra de hojas, las cuales se procesaron con 1000  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Se centrifugaron a 10000 g durante 5 min. Posteriormente se extrajeron 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de solución de: TCA (20% p/v) + TBA (0,5%). Luego se agitó y se calentó a 95°C durante 25 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 532 nm y 600 nm. Como blanco se utilizó una solución de 0,5% de TBA. Se restó la absorbancia a 600 nm (no específica) a la de 532 nm. La cantidad de MDA presente se calculó con el coeficiente de extinción molar  $155 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**E.1.3. Determinación de prolina:** la medición del contenido de prolina se realizó en un pool de hojas maduras colectadas en el tercio medio de la planta espectrofotométricamente como describe en Bates et al. (1973) con ligeras modificaciones de Berli et al. (2013). Se molieron 0,5 g de muestra con 2,5 mL de una solución de ácido sulfosalicílico al 3% a 4°C y 250 mg de polivinilpolipirrolidona. Se mezclaron y centrifugaron a 10000 g durante 10 min. Se separó el sobrenadante en cada tubo y se agregaron 2 mL de ácido acético glacial y 2 mL de solución de ninhidrina al 2,5%. Posteriormente se incubaron a 100°C durante 1h. Se enfriaron en un baño de hielo. Se agregaron 4 mL de tolueno, se mezcló vigorosamente con un vórtex durante 1 min. Cuando se separaron las fases se recolectó la fase de tolueno y se midió la absorbancia 520 nm en cubetas de vidrio óptico

de 10 mm. Finalmente se hizo una curva de calibración de prolina de 0,01 a 1 mM.

**E.1.4. Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores:** las determinaciones de pigmentos fotosintéticos se realizaron espectrofotométricamente como describió en el capítulo 3 del presente trabajo de tesis.

**E.1.5. Extracción de compuestos fenólicos:** los compuestos fenólicos se extrajeron de acuerdo con el procedimiento previamente descrito en el Capítulo 3.

**E.1.6. Análisis de compuestos fenólicos:** el perfil de compuestos fenólicos en los extractos de hojas de los diferentes tratamientos se realizó utilizando la misma metodología descrita en el Capítulo 3.

**F. Análisis estadístico:** para analizar los efectos de la inoculación, de la salinidad y su interacción se utilizó un ANOVA multifactorial y el test de Duncan para las comparaciones múltiples con un nivel de significancia de 0,05; donde el efecto de la salinidad se representó con (s), la inoculación con (t) y la interacción de estos dos factores como (sxt). Para las medidas repetidas en el tiempo se ajustó un modelo lineal mixto. El modelo incluyó efectos fijos de tratamiento, tiempo y sus interacciones. Como efecto aleatorio se incluyó la unidad experimental. Se utilizó el software estadístico InfoStat (InfoStat versión 2018v. Grupo InfoStat, Argentina). Para la construcción de los gráficos se empleó el software GraphPad Prism 7, San Diego, CA.

## V. Resultados y discusión

### A. Efecto de diferentes dosis de NaCl sobre el crecimiento de pimiento cv. Calafyuco INTA

Debido al desconocimiento del efecto del NaCl sobre el cultivar de pimiento Calafyuco INTA, se realizó un ensayo para determinar el efecto de diferentes dosis de NaCl sobre el desarrollo de las plantas. Los resultados mostraron que el efecto deletéreo del estrés salino inducido por NaCl presentó un efecto dependiente de la dosis como se muestra en la Tabla 5.1.

En todas las variables analizadas se comparó el efecto de las diferentes concentraciones de sal respecto al tratamiento control sin NaCl. En las plantas tratadas con 100, 150 y 200 mM de NaCl se presentó una disminución de la altura del 9; 22 y 26% respectivamente. Una tendencia similar se encontró en el diámetro del tallo el cual disminuyó 13; 16 y 20% respectivamente, en las plantas tratadas con 100, 150 y 200 mM de NaCl mientras que el número de hojas disminuyó un 9; 20 y 22% respectivamente. La longitud de la raíz solo se vio afectada por el tratamiento con 150 y 200 mM de NaCl disminuyendo su crecimiento un 17 y 25% respectivamente. Los tratamientos con 100, 150 y 200 mM de NaCl disminuyeron el índice de SPAD en 26; 27 y 37% respectivamente y el porcentaje de supervivencia disminuyó 20; 40 y 80% respectivamente.

Durante el ensayo pudo observarse que el aumento de la dosis de NaCl se correlacionó de forma directa con la aparición de efectos negativos más acentuados en el crecimiento y la fisiología de las plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA. Resultados similares han sido reportados en otras variedades de pimiento sometidas a estrés por diferentes dosis de NaCl, donde la respuesta negativa del tratamiento con sal en estos trabajos también ha sido dependiente de la dosis de sal aplicada, aumentando los efectos deletéreos con el incremento en

la concentración de la sal (Kaouther et al., 2013; Giuffrida et al., 2014; Hassen et al., 2014).

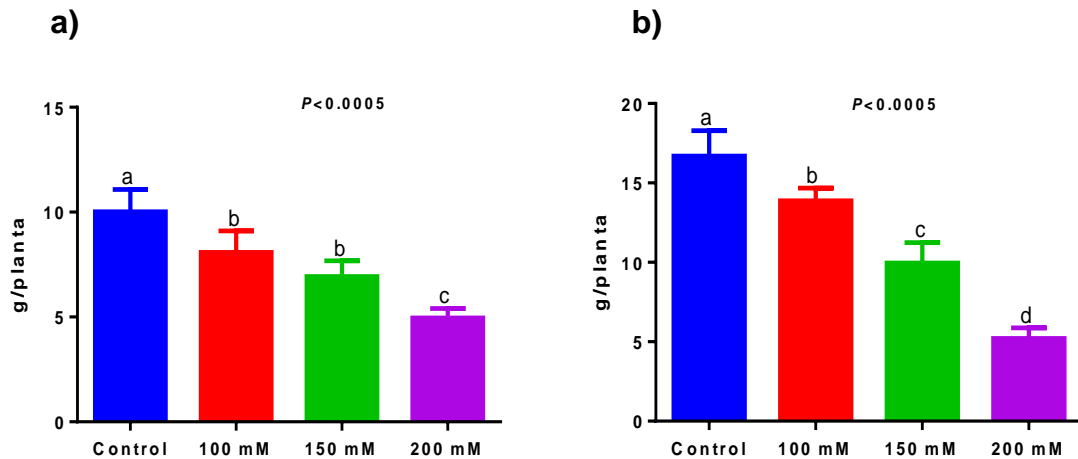
El efecto adverso del NaCl sobre la altura de la planta, el diámetro del tallo, la longitud de la raíz y el porcentaje de supervivencia ha sido reportado en diferentes especies de interés hortícolas incluido el pimiento (Bellache et al., 2022; Hernández-Salinas et al., 2022; Irakoze et al., 2022). Los resultados encontrados en esta tesis muestran que la disminución del índice de SPAD es un factor determinante de los efectos negativos del NaCl sobre el pimiento cv. Calafyuco INTA, la disminución del contenido de clorofila genera un desbalance nutricional que frena el crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo el efecto más notorio con aplicaciones de 200 mM de NaCl donde la capacidad de respuesta del sistema de defensas de la planta se ve superado por el estrés, lo que desencadena la necrosis de las hojas y finalmente la muerte de las plantas.

**Tabla 5.1.** Efectos de diferentes dosis de NaCl sobre el desarrollo y la supervivencia de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA.

Parámetros evaluados	Tratamiento NaCl (mM)			
	0	100	150	200
Conductividad eléctrica (ms/cm)	2,33	5,20	7,27	12,26
Altura (cm)	7,55±0,88a	6,83±0,29b	5,90±0,56c	5,58±0,48c
Diámetro tallo (mm)	3,31±0,23a	2,87±0,17b	2,75±0,09bc	2,65±0,19c
Hoja/Planta	8,00±0,00a	7,25±0,45b	6,40±0,51c	6,25±0,87c
Longitud raíz (cm)	25,25±2,65a	25,20±1,42a	20,83±1,97b	18,80±6,33b
SPAD	34,63±0,90a	25,70±1,26b	25,33±2,71b	22,03±2,42c
% Supervivencia	100	80	60	20

Letras diferentes indican diferencias significativas por columna.

Los tratamientos con 100, 150 y 200 mM de NaCl disminuyeron el peso seco de la raíz en 19,3; 30,8 y 50,6% respectivamente, y el peso seco aéreo de las plantas en 16,9; 40,3 y 68,8% respectivamente, con respecto al Control como se puede observar en la Figura 5.1.



**Figura 5.1.** Efecto de los diferentes tratamientos de estrés con NaCl sobre: **a)** peso seco de la raíz y **b)** peso seco de la parte aérea de plantas de pimienta cv. Calafyuco INTA. Tratamientos: Control (0 Mm), 100, 150 y 200 mM de NaCl. Letras diferentes indican diferencias significativas.

En esta tesis la producción de biomasa se vio seriamente afectada por el tratamiento con NaCl como se puede observar en la Figura 5.2. El efecto más negativo se produjo por el tratamiento con 200 mM de NaCl, el cual ocasionó una fuerte clorosis en las hojas, acompañada de una pérdida generalizada de la turgencia y la detención del crecimiento. El efecto negativo del NaCl en la producción de biomasa de raíces y hojas ha sido demostrado en otras solanáceas, acompañado de una reducción importante en la absorción de iones  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  (Rajput et al., 2013; Ben Abdallah et al., 2016; Jha & Subramanian, 2016; Sapre et al., 2022).



**Figura 5.2.** Plantas de pimienta cv. Calafyuco INTA sometidas a estrés por NaCl. Tratamientos: a) Control: 0 mM, b) 100 mM, c) 150 mM y d) 200 mM de NaCl.

### **B. Efecto de diferentes dosis de $\text{Na}_2\text{SO}_4$ sobre el crecimiento de pimienta cv. Calafyuco INTA**

Existen trabajos sobre el efecto del NaCl en diferentes cultivos; sin embargo, se conoce menos sobre el efecto de otras sales (Irakoze et al., 2022). El caso del pimienta no es la excepción, por consiguiente, se realizó un experimento para documentar el efecto del  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en plantas de pimienta cv. Calafyuco INTA. En particular se incorporó la evaluación de parámetros bioquímicos y fisiológicos en plantas de pimienta cv. Calafyuco INTA inoculados con PGPR nativas sometidas a estrés por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Para poder avanzar con este propósito fue necesario determinar en primera instancia la dosis de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  que disminuyera el crecimiento de la planta sin ocasionarle la muerte, para continuar con los ensayos con rizobacterias.

En este contexto, los resultados muestran que el efecto deletéreo del  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  es menos acentuado con respecto al estrés por NaCl. Se necesitó la aplicación de

200 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para observar efectos adversos marcados en las plantas de pimiento.

Los resultados mostraron que el efecto negativo del estrés salino inducido por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> presentó un efecto dependiente de la dosis. En términos generales la aplicación de 100 o 150 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no mostraron diferencias significativas entre sí en la mayoría de los parámetros evaluados, como se muestra en la Tabla 5.2. Las plantas tratadas con 100, 150 y 200 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> presentaron una disminución de la altura del 9,4; 15,9 y 32,1% respectivamente, con respecto al Control sin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El diámetro del tallo en las plantas tratadas con 100 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> disminuyó en un 16,0% con respecto al Control, mientras que no se encontraron diferencias entre 150 y 200 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ocasionando una disminución del 26,5% con respecto al Control. En relación al número de hojas por planta no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el Control. La longitud de la raíz en las plantas tratadas con 100 y 150 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se diferenciaron estadísticamente, disminuyendo la longitud de la raíz en un 27,5 y 31,0% respectivamente, con respecto al Control. Mientras que en las plantas tratadas con 200 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> la disminución fue del 44,9%.

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en el índice de SPAD en las plantas tratadas con 100 y 150 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> donde la disminución fue del 17,5 y 20,0% respectivamente, con respecto al Control. El efecto más nocivo sobre el índice de SPAD se encontró con 200 Mm de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con una disminución de 27,0%. El porcentaje de supervivencia no se vio afectado por ninguno de los tratamientos.

En este estudio se vio un efecto adverso acentuado sobre las plantas de pimiento con la dosis de 200 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, esto está directamente relacionado con una acumulación excesiva de sodio en el sustrato que limita la absorción de nitrógeno y otros nutrientes de gran importancia para el desarrollo de las plantas. Con dosis menores a 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> los mecanismos involucrados en la tolerancia al estrés en las plantas de pimiento parecen funcionar de forma efectiva para disminuir los efectos nocivos de la salinidad. Sin embargo, al comparar el porcentaje de



supervivencia entre 200 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 200 mM NaCl queda claro que el efecto de esta última sal es muy marcado ocasionando la muerte de todas las plantas, mientras que el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no afecta el porcentaje de supervivencia de pimiento cv. Calafyuco INTA. Esto posiblemente se debe a que en 200 mM de NaCl se encuentran 79 mM de sodio, mientras que en 200 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> están presente 65 mM del mismo, por lo que la planta está expuesta a una menor concentración de Na. Además, debemos tener en cuenta que el contraión del NaCl (Cl<sup>-</sup>) ejerce un efecto de toxicidad sobre la planta.

Resultados similares han sido reportados en otras especies de solanáceas como el tomate, en las que el efecto del NaCl fue más nocivo que el del Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Abbad et al., 2019). Sin embargo, otros estudios señalan que el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es más limitante para el crecimiento que el NaCl en algunas especies de plantas como la cebada, el trigo, la caña de azúcar y la remolacha (Reginato et al., 2021).

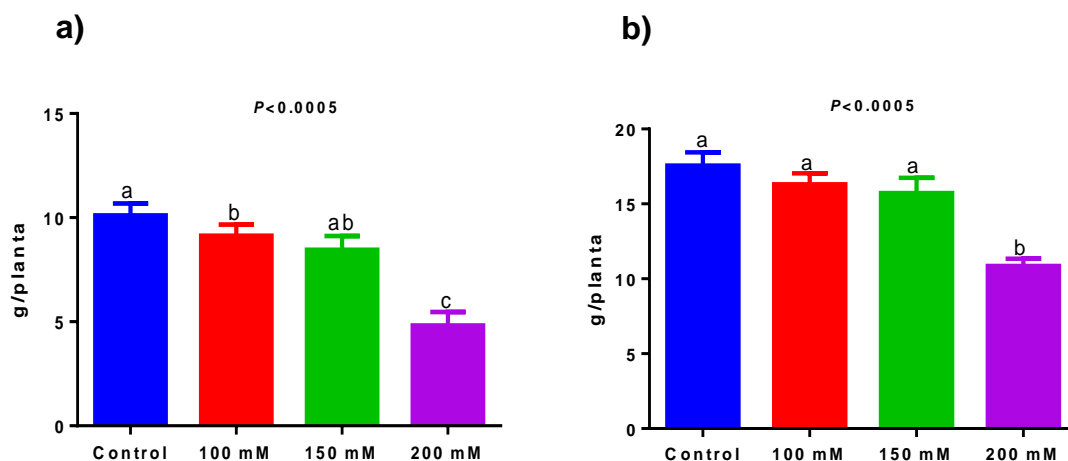
**Tabla 5.2.** Efectos de diferentes dosis de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre el desarrollo y la supervivencia de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA.

Parámetros evaluados	Tratamiento Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mM)			
	0	100	150	200
Conductividad eléctrica (ms/cm)	2,15	4,50	6,48	8,24
Altura (cm)	20,11±3,41a	18,23±3,09ab	16,92±3,47b	13,65±2,16c
Diámetro tallo (mm)	3,89±0,15a	3,27±0,27b	2,86±0,06c	2,86±0,06c
Hoja/Planta	8,60±0,50a	8,10±0,68a	8,00±0,00a	7,90±0,41a
Longitud raíz (cm)	37,97±1,13a	27,54±0,75b	26,19±0,98b	20,92±0,42c
SPAD	45,50±1,32a	37,52±0,69b	36,40±0,73b	33,37±1,04c
% Supervivencia	100	100	100	100

Letras diferentes indican diferencias significativas por columna.

El tratamiento con 100, 150 y 200 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> disminuyó el peso seco de la raíz en 10; 16 y 52% respectivamente. El peso seco aéreo de las plantas tratadas con 100 y 150 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no presentaron diferencias con respecto al Control,

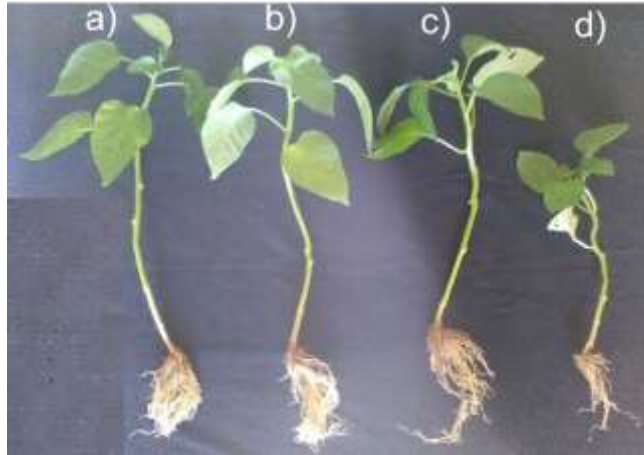
mientras que el tratamiento con 200 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  disminuyó en 38,2%, como se puede observar en la Figura 5.3.



**Figura 5.3.** Efecto del tratamiento de estrés con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sobre **a)** peso seco de la raíz y **b)** peso seco de la parte aérea de plantas de pimienta cv. Calafyuco INTA. Tratamientos: Control: (0 mM), 100, 150 y 200 mM de  $\text{NaCl}$ . Letras diferentes indican diferencias significativas.

Como puede observarse en la Figura 5.4, la producción de biomasa solo se vio afectada por el tratamiento con 200 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Las plantas tratadas con esta dosis presentaron un menor tamaño y el desarrollo de sus hojas fue bastante limitado. En este estudio las perturbaciones en el metabolismo de las plantas asociadas al sodio aportado por altas dosis de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  detienen el crecimiento de las plantas, las cuales frenan el desarrollo aéreo y radical.

Este retraso del crecimiento se presenta debido a que las plantas desvían sus rutas metabólicas antes enfocadas en el desarrollo para activar mecanismos de defensa que les permitan sobrevivir bajo las condiciones adversas impuestas por la salinidad. Resultados similares han sido documentados en plantas de otras especies de interés agronómico bajo estrés por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  como albahaca (*Ocimum basilicum*), *Jatropha curcas* y *Brassica rapa* (Tarchoune et al., 2013; Kumar et al., 2015; Aghajanzadeh et al., 2018).



**Figura 5.4.** Plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA sometidas a estrés por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Tratamientos: **a)** Control (0 mM), **b)** 100 mM, **c)** 150 mM y **d)** 200 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Teniendo en cuenta los resultados encontrados al evaluar las diferentes dosis de  $\text{NaCl}$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  sobre plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA, se determinó que las dosis óptimas para evaluar el efecto de la inoculación con PGPR en plantas de pimiento sometidas a estrés salino son de 150 mM de  $\text{NaCl}$  y 200 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Estas dosis producen un estrés de moderado a severo en las plantas limitando su crecimiento y desarrollo en el tiempo de forma progresiva, lo que permitiría evaluar el posible efecto positivo de la inoculación con PGPR en condiciones de estrés salino.

### **C. Efectos del estrés salino por $\text{NaCl}$ y $\text{Na}_2\text{SO}_4$ sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR**

El estrés severo disminuyó los parámetros evaluados como se muestra en la Tabla 5.3. La altura de la planta disminuyó con el tratamiento de 150 mM  $\text{NaCl}$  y 200 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , mientras que con la inoculación se observó un incremento en la situación sin estrés y en las situaciones de estrés salino este parámetro no fue afectado, lo que indica que la inoculación está disminuyendo los síntomas negativos del estrés.

La longitud de la raíz disminuyó en las plantas Control tratadas con 150 mM NaCl y 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sin embargo, en las plantas inoculadas sin estrés este parámetro incrementó, y bajo el estrés por las sales, el parámetro no se vio afectado, como se muestra en la Tabla 5.3. Una tendencia similar se observó para el peso seco aéreo y el de la raíz, en los cuales la inoculación incrementó estos parámetros tanto en la situación de estrés como sin estrés con respecto al Control que no fue inoculado.

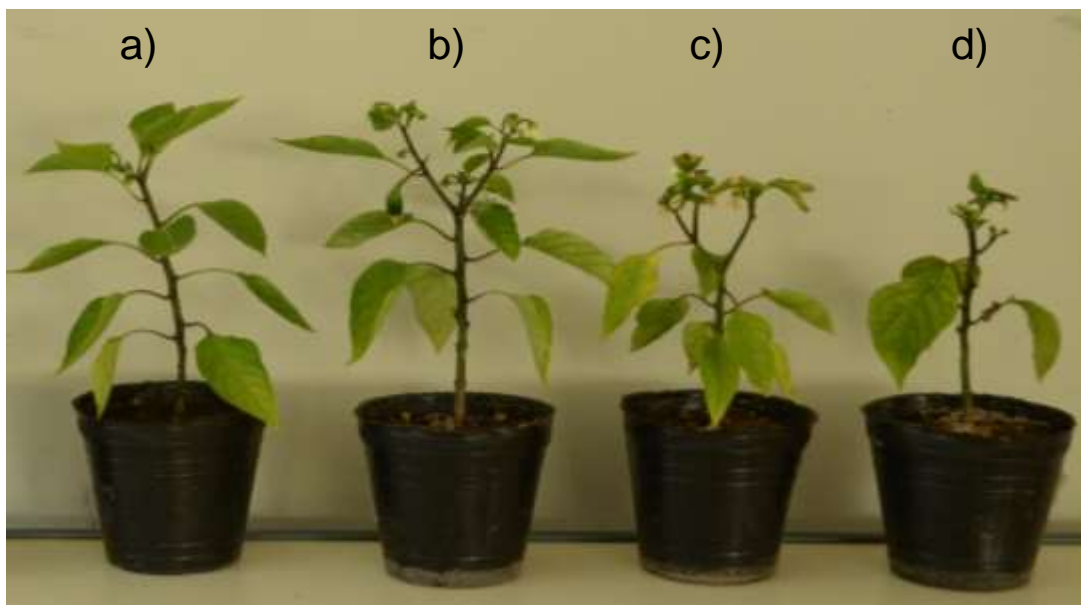
**Tabla 5.3.** Efecto de la salinidad inducida por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de pimienta cv. Calafyuco INTA inoculadas con cuatro cepas PGPR nativas de Mendoza.

Concentración de sal	Conductividad eléctrica (mS)	Tratamiento	Altura de la planta (cm)	Longitud de la raíz (cm)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco de la raíz (g)
0 mM NaCl	2,33	Control	30,58b	16,61c	1,53b	0,93b
		42P4	38,6a	26,37a	2,75a	1,36a
		60I1	37,45a	25,43a	2,64a	1,18a
150 mM NaCl	7,27	Control	27,93c	12,07c	1,08b	0,72b
		42P4	30,88b	22,94b	2,25a	1,27a
		60I1	30,62b	21,92b	2,11a	1,15a
200 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8,24	Control	29,85c	14,25	1,24b	0,85b
		42P4	33,28b	24,71a	2,46a	1,34a
		60I1	34,45b	22,91b	2,38a	1,15a
		<i>P</i> (s)	0,8568	0,0466	0,0001	0,0001
		<i>P</i> (t)	0,0079	0,0030	0,0005	0,0001
		<i>P</i> (sxt)	0,3429	0,7382	0,0001	0,0001

Letras diferentes indican diferencias significativas por columna.

En este estudio la inoculación con las PGPR revirtió de forma efectiva los efectos adversos sobre parámetros morfológicos de gran importancia a nivel fisiológico como la longitud de la raíz, esencial para garantizar un buen anclaje a la planta y para garantizar la absorción de agua y nutrientes disponibles en el suelo. Esto puede estar asociado a los mecanismos directos de promoción del crecimiento de las rizobacterias que facilitaron la adquisición de nutrientes esenciales para las plantas como el fósforo o el nitrógeno. La mayor captación de este elemento esencial en las plantas inoculadas se vio reflejado en mayores concentraciones de

clorofila a y total, mayor índice de SPAD y un mejor estado del fotosistema II, lo que facilitó en las plantas inoculadas, un mayor desarrollo aéreo, como se muestra en la Figura 5.5. Esto indica que en las plantas inoculadas las tasas fotosintéticas fueron mayores, por lo cual es de esperar que los fotoasimilados fijados en el proceso de fotosíntesis, posteriormente fueran traslocados a las raíces como fuente de energía, contribuyendo notablemente en su expansión longitudinal.

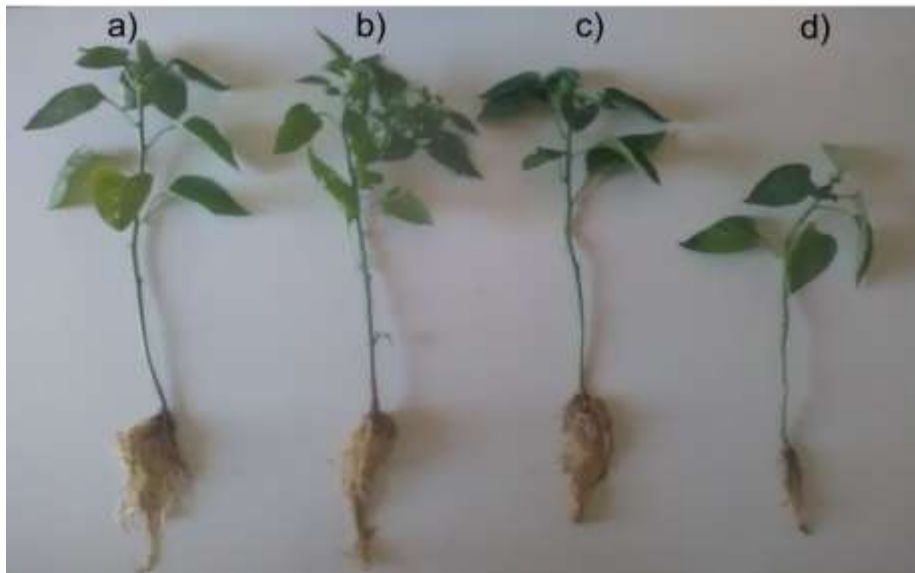


**Figura 5.5.** Plantas de pimienta cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y sometidas a estrés salino por NaCl. Tratamientos: **a)** Control (sin NaCl, sin PGPR), **b)** 42P4 + 150 mM de NaCl, **c)** 60I1 + 150 mM de NaCl y **d)** 150 mM de NaCl (sin PGPR).

De igual forma las cepas PGPR inoculadas en este estudio presentan la capacidad de solubilizar diferentes formas insolubles de fósforo en el suelo, dejándolo disponible para las plantas en las cuales es indispensable para la fotosíntesis, transporte de energía y la expansión celular (Pérez-Rodríguez et al., 2021; Malhotra et al., 2018; Liu, 2021). El fósforo se considera un nutriente esencial para ayudar a que las raíces se desarrollen más rápido y sean más abundantes. Como se ha demostrado a largo de este trabajo de tesis, la inoculación con las PGPR 42P4 y 60I1 además, mejora la disponibilidad de

nitrógeno, con respecto al Control, mejorando además la eficiencia del uso del agua vital bajo condiciones de estrés por salinidad.

Es importante señalar que, aunque en esta investigación no se determinó la capacidad ACC desaminasa de las rizobacterias utilizadas, en otros estudios ha sido bien documentada esta habilidad en distintos géneros de PGPR, por consiguiente, no se descarta que este mecanismo pudiera estar involucrado en la respuesta positiva en el desarrollo de las raíces observado en las plantas inoculadas como se muestra en la Figura 5.6.



**Figura 5.6.** Plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y sometidas a estrés salino por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Tratamientos: **a)** Control (sin  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , sin PGPR), **b)** 42P4 + 150 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , **c)** 6011 + 150 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y **d)** 200 mM de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (sin PGPR).

#### **D. Efectos del estrés salino por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre los pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR**

Los contenidos de clorofila a y clorofila total mostraron un comportamiento similar como se muestra en la Figura 5.7 a y b. Los mayores contenidos de clorofila a se encontraron en los tratamientos inoculados sin estrés salino e inoculados y tratados con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La inoculación con las PGPR revirtió el efecto negativo del NaCl sobre el contenido de clorofila a. En las plantas Control el efecto del NaCl sobre el contenido de clorofilas fue más nocivo que el del Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Los tratamientos inoculados presentaron la mayor concentración de clorofila total con respecto al Control sin estrés salino. No se encontraron diferencias entre las plantas inoculadas con 42P4 y tratadas con NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, no obstante, se diferenciaron del Control sin estrés salino. El contenido de clorofila total fue mayor en plantas inoculadas con 60I1 y tratadas con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con respecto al Control sin estrés salino. La inoculación con la cepa 60I1 disminuyó el efecto nocivo del tratamiento con NaCl.

En esta tesis las mayores concentraciones de clorofila a y clorofila total encontrados en los tratamientos inoculados, indican que las PGPR mitigan el efecto adverso de la salinidad manteniendo en funcionamiento la actividad fotosintética de la planta necesaria para la producción de fotoasimilados. Esto explica por qué las plantas inoculadas también presentaron la mayor acumulación biomasa seca y mayor crecimiento que las no inoculadas como se mostró previamente en las Figuras 5.5 y 5.6. Resultados similares han sido reportados por otros autores en cultivos de arroz, okra, frijol, alfalfa y maíz sometidos a estrés por NaCl (Bal et al., 2013; Habib et al., 2016; Gupta & Pandey, 2019; Tirry et al., 2021; Abbaszadeh-Dahaji et al., 2021).

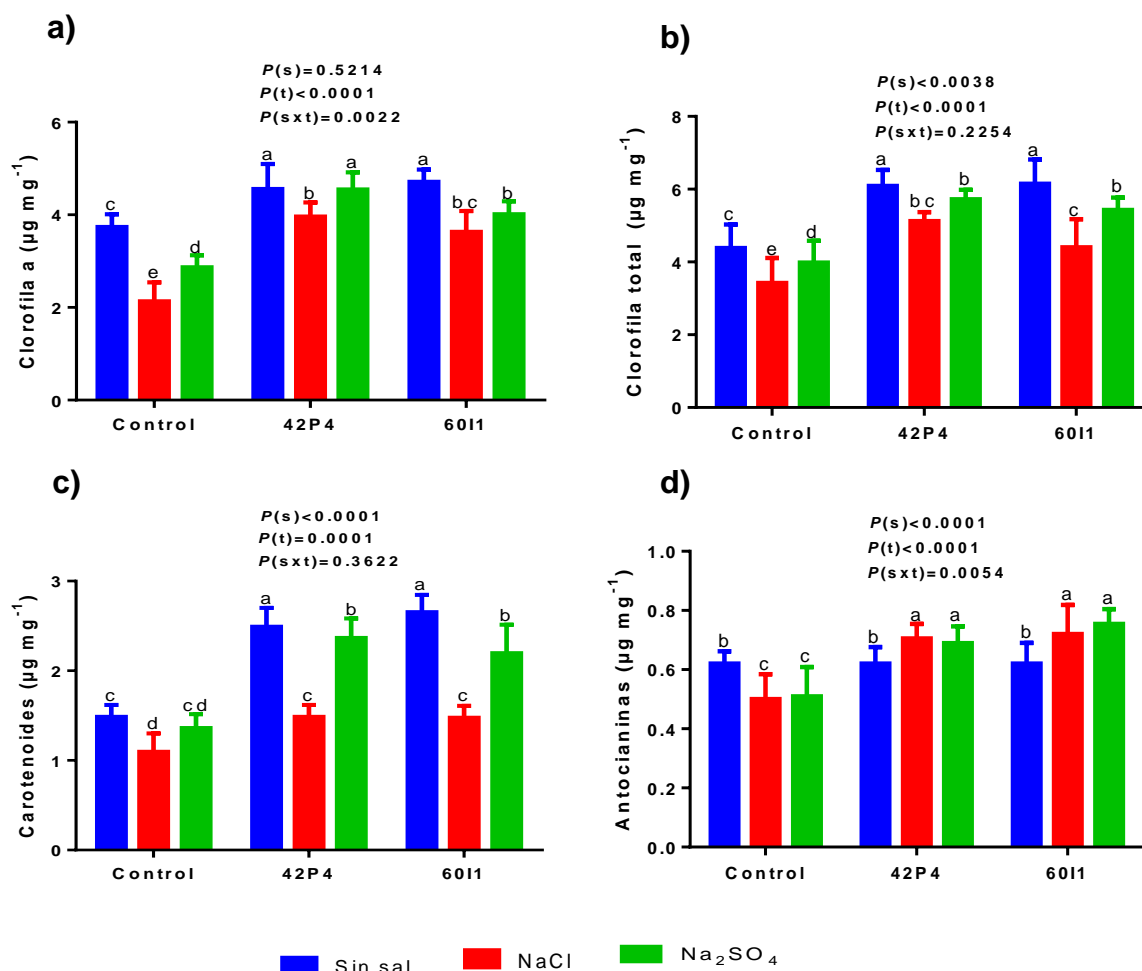
El contenido de carotenoides fue mayor en los tratamientos inoculados con las PGPR con respecto al tratamiento Control como se muestra en la Figura 5.7 c. Los tratamientos inoculados y tratados con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se diferenciaron del tratamiento Control y de los tratamientos inoculados y tratados con NaCl. La inoculación

disminuyó el efecto negativo del NaCl y del Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre el contenido de carotenoides. El efecto más negativo en el tratamiento Control se observó posterior a la inoculación con NaCl.

En este estudio se observó que la mayor concentración de carotenoides en los tratamientos inoculados se puede explicar como un efecto benéfico de las PGPR que inducen un incremento en la producción de carotenoides que desempeñan un rol fundamental como extintores del oxígeno singlete protegiendo a la clorofila de la fotooxidación provocada por el estrés salino, por lo cual el aparato fotosintético de las plantas inoculadas continúa en funcionamiento a pesar de las limitaciones impuestas por la salinidad. Resultados similares han sido reportados en otras investigaciones en las cuales se demuestra que carotenoides liposolubles en los cloroplastos como: tocoferoles, tocotrienoles y plastocromanol-8 desempeñan un rol fundamental frente al estrés oxidativo en las plantas superiores (Ramel et al., 2013; Park et al., 2017; Kumar et al., 2020).

La inoculación con las PGPR disminuyó el efecto nocivo de los tratamientos con NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre el contenido de antocianinas como se muestra en la Figura 5.7 d. Los tratamientos inoculados sin estrés salino mostraron contenidos de antocianinas similares al Control sin salinidad. Los contenidos de antocianinas incrementaron en los tratamientos inoculados con la cepa 42P4 sometidos a estrés por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con respecto al Control sin estrés salino. La inoculación con la cepa 6011 incrementó el contenido de antocianinas bajo estrés por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> superando al tratamiento inoculado sin salinidad. Esto permite inferir que las rizobacterias ayudan a promover el sistema de defensas de la planta protegiendo las células de agentes mutagénicos como las ERO. Resultados similares han sido reportados en diferentes especies de plantas sometidas a estrés salino e inoculados con PGPR como tomate, arabidopsis, apio y acelga (Zameer et al., 2016; Erice et al., 2017; Afzal et al., 2019; Redondo-Gómez et al., 2022).





**Figura 5.7.** Concentración de **a)** clorofila a, **b)** clorofila total, **c)** carotenoides y **d)** antocianinas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y sometidas a estrés salino por NaCl y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

### E. Efectos del estrés salino por NaCl y $\text{Na}_2\text{SO}_4$ sobre el contenido de nitrógeno de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR

De las sales utilizadas en este estudio, el tratamiento con NaCl mostró el efecto más adverso sobre el contenido de nitrógeno en hojas con respecto al  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  tanto en los tratamientos inoculados como en los sin inocular. No obstante, en condiciones sin salinidad y bajo estrés por NaCl y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  el contenido de nitrógeno fue mayor en los tratamientos inoculados con respecto al Control.

Además, sin estrés salino, las plantas inoculadas se diferenciaron del tratamiento Control y en condiciones de salinidad el tratamiento con las bacterias disminuyó el efecto negativo de las sales e igualan el contenido de nitrógeno del Control sin NaCl y con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

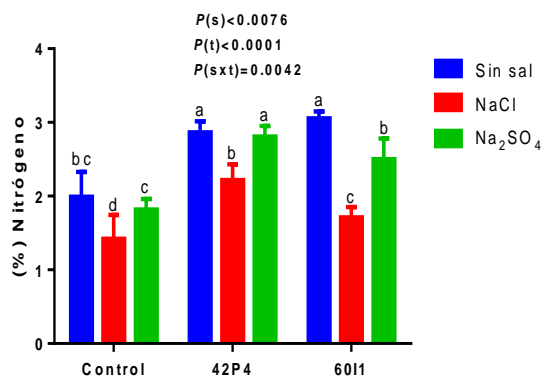
La reducción del contenido de nitrógeno en las hojas de las plantas sometidas a estrés por NaCl está relacionada con que las altas concentraciones de Cl en el suelo inhiben la absorción de nitratos, por lo cual disminuye la fotosíntesis, induciendo clorosis en las hojas y en las situaciones más graves la necrosis con posterior caída de las hojas como se muestra en la Figura 5.8, en las plantas tratadas con 150 mM de NaCl.

El efecto nocivo del sodio aportado por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, está asociado a que el sodio altera el funcionamiento normal de la membrana plasmática desplazando los iones de calcio de los sitios de enlace de la membrana celular, inhibiendo la absorción de potasio. Este tipo de alteraciones repercuten negativamente en la asimilación de nutrientes como el nitrógeno, debido a que el potasio es esencial para la apertura y cierre estomático, proceso esencial para la absorción de agua y nutrientes del suelo.

Por lo recién expuesto, se puede inferir que la disminución del contenido de nitrógeno es mayor en las plantas tratadas con NaCl en comparación con el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Esto se debe a que, en el caso del NaCl la acción conjunta de los iones sodio y cloro, potencian el efecto adverso sobre el metabolismo de la planta. Mientras que en el tratamiento con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> el efecto deletéreo es ejercido en mayor medida por el ión sodio, debido a que el anión sulfato se comporta como un donador de azufre para las plantas, el cual es un nutriente indispensable para la formación de aminoácidos (cisteína, cistina y metionina), coenzimas y otras macromoléculas de gran importancia en la fisiología vegetal.

Aunque es importante mencionar que elevadas concentraciones como las del tratamiento con 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> el anión sulfato limita la capacidad de compartimentación de iones, perturbando el ajuste osmótico, lo que da como

resultado un desequilibrio hídrico y síntomas de toxicidad asociados a la alteración del metabolismo del carbono (Llanes et al., 2013).



**Figura 5.8.** Contenido de nitrógeno en plantas de pimienta cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y sometidas a estrés salino por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tratamientos: Control (sin sal), Control + 150 mM NaCl, Control + 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 42P4 (sin sal), 42P4 + 150 mM NaCl, 42P4 + 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 60I1 (sin sal), 60I1 + 150 mM NaCl y 60I1 + 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

## F. Efectos del estrés salino por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre parámetros fisiológicos medidos *in situ* en plantas de pimienta cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR

El índice de clorofila SPAD incrementó en todos los tratamientos inoculados con y sin estrés salino, diferenciándose del tratamiento Control sin salinidad como se muestra en la Figura 5.9 a. La inoculación con las cepas 42P4 y 60I1 disminuyó el efecto negativo de la salinidad sobre el índice de clorofila en condiciones de estrés por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La cepa 42P4 fue la más efectiva incrementando significativamente el índice de SPAD bajo estrés por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con respecto al tratamiento 60I1 y al Control sin salinidad.

El índice de SPAD es una evaluación *in situ*, no destructiva de la intensidad del verde de la hoja que se encuentra directamente correlacionado con el contenido de nitrógeno y clorofila. Los resultados encontrados en este estudio concuerdan

con las determinaciones bioquímicas de nitrógeno y clorofilas determinadas previamente, reforzando la validez de los resultados expuestos.

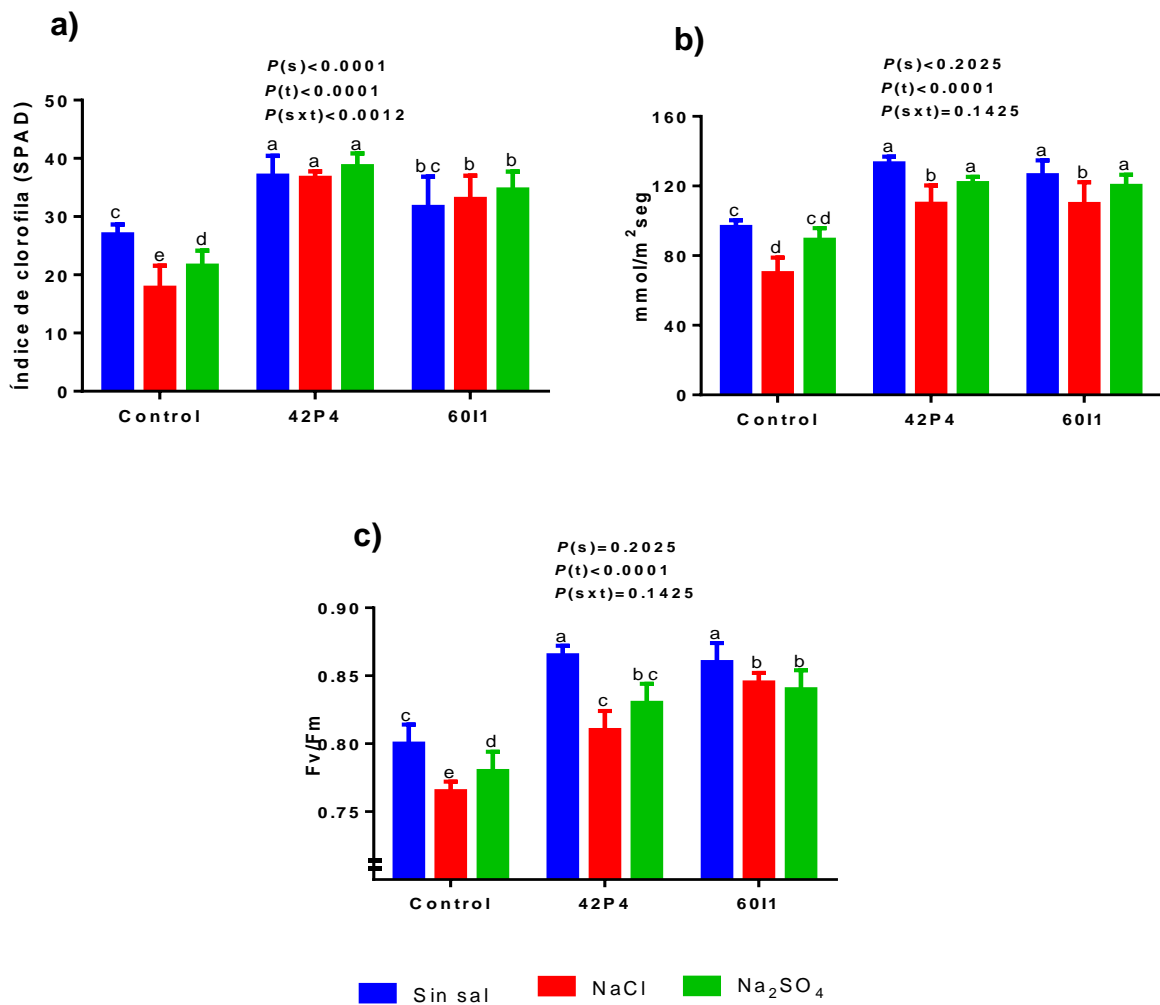
Bajo las condiciones de estrés salino evaluadas, un mayor índice de SPAD en las plantas inoculadas con las PGPR, confirman que los mecanismos promotores del crecimiento de las rizobacterias han contribuido para maximizar la nutrición mineral de las plantas de pimienta, favoreciendo la acumulación de mayores concentraciones de clorofila en las hojas. Estas mayores concentraciones de clorofila han permitido mantener la estabilidad de las tasas fotosintéticas, conllevando así a una mayor acumulación de biomasa en las plantas inoculadas como se mostró en la Tabla 5.3. Resultados similares han sido reportados en cultivos de colza, salvia y tomate, en las cuales la inoculación con PGPR incrementó el contenido de clorofila, favoreciendo la acumulación de materia seca en las plantas (Saghafi et al., 2018; Lami et al., 2020; Aslani et al., 2021; Medeiros & Bettioli, 2021).

La conductancia estomática fue mayor en los tratamientos inoculados sin sal e inoculados bajo estrés por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  como se muestra en la Figura 5.9 b. En condiciones de estrés por  $\text{NaCl}$  la inoculación revirtió el efecto negativo de la salinidad sobre este parámetro. Los tratamientos inoculados sin estrés se diferenciaron significativamente del Control sin sal. El efecto más negativo sobre la conductancia estomática fue ocasionado por el  $\text{NaCl}$  en el Control.

Los resultados demuestran que la inoculación con las PGPR bajo condiciones de estrés salino ejerce un efecto benéfico sobre las plantas. Este efecto inicia en la zona de la rizósfera favoreciendo la absorción de agua y la nutrición mineral, continua por medio de la estabilidad de los contenidos de clorofila y se expresa finalmente en una mayor tasa fotosintética. Esta tasa sólo es posible cuando la conductancia estomática óptima posibilita el intercambio gaseoso que permite la fijación de  $\text{CO}_2$  atmosférico, el cual posteriormente es convertido en fotoasimilados.

La eficiencia del fotosistema II (Fv/Fm) fue mayor en los tratamientos inoculados con respecto al Control sin sal y con sal como se puede observar en la Figura 5.9 c. La inoculación con PGPR revirtió el efecto negativo del NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre este parámetro. En el Control la aplicación de NaCl afectó más la eficiencia del fotosistema II que el tratamiento con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

El efecto positivo de la inoculación con las PGPR sobre Fv/Fm en condiciones de estrés por salinidad se puede explicar si se tienen en cuenta los resultados positivos encontrados en otros parámetros estrechamente vinculados como la conductancia estomática y los contenidos de nitrógeno, clorofila a y clorofila total. Los parámetros recién mencionados sustentan el funcionamiento adecuado del fotosistema II y los incrementos en la altura de las plantas, así como la mayor acumulación de materia seca área y radical pese al estrés ocasionado por el NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Resultados similares de Fv/Fm han sido reportados en otras especies de interés agronómico en condiciones de estrés salino como arroz, cítricos, trigo y olivo (García-Cristobal et al., 2015; Barnawal et al., 2017; Vives-Peris et al., 2018; Galicia-Campos et al., 2020; Babar et al., 2021).



**Figura 5.9.** Estudio de parámetros fisiológicos, **a)** Índice de clorofila (SPAD), **b)** conductancia estomática y **c)** eficiencia del fotosistema II (fv/fm) de plantas de pimienta cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y sometidas a estrés salino por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tratamientos: Control (sin sal), Control + 150 mM NaCl, Control + 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 42P4 (sin sal), 42P4 + 150 mM NaCl, 42P4 + 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6011 (sin sal), 6011 + 150 mM NaCl y 6011 + 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

## **G. Efectos del estrés salino por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre indicadores de tolerancia a la salinidad en plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR**

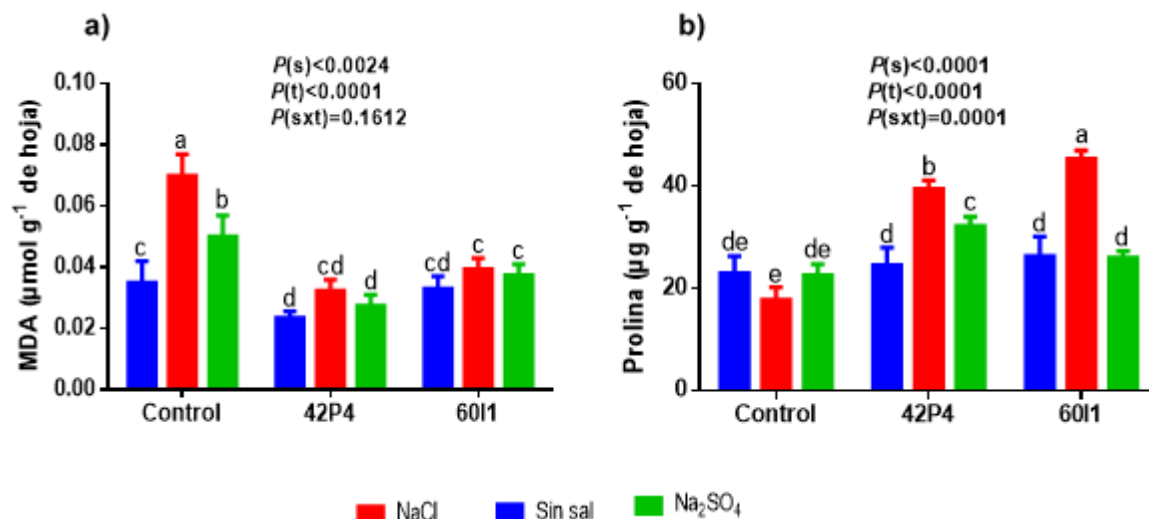
El nivel de MDA aumentó significativamente en las plantas Control tratadas con NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como se muestra la Figura 5.10 a. El tratamiento con NaCl indujo las mayores concentraciones de MDA en el tratamiento Control. Mientras que en los tratamientos inoculados con las PGPR sin NaCl y con NaCl los niveles de MDA fueron similares a los del Control sin NaCl. Una tendencia similar a la recién descrita, se observó en las plantas inoculadas más Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y sin Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Resultados similares han sido reportados en plantas de *Salsola ikonnikovii* bajo estrés por NaCl (Xing et al., 2013).

En este estudio, la reducción de la concentración de MDA en los tratamientos inoculados indica una disminución en la peroxidación de los lípidos de las membranas, esto es posible debido a que las PGPR mejoran el suministro de nutrientes a las plantas, estimulando la RSI. Esto está relacionado con una recuperación de la integridad de las membranas celulares, garantizando un mejor funcionamiento celular de las plantas de pimiento bajo estrés por salinidad. Resultados similares han sido reportados en otras especies de plantas bajo estrés salino (Singh & Jha, 2016; Sapre et al., 2018; Pan et al., 2019; Li et al., 2017).

Los contenidos de prolina incrementaron en todos los tratamientos inoculados con respecto al Control como se puede observar en la Figura 5.10 b. Los tratamientos inoculados sin salinidad no se diferenciaron del Control sin estrés salino. Los mayores aumentos en el contenido de prolina se presentaron en los tratamientos inoculados con las PGPR en condiciones estrés por NaCl.

Los resultados encontrados permiten sugerir que la producción de prolina en los tratamientos inoculados inhibe el aumento del contenido de MDA. Esto se puede entender si se tiene en cuenta que la prolina actúa como un soluto compatible capaz de garantizar el metabolismo celular bajo condiciones de salinidad, razón

por lo cual los lípidos de las membranas de estas células conservan su integridad estructural y funcional pese al estrés. Resultados similares han sido reportados en cultivos de maíz, *Bacopa monnieri* y pimiento, sometidos a estrés salino (Bharti et al., 2013; Hahm et al., 2017; Abbas et al., 2019; Ahmed et al., 2019).



**Figura 5.10. a)** Contenido de MDA y **b)** contenido de prolina de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y sometidas a estrés salino por NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tratamientos: Control (sin sal), Control + 150 mM NaCl, Control + 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 42P4 (sin sal), 42P4 + 150 mM NaCl, 42P4 + 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 60I1 (sin sal), 60I1 + 150 mM NaCl y 60I1 + 200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

## H. Efectos del estrés salino por NaCl sobre el perfil de compuestos fenólicos de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR

La biosíntesis de compuestos fenólicos se ve afectada por numerosos factores ambientales (Rahimi et al., 2018). Para sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas las plantas deben superar el estrés por medio de adaptaciones en el metabolismo endógeno (Chiappero et al., 2019). Una de las vías que se modifica es la de los compuestos fenólicos, los cuales incrementan principalmente en situaciones de estrés (Basha et al., 2006). Debido a que el NaCl mostró el efecto



más adverso sobre la fisiología y el desarrollo de las plantas, se utilizó esta sal como agente estresante para evaluar el efecto de la inoculación con las PGPR sobre el perfil de compuestos fenólicos en las plantas sometidas a estrés salino.

Como se puede ver en la Tabla 5.4 se cuantificaron 22 compuestos que se agrupan en cuatro familias según su estructura química en: alcoholes fenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenoides. Los resultados mostraron una mayor concentración de la sumatoria de compuestos fenólicos en las plantas tratadas con 42P4+NaCl, seguido por el Control y los tratamientos NaCl y 60I1+NaCl que no presentaron diferencias significativas entre sí.

**Tabla 5.4.** Perfil de compuestos fenólicos cuantificados en plantas de pimiento cultivadas bajo estrés por NaCl e inoculadas con las PGPR 60I1 y 42P4. Los resultados cuantitativos están expresados en mg g<sup>-1</sup> de materia seca.

Compuesto	Control	NaCl	60I1+NaCl	42P4+NaCl
<b>Alcoholes fenólicos simples</b>				
Hidroxitirosol	0,92±0,04a	0,49±0,08b	0,81±0,15a	0,82±0,01a
Tirosol	0,62±0,08a	0,36±0,02c	0,42±0,06b	0,36±0,06c
<b>∑ Alcoholes fenólicos simples</b>	<b>1,54±0,08a</b>	<b>0,85±0,08c</b>	<b>1,23±0,16b</b>	<b>1,18±0,06b</b>
<b>Flavonoides</b>				
(+)-catequina	0,23±0,01b	0,10±0,01c	0,09±0,02c	0,30±0,01a
(-)-epicatequina	n,d,*	0,11±0,01a	0,11±0,03a	n,d,*
(-)-epigallocatequina	8,62±0,27a	5,56±0,27b	5,64±0,47b	9,43±0,25a
(-)-galato de galocatequina	12,06±1,82a	12,22±1,20a	10,26±0,58b	12,67±1,06a
(-)-galato de epigallocatequina	3,45±0,22a	1,13±0,08b	0,19±0,01c	3,69±0,21a
Quercetina	0,51±0,09a	0,39±0,03b	0,49±0,03a	0,46±0,03a
Rutina	n,d,*	0,04±0,04b	n,d,*	0,70±0,06a
Miricetina	1,95±0,36a	1,68±0,14b	1,81±0,10a	1,96±0,17a
Naringina	5,62±0,29c	16,34±1,00a	8,70±1,46b	5,22±0,34c
Naringenina	n,d,*	0,15±0,00a	n,d,*	n,d,*
Procianidina B1	1,95±0,11c	5,46±0,14b	9,17±0,96a	0,36±0,16d
Procianidina B2	6,02±0,65a	2,21±0,16c	2,10±0,11c	3,15±0,29b
<b>∑ Flavonoides</b>	<b>40,41±2,02b</b>	<b>45,39±1,60a</b>	<b>38,56 ±1,90c</b>	<b>37,94±1,22c</b>
<b>Ácidos fenólicos</b>				
Ácido cinámico	3,94±0,03b	4,24±0,36b	2,73±0,61b	8,70±1,15a
Ácido gálico	0,49±0,35 c	1,39±0,08a	0,82±0,07bc	1,19±0,06ab
Ácido ferúlico	0,21±0,01b	0,15±0,01c	0,11±0,01c	0,91±0,02a
Ácido siríngico	0,16±0,01a	0,11±0,01b	0,11±0,01b	0,17±0,02a
Ácido p-cumárico	0,14±0,00b	0,14±0,03b	0,19±0,02a	0,20±0,01a
<b>∑ Ácidos fenólicos</b>	<b>4,94±0,35c</b>	<b>6,03±0,37b</b>	<b>3,96±0,61c</b>	<b>11,17±1,15a</b>
<b>Estilbenoides</b>				
trans-resveratrol	3,44±0,21a	1,59±0,18c	1,53±0,10c	2,91±0,06b
Polidatina	0,25±0,08b	0,80±0,19a	1,02±0,21a	0,30±0,06b
Pteroestilbeno	1,37±0,08c	1,98±0,13a	1,70±0,12b	1,73± 0,01b
<b>∑ Estilbenoides</b>	<b>5,06±0,23a</b>	<b>4,37±0,29b</b>	<b>4,25±0,26b</b>	<b>4,94±0,08a</b>
<b>∑ compuestos fenólicos totales</b>	<b>151,75±5,30b</b>	<b>125,6±2,75c</b>	<b>117,41±2,77c</b>	<b>161,91±3,51a</b>

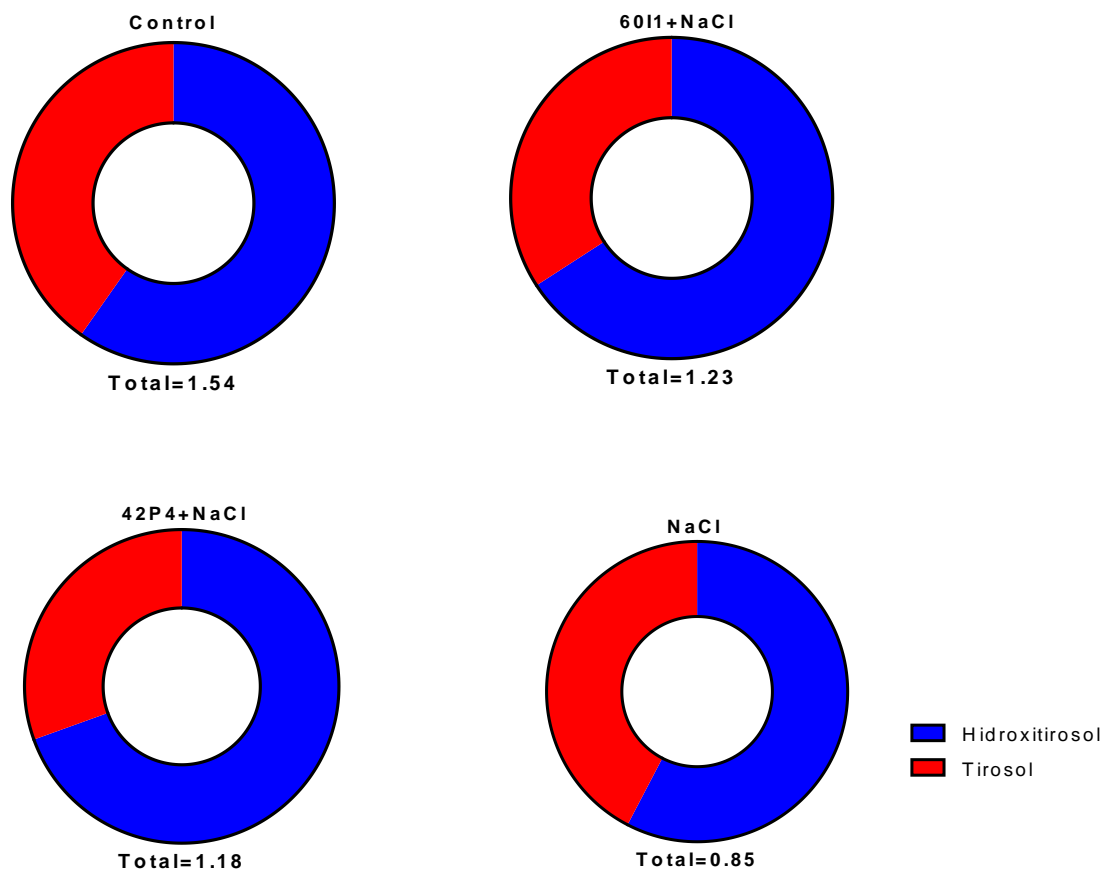
Letras diferentes indican diferencias significativas (por fila). Los resultados vienen dados por el valor medio (n = 3; tres determinaciones independientes, incluida la extracción y la posterior inyección) ± desviación estándar. \*: no detectable.

Para facilitar el análisis de los resultados se realizaron gráficos circulares para cada una de las familias de compuestos fenólicos (alcoholes fenólicos simples, flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenoides). Este tipo de gráficos es una representación relativa del total de cada familia y cada porción representa la abundancia de un compuesto dentro de su familia.

Generalmente se habla que una mayor concentración de compuestos fenólicos totales se asocia a un mayor nivel de estrés, sin embargo, la ventaja de poder hacer un perfilado, y analizar los diferentes compuestos presentes en cada ensayo permite observar los efectos benéficos de algunos de ellos en la resistencia a diferentes niveles y tipos de estrés, permitiendo incluso visualizar qué rutas biosintéticas se "activan" en cada caso.

Como alcoholes fenólicos identificamos hidroxitirosol y tirosol. Los tratamientos inoculados y el Control presentaron mayor concentración de alcoholes fenólicos simples con respecto al tratamiento NaCl. Este tipo de compuestos se caracterizan por presentar una amplia actividad antioxidante. Es plausible sugerir que la inoculación disminuyó el efecto negativo de la salinidad sobre las plantas de pimiento estimulando la producción de compuestos de defensa como hidroxitirosol y tirosol, mejorando la adaptación de las plantas inoculadas en presencia de NaCl.

La concentración de tirosol en el tratamiento Control fue de  $0,62 \text{ mg g}^{-1}$ , mientras que en los demás tratamientos fue menor ( $0,36$ ;  $0,42$  y  $0,36 \text{ mg g}^{-1}$ , NaCl, 60I1+NaCl y 42P4+NaCl, respectivamente). Como se muestra en la Figura 5.11. La concentración de hidroxitirosol en los tratamientos 42P4+NaCl ( $0,82 \text{ mg g}^{-1}$ ) y 60I1+NaCl ( $0,81 \text{ mg g}^{-1}$ ) fue similar a la del Control ( $0,92 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que en el tratamiento con NaCl ( $0,49 \text{ mg g}^{-1}$ ) se encontraron las concentraciones más bajas.



**Figura 5.11.** Contenido de alcoholes fenólicos simples detectados en plantas de pimiento bajo estrés por NaCl e inoculadas con las PGPR en estudio. Tratamientos: Control (sin bacterias, ni NaCl); 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 42P4: *Pseudomonas* 42P4 y 150 mM NaCl.

Uno de los efectos negativos más conocidos que provoca la salinidad en las plantas es el estrés oxidativo, el cual está caracterizado por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, las cuales cuando exceden la capacidad antioxidante de las plantas desencadenan una serie de eventos que finalmente concluyen en la muerte celular. La menor concentración de hidroxitirosol se presentó en las plantas de pimiento tratadas con NaCl, en este tratamiento esta sal desencadenó una serie de efectos nocivos en la fisiología de las plantas de pimiento caracterizada por la disminución de los parámetros relacionados con la absorción de nitrógeno, el contenido de clorofila y la eficiencia del fotosistema II,

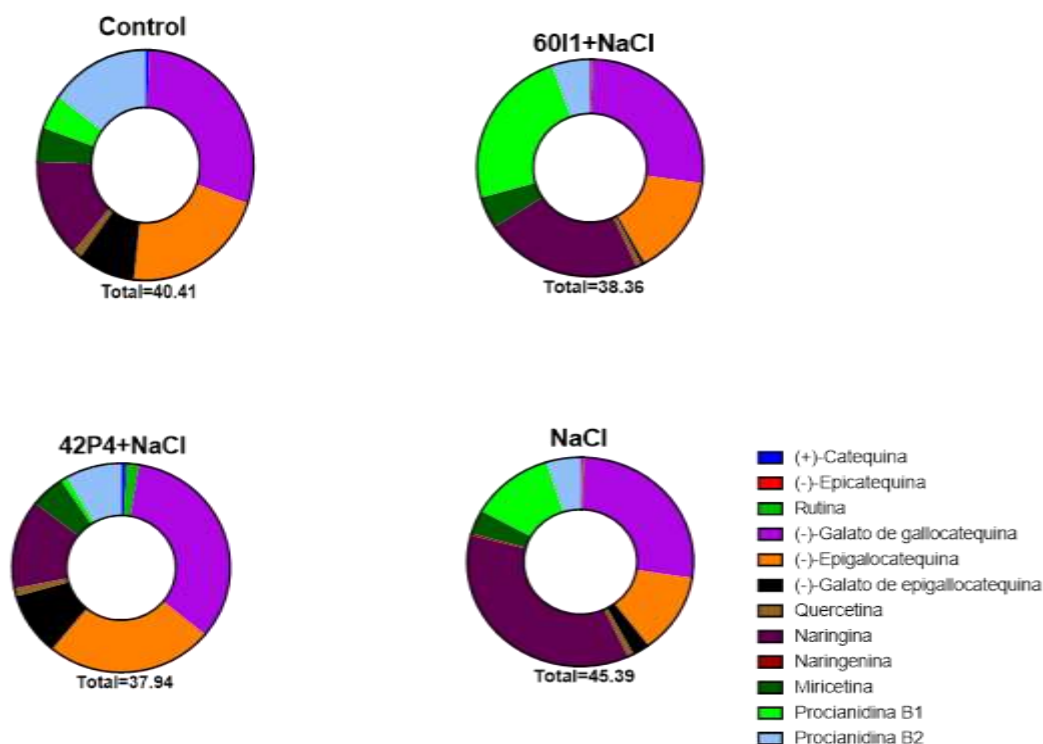
con una consecuente disminución de la altura de las plantas y una menor acumulación de biomasa seca de la raíz y de la parte aérea. La disminución de la eficiencia fotosintética y de la concentración de hidroxitirosol ha sido reportada en plantas de olivo bajo condiciones de estrés hídrico, frío y salinidad (Ortega-García & Peragón, 2009; Petridis et al., 2012; Mechri et al., 2019).

La disminución de hidroxitirosol en las plantas tratadas solo con NaCl contrasta con los resultados encontrados en las plantas tratadas con NaCl e inoculadas con 42P4 o 60I1 en las cuales se disminuyó el efecto negativo de la sal sobre la fisiología de las plantas, en estos tratamientos se encontró la mayor concentración de hidroxitirosol igualando al Control sin NaCl. En este contexto, es factible sugerir que el hidroxitirosol desempeña un rol importante en las plantas de pimiento bajo estrés por NaCl reduciendo los efectos indeseables de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Bajo condiciones de estrés cuando el aparato fotosintético es desmantelado, el exceso de radiación solar que no es procesado por la clorofila necesita ser interceptado para disminuir la producción de ERO generadas por la radiación UV, en este tipo de situaciones el hidroxitirosol es de gran importancia por su capacidad antioxidante (Roca & Pérez-Gálvez, 2020). En otras investigaciones se ha determinado que el hidroxitirosol es un potente antioxidante con capacidad para detener el estrés oxidativo ocasionado por grupos  $\text{OH}^*$  y por los radicales superóxidos, además presenta actividad secuestrante hacia 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y el óxido nítrico (NO) (Hajihashemi & Geuns, 2013).

En la familia de los flavonoides se cuantificaron 12 compuestos los cuales se detallan en la Tabla 5.4. Los perfiles de los flavonoides mostraron diferencias entre los tratamientos Control, 42P4+NaCl y 60I1+NaCl, como se puede observar en la Figura 5.12. La sumatoria total de flavonoides en el tratamiento NaCl fue de 45,39  $\text{mg g}^{-1}$ , diferenciándose de los demás tratamientos, fue seguido por el tratamiento Control (40,41  $\text{mg g}^{-1}$ ) y los tratamientos 60I1+NaCl (38,36  $\text{mg g}^{-1}$ ) y 42P4+NaCl (37,94  $\text{mg g}^{-1}$ ) que no se diferenciaron entre sí.

La mayor concentración de flavonoides en el tratamiento con 150 mM de NaCl puede haberse producido a expensas de una reducción del contenido de carotenoides, como se muestra en la Figura 5.7 a. Resultados similares han sido reportados en otras solanáceas bajo estrés por 150 mM de NaCl (Ben Abdallah et al., 2016).



**Figura 5.12.** Distribución porcentual de flavonoides cuantificados en plantas de pimiento bajo estrés por NaCl e inoculadas con las PGPR en estudio.

Los carotenoides juegan un rol determinante como extintores de especies reactivas de oxígeno, es factible inferir que en este estudio existen dos mecanismos diferentes para enfrentar los efectos nocivos del estrés por NaCl entre las plantas tratadas con NaCl e inoculadas, siendo más efectivo el mecanismo empleado por las plantas inoculadas en las cuales los parámetros fisiológicos permanecieron estables pese al estrés salino.

Como puede observarse en la Figura 5.12, los compuestos más abundantes en la familia de los flavonoides fueron naringina, (-)-galato de gallocatequina y (-)-

epigallocatequina. El tratamiento con NaCl presentó las mayores concentraciones de naringina  $16,34 \text{ mg g}^{-1}$  duplicando el contenido de 60I1+NaCl y triplicando los contenidos de 42P4+NaCl y Control. Las concentraciones de miricetina fueron muy similares para los tratamientos 42P4+NaCl, Control y 60I1+NaCl ( $1,96$ ,  $1,95$  y  $1,81 \text{ mg g}^{-1}$ , respetivamente); mientras que el tratamiento con NaCl presentó las menores concentraciones de miricetina. Del análisis de la Figura 5.12, se puede resaltar que en el Control los compuestos más abundantes fueron (-)-galato de galocatequina y (-)-epigallocatequina. Sin dejar de lado que el compuesto (-)-galato de galocatequina se presenta en concentraciones similares en los tratamientos con 42P4+NaCl y NaCl. Las concentraciones de (-)-galato de galocatequina fueron igual en los tratamientos inoculados y el control, mientras que en el tratamiento con NaCl se encontraron las menores concentraciones de este compuesto.

El contenido de quercetina disminuyó en el tratamiento con NaCl, mientras que no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos 60I1+NaCl y 42P4+NaCl con respecto al Control. Esto indica que la inoculación disminuye el efecto nocivo del NaCl sobre la acumulación quercetina, la cual tiene un gran potencial para eliminar especies reactivas de oxígeno (Agati et al., 2011; Ben Abdallah et al., 2016), lo que concuerda con los menores niveles de MDA encontrado en las plantas inoculadas en condiciones de salinidad.

La inoculación con las PGPR disminuyó el efecto nocivo del NaCl sobre los contenidos de miricetina y quercetina. Estos resultados demuestran que la miricetina y la quercetina jugarían un rol destacado en el sistema de defensa antioxidante en las hojas de las plantas de pimiento. En otros estudios la salinidad por NaCl indujo un efecto similar en las concentraciones miricetina y quercetina en plantas de *Polygonum maritimum* y trigo (Rodrigues et al., 2019; Janda et al., 2018).

El contenido de naringina encontrado fue mayor en el tratamiento NaCl superando ampliamente a los demás tratamientos. La naringina es considerada un

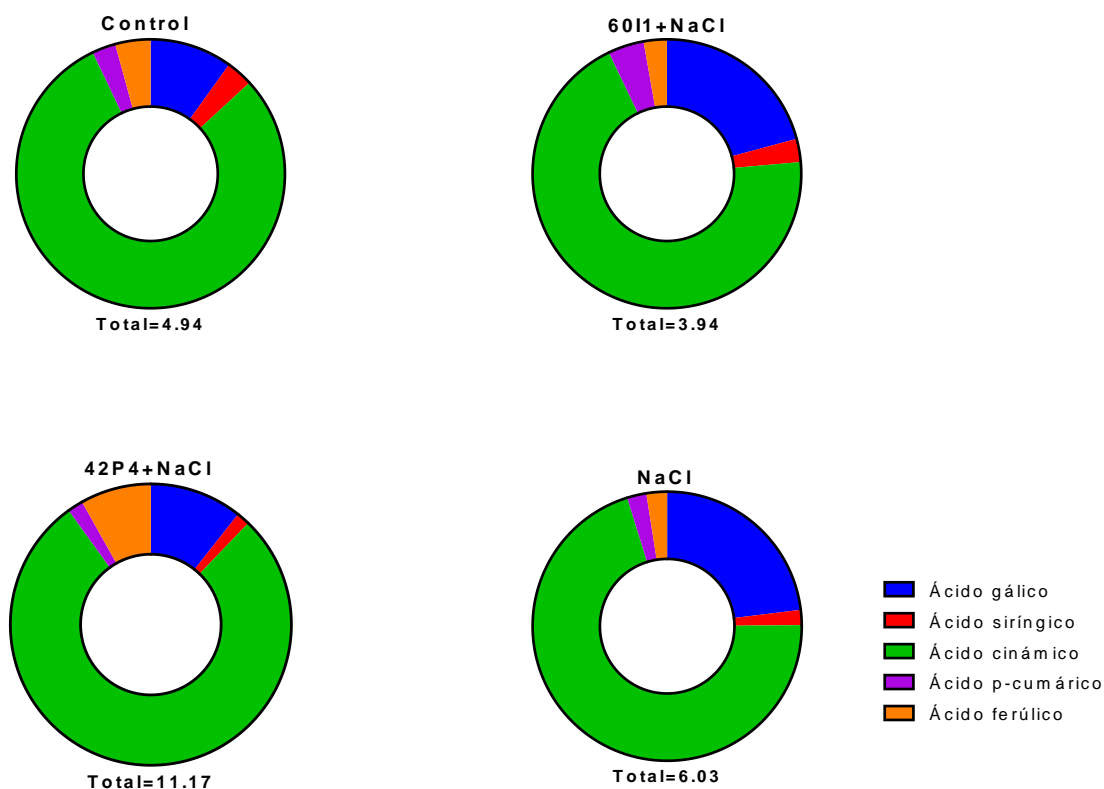
mecanismo antioxidante no enzimático eficaz en la eliminación de ERO en plantas sometidas a estrés por lesiones externas (Liu et al., 2021). Los resultados encontrados permiten inferir que la naringina en el tratamiento con NaCl es el flavonoide más producido para enfrentar los efectos negativos de la salinidad, mientras que en los tratamientos inoculados el rol protagónico está a cargo de la miricetina y quercetina.

La mayor concentración de (-)-galato de gallocatequina en los tratamientos inoculados y el control se correlaciona con el incremento en el peso seco de la raíz y la disminución de los contenidos MDA. El mayor desarrollo del sistema radical es un parámetro de gran importancia debido a que implica una mayor absorción de agua y de nutrientes pese a las condiciones adversas derivadas del estrés salino. Resultados similares se han reportado en plantas de tomate tras la aplicación exógena de epigallocatequina-3-galato (Ahammed et al., 2018). El epigallocatequina-3-galato es un agente protector frente a estrés por frío, calor, salinidad y sequía, debido a que disminuye la producción de ERO y el daño de las membranas, preservando la funcionalidad del aparato fotosintético (Li et al., 2019). De igual forma la aplicación de epigallocatequina-3-galato exógena está implicada en la resistencia de *A. thaliana* al estrés biótico inducido por fitopatógenos (Hong et al., 2015).

En la familia de los ácidos fenólicos la mayor concentración total se encontró en el tratamiento con 42P4+NaCl (11,17 mg g<sup>-1</sup>), seguido por NaCl (6,03 mg g<sup>-1</sup>), los tratamientos Control y 60I1+NaCl no mostraron diferencias significativas entre sí y presentaron las concentraciones más bajas (4,94 y 3,94 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente). Como se muestra en la Figura 5.13 el ácido cinámico fue el compuesto más abundante en los cuatro tratamientos. Se encontró en una mayor concentración en el tratamiento con 42P4+NaCl (8,70 mg g<sup>-1</sup>), seguidos por los tratamientos NaCl, Control y 60I1+NaCl (4,24, 3,94 y 2,73 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente) los cuales no presentaron diferencias significativas. El ácido gálico se presentó con concentraciones similares en los tratamientos NaCl y 42P4+NaCl (1,39 y 1,19 mg g<sup>-1</sup>), mientras que en los tratamientos 60I1+NaCl y Control (0,82 y 0,49 mg g<sup>-1</sup>), se presentó en concentraciones menores pero sin diferencia significativa. El ácido p-



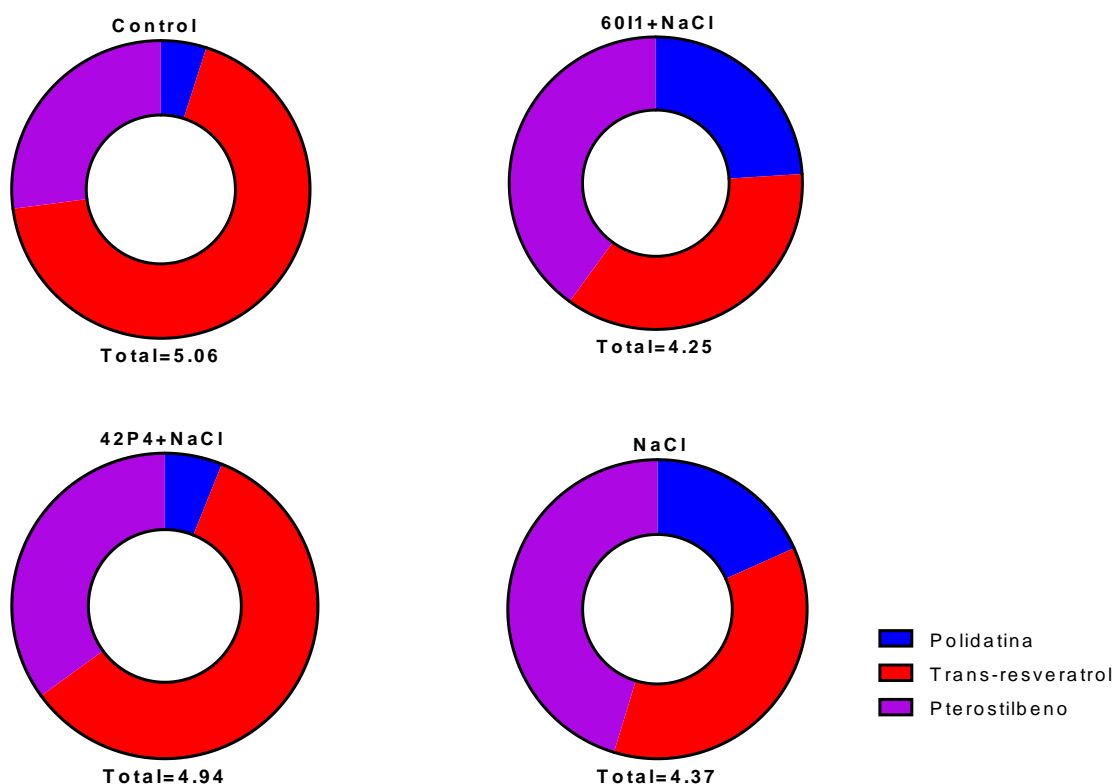
cumárico se encontró en mayor concentración en el tratamiento 42P4+NaCl (0,20 mg g<sup>-1</sup>), mientras que en los demás tratamientos 60I1+NaCl, Control y NaCl (0,17, 0,14 y 0,14 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente) sus concentraciones no mostraron diferencia significativa.



**Figura 5.13.** Distribución porcentual de ácidos fenólicos cuantificados en plantas de pimienta bajo estrés por NaCl e inoculadas con las PGPR en estudio.

La mayor concentración de ácido p-cumárico se encontró en los tratamientos inoculados. La acumulación de ácido fenólico está relacionada con la reducción del estrés oxidativo, ya que el ácido p-cumárico muestra una gran actividad eliminadora de radicales debido a su naturaleza hidroxilo (Jamalian et al., 2013). Resultados similares se encontraron en otro estudio en plantas de arroz donde se propone que el ácido p-cumárico y sus derivados son agentes prometedores para reducir los efectos perjudiciales estrés salino (Minh et al., 2016).

La mayor concentración de la familia de estilbenoides se encontró en el tratamiento Control ( $5,06 \text{ mg g}^{-1}$ ), y el tratamiento con 42P4+NaCl ( $4,94 \text{ mg g}^{-1}$ ) sin diferencias significativas, mientras que en los tratamientos con NaCl y 60I1+NaCl las concentraciones fueron similares ( $4,37$  y  $4,25 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente), como se muestra en la Figura 5.14.



**Figura 5.14.** Distribución porcentual de estilbenoides cuantificados en plantas de pimienta bajo estrés por NaCl e inoculadas con las PGPR en estudio.

Las mayores concentraciones de trans-resveratrol se presentaron en el tratamiento Control ( $3,44 \text{ mg g}^{-1}$ ), seguido del tratamiento con 42P4+NaCl ( $2,91 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que los tratamientos con NaCl y 60I1+NaCl presentaron concentraciones similares ( $1,59$  y  $1,53 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente). Las mayores

concentraciones de polidatina se presentaron en los tratamientos con 6011+NaCl y NaCl (1,02 y 0,80 mg g<sup>-1</sup> respectivamente), mientras que los tratamientos con 42P4+NaCl y Control presentaron las concentraciones más bajas (0,30 y 0,25 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente). También se cuantificó pterostilbena, hallando la mayor concentración en el tratamiento con NaCl (1,98 mg g<sup>-1</sup>), seguido de los tratamientos 42P4+NaCl y 6011+NaCl, los cuales mostraron concentraciones similares (1,73 y 1,70 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente), mientras que el Control presentó la menor concentración (1,37 mg g<sup>-1</sup>).

La concentración de trans-resveratrol fue similar en el tratamiento 42P4+NaCl y el tratamiento Control. Es plausible sugerir que la inoculación con la cepa 42P4 incrementa las concentraciones de trans-resveratrol revirtiendo el efecto nocivo del NaCl sobre parámetros de gran importancia como los contenidos de nitrógeno, clorofila a y total, garantizando el funcionamiento del fotosistema bajo estrés salino. Además, el tratamiento con 42P4+NaCl redujo la peroxidación lipídica e incrementó los contenidos de prolina indicando una adaptación importante para superar los efectos adversos de la salinidad. Resultados similares han sido reportados en *Citrus aurantium* tras la aplicación exógena de resveratrol (Kostopoulou et al., 2014). El papel protector del resveratrol también ha sido informado en plantas de manzana estresadas por KCl (Li et al., 2021). De igual forma el potencial antioxidante del resveratrol ha sido documentado frente a otros tipos de estreses como ozono, metales y radiación UV (Hasan & Bae et al., 2018; Sales & Resurreccion et al., 2014; Matus, 2016).

De esta manera, estudiar diferentes parámetros fisiológicos y bioquímicos junto con los perfiles de compuestos fenólicos y su cambio frente a los diferentes tratamientos de estrés salinos permite dilucidar los mecanismos de acción que las bacterias PGPR desempeñan para mitigar dichos efectos. Además, los resultados indican que el efecto salino no es sólo producto del catión sodio, sino que el contraión genera un efecto sobre el estrés como se demostró en las plantas tratadas con NaCl. Finalmente, después de demostrar el efecto benéfico de la inoculación con PGPR bajo distintos estados fenológicos de las plantas de

pimiento cv. Calafyuco INTA y bajo estrés abiótico, se plantea estudiar en el próximo capítulo el potencial de las PGPR utilizadas como biofertilizante en plantas de pimiento cultivadas bajo condiciones de campo.

## **CAPITULO 6: Evaluación del efecto de la inoculación de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA con PGPR nativas bajo condiciones de campo en la provincia de Mendoza**

### **I. Introducción**

Según el ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (2021), en Argentina, en la última década, se ha duplicado el uso de fertilizantes nitrogenados. En el año 2019 se consumieron 2.618.215 t de fertilizantes nitrogenados, los cuales representan el 56% de los fertilizantes comercializados en el mercado nacional. Además, el mismo informe señala que la dosis promedio de fertilización nitrogenada no alcanza para cubrir los requerimientos nutricionales de los cultivos, por lo cual la reposición de este nutriente en el suelo refleja un balance deficitario, el cual debe ser abordado de forma responsable para garantizar la sostenibilidad.

Por lo recién expuesto, se sugiere el uso de alternativas agro-sustentables que permitan incrementar la disponibilidad de nitrógeno en los suelos cultivados de Argentina. Aunque en un modelo biológico diferente al estudiado en esta tesis, en Argentina la biofertilización de soja con las bacterias noduladoras del género *Bradyrhizobium* en la región pampeana han demostrado que provee hasta un 70% del nitrógeno requerido por las plantaciones a un bajo costo.

Las prácticas agrícolas sustentables cada vez toman más importancia en la actualidad como una estrategia para mitigar los efectos adversos de la agricultura moderna, la cual se ha caracterizado por generar un alto rendimiento y calidad de los cultivos por medio de un uso desproporcionado de agroquímicos costosos y muy contaminantes (Kavino et al., 2010).

Los biofertilizantes suelen estar constituidos por PGPR que son capaces de colonizar la rizósfera de las plantas mejorando la disponibilidad de nutrientes y

regulando los niveles de fitohormonas, estimulando el desarrollo de los cultivos. Lo anteriormente mencionado ha hecho que sean considerados como una alternativa o complemento al uso de productos químicos en la producción agrícola (Bhattacharjee & Dey, 2014). En ocasiones es frecuente el uso de distintas PGPR en un bioformulado combinando cepas con diferentes actividades biológicas que en conjunto potencia el desarrollo de los cultivos (Bechtaoui et al., 2020; Marinkovic et al., 2018).

La comercialización de biofertilizantes en la provincia de Mendoza es un sector económico poco explotado, debido en gran medida a la falta de cepas nativas para los cultivos de la región. La falta de respuestas consistentes en cultivares regionales y el escaso conocimiento respecto al almacenamiento, formas de aplicación y dosificación adecuada, limitan el uso intensivo de PGPR en la provincia.

En los capítulos 2, 3, 4 y 5 del presente estudio se ha demostrado el efecto benéfico de PGPR nativas de Mendoza sobre plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA en condiciones controladas. En base a los resultados obtenidos se seleccionaron las cepas con mayor potencial para evaluar su actividad en condiciones de campo.

Para este propósito se seleccionaron las cepas 42P4 y 60I1. La cepa 42P4 pertenece al género *Pseudomonas* sp., uno de los géneros de PGPR más estudiados a nivel mundial. Se caracteriza por presentar un rápido crecimiento en el suelo colonizando de forma efectiva la rizósfera, además se ha asociado a la mejora del crecimiento de las plantas en campo y en distintas condiciones de estrés como hídrico, salino y por metales pesados (Mirzaei et al., 2020; Tahiri et al., 2022). Por otra parte, la cepa 60I1 corresponde al género *Cellulosimicrobium* sp., bacterias Gram positivas tipo bastón, las cuales están ampliamente distribuidas en el agua, suelo y material vegetal en descomposición. Este género ha sido reconocido por su potente potencial antifúngico contra fitopatógenos que ocasionan graves pérdidas en cultivos de pimiento como *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum* (Park & Shim, 2014).

El presente estudio se condujo en condiciones de campo en tres temporadas. Los ensayos se realizaron en los veranos de 2019, 2020 y 2021, los cultivos fueron plantados en tres sitios diferentes de la provincia de Mendoza (San Martín, Campo experimental de la FCA en Lujan de Cuyo y Montecaseros).

## II. Objetivo específico

5. Evaluar en plantas de pimiento Calahorra (cv. Calafyuco INTA) cultivadas en condiciones de campo los cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, del perfil de compuestos fenólicos y del componente rendimiento producidos por la inoculación con dos cepas PGPR nativas 42P4 y 60I1.

## III. Hipótesis

5. La inoculación con las PGPR promueve el crecimiento, desarrollo y la producción de plantas de pimiento cultivadas en campo.

## IV. Materiales y métodos

**A. Material vegetal:** se emplearon semillas de *Capsicum annuum* cv. Calafyuco INTA gentilmente suministradas por el Dr. Claudio Galmarini (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA-La Consulta).

**B. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal:** las cepas utilizadas fueron: *Cellulosimicrobium* 60I1 (60I1) y *Pseudomonas* 42P4 (42P4). Las rizobacterias se hicieron crecer de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 2 de la presente tesis.

**C. Germinación de las semillas:** las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 20% por 1 min y posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de desinfectante. Las semillas se sembraron en

bandejas que contenían sustrato estéril (Kekkila, turba Sphagnum, Finlandia) y se trasladaron al invernáculo. Luego, cuando los plantines presentaron el primer par de hojas verdaderas se inocularon con la cepa correspondiente a cada tratamiento y a los 25 días después de la inoculación se trasplantaron a campo.

**D. Ubicación geográfica de los experimentos:** en esta investigación a cada temporada o año de siembra le corresponde una ubicación geográfica diferente, en lo sucesivo para facilitar la comprensión del texto se citará el año de la siembra, así quedara explícito el lugar donde se llevó a cabo el experimento como se describe a continuación:

**Año 1:** la primera siembra se realizó en el verano del año 2018 en la finca del horticultor Daniel Frasca ubicada en el departamento de General San Martín en la provincia de Mendoza (<https://maps.app.goo.gl/w5BVBVUvVkTf9U9a> 33°02'11.1"S y 68°24'53.3"W). A las plantas se les suministro riego por gravedad durante 3 días por semana. Los plantines se sembraron en el campo el 12 de noviembre del 2018.

**Año 2:** la segunda siembra se realizó en el verano del año 2019 en el predio de la parcela experimental de Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo, ubicada en el departamento de Luján de Cuyo en la provincia de Mendoza (<https://goo.gl/maps/koPc5XpJND37msuB9>, 33°00'38.4"S y 68°52'43.9"W). A las plantas se les suministro riego por gravedad cada 8 días. Los plantines se sembraron en el campo el 8 de noviembre del 2019.

**Año 3:** la tercera siembra se realizó en el verano del año 2021 en el distrito de Montecaseros, ubicado en el departamento de General San Martín en la provincia de Mendoza (<https://maps.app.goo.gl/VLzDVCAafcdjJZTA> 33°02'45.8"S y 68°16'29.9"W). El riego de estas plantas se realizó por medio de un sistema de riego por goteo 3 días por semana. Los plantines se sembraron en el campo el 25 de noviembre del año 2021.



**E. Diseño experimental:** se estableció un diseño completamente aleatorizado de 4 tratamientos, con tres repeticiones de 10 plantas cada uno. Cada plantín se inoculó con 1000  $\mu\text{L}$  de medio conteniendo la cepa correspondiente al tratamiento, como se muestra en la Figura 6.1. Para el tratamiento coinoculado se aplicó 500  $\mu\text{L}$  de la cepa 60I1 más 500  $\mu\text{L}$  de la cepa 42P4 para un volumen final de inoculante de 1000  $\mu\text{L}$ . Los tratamientos fueron los siguientes:

- T1.** Control, plantas inoculadas con medio LB.
- T2.** Plantas inoculadas con 60I1.
- T3.** Plantas inoculadas con 42P4.
- T4.** Plantas inoculadas con 60I1+42P4.



**Figura 6.1.** Inoculación de plantines de pimienta con las cepas PGPR en estudio 15 días antes del trasplante a campo.

Cabe resaltar que se realizó una única inoculación con las PGPR en la etapa de plantín y las determinaciones se realizaron en plantas adultas cultivadas a campo.

**F. Variables evaluadas:** al momento de la floración, 60 días después de la siembra (dds), se evaluaron parámetros de crecimiento: altura de la planta y diámetro del tallo. La altura de la planta se determinó desde la parte inferior del tallo hasta el ápice apical, mientras que el diámetro del tallo se evaluó a 10 cm del suelo con un calibre digital (Caliper 0 a 150 mm). En la etapa de cosecha, 100 dds, se determinó el número de frutos por plantas, longitud, diámetro y espesor de la pared de los frutos con un calibre digital (Caliper 0 a 150 mm), y peso seco de los frutos en estufa a 60°C hasta peso constante.

**G. Determinación de nitrógeno:** se realizó en hojas previo a la floración siguiendo la misma metodología descrita en el Capítulo 3 del presente trabajo de tesis.

**H. Pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores:** las determinaciones de pigmentos fotosintéticos se realizaron en hojas previo a la floración por espectrofotometría como describió en el capítulo 3.

**I. Extracción de los compuestos fenólicos:** los compuestos fenólicos se determinaron en hojas colectadas previo a la floración de acuerdo con el procedimiento previamente descrito en el Capítulo 3.

**J. Análisis de compuestos fenólicos:** el perfil de compuestos fenólicos en los extractos de hojas de los diferentes tratamientos se realizó utilizando la misma metodología descrita en el Capítulo 3.

**K. Análisis físico-químico de los suelos:** se realizó el análisis del suelo de correspondiente a los años 2019 y 2021. Los resultados se incluyen en el Anexo 1.

**L. Análisis estadístico:** para analizar los efectos de la inoculación, el año de siembra y su interacción se utilizó un ANOVA multifactorial y el test de Duncan para las comparaciones múltiples con un nivel de significancia de 0,05; donde el efecto de la temporada o año de siembra se representó con (a), la inoculación con (t) y la interacción de estos dos factores como (axt). Para las medidas repetidas en el tiempo se ajustó un modelo lineal mixto. El modelo incluyó efectos fijos de tratamiento, tiempo y sus interacciones. Como efecto aleatorio se incluyó la unidad experimental. Se utilizó el software estadístico InfoStat (InfoStat versión 2018v. Grupo InfoStat, Argentina). Para la construcción de los gráficos se empleó el software GraphPad Prism 7, San Diego, CA.

## V. Resultados y discusión

### A. Efecto de la inoculación con PGPR sobre el desarrollo de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA cultivadas bajo condiciones de campo

En la Figura 6.2 a se muestra el monitoreo agronómico de la plantación y en la Figura 6.2 b la evaluación de las variables mencionadas en materiales y métodos.

a)



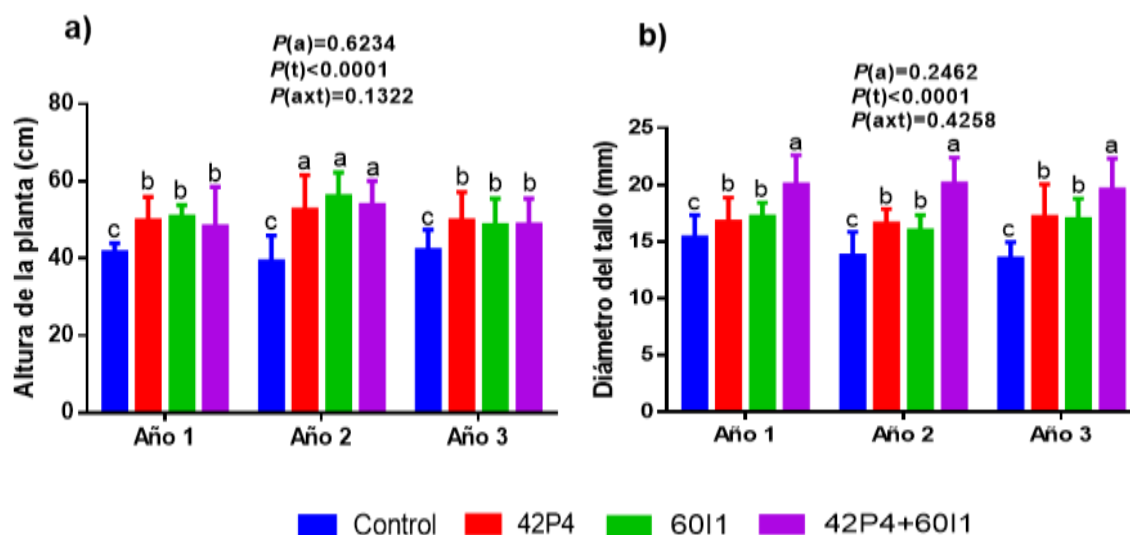
b)



**Figura 6.2.** a) Monitoreo del desarrollo de las plantas y b) medición de parámetros relacionados con el desarrollo de las plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y cultivadas bajo condiciones de campo.

El análisis de los datos mostró que el *P*-value de la temporada no fue significativo, sin embargo, si lo fue para los tratamientos de inoculación, mientras que la interacción de ambos factores tampoco fue significativa (Figura 6.3). Se observó un efecto promotor de la inoculación en los suelos de las tres temporadas analizadas que como característica general contenían muy baja materia orgánica, contenidos medios de nitrógeno en la finca de la FCA (año 2019) y muy bajo en el finca de Montecaseros (año 2021); con contenidos de fósforo muy bajos y bajo respectivamente. Las plantas inoculadas con las cepas 6011 y 42P4, así como las coinoculadas presentaron una mayor altura con respecto a las plantas Control, en cada uno de los tres años de siembra. Una tendencia similar se observó en el diámetro del tallo el cual fue superior en las plantas inoculadas con respecto al

Control. Sin embargo, el tratamiento coinoculado presentó el mayor diámetro de tallo, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos, como se muestra en la Figura 6.3 a y b. Este parámetro está directamente relacionado con el vigor de la planta, demostrando la efectividad de la inoculación.



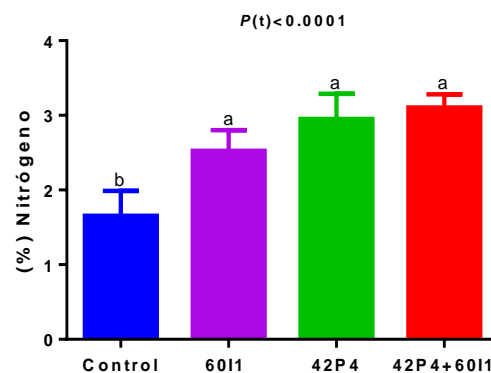
**Figura 6.3.** Resultados obtenidos en las determinaciones de **a)** Altura de las plantas y **b)** Diámetro del tallo de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y cultivadas bajo condiciones de campo. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Es importante señalar que como se demostró en el capítulo 3 de esta tesis, los plantines previamente inoculados antes de ser trasplantados a campo se encuentran con una estructura radical bien desarrollada, la cual facilita la exploración de una mayor porción de suelo facilitando la absorción de agua y adquisición de nutrientes que potencian el desarrollo de los plantines inoculados al momento de llegar al campo. Por otra parte, demostramos que las cepas en estudio tienen la capacidad de solubilizar diferentes fuentes de fósforo, producir sideróforos que facilitan la captación de hierro y además producen reguladores del crecimiento vegetal (Pérez-Rodriguez et al., 2021). Además, el efecto positivo sobre la altura y el diámetro de tallo de las plantas de pimiento inoculadas con las

PGPR nativas puede estar relacionado con el mecanismo de fijación de nitrógeno atmosférico que poseen las rizobacterias inoculadas como se muestra a continuación.

### **B. Efectos de la inoculación con PGPR sobre el contenido de nitrógeno en hojas de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA cultivadas en campo**

Con base en que en los parámetros morfológicos de mayor interés no se encontraron diferencias estadísticas entre los diferentes años de siembra, por consiguiente, se optó por analizar el contenido de nitrógeno de las plantas cultivadas solo en el tercer año. Los tratamientos inoculados se diferenciaron del Control en el contenido de nitrógeno foliar. El tratamiento con las cepas 60I1 y 42P4 solas o combinadas presentaron la misma concentración de nitrógeno como se puede observar en la Figura 6.4.



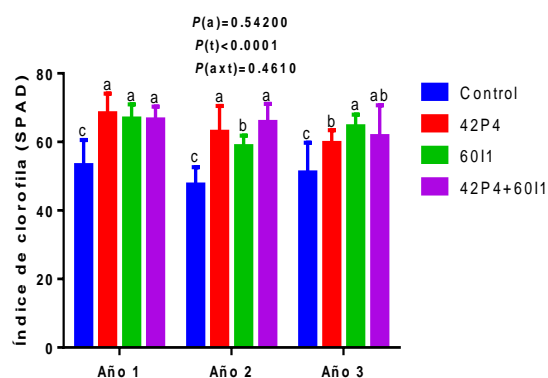
**Figura 6.4.** Contenido de nitrógeno en hojas de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR bajo condiciones de campo. Tratamientos: Control, 42P4, 60I1 y coinoculado de 42P4+60I1. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

La mayor concentración de nitrógeno en las hojas de plantas inoculadas, confirman que las PGPR despliegan el mecanismo de promoción del crecimiento relacionado con la fijación de nitrógeno atmosférico en el suelo, el cual queda disponible para ser asimilado por las plantas de pimiento.

### C. Efecto de la inoculación con PGPR sobre parámetros fisiológicos de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA cultivadas bajo condiciones de campo

El índice de clorofila SPAD mostró una tendencia similar en los tratamientos inoculados, los cuales se diferenciaron del Control en todos los años de siembra como se puede apreciar en la Figura 6.5. La estimación *in situ* de este parámetro permite inferir que los contenidos de clorofila en las plantas inoculadas se encuentran en un nivel óptimo debido a la nutrición nitrogenada proporcionada a las plantas por las PGPR.

Los valores encontrados del índice de SPAD en las plantas inoculadas están asociados a un mayor desarrollo de la parte aérea y mejora de los parámetros relacionados con el componente rendimiento. Otros autores han descrito una correlación lineal y positiva entre el índice de SPAD y la producción. En plantas de triticale y papa el índice de SPAD predice con precisión el rendimiento del cultivo (Janusauskaite et al., 2017; Krystyna & Milena, 2017).

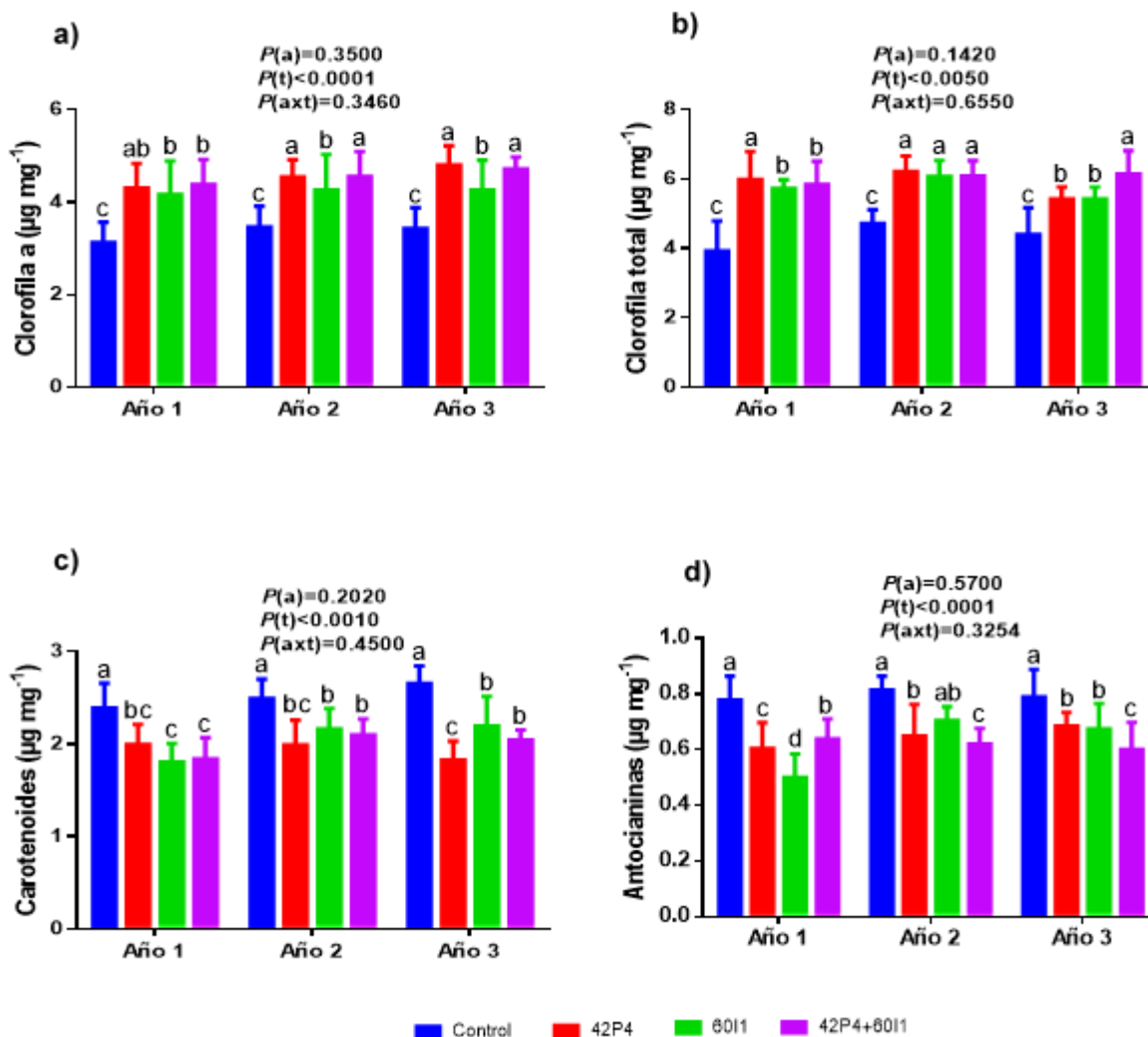


**Figura 6.5.** Índice de clorofila medido *in situ* en plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y cultivadas bajo condiciones de campo. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Los contenidos de clorofila a y total determinadas por método colorimétrico muestran una mayor concentración de los pigmentos fotosintéticos en las plantas inoculadas con respecto al tratamiento Control. Los incrementos en los contenidos de clorofila a y total en las plantas inoculadas pueden estar relacionados con una mayor absorción de nitrógeno debido al mecanismo de fijación de nitrógeno atmosférico que poseen las cepas en estudio. Resultados similares han sido reportados en cultivos de trigo, arroz, espinaca y tomate inoculados con distintas PGPR (Sharma et al., 2014; Purwanto & Suharti, 2021; RoyChowdhury et al., 2016; Moustaine et al., 2017).

Entretanto, el contenido de compuestos fotoprotectores como los carotenoides fue mayor en el tratamiento Control con respecto a los tratamientos inoculados en todos los años de siembra como se puede observar en la Figura 6.6 a y b. Una tendencia similar se observó en el contenido de antocianinas los cuales se encontraron en mayor concentración en el tratamiento Control con respecto a los inoculados como se muestra en la Figura 6.6 c y d.





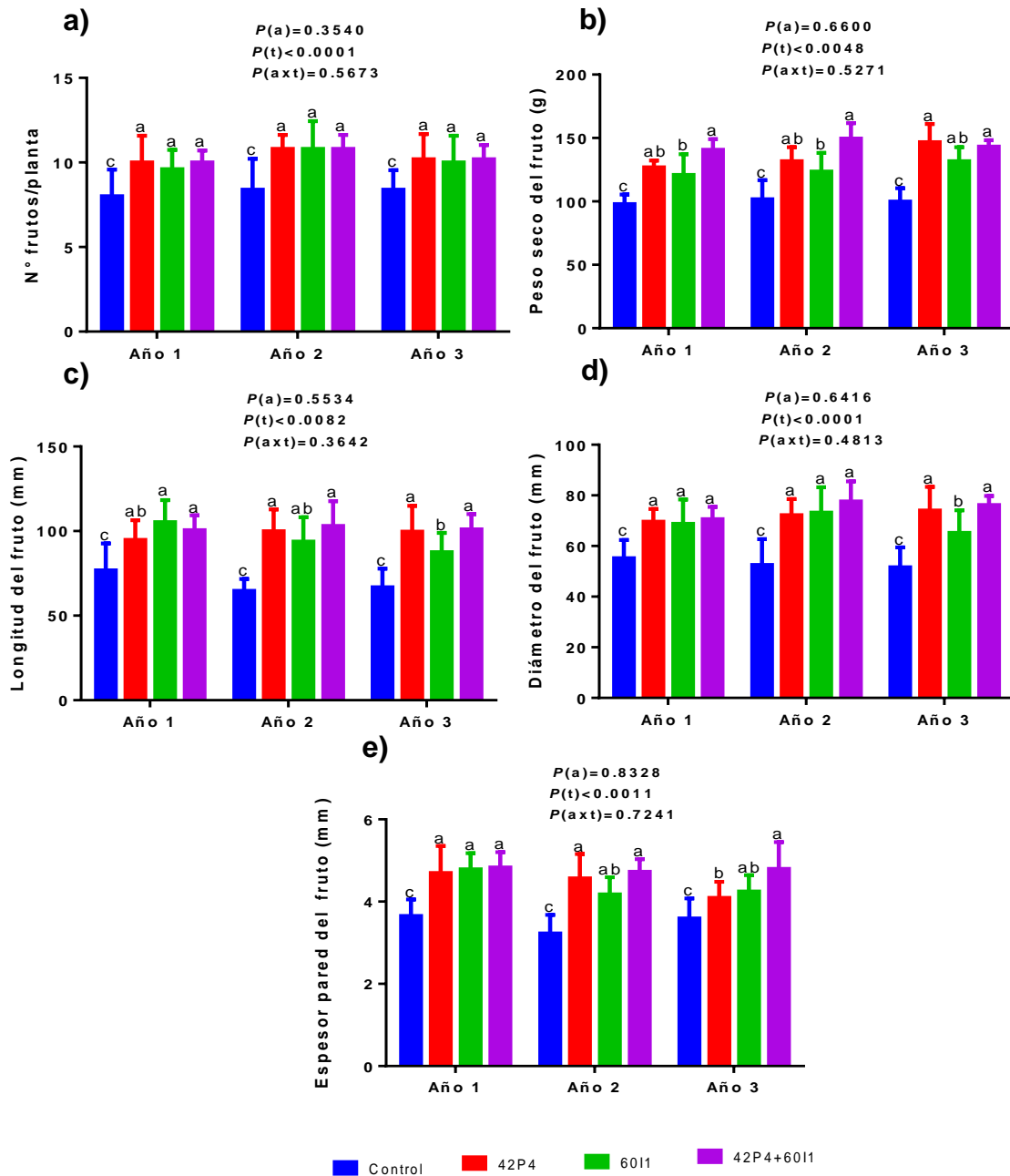
**Figura 6.6.** Concentración de **a)** clorofila a, **b)** clorofila total, **c)** carotenoides y **d)** antocianinas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y cultivadas en condiciones de campo. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

La mayor producción de pigmentos fotoprotectores en el tratamiento Control puede estar relacionada con la deficiencia de nitrógeno, lo cual deriva en una deficiencia de clorofila; ante esta situación, las plantas incrementan la producción de carotenoides para poder procesar el exceso de radiación UV. Un rol similar estaría desempeñando las antocianinas pero dirigidas a frenar el efecto nocivo de las especies reactivas de oxígeno. Este tipo de actividad fotoprotectora de

carotenoides y antocianinas ha sido demostrada en cultivos de lechuga y soja bajo deficiencia de nitrógeno (Becker et al., 2015; Li et al., 2018).

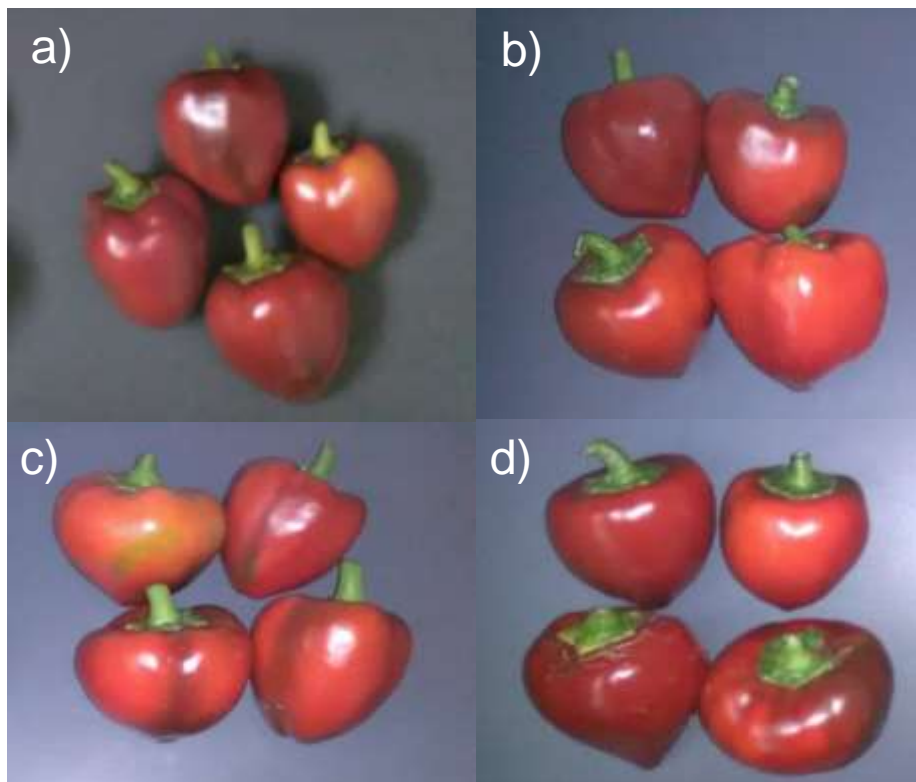
#### **D. Parámetros del componente rendimiento evaluados en plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y cultivadas bajo condiciones de campo**

Las plantas inoculadas con las PGPR presentaron el mayor número de frutos, así como los frutos con mayor peso seco como se muestra en la Figura 6.7 a y b. Los frutos de las plantas inoculadas también fueron los más largos, anchos y con mayor grosor de la pared como se muestra en la Figura 6.7 c, d y e. Estos parámetros demuestran la efectividad de las PGPR estudiadas para promover el crecimiento de las plantas de pimiento Calafyuco INTA e incrementar la producción.



**Figura 6.7.** a) Número de frutos por planta, b) peso seco del fruto, c) longitud del fruto, d) diámetro del fruto y e) espesor de la pared del fruto de plantas de pimienta cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y cultivadas bajo condiciones de campo. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Los resultados presentados previamente relacionados al contenido de nitrógeno en las plantas inoculadas, permiten inferir que el aporte de este nutriente por medio del mecanismo de fijación de nitrógeno atmosférico por parte de las bacterias provocó un mayor desarrollo de las plantas en la fase vegetativa. Posteriormente al final del ciclo del cultivo, esto se tradujo en una mayor cantidad y calidad de los frutos como se puede apreciar en la Figura 6.8. Resultados similares han sido reportados sobre parámetros relacionados con el rendimiento en cultivos de maíz, trigo y centeno inoculados con diversas PGPR en los cuales la mayor disponibilidad de nitrógeno incrementó los contenidos de clorofila con una consecuente mejora de la tasa fotosintética, lo que aumento el peso seco de los granos (Gholami et al., 2012; Jarak et al., 2012; Kumar et al., 2014; Song et al., 2015; Breedt et al., 2017).



**Figura 6.8.** Frutos de plantas de pimiento cv. Calafyuco INTA inoculadas con PGPR y cultivadas bajo condiciones de campo. Tratamientos: **a)** Control, **b)** plantas inoculadas con 6011 **c)** 42P4 y **d)** 6011+42P4. Las fotografías se tomaron a escala real.

### **E. Efecto de la inoculación con PGPR sobre perfil de compuestos fenólicos en plantas de pimiento Calafyuco INTA cultivadas bajo condiciones de campo**

Como se mencionó anteriormente, debido a la ausencia de diferencias estadísticas entre los diferentes años de siembra en los parámetros vegetativos, se optó por analizar el perfil de los compuestos fenólicos de las plantas cultivadas en el tercer año.

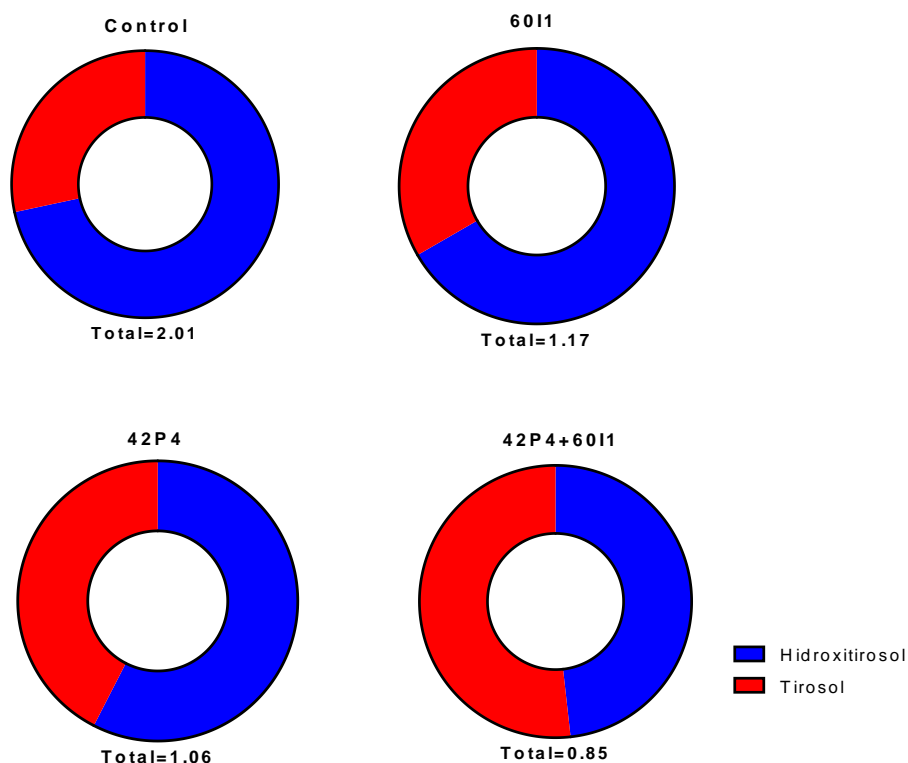
El perfil de los compuestos fenólicos de plantas de pimiento cultivadas en campo no inoculadas (Control), inoculadas con PGPR (60I1 y 42P4) y 42P4+60I1 se muestran en la Tabla 1. Se cuantificaron 22 compuestos fenólicos que se agrupan en cuatro familias, según su estructura química, teniendo así: alcoholes fenólicos simples, flavonoides, ácido fenólico y estilbenoides. Los resultados muestran una mayor concentración de la sumatoria de compuestos fenólicos en las plantas tratadas con 42P4, seguida por el tratamiento 42P4+60I1, el Control y 60I1.

**Tabla 1.** Perfil de compuestos fenólicos cuantificados en plantas de pimiento, cultivadas en campo e inoculadas con las PGPR en estudio. Los resultados cuantitativos están expresados en mg g<sup>-1</sup> de materia seca.

Compuesto	Control	60I1	42P4	42P4+60I1
<b>Alcoholes fenólicos simples</b>				
Hidroxitirosol	1,44±0,18a	0,78±0,12b	0,61±0,14b	0,41±0,01c
Tirosol	0,57±0,01a	0,39±0,00c	0,45±0,10b	0,44±0,04b
<b>Σ Alcoholes fenólicos simples</b>	2,01±0,18a	1,17±0,12b	1,06±0,17b	0,85±0,04c
<b>Flavonoides</b>				
(+)-Catequina	17,50±0,23a	0,17±0,05b	0,35±0,00b	0,26±0,18b
Rutina	0,70±0,02b	0,20±0,00c	4,04±0,04a	1,03±0,00b
(-)-Epicatequina	0,16±0,01a	n.d.*	n.d.*	0,24±0,12a
(-)-Epigallocatequina	13,63±0,02a	6,88±0,13b	5,33±0,40b	23,37±0,01a
(-)-Galato de galocatequina	18,82±0,78c	17,48±0,64c	37,74±2,54a	22,80±1,15b
(-)-Galato de epigallocatequina	8,11±1,99a	3,37±0,42c	6,77±0,57b	3,39±0,20c
Quercetina	0,62±0,11c	0,41±0,11c	14,04±0,23a	4,63±0,97b
Naringina	n.d.*	8,60±0,90c	43,83±4,02a	13,66±0,70b
Naringenina	0,25±0,08a	n.d.*	n.d.*	n.d.*
Miricetina	3,73±0,03b	3,05±0,15b	12,09±1,36a	11,01±0,29a
Procianidina B1	n.d.*	5,53±0,07a	0,87±0,10b	6,72±2,13a
Procianidina B2	4,12±2,97b	2,42±0,39c	n.d.*	9,43±0,63a
<b>Σ Flavonoides</b>	67,64±3,66c	48,11±1,26d	125,06±5,00a	96,54±2,80b
<b>Ácidos fenólicos</b>				
Ácido galico	n.d.*	1,01±0,13a	n.d.*	n.d.*
Ácido cinámico	4,05±0,23d	6,11±0,25c	33,55±4,52a	21,20±4,51b
Ácido p-coumarico	1,20±0,23a	0,29±0,02c	0,82±0,52b	0,30±0,08c
Ácido siringico	0,16±0,06b	0,15±0,01b	0,48±0,06a	0,40±0,01a
Ácido ferúlico	2,34±0,09a	0,15±0,01b	n.d.*	n.d.*
<b>Σ Ácidos fenólicos</b>	7,75±0,34c	7,71±0,28c	34,85±4,55a	21,9±4,51b
<b>Estilbenoides</b>				
Polidatina	n.d.*	1,81±0,01b	6,06±0,71a	2,67±1,28b
trans-resveratrol	1,47±0,66c	3,00±0,21b	7,96±0,51a	6,90±1,28a
Pteroestilbeno	1,37±0,24c	1,98±0,26a	2,01±0,06a	1,67±0,04b
<b>Σ Estilbenoides</b>	2,84±0,70d	6,79±0,33c	16,03±0,87a	11,24±1,81b
<b>Σ Compuestos fenólicos totales</b>	80,20±0,95c	63,78±2,54c	176,98±6,07a	130,49±4,48b

Letras diferentes indican diferencias significativas (por fila). Los resultados vienen dados por el valor medio (n = 3; tres determinaciones independientes, incluida la extracción y la posterior inyección) ± desviación estándar. \*: no detectado.

La mayor concentración de alcoholes fenólicos simples (hidroxitirosol y tirosol) se encontró en el tratamiento Control (2,01 mg g<sup>-1</sup>), seguido por 60I1 (1,17 mg g<sup>-1</sup>), 42P4 (1,06 mg g<sup>-1</sup>) y 42P4+60I1 (0,85 mg g<sup>-1</sup>). Dentro de esta familia el tratamiento control presentó las mayores concentraciones de hidroxitirosol (1,44 mg g<sup>-1</sup>) y tirosol (0,57 mg g<sup>-1</sup>) mientras que la menor concentración de hidroxitirosol se encontró en el tratamiento 42P4+60I1 (0,41 mg g<sup>-1</sup>) y la menor concentración de tirosol correspondió al tratamiento 60I1 (0,39 mg g<sup>-1</sup>), como se muestra en la Figura 6.9.



**Figura 6.9.** Contenido de alcoholes fenólicos simples cuantificados en plantas de pimiento, cultivadas en campo e inoculadas con las PGPR en estudio. Tratamientos: Control (sin bacterias); 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 42P4: *Pseudomonas* 42P4 y coinoculación: 42P4+60I1.

La mayor concentración de hidroxitirosol y tirosol encontrada en el tratamiento Control puede estar relacionada con una mayor capacidad antioxidante requerida

por las plantas debido al estrés por escases de nutrientes. La activación de la ruta del ácido shikímico para la síntesis de los compuestos fenólicos para enfrentar el estrés abiótico propició la desviación de fotoasimilados y nutrientes, para activar mecanismos de defensa. Así, la cantidad de fotoasimilados requeridos para completar el crecimiento disminuyó. Las plantas Controles presentaron menor contenido de nitrógeno, clorofila a y total, así como menor tamaño de las plantas y frutos con menor peso seco. Caretto y colaboradores, (2015) señalan que la activación de los mecanismos de defensa en las plantas que involucran la producción de compuestos fenólicos implica un costo energético elevado el cual va en detrimento del crecimiento y el rendimiento.

La teoría de “asignación flexible de recursos durante la defensa” de la fisiología vegetal explica que debido a que los recursos para el desarrollo de las plantas son limitados, estas deben repartir el gasto energético entre diferentes funciones fisiológicas, como crecimiento, aclimatación, mantenimiento de tejidos, reproducción y defensa. Estas funciones presentan una relación inversa y mutuamente excluyente, ya que la asignación a una función da como resultado la disminución de otra (Schultz et al., 2013).

La mayor concentración de hidroxitirosol y tirosol en el tratamiento Control se correlacionó con un menor contenido de nitrógeno en las hojas. La deficiencia de nitrógeno se considera un estrés abiótico importante capaz de reducir la conductividad hidráulica del sistema radicular y de disparar la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las raíces. El incremento de compuestos fenólicos en respuesta al estrés abiótico por falta de nitrógeno ha sido documentado en plantas de manzanilla, tabaco y albahaca (Kováčik et al., 2007; Del Mar Rubio-Wilhelmi et al., 2012; Argyropoulou et al., 2015).

Bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno se incrementa la producción de compuestos fenólicos, dentro de los cuales están los alcoholes fenólicos simples, esto es debido a la disminución de la demanda de aminoácidos y proteínas destinadas para intervenir en el crecimiento de la planta. Además, la falta de nitrógeno obliga a la planta a realizar cambios importantes en su metabolismo lo

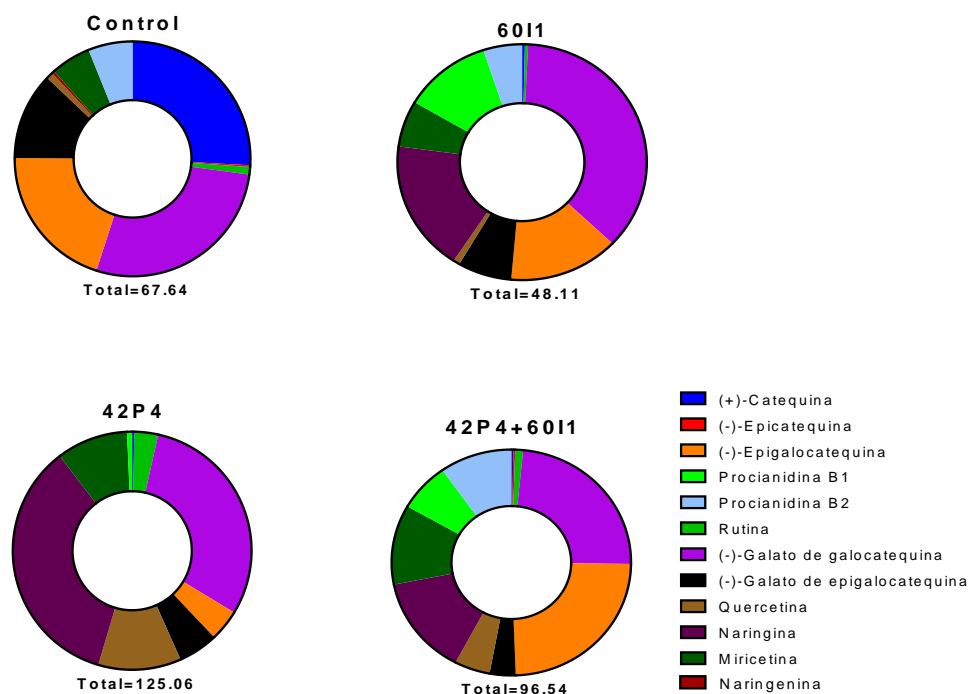


que induce un cambio de compuestos nitrogenados como los aminoácidos a compuestos ricos en carbono como los compuestos fenólicos (Del Mar Rubio-Wilhelmi et al., 2012).

Estos resultados permiten sugerir que la interacción de las PGPR con las plantas de pimiento en los tratamientos inoculados ha sido efectiva, de tal forma que las cepas bacterianas han activado los mecanismos que promueven el crecimiento de las plantas, proporcionando una mejor nutrición al cultivo.

El despliegue de los mecanismos previamente mencionados se evidencia en el incremento de los contenidos de clorofila; en conjunto la estabilidad de la tasa fotosintética en las plantas inoculadas que indujo una mayor altura de las plantas y una mejora notable en los parámetros relacionados con el componente rendimiento. Los contenidos adecuados de clorofila en las plantas inoculadas redujeron la necesidad de producir alcoholes fenólicos simples, una situación inversa se observó en el tratamiento Control, en el cual ante la deficiencia de clorofila y los problemas de estrés oxidativos derivados de esta situación las plantas redireccionaron su metabolismo hacia la producción de alcoholes fenólicos para atenuar los posibles efectos nocivos de las ERO.

En la familia de los flavonoides, se identificaron y cuantificaron los siguientes compuestos: (+)-catequina, rutina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-galato de galocatequina, (-)-galato de epigallocatequina, quercetina, naringina, naringenina, miricetina, procianidina B1 y procianidina B2. La concentración total de los perfiles de flavonoides fue diferente para cada tratamiento como se muestra en la Figura 6.10.



**Figura 6.10.** Flavonoides cuantificados en plantas de pimienta cultivadas en campo e inoculadas con las PGPR en estudio. Tratamientos: Control (sin bacterias); 6011: *Cellulosimicrobium* 6011; 42P4: *Pseudomonas* 42P4 y coinoculado: 42P4+6011.

La mayor concentración total de flavonoides la presentó el tratamiento 42P4+6011 ( $456,94 \text{ mg g}^{-1}$ ), seguido por el 42P4 ( $444,61 \text{ mg g}^{-1}$ ), el Control ( $235,76 \text{ mg g}^{-1}$ ) y 6011 ( $143,06 \text{ mg g}^{-1}$ ). Los niveles más altos en esta familia correspondieron a la (-)-epigallocatequina y (-)-galato de galocatequina en el tratamiento 42P4+6011 ( $23,37$  y  $22,80 \text{ mg g}^{-1}$  respectivamente).

El tratamiento Control presentó la mayor concentración de catequina, así como el menor contenido de nitrógeno en las hojas. Estos resultados indican que el estrés abiótico impuesto por la deficiencia de nitrógeno genera estrés oxidativo en las plantas de pimienta, de ahí la necesidad de producir catequina, la cual tiene un gran efecto antioxidante que ayuda a mitigar los efectos adversos de ERO

(Kovacik et al., 2014). Resultados similares se han reportado en hojas de plantas de té y en inflorescencias de *Coreopsis tinctoria* donde la deficiencia de nitrógeno estimuló la producción de catequinas (Fan et al., 2015; Li et al., 2021).

La concentración de galato de epigallocatequina fue mayor en el Control comparado con los demás tratamientos y presentó el mismo comportamiento previamente descrito de las catequinas con respecto al contenido de nitrógeno. Ahammed et al., (2018) informaron que el tratamiento exógeno con dosis medias y bajas de galato de epigallocatequina incrementan el crecimiento y la germinación de plántulas de tomate bajo estrés salino.

De igual forma el efecto benéfico del galato de epigallocatequina ha sido demostrado en plantas de tomate bajo estrés por calor, frío y sequía (Li et al., 2019). No obstante, otros autores han reportado que el tratamiento exógeno con dosis altas de galato de epigallocatequina retrasa la germinación, el crecimiento de raíces primarias y reduce la acumulación de biomasa en plántulas de tomate (Ahammed et al., 2020).

Por lo reportado en la literatura, se puede sugerir que las altas concentraciones de galato de epigallocatequina pueden comportarse como un agente limitante del crecimiento de las plantas. Las mayores concentraciones de galato de epigallocatequina en el tratamiento Control se correlacionan con un menor crecimiento de las plantas, contenido de nitrógeno, clorofila a y total, eficiencia del fotosistema II (Fv/Fm) y menor acumulación de materia seca en los frutos. Por consiguiente, se propone que el efecto nocivo de la gran acumulación de galato de epigallocatequina observados responden a la teoría de “asignación” previamente explicada en la sección correspondiente a los alcoholes fenólicos simples.

La teoría de “asignación” aplicada a los resultados encontrados en este estudio establece un vínculo entre diferentes familias de compuestos fenólicos (alcoholes fenólicos simples y flavonoides) involucrando la producción exacerbada en el tratamiento Control de hidroxitirosol, tirosol, catequina y galato de epigallocatequina que responden a una menor disponibilidad de nitrógeno, lo que ocasiona una reconfiguración del metabolismo de la planta, el cual se centra en la

producción de compuestos de carbono para frenar los efectos del estrés oxidativo impuesto por el déficit de nitrógeno.

La naringina solo se cuantificó en los tratamientos inoculados con las PGPR, mientras que en el tratamiento Control no fue detectada. La naringina es un flavonoide glicosilado, por lo que es razonable sugerir que en el tratamiento Control la naringina se desglicosiló dando lugar a la naringenina la cual solo se cuantificó en este tratamiento. Abdul-Qader y colaboradores, (2014) reportaron que la fertilización biológica y química incrementaron la concentración de naringina en plantas de estevia. De igual forma, en otra investigación se reportó que la aplicación de digestatos mejoró la calidad en plantas de pepino incrementando el contenido de naringina (Panuccio et al., 2019).

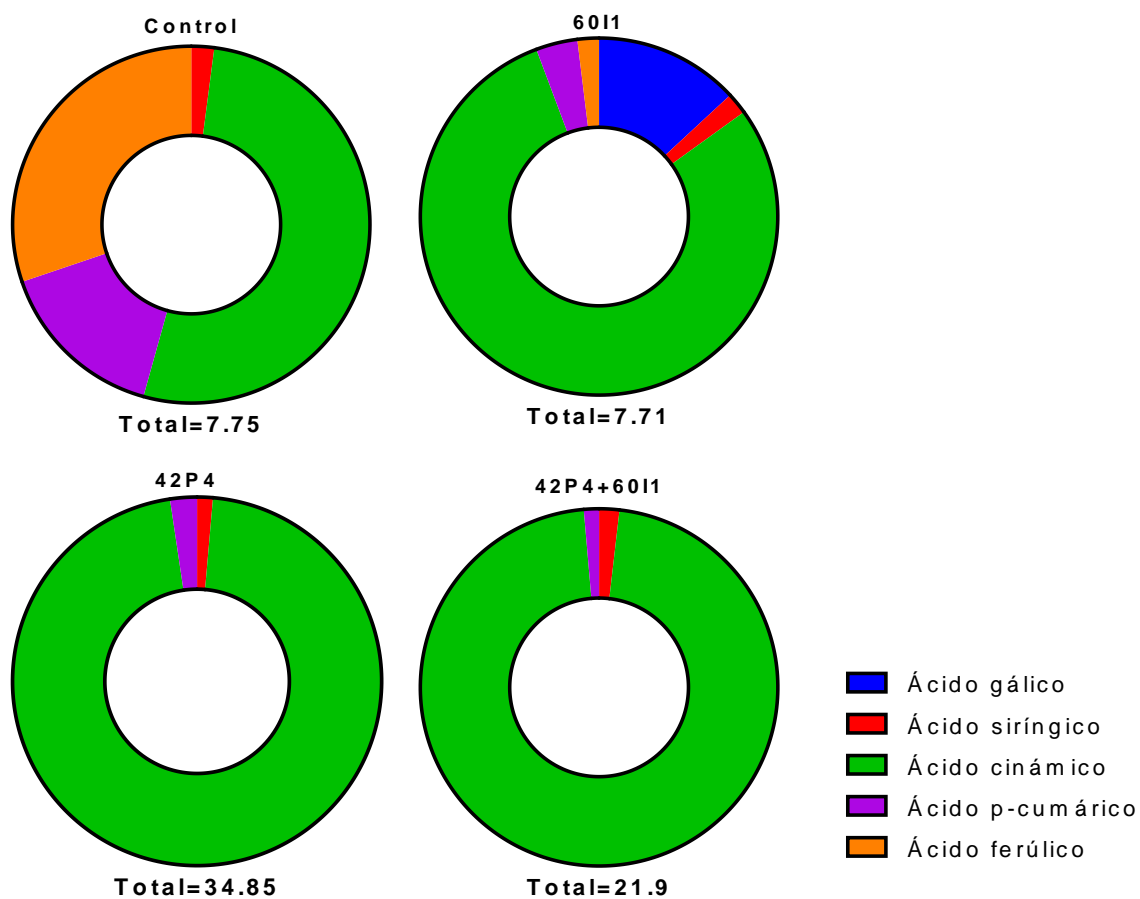
La naringenina solo se detectó y cuantificó en el tratamiento Control, el cual también presentó el menor tamaño de las plantas y la menor calidad de los frutos (peso, largo, diámetro y el espesor de la pared del fruto). Se ha reportado que, de manera dependiente de la dosis, la naringenina inhibe la germinación y el crecimiento de las raíces en plántulas *A. thaliana* (Hernández & Munné-Bosch, 2012). De igual forma en otro estudio se demostró que la naringenina inhibe el crecimiento longitudinal, el peso y el crecimiento celular en raíces de soja (Bido et al., 2010). Es posible que los mayores contenidos de naringenina en el tratamiento Control de este estudio hayan afectado el desarrollo radical, limitando la absorción de nutrientes lo que se vio reflejado en un menor desarrollo de las plantas.

La naringenina es considerada el precursor principal de la mayoría de los flavonoides (Abdel-Lateif et al., 2013; Feng et al., 2013). La presencia de este compuesto en el tratamiento Control y su ausencia en los tratamientos inoculados, permiten inferir que las plantas Control se encuentran en un estado de producción de flavonoides que apunta a necesidades fisiológicas diferentes en comparación con los demás tratamientos. Se sugiere que en los tratamientos inoculados se han metabolizado la naringenina para atender otros requerimientos metabólicos de las plantas, esto una vez más como se ha mencionado a lo largo de la discusión de los compuestos

fenólicos, puede estar claramente relacionado con las deficiencias de nitrógeno encontradas en las plantas Control.

El estrés ocasionado por la deficiencia de nitrógeno en el tratamiento Control se encuentra asociado a una menor concentración de clorofila a y total en las plantas. La disminución de clorofila es considerada el primer indicio de estrés y de la consecuente producción de ERO. Por otra parte, se sabe que el aumento de  $H_2O_2$  contribuye a la regulación positiva de los genes involucrados en la defensa de las plantas. Frente a este tipo de situaciones el papel de los compuestos fenólicos radica principalmente en la eliminación de ERO. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que paradójicamente la naringenina puede activar de forma explosiva la producción de  $H_2O_2$  y  $O^{\cdot-}$ , estimulando la respuesta defensiva de las plantas caracterizada por la activación de genes de defensa y la acumulación de ácido salicílico (An et al., 2021). Por consiguiente, es factible sugerir que los mayores contenidos de naringenina en el tratamiento Control podrían haber sido tomados como una señal para que las plantas activaran los mecanismos de defensa debido al estrés por falta de nitrógeno, de esta forma en las plantas Control se produjo una descompensación entre los recursos destinados para la defensa en los cuales se invirtió más, en detrimento del crecimiento y la producción.

Como ácidos fenólicos, se cuantificaron ácido gálico, ácido cinámico, ácido p-cumárico, ácido siríngico y ácido ferúlico. La mayor concentración total de ácidos fenólicos fue cuantificada en el tratamiento 42P4 ( $34,85 \text{ mg g}^{-1}$ ), seguido por el 42P4+60I1 ( $21,91 \text{ mg g}^{-1}$ ), Control ( $7,75 \text{ mg g}^{-1}$ ) y 60I1 ( $7,71 \text{ mg g}^{-1}$ ) como se puede observar en la Figura 6.11.



**Figura 6.11.** Contenido de ácidos fenólicos detectados en plantas de pimienta cultivadas en campo e inoculadas con las PGPR en estudio. Tratamientos: Control (sin bacterias); 60I1: *Cellulosimicrobium* 60I1; 42P4: *Pseudomonas* 42P4 y coinoculación: 42P4+60I1.

El ácido gálico solo se cuantificó en el tratamiento 60I1 (1,01 mg g<sup>-1</sup>). Los tratamientos 42P4 y 42P4+60I1 mostraron altas concentraciones de ácido cinámico (33,55 y 21,20 mg g<sup>-1</sup>) respectivamente. De igual forma, los tratamientos Control y 42P4 mostraron las mayores concentraciones de ácido p-cumárico, (1,20 y 0,82 mg g<sup>-1</sup>) respectivamente, seguidos por el tratamiento 42P4+60I1 (0,30 mg g<sup>-1</sup>) y 60I1 (0,29 mg g<sup>-1</sup>). La mayor concentración de ácido siríngico se cuantificó en el tratamiento 42P4 (0,48 mg g<sup>-1</sup>), mientras que la menor concentración la presentó el tratamiento 60I1 (0,15 mg g<sup>-1</sup>). La mayor concentración de ácido

ferúlico se cuantificó en el tratamiento control ( $2,34 \text{ mg g}^{-1}$ ), seguido por el tratamiento 60I1 ( $0,15 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que en los tratamientos 42P4 y 42P4+60I1 no fue detectado.

El comportamiento de los ácidos fenólicos en las plantas cultivadas en campo e inoculadas con PGPR en esta tesis presenta una tendencia claramente definida. Para entenderlo es importante señalar que en la ruta del ácido shikímico la desaminación de la fenilalanina por medio de la acción de la fenilalanina amonio liasa (PAL) da lugar a la formación de ácidos cinámico y cumárico, estos dos compuestos son responsables de la formación de moléculas orgánicas complejas como la lignina, cumarinas, taninos, flaconas, isoflavonas y flavonoides. Los ácidos cinámico y cumárico se metabolizan y dan lugar a los ácidos ferúlico y caféico de gran importancia en otras funciones del metabolismo secundario.

Como se muestra en la Figura 6.11 en esta investigación se presentan dos rutas claramente definidas en relación a la síntesis de los ácidos cinámico y cumárico. La ruta 1: está definida por una mayor producción de ácido cinámico y es el mecanismo prevalente en los tratamientos inoculados. Mientras que la ruta 2: está determinada por una mayor producción de ácido p-cumárico y corresponde al mecanismo adoptado por las plantas Control.

La prevalencia de alguna de estas rutas tiene importantes implicaciones en la producción de otros ácidos fenólicos que se forman como resultado del metabolismo del cinámico y p-cumárico. Por ejemplo, la mayor concentración de ácido cinámico se cuantificó en los tratamientos inoculados, mientras que el control presentó las menores concentraciones de este compuesto, así como una menor altura de la planta y calidad de los frutos. En otros estudios se demostró que el ácido cinámico es un promotor del crecimiento de las plantas debido a que estimula la división y la expansión celular en las hojas, además contribuye a la expansión del sistema radical facilitando la exploración y captación de nutrientes (Singh et al., 2013; Kurepa et al., 2018; Steenackers et al., 2019).

La ruta 2 propuesta en el metabolismo de los ácidos fenólicos corresponde al mecanismo utilizado por el Control, donde se presenta un importante gasto de

ácido cinámico favoreciendo la conservación del ácido p-cumárico el cual es más abundante en el Control, como se muestra en la Figura 6.11.

Para explicarlo se procedió a analizar de forma indirecta el destino del ácido cinámico en los tratamientos partiendo de un subproducto de su metabolización: el ácido ferúlico, el cual se encontró en una concentración 15 veces mayor en el tratamiento Control con respecto al tratamiento con 6011, mientras que en los tratamientos 42P4 y 42P4+6011 no fue detectado. El ácido ferúlico es un derivado del ácido cinámico enormemente abundante en los tejidos vegetales, debido a que es un componente esencial de la pared celular, su génesis está determinada por el ataque oxidativo sobre el alcohol coniferilo un importante componente de la lignina (Mathew & Abraham, 2006; Kumar & Pruthi, 2014).

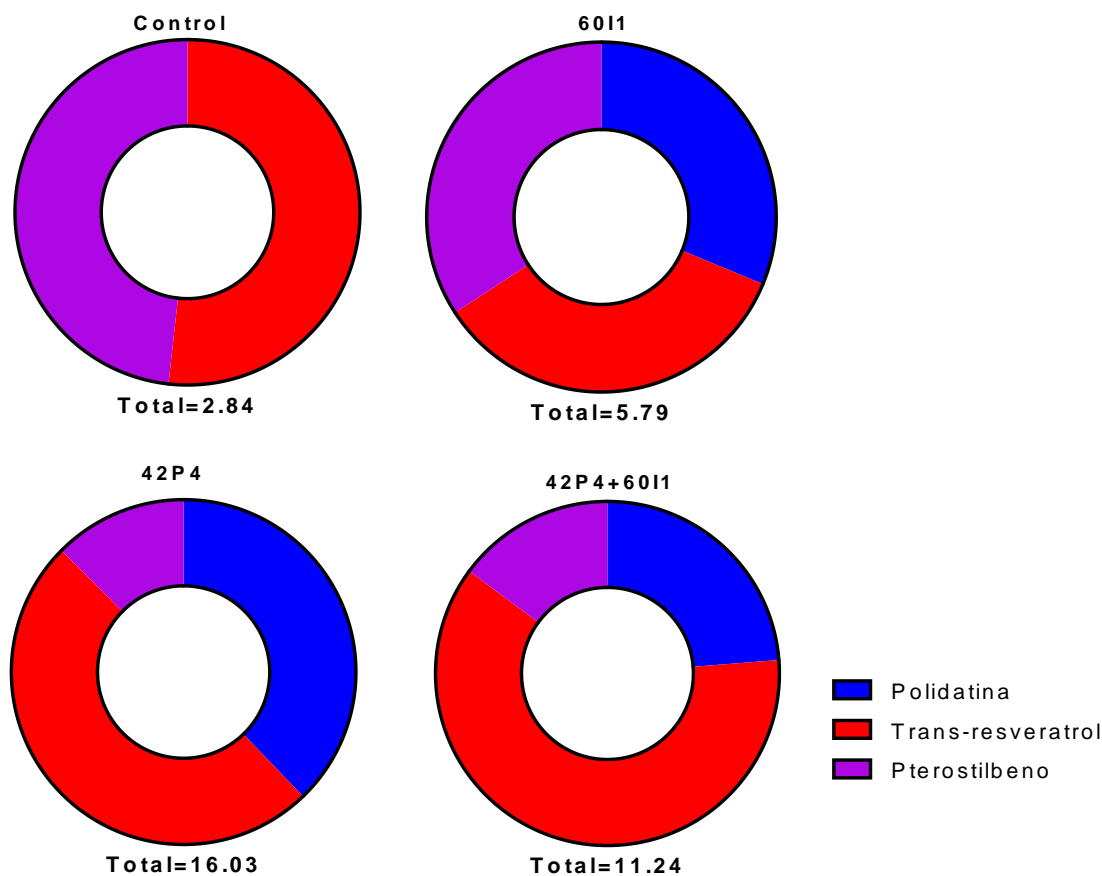
La concentración de ácido cinámico cuantificada en el Control fue menor que la cuantificada en los tratamientos inoculados. Esto permite inferir que en el tratamiento Control se está redireccionando la conversión de ácido cinámico a ácido ferúlico en comparación con los demás tratamientos. Esto puede estar relacionado a la baja disponibilidad de nutrientes en el tratamiento Control lo que obliga a las plantas a producir ácido ferúlico para reforzar la actividad antioxidante impuestas por las especies reactivas de oxígeno, que abundan bajo distintas condiciones de estrés, incluido el estrés por escases de nutrientes.

En particular la deficiencia de nitrógeno encontrada en el tratamiento Control puede estar relacionada con la producción de ácido ferúlico como antioxidante. Resultados similares fueron reportados en plantas de manzanilla bajo estrés por deficiencia de nitrógeno (Kováčik et al., 2007). Otros autores han informado que el ácido ferúlico es efectivo para eliminar radicales libres como el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido, radical hidroxilo e inclusive el dióxido de nitrógeno (Paiva et al., 2013; Boz, 2015). Además, el ácido ferúlico es un precursor de importantes moléculas de señalización, compuestos antimicrobianos y fitoalexinas de gran importancia en la respuesta de defensa de las plantas (Mathew & Abraham, 2006).



La limitada producción de ácido ferúlico en las plantas inoculadas y coinoculadas cultivadas bajo condiciones de campo puede considerarse como indicador de un correcto balance a nivel metabólico de las plantas que presentan una mejor nutrición debido al efecto de promoción por las PGPR. Es importante resaltar que la menor concentración de ácido ferúlico en los tratamientos inoculados presenta una correlación directa con los mayores contenidos de ácido cinámico, nitrógeno, contenidos clorofila a y total, altura de la planta y calidad de frutos encontrada en estos tratamientos bajo el efecto de las rizobacterias.

En la familia de los estilbenoides se cuantificaron polidatina, trans-resveratrol y pterostilbeno. La mayor concentración de estilbenoides se cuantificó en el tratamiento 42P4 (16,03 mg g<sup>-1</sup>), seguido por el tratamiento 42P4+60I1 (11,24 mg g<sup>-1</sup>), 60I1 (6,79 mg g<sup>-1</sup>) y Control (2,84 mg g<sup>-1</sup>). El tratamiento 42P4 presentó las mayores concentraciones de trans-resveratrol, polidatina y pteroestilbeno con (7,89, 6,06 y 2,01 mg g<sup>-1</sup>), respectivamente. Mientras que en el control no se cuantificó polidatina, además mostró las concentraciones más bajas de trans-resveratrol y pteroestilbeno con (1,47 y 1,37 mg g<sup>-1</sup>), respectivamente. Como se muestra en la Figura 6.12.



**Figura 6.12.** Contenido de estilbenoides detectados en plantas de pimiento cultivadas en campo e inoculadas con las PGPR en estudio. Tratamientos: Control (sin bacterias); 6011: *Cellulosimicrobium* 6011; 42P4: *Pseudomonas* 42P4 y coinoculado: 42P4+6011.

Los tratamientos inoculados presentaron la mayor concentración de estilbenoides con respecto al Control. La polidatina se cuantificó en todos los tratamientos excepto el Control en el cual no fue detectado. La polidatina es un glucósido del resveratrol, este último compuesto también presentó la menor concentración en el tratamiento Control. Lo recién expuesto, permite sugerir que en las plantas inoculadas en las cuales se presentó el mayor crecimiento y producción el resveratrol se encuentra unido a azúcares formando polidatina, mientras que en el tratamiento Control se ha separado el grupo glucósido del resveratrol por lo cual la polidatina no fue detectada en este tratamiento.

La baja disponibilidad de glucósidos en el Control para formar polidatina puede estar asociada con la baja disponibilidad de clorofila a y total, lo que ocasionó un funcionamiento deficiente del fotosistema II, reduciendo la cantidad de hidratos de carbono producidos en el proceso fotosintético. Aunque también se propone como hipótesis alternativa que en el tratamiento Control fue necesario recurrir a la glucosa de la polidatina para usarla como fuente de energía en otros procesos fisiológicos de la planta dando como resultado el agotamiento de la polidatina que paso a convertirse en resveratrol.

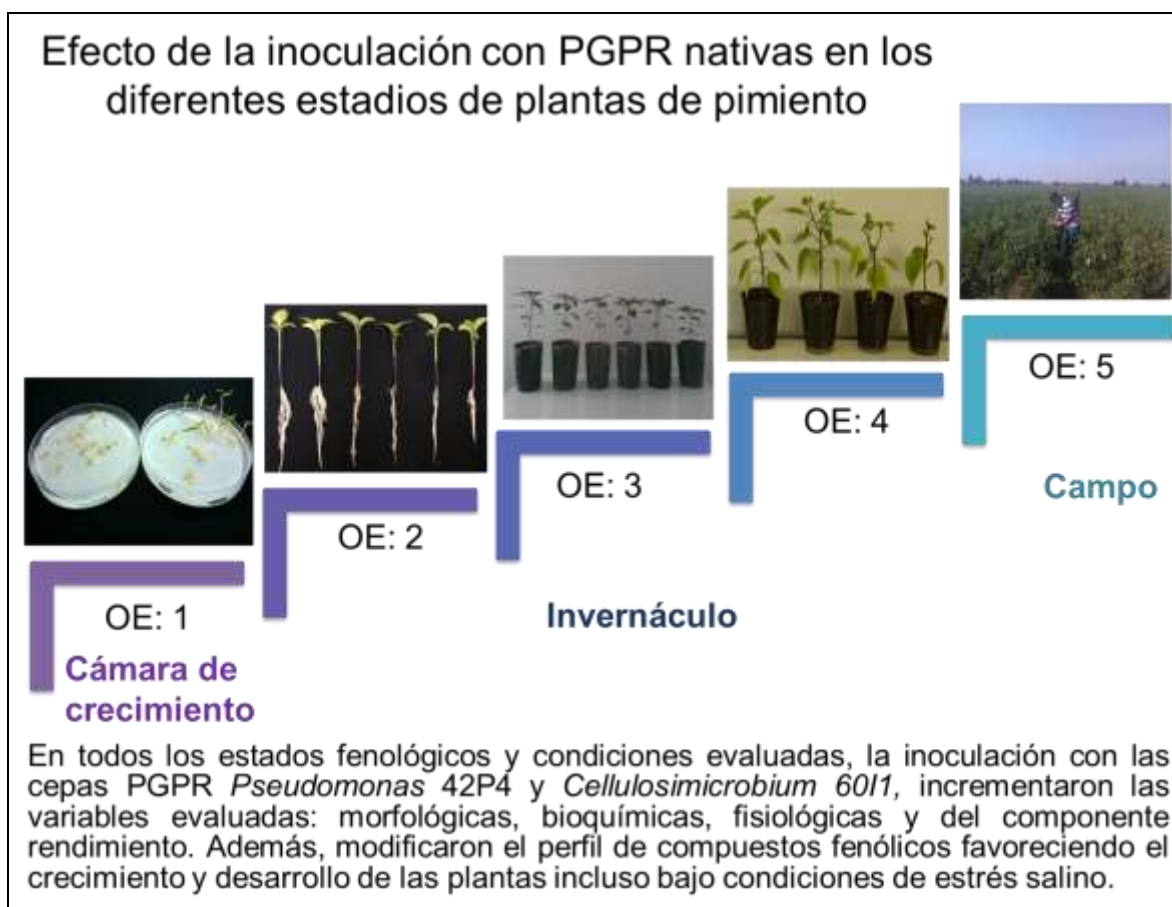
Las plantas Control presentaron la menor concentración de pterostilbena, este compuesto es un análogo natural metoxilado del resveratrol. Por lo que una menor concentración de resveratrol en el Control como recién se había informado es consistente con menores contenidos de pterostilbena, debido a que el primero se usa como sustrato precursor para la formación de este último. El resveratrol es un compuesto importante que protege a las hojas de la radiación UV (Ogneva et al., 2021). Mientras que el pterostilbena posee propiedades antifúngicas incluso más potentes que las del resveratrol (Flamini et al., 2013; Wang, et al., 2018; Duke, 2022). Además, el pterostilbena está involucrado en los mecanismos de tolerancia a la sequía en plantas (Yang et al., 2021).

Por consiguiente, es factible sugerir que la sumatoria de los mecanismos relacionados con la efectividad de las PGPR, pueden estar involucrados con el buen desarrollo de la parte aérea de las plantas inoculadas, lo que representan una característica agronómica de gran importancia en la medida en que refleja plantas bien nutridas, las cuales se encuentran aptas para producir frutos de calidad y tolerar de forma más eficiente el estrés ambiental. La mayor concentración de nitrógeno en los tratamientos inoculados con respecto al Control ayuda a explicar la mayor concentración de clorofila a y total, así como la mayor altura y ancho de las plantas, que posteriormente en la etapa de cosecha se tradujeron en una mejora en el peso seco, longitud, ancho y grosor de los frutos.

Por todos los resultados encontrados, el uso de estas rizobacterias podría ser una alternativa sustentable para los productores de pimiento para industria en la provincia de Mendoza, contribuyendo significativamente en la reducción de los costos asociados a la compra de fertilizantes de origen mineral, sumado a un beneficio ambiental.

## Conclusiones generales de la tesis

La inoculación de pimiento cv. Calafyuco INTA en distintos estadios de desarrollo fenológico con PGPR nativas de Mendoza, demostró ser un método recomendable para incrementar los parámetros relacionados con el crecimiento, así como para modificar de forma positiva variables fisiológicas e incrementar la producción y calidad de frutos (Figura 6.13). Además, el perfil de compuestos fenólicos se vio modificado por la inoculación de forma diferente dependiendo del estado fenológico de la planta.



**Figura 6.13.** Resumen gráfico de las conclusiones

El efecto de la inoculación demostró ser dependiente de la PGPR empleada, las más efectivas fueron *Pseudomonas* 42P4 y *Cellulosimicrobium* 6011. También la formulación de un consorcio fue efectiva para promover el crecimiento al combinar ambas cepas.

Las PGPR incrementaron la germinación de las semillas, el índice de vigor, el diámetro y la longitud de las plántulas, reduciendo el tiempo de germinación hasta un 28% lo cual es de suma importancia para la producción industrial de plantines de pimiento a gran escala. La inoculación incrementó la concentración de compuestos fenólicos libres en las plántulas, entre los que resaltan una mayor producción de ácidos fenólicos naringina, rutina y tirosol que podrían ser utilizados como fuentes de carbono para las PGPR y compuestos antioxidantes para las plantas.

La inoculación de plantines de pimiento con las PGPR *Pseudomonas* 42P4 y *Cellulosimicrobium* 6011 fue efectiva para incrementar el crecimiento, de forma similar a un fertilizante comercial de origen químico. En los plantines inoculados predominó la producción de los flavonoides (naringenina, naringina, catequina y (-)-galato de epigallocatequina). Esto se correlacionó con una respuesta positiva en la acumulación de pigmentos fotosintéticos y en el crecimiento.

La inoculación de plantas en macetas también incrementó los parámetros morfológicos y fisiológicos, de forma similar al tratamiento Fertilizado. Además, las PGPR incrementaron el número de flores por planta, así como el diámetro, número y peso seco de los frutos. La inoculación con *Pseudomonas* 42P4 incrementó la producción de quercetina, naringenina, (-)-galato de galocatequina, quercetina y miricetina. La abundancia de estos compuestos se correlaciona con una efectiva colonización del sistema radical por parte de las bacterias.

De igual forma, en los tratamientos inoculados con *Pseudomonas* 42P4 y Fertilizado se encontraron compuestos con actividad antifúngica como los ácidos fenólicos (ácido cinámico y ferúlico), debido a que son precursores del ácido salicílico. Se determinó como dosis de tolerancia a la salinidad para el pimiento cv. Calafyuco INTA una concentración de 150 mM de NaCl y 200 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La

inoculación con las cepas *Pseudomonas* 42P4 y *Cellulosimicrobium* 6011 disminuye los efectos negativos de la salinidad por ambas sales en plantas de pimiento, incrementado la respuesta ante el estrés abiótico por medio de una mayor acumulación de nitrógeno prolina, hidroxitirosol, tirosol, miricetina, quercetina, (-)-galato de galocatequina, ácido p-cumárico y trans-resveratrol. Además, las plantas inoculadas mantuvieron la integridad de las membranas y el equilibrio osmótico..

Las PGPR *Pseudomonas* 42P4 y *Cellulosimicrobium* 6011 demostraron su capacidad para desplegar los mecanismos de promoción del crecimiento en plantas cultivadas en campo, incrementando el desarrollo de la parte aérea de las plantas inoculadas, lo que representan una característica agronómica de gran importancia en la medida en que refleja plantas con un buen estado nutricional, las cuales se encuentran aptas para producir frutos de excelente calidad y tolerar de forma más eficiente el estrés ambiental. Además, las plantas inoculadas con las PGPR en estudio produjeron el mayor número de frutos y con mayor contenido de materia seca en los tres años de ensayos.

Las plantas inoculadas presentaron una mayor producción de ácido cinámico, mientras que en las Control predominó el ácido p-cumárico. Los tratamientos inoculados presentaron la mayor concentración de estilbenoides con respecto al Control, los cuales están relacionados con la defensa de las plantas. La polidatina se cuantificó en todos los tratamientos excepto en el Control.

Finalmente, se sugiere el uso combinado de las rizobacterias *Pseudomonas* 42P4 y *Celulosimicrobium* 6011 como un bioinoculante efectivo para promover la germinación de semillas de pimiento cv. Calafyuco INTA, incrementar el crecimiento de los plantines, inducir la RSI bajo condiciones de estrés por salinidad y para suplir gran parte de la fertilización nitrogenada en las plantas cultivadas en campo, así como para incrementar la producción en la provincia de Mendoza. No obstante, se sugiere la realización de experimentos que permitan desarrollar un protocolo para la producción a escala industrial de las rizobacterias.

## **Ideas proyecto generadas a partir de la tesis**

Evaluar los efectos de la aplicación exógena de compuestos fenólicos en el proceso de colonización y germinación de semillas inoculadas con PGPR para correlacionar el efecto de cada uno con el que se produce con la inoculación con las bacterias.

Determinar y evaluar otros mecanismos asociados a la producción y modificación de niveles endógenos de hormonas que participan en el alivio del estrés salino.

Estudiar bajo condiciones de estrés salino el potencial antioxidante de la aplicación exógena compuestos fenólicos y PGPR.

Realizar ensayos de campo en distintas localizaciones de la provincia de Mendoza con suelos con diferentes características.

Evaluar mecanismos por los cuales las PGPR producen incrementos en la calidad de frutos.



## Referencias

- Abbas-Zadeh, P., Saleh-Rastin, N., Asadi-Rahmani, H., Khavazi, K., Soltani, A., Shoary-Nejati, A.R., & Miransari, M. (2010). Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. *Acta physiologiae plantarum*, 32, 281-288.
- Abbas, R., Rasul, S., Aslam, K., Baber, M., Shahid, M., Mubeen, F., & Naqqash, T. (2019). Halotolerant PGPR: A hope for cultivation of saline soils. *Journal of king saud university-science*, 31, 1195-1201.
- Abbasi, S., Zahedi, H., Sadeghipour, O., & Akbari, R. (2013). Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on physiological parameters and nitrogen content of soybean grown under different irrigation regimes. *Research on crops*, 14, 798-803.
- Abbaszadeh-Dahaji, P., Atajan, F. A., Omidvari, M., Tahan, V., & Kariman, K. (2021). Mitigation of Copper Stress in Maize (*Zea mays*) and Sunflower (*Helianthus annuus*) Plants by Copper-resistant Pseudomonas Strains. *Current microbiology*, 78, 1335-1343.
- Abbad, M., Snoussi, S. A., Djerdjouri, A., & Ghanem Boughanmi, N. (2019). Comparative effect of two varieties of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to salinity. *Agrobiologia*, 9, 1601-1609.
- Abdul-Baki, A., & Anderson, J. (1973). Vigor determination in soybean seed by multiple criteria 1. *Crop science*, 13, 630–633.
- Abdul-Qader, Z.M., Rabie, K.M., & Husni, H.S. (2014). Efficacy of Bio-fertilizer and Chemical Fertilization on Flavonoids Distribution in Different Plant Parts of *Stevia rebaudiana* (Bertoni.). *Revista bionatura*, 7, 2-20.
- Abdel-Lateif, K., Vaissayre, V., Gherbi, H., Verries, C., Meudec, E., Perrine-Walker, F., & Hocher, V. (2013). Silencing of the chalcone synthase gene in *Casuarina*

*glauca* highlights the important role of flavonoids during nodulation. *New phytologist*, 199, 1012-1021.

Adesemoye, A.O., Torbert, H.A., & Kloepper, J.W. (2008). Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian journal of microbiology*, 54, 876-886.

Afzal, W., Anjum, T., Choudhry, H. J., Ahmad, S. R., & Aslam, M. (2019). Screening and evaluation of indigenous halo-tolerant microbes for salt stress alleviation in celery (*Apium graveolens*). *Soil & Environment*, 38, 1-10.

Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant science*, 196, 67-76.

Agati, G., Biricolti, S., Guidi, L., Ferrini, F., Fini, A., & Tattini, M. (2011). The biosynthesis of flavonoids is enhanced similarly by UV radiation and root zone salinity in *L. vulgare* leaves. *Journal of plant physiology*, 168, 204-212.

Aghajanzadeh, T. A., Reich, M., Kopriva, S., & De Kok, L. J. (2018). Impact of chloride (NaCl, KCl) and sulphate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) salinity on glucosinolate metabolism in *Brassica rapa*. *Journal of agronomy and crop science*, 204, 137-146.

Ahammed, G. J., Li, Y., Li, X., Han, W. Y., & Chen, S. (2018). Epigallocatechin-3-gallate alleviates salinity-retarded seed germination and oxidative stress in tomato. *Journal of plant growth regulation*, 37, 1349-1356.

Ahammed, G. J., Li, Y., Cheng, Y., Liu, A., Chen, S., & Li, X. (2020). Abscisic acid and gibberellins act antagonistically to mediate epigallocatechin-3-gallate-retarded seed germination and early seedling growth in tomato. *Journal of plant growth regulation*, 1, 11-42.

Ahammed, G. J., Li, Y., Cheng, Y., Liu, A., Chen, S., & Li, X. (2020). Abscisic acid and gibberellins act antagonistically to mediate epigallocatechin-3-gallate-retarded seed germination and early seedling growth in tomato. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39, 1414-1424.

Ahmed, E., & Holmström, S.J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial biotechnology*, 7, 196-208.

Ahmed, S., Roy Choudhury, A., Chatterjee, P., Samaddar, S., Kim, K., Jeon, S., & Sa, T. (2019). The role of plant growth-promoting rhizobacteria to modulate proline biosynthesis in plants for salt stress alleviation. In *plant growth promoting rhizobacteria for sustainable stress management*, 1, 1-20.

Aini, N., Dwi Yamika, W.S., & Pahlevi, R.W. (2019). The effect of nutrient concentration and inoculation of PGPR and AMF on the yield and fruit quality of hydroponic cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill. var. cerasiforme). *Journal of applied horticulture*, 21, 2-25.

Akhtar, S.S., Mekureyaw, M.F., Pandey, C., & Roitsch, T. (2020). Role of cytokinins for interactions of plants with microbial pathogens and pest insects. *Frontiers in plant science*, 10, 17-77.

Al Mamari, H. H. (2021). Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis. In *Phenolic Compounds*. IntechOpen.

Alizadeh, A., Khoshkhui, M., Javidnia, K., Firuzi, O., Tafazoli, E., Khalighi, A., 2010. Effects of fertilizer on yield, essential oil composition, total phenolic content and antioxidant activity in *Satureja hortensis* L. (*Lamiaceae*) cultivated in Iran. *Journal of medicinal plants research*, 4, 033–040.

Alkahtani, M. D., Attia, K. A., Hafez, Y. M., Khan, N., Eid, A. M., Ali, M. A., & Abdelaal, K. A. (2020). Chlorophyll fluorescence parameters and antioxidant defense system can display salt tolerance of salt acclimated sweet pepper plants treated with chitosan and plant growth promoting rhizobacteria. *Agronomy*, 10, 11-80.

Ambreetha, S., Chinnadurai, C., Marimuthu, P., & Balachandar, D. (2018). Plant-associated *Bacillus* modulates the expression of auxin-responsive genes of rice and modifies the root architecture. *Rhizosphere*, 5, 57-66.

Amogou, O., Dagbénonbakin, G., Agbodjato, N. A., Noumavo, P. A., Salami, H. A., Valère, S., & Baba-Moussa, L. (2018). Influence of Isolated PGPR Rhizobacteria in Central and Northern Benin on Maize Germination and Greenhouse Growth. *American Journal of Plant Sciences*, 9, 2775-2793.

An, J., Kim, S.H., Bahk, S., Vuong, U.T., Nguyen, N.T., Do, H.L., & Chung, W.S. (2021). Naringenin induces pathogen resistance against *Pseudomonas syringae* through the activation of NPR1 in *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, 12, 8-53.

Anbi, A. A., Mirshekari, B., Eivazi, A., Yarnia, M., & Behrouzfar, E.K. (2020). PGPRs affected photosynthetic capacity and nutrient uptake in different *Salvia* species. *Journal of plant nutrition*, 43, 108-121.

Ankati, S., & Podile, A. (2019). Metabolites in the root exudates of groundnut change during interaction with plant growth promoting rhizobacteria in a strain-specific manner. *Journal of plant physiology*, 243, 153-157.

Antonio, A.S., Wiedemann, L.S.M., & Junior, V.V. (2018). The genus *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites. *The royal society of chemistry*, 8, 25767-25784.

Annan, H., Golding, A L., Zhao, Y., & Dong, Z. (2012). Choice of hydrogen uptake (Hup) status in legume-rhizobia symbioses. *Ecology and evolution*, 2, 2285-2290.

Annapurna, K., Kumar, A., Kumar, L V., Govindasamy, V., Bose, P., & Ramadoss, D. (2013). PGPR-induced systemic resistance (ISR) in plant disease management. *Bacteria in Agrobiolology*, 5, 405-425.

Arora, N. K., Tewari, S., Singh, S., Lal, N., & Maheshwari, D. K. (2012). PGPR for protection of plant health under saline conditions. *Bacteria in agrobiolology*, 5, 239-258.

Argyropoulou, K., Salahas, G., Papisavvas, A., & Hela, D. (2015). Impact of nitrogen deficiency on biomass production, morphological and biochemical characteristics of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants, cultivated

aeroponically. *Journal of International Scientific Publications: Agriculture and food*, 3, 32-42.

Arikan, Ş., İpek, M., Eşitken, A., Pırlak, L., Dönmez, M. F., & Turan, M. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria mitigate deleterious combined effects of salinity and lime in soil in strawberry plants. *Journal of plant nutrition*, 43, 2028-2039.

Artyszak, A., & Gozdowski, D. (2020). The effect of growth activators and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on the soil properties, root yield, and technological quality of sugar beet. *Agronomy*, 10, 12-62.

Aslani, Z., Hassani, A., Abdollahi Mandoulakani, B., Barin, M., & Maleki, R. (2021). Effect of plant growth-promoting microorganisms inoculation on some growth and physiological parameters and nutrients content of sage (*Salvia officinalis*) under salinity stress conditions. *Applied soil research*, 9, 104-122.

Awasthi, R., Tewari, R., & Nayyar, H. (2011). Synergy between plants and P-solubilizing microbes in soils: effects on growth and physiology of crops. *International research journal of microbiology*, 2, 484-503.

Ayuso-Calles, M., García-Estévez, I., Jiménez-Gómez, A., Flores-Félix, J. D., Escribano-Bailón, M. T., & Rivas, R. (2020). Rhizobium laguerreae improves productivity and phenolic compound content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under saline stress conditions. *Foods*, 9, 11-66.

Babar, M., Rasul, S., Aslam, K., Abbas, R., Manzoor, I., Hanif, M. K., & Naqqash, T. (2021). Mining of halo-tolerant plant growth promoting rhizobacteria and their impact on wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline conditions. *Journal of king saud university-science*, 33, 101-372.

Badri, D.V., & Vivanco, J.M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, cell & environment*, 32, 666–681.

Badri, D.V., Chaparro, J.M., Zhang, R., Shen, Q., & Vivanco, J.M. (2013). Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of

Arabidopsis to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. *Journal of biological chemistry*, 288, 4502-4512.

Baenas, N., Belović, M., Ilic, N., Moreno, D.A., & García-Viguera, C. (2019). Industrial use of pepper (*Capsicum annum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. *Food chemistry*, 274, 872-885.

Bais, H. P., Venkatachalam, L., & Biedrzycki, M. L. (2010). Stimulation or inhibition: conflicting evidence for (±)-catechin's role as a chemical facilitator and disease protecting agent. *Plant signaling & behavior*, 5, 239-246.

Bakker, P. A., Berendsen, R. L., Doornbos, R. F., Wintermans, P. C., & Pieterse, C. M. (2013). The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in plant science*, 4, 21-165.

Bal, H.B., Nayak, L., Das, S., & Adhya, T.K. (2013). Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and soil*, 366, 93-105.

Balestrini, R., Brunetti, C., Cammareri, M., Caretto, S., Cavallaro, V., Cominelli, E., & Zampieri, E. (2021). Strategies to Modulate Specialized Metabolism in Mediterranean Crops: From Molecular Aspects to Field. *International journal of molecular sciences*, 22, 28-87.

Barnawal, D., Bharti, N., Pandey, S. S., Pandey, A., Chanotiya, C. S., & Kalra, A. (2017). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1/TaDREB2 expression. *Physiologia plantarum*, 161, 502-514.

Barros, R., Isidoro, D., & Aragüés, R. (2012). Irrigation management, nitrogen fertilization and nitrogen losses in the return flows of La Violada irrigation district (Spain). *Agriculture, ecosystems & environment*, 155, 161-171.

Basha, S. A., Sarma, B. K., Singh, D. P., Annapurna, K., & Singh, U. P. (2006). Differential methods of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria induce

synthesis of phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds differentially in chickpea. *Folia microbiológica*, 51, 463-468.

Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Bottini, R., & Baraldi, R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A 1 and A 3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant growth regulation*, 24, 7-11.

Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39, 205-207.

Batiha, G.E.S., Alqahtani, A., Ojo, O.A., Shaheen, H.M., Wasef, L., Elzeiny, M., & Hetta, H.F. (2020). Biological properties, bioactive constituents, and pharmacokinetics of some *Capsicum* spp. and capsaicinoids. *International journal of molecular sciences*, 21, 51-79.

Battaglia, M., & Covarrubias, A. A. (2013). Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in legumes. *Frontiers in plant science*, 4, 190-194.

Bechtaoui, N., Raklami, A., Benidire, L., Tahiri, A.I., Göttfert, M., & Oufdou, K. (2020). Effects of PGPR co-inoculation on growth, phosphorus nutrition and phosphatase/phytase activities of faba bean under different phosphorus availability conditions. *Polish journal of environmental studies*, 29, 1557-1565.

Becherescu, A., Hoza, G., Poșta, G., & Popa, D. (2016). Importance of crop substratum and foliar fertilizers on yield and quality in hybrid cornichon cucumbers. *Journal of Horticulture, Forestry and biotechnology*, 20, 15-20.

Becker, C., Urlić, B., Jukić Špika, M., Kläring, H.P., Krumbein, A., Baldermann, S., & Schwarz, D. (2015). Nitrogen limited red and green leaf lettuce accumulate flavonoid glycosides, caffeic acid derivatives, and sucrose while losing chlorophylls,  $\beta$ -carotene and xanthophylls. *Plos one*, 10, 11-15.

Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K., & Thatoi, H.N. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising

microorganism in mangrove a review. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 3, 97-110.

Behera, A. D., Nachu, N. S., Ashwin, R., & Bagyaraj, D. J. (2019). Influence of AM fungus *G. mosseae* and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on growth of tomato seedlings raised in pro trays. *Journal of soil biology and ecology*, 39, 53-63.

Bellache, M., Moltó, N., Benfekih, L. A., Torres-Pagan, N., Mir, R., Verdeguer, M., & Vicente, O. (2022). Physiological and biochemical responses to water stress and salinity of the invasive moth plant, *Araujia sericifera* Brot., during seed germination and vegetative growth. *Agronomy*, 12, 3-61.

Ben Abdallah, S., Aung, B., Amyot, L., Lalin, I., Lachâal, M., Karray-Bouraoui, N., & Hannoufa, A. (2016). Salt stress (NaCl) affects plant growth and branch pathways of carotenoid and flavonoid biosyntheses in *Solanum nigrum*. *Acta physiologiae plantarum*, 38, 1-13.

Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L.M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35, 1044-1051.

Berli, F. J., Alonso, R., Bressan-Smith, R., & Bottini, R. (2013). UV-B impairs growth and gas exchange in grapevines grown in high altitude. *Physiologia Plantarum*, 149, 127-140.

Bezhushvili, M., Tskhvedadze, L., Surguladze, M., Shoshiashvili, G., Kharadze, S., Gagunashvili, L., & Vashakidze, P. (2019). Stress-metabolites phytoalexins-stilbenoids of grape skin Rkatsiteli variety (*Vitis vinifera* L.) in condition gray mildew. *Eurasian journal of biosciences*, 13, 549-554.

Blanco, Y. (2006). La utilización de la alelopatía y sus efectos en diferentes cultivos agrícolas. *Cultivos tropicales*, 27, 5-16.

Bhardwaj, D., Ansari, M.W., Sahoo, R.K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, 13, 1-10.



Bharti, N., Pandey, S. S., Barnawal, D., Patel, V. K., & Kalra, A. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Scientific reports*, 6, 1-16.

Bharti, N., Yadav, D., Barnawal, D., Maji, D., & Kalra, A. (2013). *Exiguobacterium oxidotolerans*, a halotolerant plant growth promoting rhizobacteria, improves yield and content of secondary metabolites in *Bacopa monnieri* (L.) Pennell under primary and secondary salt stress. *World journal of microbiology and biotechnology*, 29, 379-387.

Bharti, N., & Barnawal, D. (2019). Amelioration of salinity stress by PGPR: ACC deaminase and ROS scavenging enzymes activity. In *PGPR amelioration in sustainable agriculture*, 85, 45-106.

Bharathi, C. S., Mohan, B., & Alagudurai, S. (2014). Raising of hybrid vegetable seedlings under protrays. *Journal of krishi vigyan*, 2, 64-68.

Bharti, N., & Barnawal, D. (2019). Amelioration of salinity stress by PGPR: ACC deaminase and ROS scavenging enzymes activity. In *PGPR amelioration in sustainable agriculture*, 1, 85-106.

Bharucha, U., Patel, K., & Trivedi, U.B. (2013). Optimization of indole acetic acid production by *Pseudomonas putida* UB1 and its effect as plant growth-promoting rhizobacteria on mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural research*, 2, 215-221.

Bhat, M.A., Kumar, V., Bhat, M.A., Wani, I.A., Dar, F.L., Farooq, I., & Jan, A.T. (2020). Mechanistic insights of the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with plant roots toward enhancing plant productivity by alleviating salinity stress. *Frontiers in microbiology*, 11, 18-23.

Bhat, M. A., Kumar, V., Bhat, M. A., Wani, I. A., Dar, F. L., Farooq, I., & Jan, A. T. (2020). Mechanistic insights of the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with plant roots toward enhancing plant productivity by alleviating salinity stress. *Frontiers in microbiology*, 19, 52-86.

- Bhattacharjee, R., & Dey, U. (2014). Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. *African journal of microbiology research*, 8, 2332-2343.
- Bhutani, N., Maheshwari, R., Negi, M., & Suneja, P. (2018). Optimization of IAA production by endophytic *Bacillus* spp. from *Vigna radiata* for their potential use as plant growth promoters. *Israel Journal of plant sciences*, 65, 83-96.
- Bido, G.D.S., Ferrarese, M.D.L.L., Marchiosi, R., & Ferrarese-Filho, O. (2010). Naringenin inhibits the growth and stimulates the lignification of soybean root. *Brazilian archives of biology and technology*, 53, 533-542.
- Bishnoi, U. (2015). PGPR interaction: an ecofriendly approach promoting the sustainable agriculture system. *Advances in botanical research*, 75, 81-113.
- Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D., & Pharis, R.P. (1989). Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant physiology*, 90, 45-47.
- Bottini R, Cassan F, Piccoli P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied microbiology and biotechnology*, 65, 497-503.
- Boz, H. (2015). Ferulic acid in cereals-a review. *Czech journal of food sciences*, 33, 1-7.
- Breedt, G., Labuschagne, N., & Coutinho, T.A. (2017). Seed treatment with selected plant growth-promoting rhizobacteria increases maize yield in the field. *Annals of applied biology*, 171, 229-236.
- Caccia, S., Casartelli, M., Grimaldi, A., Losa, E., de Eguileor, M., Pennacchio, F., & Giordana, B. (2007). Unexpected similarity of intestinal sugar absorption by SGLT1 and apical GLUT2 in an insect (*Aphidius ervi*, Hymenoptera) and mammals. *American journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology*, 292, 2284-2291.
- Cameron, K.C., Di, H.J., & Moir, J.L. (2013). Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Annals of applied biology*, 162, 145-173.

Capanoglu, E. (2010). The potential of priming in food production. *Trends in food science & technology*, 21, 399-407.

Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., Mita, G., & Lattanzio, V. (2015). Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. *International journal of molecular sciences*, 16, 26378-26394.

Carrizo-García, C., Barfuss, M.H., Sehr, E.M., Barboza, G.E., Samuel, R., Moscone, E.A., & Ehrendorfer, F. (2016). Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Annals of botany*, 118, 35-51.

Castellano, G., Lara, A., & Torrens, F. (2014). Classification of stilbenoid compounds by entropy of artificial intelligence. *Phytochemistry*, 97, 62-69.

Castillo, P., Molina, R., Andrade, A., Vigliocco, A., Alemanno, S., & Cassán, F.D. (2015). Phytohormones and other plant growth regulators produced by PGPR: the genus *Azospirillum*. In *handbook for azospirillum*, 1, 115-138.

Cassán, F., Vanderleyden, J., & Spaepen, S. (2014). Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of plant growth regulation*, 33, 440-459.

Cavalcante da Silva, M.J., Palmeira, S.F., Fortes, K., Nascimento, V.X., de Medeiros, A.S., Cavalcanti da Silva, S.J., & Sant'Ana, A.E.G. (2020). IAA production of indigenous isolate of plant growth promoting rhizobacteria in the presence of tryptophan. *Australian journal of crop science*, 14, 537-544.

Ceccaroni, D., Alfeo, V., Bravi, E., Sileoni, V., Perretti, G., & Marconi, O. (2020). Effect of the time and temperature of germination on the phenolic compounds of *Triticum aestivum*, L. and *Panicum miliaceum*, L. *Food Science and Technology*. 127, 109-396.

Cederlund, H., Wessén, E., Enwall, K., Jones, C.M., Juhanson, J., Pell, M., & Hallin, S. (2014). Soil carbon quality and nitrogen fertilization structure bacterial

communities with predictable responses of major bacterial phyla. *Applied soil ecology*, 84, 62-68.

Cesari, A., Paulucci, N., Lopez-Gomez, M., Hidalgo-Castellanos, J., Pla, C., & Dardanelli, M. (2019). Restrictive water condition modifies the root exudates composition during peanut-PGPR interaction and conditions early events, reversing the negative effects on plant growth. *Plant physiology and biochemistry*, 142, 519–527.

Chakraborty, A. P., Chakraborty, B. N., & Chakraborty, U. (2015). *Bacillus megaterium* from tea rhizosphere promotes growth and induces systemic resistance in tea against *Sclerotium rolfsii*. *Indian phytopathology*, 68, 237-247.

Chamam, A., Sanguin, H., Bellvert, F., Meiffren, G., Comte, G., Wisniewski-Dye, F., Bertrand, C. & Prigent-Combaret, C. (2013) Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum-Oryza sativa* association. *Phytochemistry*, 87, 65–77.

Chaparro, J.M., Badri, D.V., Bakker, M.G., Sugiyama, A.C., Manter, D.K., & Vivanco, J.M. (2013). Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *Plos one*, 8, 2-10.

Chapelle E.W., Kim M.S. & McMurtrey J. (1992) Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): an algorithm for the remote estimation of the concentration of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids in soybean leaves. *Remote sensing of environment*, 39, 239-247.

Chartzoulakis, K., & Klapaki, G. (2000). Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Scientia horticulturae*, 86, 247-260.

Chen, K., Li, G.J., Bressan, R.A., Song, C.P., Zhu, J.K., & Zhao, Y. (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of integrative plant biology*, 62, 25-54.

Chen, D., Lan, Z., Hu, S., & Bai, Y. (2015). Effects of nitrogen enrichment on belowground communities in grassland: Relative role of soil nitrogen availability vs. soil acidification. *Soil biology and biochemistry*, 89, 99-108.

Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant physiology and biochemistry*, 72, 1-20.

Chiou, K.L., & Hastorf, C.A. (2014). A systematic approach to species-level identification of chile pepper (*Capsicum* spp.) seeds: Establishing the groundwork for tracking the domestication and movement of chile peppers through the Americas and beyond. *Economic botany*, 68, 316-336.

Chiappero, J., del Rosario Cappellari, L., Alderete, L. G. S., Palermo, T. B., & Banchio, E. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria improve the antioxidant status in *Mentha piperita* grown under drought stress leading to an enhancement of plant growth and total phenolic content. *Industrial crops and products*, 139, 111-553.

Chowdhury, A.R. & Sengpta, C. (2016). Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from agricultural field and their potential role on germination and growth of spinach. *International journal of control, automation and systems*, 6, 128-131.

Christou, A., Manganaris, G. A., Papadopoulos, I., & Fotopoulos, V. (2013). Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. *Journal of experimental botany*, 64, 1953-1966.

Cohen, A. C., Bottini, R., & Piccoli, P. N. (2008). *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant growth regulation*, 54, 97-103.

Cohen, A.C., Bottini, R., & Piccoli, P. (2015). Role of abscisic acid producing PGPR in sustainable agriculture. *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*, 4, 259-282.

Cohen, A.C., Travaglia, C.N., Bottini, R., & Piccoli, P.N. (2009). Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany*, 87, 455-462.

Colebrook, E.H., Thomas, S.G., Phillips, A.L., & Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *Journal of experimental biology*, 217, 67-75.

Conway, G.R., & Barbier, E.B. (2013). After the green revolution: Sustainable agriculture for development. *Earthscan*, 4, 10-25.

Cordero, I., Balaguer, L., Rincón, A., & Pueyo, J.J. (2018). Inoculation of tomato plants with selected PGPR represents a feasible alternative to chemical fertilization under salt stress. *Journal of plant nutrition and soil science*, 181, 694-703.

Corso, M., Perreau, F., Mouille, G., & Lepiniec, L. (2020). Specialized phenolic compounds in seeds: structures, functions, and regulations. *Plant science*, 296, 110-471.

Cui, X., Murthy, H.N., Wu, C., & Paek, K. (2010). Adventitious root suspension cultures of *Hypericum perforatum*: effect of nitrogen source on production of biomass and secondary metabolites. *In vitro cellular & developmental biology*, 46, 437-444.

Dal Cortivo, C., Barion, G., Visioli, G., Mattarozzi, M., Mosca, G., & Vamerali, T. (2017). Increased root growth and nitrogen accumulation in common wheat following PGPR inoculation: Assessment of plant-microbe interactions by ESEM. *Agriculture, ecosystems & environment*, 247, 396-408.

Danish, S., Zafar-ul-Hye, M., Mohsin, F., & Hussain, M. (2020). ACC-deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria and biochar mitigate adverse effects of drought stress on maize growth. *PLoS one*, 15, 4-76.

Dardanelli, M.S., Manyani, H., González-Barroso, S., Rodríguez-Carvajal, M.A., Gil-Serrano, A.M., Espuny, M. R., & Ollero, F. J. (2010). Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. *Plant and soil*, 328, 483-493.

Date, T., Shigeno, K., Hiroshima, M., Seo, K., Sato, M., Tebayashi, S., & Sato, S. (2021). Verbascoside from *Verbena incompta* is a plant root growth inhibitor. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 85, 1602-1608.

De Bellis, P., & Ercolani, G. L. (2001). Growth interactions during bacterial colonization of seedling rootlets. *Applied and environmental microbiology*, 67, 1945-1948.

De-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., & Bashan, Y. (2012). The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation—A comprehensive evaluation. *Applied soil ecology*, 61, 171-189.

Dehghani Bidgoli, R., Azarnezhad, N., Akhbari, M., & Ghorbani, M. (2019). Salinity stress and PGPR effects on essential oil changes in *Rosmarinus officinalis* L. *Agriculture & food security*, 8, 1-7.

De Mello Prado, R. (2021). Chlorine. In *Mineral nutrition of tropical plants*, 10, 243-250.

De Werra, P., Huser, A., Tabacchi, R., Keel, C., & Maurhofer, M. (2011). Plant-and microbe-derived compounds affect the expression of genes encoding antifungal compounds in a *pseudomonas* with biocontrol activity. *Applied and environmental microbiology*, 77, 2807-2812.

Del Mar Rubio-Wilhelmi, M., Sanchez-Rodriguez, E., Leyva, R., Blasco, B., Romero, L., Blumwald, E., & Ruiz, J.M. (2012). Response of carbon and nitrogen-rich metabolites to nitrogen deficiency in PSARK:: IPT tobacco plants. *Plant physiology and biochemistry*, 57, 231-237.

Del Rosario Cappellari, L., Chiappero, J., Santoro, M. V., Giordano, W., & Banchio, E. (2017). Inducing phenolic production and volatile organic compounds emission by inoculating *Mentha piperita* with plant growth-promoting rhizobacteria. *Scientia horticulturae*, 220, 193-198.

Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A. M., Brewer, T. E., Benavent-González, A., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., & Fierer, N. (2018). A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science*, 359, 320-325.

Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and experimental botany*, 109, 212-228.

Desai, S., Bagyaraj, D. J., & Ashwin, R. (2020). Inoculation with microbial consortium promotes growth of tomato and capsicum seedlings raised in pro trays. *Proceedings of the national academy of sciences, india section b. Biological sciences*, 90, 21-28.

Díaz-Zorita, M., & Fernandez-Canigia, M.V. (2009). Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *European journal of soil biology*, 45, 3–11.

Dimkpa, C.O., Zeng, J., McLean, J.E., Britt, D.W., Zhan, J., & Anderson, A.J. (2012). Production of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in the plant-beneficial bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 is inhibited by ZnO nanoparticles but enhanced by CuO nanoparticles. *Applied and environmental microbiology*, 78, 1404-1410.

Ding, C., Lei, L., Yao, L., Wang, L., Hao, X., Li, N., & Wang, X. (2019). The involvements of calcium-dependent protein kinases and catechins in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] cold responses. *Plant physiology and biochemistry*, 143, 190-202.

Do Rego, E.R., do Rêgo, M.M., & Finger, F.L. (2016). Production and breeding of chilli peppers (*Capsicum spp.*). *Springer international publishing*, 9, 13-24.



Droque, B., Combes-Meynet, E., Moenne-Loccoz, Y., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent Combaret, C. (2013). Control of the cooperation between plant growth-promoting rhizobacteria and crops by rhizosphere signals. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, 1, 279–293.

Dubois, M., Van den Broeck, L., & Inzé, D. (2018). The pivotal role of ethylene in plant growth. *Trends in plant science*, 23, 311-323.

Duenas, M., Hernández, T., Estrella, I., & Fernández, D. (2009). Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food chemistry*, 117, 599–607.

Duke, S.O. (2022). Benefits of Resveratrol and Pterostilbene to Crops and Their Potential Nutraceutical Value to Mammals. *Agriculture*, 12, 3-368.

Durán, G., Condorí, M., Echazú, R., & Díaz-Russo, G. (2010). Secador solar híbrido para la producción continúa a escala industrial de pimiento para pimentón. In *IV Conferencia Latino Americana de Energía Solar (IV ISES\_CLA)*. Cusco, Perú.

Dutta, T., Neelapu, N.R., Wani, S.H., & Challa, S. (2018). Compatible solute engineering of crop plants for improved tolerance toward abiotic stresses. In *Biochemical, physiological and molecular avenues for combating abiotic stress tolerance in plants*, 12, 221-254.

Ejaz, S., Batool, S., Anjum, M.A., Naz, S., Qayyum, M.F., Naqqash, T., & Ali, S. (2020). Effects of inoculation of root-associative *Azospirillum* and *Agrobacterium* strains on growth, yield and quality of pea (*Pisum sativum* L.) grown under different nitrogen and phosphorus regimes. *Scientia horticulturae*, 270, 109-401.

El-Hadidy, A. E. (2016). Biocontrol activities of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) against Phytophthora blight and growth promotion of sweet pepper. *Sciences*, 6, 1138-1149.

El Monfalouti, H., Charrouf, Z., Belviso, S., Ghirardello, D., Scursatone, B., Guillaume, D., & Zeppa, G. (2012). Analysis and antioxidant capacity of the

phenolic compounds from argan fruit (*Argania spinosa* (L.) Skeels). *European journal of lipid science and technology*, 114, 446-452.

Erice, G., Ruíz-Lozano, J. M., Zamarreño, Á. M., García-Mina, J. M., & Aroca, R. (2017). Transcriptomic analysis reveals the importance of JA-Ile turnover in the response of Arabidopsis plants to plant growth promoting rhizobacteria and salinity. *Environmental and experimental botany*, 143, 10-19.

Erturk, Y., Ercisli, S., Haznedar, A., & Cakmakci, R. (2010). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biological research*, 43, 91-98.

Eshbaugh, W.H. (1970). A biosystematic and evolutionary study of *Capsicum baccatum* (Solanaceae). *Brittonia*, 22, 31-43.

Falovo, C., Schreiner, M., Schwarz, D., Colla, G., & Krumbein, A. (2011). Phytochemical changes induced by different nitrogen supply forms and radiation levels in two leafy Brassica species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 4198-4207.

Fan, X. H., Wang, L. T., An, J. Y., Zhang, S. D., Cai, Z. H., Niu, L. L., & Fu, Y. J. (2021). Magnetically immobilized edible *Bacillus natto* for the biotransformation of polydatin to resveratrol and its bioactivity assessment. *Industrial crops and products*, 161, 113-213.

Fan, K., Fan, D., Ding, Z., Su, Y., & Wang, X. (2015). Cs-miR156 is involved in the nitrogen form regulation of catechins accumulation in tea plant (*Camellia sinensis* L.). *Plant physiology and biochemistry*, 97, 350-360.

FAO & ITPS. 2015. Status of the World's Soil Resources (SWSR)-Main Report Chapter 12: Regional Assessments of Soil Changes in Latin America and the Caribbean. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy.

FAOSTAT (2012). Food and Agricultural Organization of the United Nations Statistical Database, Rome, Italy.

FAOSTAT (2021). Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

Faria, D.C., Dias, A.C., Melo, I.S. & de Carvalho-Costa, F.E. (2013). Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. *World Journal microbiology biotechnology*, 29, 217-221.

Farmer, E.E., & Mueller, M.J. (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual review of plant biology*, 64, 429-450.

Feldman, S.R., Bisaro, V., Biani, N.B., & Prado, D.E. (2008). Soil salinity determines the relative abundance of C3/C4 species in Argentinean grasslands. *Global ecology and biogeography*, 17, 708-714.

Feng, H., Zhang, N., Du, W., Zhang, H., Liu, Y., Fu, R., & Zhang, R. (2018). Identification of chemotaxis compounds in root exudates and their sensing chemoreceptors in plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Molecular plant-microbe interactions*, 31, 995-1005.

Feng, H., Tian, X., Liu, Y., Li, Y., Zhang, X., Jones, B.J., & Sun, J. (2013). Analysis of flavonoids and the flavonoid structural genes in brown fiber of upland cotton. *Plos one*, 8, 3-20.

Flamini, R., Mattivi, F., Rosso, M.D., Arapitsas, P., & Bavaresco, L. (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International journal of molecular sciences*, 14, 19651-19669.

Finkelstein, R. (2013). Abscisic acid synthesis and response. *The Arabidopsis book/American society of plant biologists*, 11.

Fita, A., Rodríguez-Burruezo, A., Boscaiu, M., Prohens, J., & Vicente, O. (2015). Breeding and domesticating crops adapted to drought and salinity: a new paradigm for increasing food production. *Frontiers in plant science*, 6, 9-78.

Fulton, J.C., & Uchanski, M.E. (2017). A Review of Chile Pepper (*Capsicum annuum*) Stip: A Physiological Disorder of Peppers. *Hortscience*, 52, 4-9.

Gallart, M., Paungfoo-Lonhienne, C., Gonzalez, A., & Trueman, S.J. (2021). Nitrogen source influences the effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on *Macadamia integrifolia*. *Agronomy*, 11, 1064.

Galicia-Campos, E., Ramos-Solano, B., Montero-Palmero, M., Gutierrez-Mañero, F. J., & García-Villaraco, A. (2020). Management of plant physiology with beneficial bacteria to improve leaf bioactive profiles and plant adaptation under saline stress in *Olea europea* L. *Foods*, 9,1-57.

Galmarini, C.A., Senetiner & Galmarini, H. 1991. "Breeding peppers (*Capsicum annuum* L) for resistance to *Phytophthora capsici* Leonian in Argentina: Calafyucu INTA, a new resistant cultivar". *Capsicum Newsletter*, 10:61.

Galmarini, C.R. (2000). El género *Capsicum* y las perspectivas del mejoramiento genético de pimiento en Argentina. *Avances en Horticultura*, 4, 31-39.

Gantait, S., Rani Sinniah, U., Ali, N., & Chandra Sahu, N. (2015). Gibberellins-a multifaceted hormone in plant growth regulatory network. *Current protein and peptide science*, 16, 406-412.

García, J., Maroniche, G., Creus, C., Suárez, R., Ramirez, J., & Groppa, M. (2017). *In vitro* PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiology*, 202, 21–29.

Garcia-Seco, D., Zhang, Y., Gutierrez-Mañero, F.J., Martin, C., & Ramos-Solano, B. (2015). Application of *Pseudomonas fluorescens* to blackberry under field conditions improves fruit quality by modifying flavonoid metabolism. *Plos one*, 10, 11-16.

García-Cristobal, J., García-Villaraco, A., Ramos, B., Gutierrez-Mañero, J., & Lucas, J. A. (2015). Priming of pathogenesis related-proteins and enzymes related to oxidative stress by plant growth promoting rhizobacteria on rice plants upon abiotic and biotic stress challenge. *Journal of plant physiology*, 188, 72-79.

- García, F. (2005). Soja: criterios para el manejo de la fertilización del cultivo. *INPOFOS Informaciones agronómicas*, 2, 1-6.
- Gaurav, A., & Pallavi, K.P. (2020). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on growth and physiological parameters in chickpea. *Journal pharmacognosy and phytochemistry*, 9, 29-34.
- Ghaffari, H., Gholizadeh, A., Biabani, A., Fallah, A., & Mohammadian, M. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) application with different nitrogen fertilizer levels in rice (*Oryza sativa* L.). *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 41, 715-728.
- Ghanem, M. E., Hichri, I., Smigocki, A. C., Albacete, A., Fauconnier, M. L., Diatloff, E., & Pérez-Alfocea, F. (2011). Root-targeted biotechnology to mediate hormonal signalling and improve crop stress tolerance. *Plant cell reports*, 30, 807-823.
- Ghosh, S., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2012). Production of shikimic acid. *Biotechnology advances*, 30, 1425-1431.
- Gholami, A., Biyari, A., Gholipour, M., & Asadi Rahmani, H. (2012). Growth promotion of maize (*Zea mays* L.) by plant-growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Communications in soil science and plant analysis*, 43, 1263-1272.
- Giorio, P., Cirillo, V., Caramante, M., Oliva, M., Guida, G., Venezia, A., & Albrizio, R. (2020). Physiological basis of salt stress tolerance in a landrace and a commercial variety of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plants*, 9,104-795.
- Giron, D., Frago, E., Glevarec, G., Pieterse, C.M., & Dicke, M. (2013). Cytokinins as key regulators in plant–microbe–insect interactions: connecting plant growth and defence. *Functional Ecology*, 27, 599-609.
- Giuffrida, F., Graziani, G., Fogliano, V., Scuderi, D., Romano, D., & Leonardi, C. (2014). Effects of nutrient and NaCl salinity on growth, yield, quality and composition of pepper grown in soilless closed system. *Journal of Plant Nutrition*, 37, 1455-1474.

- Glick, B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 41, 109-117.
- Glick, B.R., Penrose, D.M., & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of theoretical biology*, 190, 63-68.
- Glick, B.R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Gobie, W. (2019). A seminar review on red pepper (*Capsicum*) production and marketing in Ethiopia. *Cogent food & agriculture*, 5, 16-93.
- Gosch, C., Halbwirth, H., & Stich, K. (2010). Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry*, 71, 838-843.
- Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C. & Tejada-Moral, M. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent food & agriculture*, 2, 10-22.
- Gouda, S., Kerry, R.G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.S., & Patra, J.K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological research*, 206, 131-140.
- Graeber, K.A.I., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, Gerhar. D., & Soppe, W.J. (2012). Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, cell & environment*, 35, 1769-1786.
- Grobelak, A., Napora, A., & Kacprzak, M. (2015). Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological engineering*, 84, 22-28.
- Grochowska, M. J., & Ciużyńska, W. (1979). Differences between fruit-bearing and non-bearing apple spurs in activity of an enzyme system decomposing phloridzin. *Biologia Plantarum*, 21, 201-205.

- Grover, M., Ali, S.Z., Sandhya, V., Rasul, A., & Venkateswarlu, B. (2011). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World journal of microbiology and biotechnology*, 27, 1231-1240.
- Guebel, D. V., Nudel, B. C., & Giuliatti, A. M. (1991). A simple and rapid micro-Kjeldahl method for total nitrogen analysis. *Biotechnology Techniques*, 5, 427-430.
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K., & Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal microbiology Biochemistry Technology*, 7, 96-102.
- Gupta, S., & Rashotte, A.M. (2012). Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant. *Plant cell reports*, 31, 801-812.
- Gupta, S., & Pandey, S. (2019). ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in French bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Frontiers in microbiology*, 15, 6-19.
- Gusain, P., & Bhandari, B.S. (2019). Rhizosphere associated PGPR functioning. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 8, 1181-1191.
- Guzmán-Ortiz, F., San Martín-Martínez, E., Valverde, M., Rodríguez-Aza, Y., Berríos, J., & Mora-Escobedo, R. (2017). Profile analysis and correlation across phenolic compounds, isoflavones and antioxidant capacity during germination of soybeans (*Glycine max L.*). *Cyta – journal of food*, 15, 516–524.
- Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L.S.P. (2012). Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in plant science*, 17, 172-179.
- Habib, S. H., Kausar, H., & Saud, H. M. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes. *Biomed research international*, 20, 16-32.

Hafez, E.M., Alsohim, A.S., Farig, M., Omara, A.E.D., Rashwan, E., & Kamara, M. M. (2019). Synergistic effect of biochar and plant growth promoting rhizobacteria on alleviation of water deficit in rice plants under salt-affected soil. *Agronomy*, *9*, 12-847.

Hahm, M. S., Son, J. S., Hwang, Y. J., Kwon, D. K., & Ghim, S. Y. (2017). Alleviation of salt stress in pepper (*Capsicum annum* L.) plants by plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of microbiology and biotechnology*, *27*, 1790-1797.

Hajihashemi, S., & Geuns, J. M. (2013). Free radical scavenging activity of steviol glycosides, steviol glucuronide, hydroxytyrosol, metformin, aspirin and leaf extract of *Stevia rebaudiana*. *Free radicals and antioxidants*, *3*, 34-41.

Hammerbacher, A., Ralph, S.G., Bohlmann, J., Fenning, T.M., Gershenzon, J., & Schmidt, A. (2011). Biosynthesis of the major tetrahydroxystilbenes in spruce, astringin and isorhapontin, proceeds via resveratrol and is enhanced by fungal infection. *Plant physiology*, *157*, 876-890.

Hasan, M., & Bae, H. (2017). An overview of stress-induced resveratrol synthesis in grapes: perspectives for resveratrol-enriched grape products. *Molecules*, *22*(2), 294.

Hassen, A., Maher, S., & Cherif, H. (2014). Effect of salt stress (NaCl) on germination and early seedling parameters of three pepper cultivars (*Capsicum annum* L.). *Journal of stress physiology & biochemistry*, *10*, 14-25.

Hayano-Kanashiro, C., Gámez-Meza, N., & Medina-Juárez, L.Á. (2016). Wild pepper *Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*: Taxonomy, plant morphology, distribution, genetic diversity, genome sequencing, and phytochemical compounds. *Crop science*, *56*, 1-11.

Hazotte, A., Péron, O., Gaudin, P., Abdelouas, A., & Lebeau, T. (2018). Effect of *Pseudomonas fluorescens* and pyoverdine on the phytoextraction of cesium by red clover in soil pots and hydroponics. *Environmental science and pollution research*, *25*, 20680-20690.



- Heath, R.L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125, 189-198.
- He, Y., Pantigoso, H. A., Wu, Z., & Vivanco, J. M. (2019). Co-inoculation of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato. *Journal of applied microbiology*, 127, 196-207.
- Hermans, S. M., Buckley, H. L., Case, B. S., Curran-Cournane, F., Taylor, M., & Lear, G. (2017). Bacteria as emerging indicators of soil condition. *Applied and environmental microbiology*, 83, 282-616.
- Hernández-Pérez, T., Gómez-García, M.D.R., Valverde, M.E., & Paredes-López, O. (2020). *Capsicum annuum* (hot pepper): An ancient Latin-American crop with outstanding bioactive compounds and nutraceutical potential. A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19, 2972-2993.
- Hernández-Salinas, M., Valdez-Aguilar, L. A., Alia-Tejacal, I., Alvarado-Camarillo, D., & Cartmill, A. D. (2022). Silicon enhances the tolerance to moderate NaCl-salinity in tomato grown in a hydroponic recirculating system. *Journal of plant nutrition*, 45, 413-425.
- Hernández, I., & Munné-Bosch, S. (2012). Naringenin inhibits seed germination and seedling root growth through a salicylic acid-independent mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology and biochemistry*, 61, 24-28.
- Higuera-Acuña, S. V. (2013). Compuestos fenólicos en la relación nogal pecanero (*Carya illinoensis*)-gusano barrenador de la nuez (*Acrobasis nuxvorella*) (Doctoral dissertation, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo).
- Hinsinger, P., Betencourt, E., Bernard, L., Brauman, A., Plassard, C., Shen, J., & Zhang, F. (2011). P for two, sharing a scarce resource: soil phosphorus acquisition in the rhizosphere of intercropped species. *Plant physiology*, 156, 1078-1086.

Hong, G., Wang, J., Hochstetter, D., Gao, Y., Xu, P., & Wang, Y. (2015). Epigallocatechin-3-gallate functions as a physiological regulator by modulating the jasmonic acid pathway. *Physiol Plant* 153:432– 439.

Hossain, M.S., & Dietz, K.J. (2016). Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress. *Frontiers in plant science*, 7, 548.

Hunziker, A.T. (1951). Noticias sobre el cultivo de *Capsicum baccatum* L. (Solanaceae) y géneros afines. *Kurtziana*, 1, 303.

Hunziker A.T. (1998). Estudios sobre Solanaceae XLVI. Los ajíes silvestres de Argentina (*Capsicum*). *Darwiniana*, 36, 201-203.

Hussain, K., Majeed, A., Nawaz, K., Nisar, M. F., Khan, F., Afghan, S., & Ali, K. (2010). Comparative study for salt stress among seed, root stock and direct regenerated violet (*Viola odorata* L.) seedlings in relation to growth, ion contents and enzyme activities. *African journal of biotechnology*, 9, 2108-2117.

INTA (2021). Disponible en: <https://intainforma.inta.gob.ar/el-inta-elaboro-el-primer-mapa-de-suelos-afectados-por-sales/>

Ipek, M., Pirlak, L., Esitken, A., Figen Dönmez, M., Turan, M., & Sahin, F. (2014). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) increase yield, growth and nutrition of strawberry under high-calcareous soil conditions. *Journal of plant nutrition*, 37, 990-1001.

Irakoze, W., Quinet, M., Prodjimoto, H., Rufyikiri, G., Nijimbere, S., & Lutts, S. (2022). Differential effects of sulfate and chloride salinities on rice (*Oryza sativa* L.) gene expression patterns: A comparative transcriptomic and physiological approach. *Current plant biology*, 29, 100-237.

Isayenkov, S.V., & Maathuis, F.J. (2019). Plant salinity stress: many unanswered questions remain. *Frontiers in Plant Science*, 10, 80-81.

Islam, F., Yasmeeen, T., Arif, M.S., Riaz, M., Shahzad, S.M., Imran, Q., & Ali, I. (2016). Combined ability of chromium (Cr) tolerant plant growth promoting bacteria

(PGPB) and salicylic acid (SA) in attenuation of chromium stress in maize plants. *Plant physiology and biochemistry*, 108, 456-467.

Ismail, H., Maksimović, J.D., Maksimović, V., Shabala, L., Živanović, B.D., Tian, Y., & Shabala, S. (2015). Rutin, a flavonoid with antioxidant activity, improves plant salinity tolerance by regulating K<sup>+</sup> retention and Na<sup>+</sup> exclusion from leaf mesophyll in quinoa and broad beans. *Functional plant biology*, 43, 75-86.

ISTA. (2017). International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.

Iqbal, M.A., Khalid, M., Zahir, Z.A., & Ahmad, R. (2016). Auxin producing plant growth promoting rhizobacteria improve growth, physiology and yield of maize under saline field conditions. *Interantional Journal Agriculture and Biology*, 18, 37-45.

Iqbal, N., Khan, N.A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., & Khan, M.I.R. (2017). Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers in plant science*, 8, 475.

Jain, V., & Gupta, K. (2003). The flavonoid naringenin enhances intercellular colonization of rice roots by *Azorhizobium caulinodans*. *Biology and fertility of soils*, 138, 119–123.

Jamalian, S., Gholami, M., & Esna-Ashari, M. (2013). Abscisic acid-mediated leaf phenolic compounds, plant growth and yield is strawberry under different salt stress regimes. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25, 291-299.

Janda, T., Khalil, R., Tajti, J., Pál, M., Szalai, G., Rudnóy, S., & Darko, É. (2018). The newly synthesized plant growth regulator S-methylmethionine salicylate may provide protection against high salinity in wheat. *Plant Growth Regulation*, 85, 305-315.

Janusauskaite, D., Feiziene, D., & Feiza, V. (2017). Relationship between spring triticale physiological traits and productivity changes as affected by different N rates. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & plant science*, 67, 534-541.

Jarak, M., Bjeli, D., Joscaron, D., Hajnal-Jafari, T., & Stamenov, D. (2012). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. *African journal of microbiology research*, 6, 5683-5690.

Jarret, R.L., Barboza, G.E., da Costa Batista, F.R., Berke, T., Chou, Y.Y., Hulse-Kemp, A., & Szoke, A. (2019). *Capsicum* - An abbreviated compendium. *Journal of the american society for horticultural science*, 144, 3-22.

Jeyanthi, V., & Kanimozhi, S. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)-prospective and mechanisms: A review. *Journal of pure and applied microbiology*, 12, 733-749.

Jha, C.K., & Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of agricultural research and development*, 5, 108-119.

Jha, Y., & Subramanian, R. B. (2016). Rhizobacteria enhance oil content and physiological status of *Hyptis suaveolens* under salinity stress. *Rhizosphere*, 1, 33-35.

Jin, C.W., Li, G.X., Yu, X.H., & Zheng, S.J. (2010). Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere. *Annals of botany*, 105, 835-841.

Kang, S. M., Khan, A. L., Waqas, M., You, Y. H., Kim, J. H., Kim, J. G., & Lee, I. J. (2014). Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus*. *Journal of plant interactions*, 9, 673-682.

Kang, S.M., Khan, A.L., You, Y.H., Kim, J.G., Kamran, M., & Lee, I.J. (2014). Gibberellin production by newly isolated strain *Leifsonia soli* SE134 and its potential to promote plant growth. *Journal of microbiology and biotechnology*, 24, 106-112.

Kantar, M.B., Anderson, J.E., Lucht, S.A., Mercer, K., Bernau, V., Case, K.A., & Baumler, D.J. (2016). Vitamin variation in *Capsicum* Spp. provides opportunities to improve nutritional value of human diets. *PLoS one*, 11, 161-464.

Kannan, R.R., & Vincent, S.P. (2011). Molecular characterization of antagonistic *Streptomyces* isolated from a Mangrove swamp. *Asian journal of biotechnology*, 3, 237-245.

Kannoja, P., Choudhary, K.K., Srivastava, A.K., & Singh, A.K. (2019). PGPR bioelicitors: induced systemic resistance (ISR) and proteomic perspective on biocontrol. In *PGPR amelioration in sustainable agriculture*, 4, 67-84.

Kaouther, Z., Nina, H., Rezwana, A., & Cherif, H. (2013). Evaluation of salt tolerance (NaCl) in Tunisian chili pepper (*Capsicum frutescens* L.) on growth, mineral analysis and solutes synthesis. *Journal of stress physiology & biochemistry*, 9, 209-228.

Karnwal, A., & Kumar, V. (2012). Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Annual review of food science and technology*, 13, 1-6.

Kavi kishor, P.B., & Sreenivasulu, N. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue. *Plant, cell & environment*, 37, 300-311.

Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D., & Samiyappan, R. (2010). Effect of chitinolytic PGPR on growth, yield and physiological attributes of banana (*Musa spp.*) under field conditions. *Applied soil ecology*, 45, 71-77.

Kenawy, A., Dailin, D.J., Abo-Zaid, G.A., Abd Malek, R., Ambehatabi, K.K., Zakaria, K.H.N., & El Enshasy, H.A. (2019). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and their roles in biocontrol of plant diseases. In *plant growth promoting rhizobacteria for sustainable stress management*, 1, 35-38.

Khalid, S., Asghar, H.N., Akhtar, M.J., Aslam, A., & Zahir, Z.A. (2015). Biofortification of iron in chickpea by plant growth promoting rhizobacteria. *Pakistan Journal Botany*, 47, 1191-1194.

Khalilpour, M., Mozafari, V., & Abbaszadeh-Dahaji, P. (2021). Tolerance to salinity and drought stresses in pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings inoculated with indigenous stress-tolerant PGPR isolates. *Scientia horticultrae*, 289, 110-440.

Khan, M.S., Zaidi, A., & Musarrat, J. (2014). Phosphate solubilizing microorganisms, *principles and application of microphos technology*. 1, 257-297.

Khan, A., Singh, P., & Srivastava, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator–Siderophore: A review. *Microbiological research*, 212, 103-111.

Khan, N., Bano, A., & Zandi, P. (2018). Effects of exogenously applied plant growth regulators in combination with PGPR on the physiology and root growth of chickpea (*Cicer arietinum*) and their role in drought tolerance. *Journal of plant interactions*, 13, 239-247.

Khanna, K., Jamwal, V. L., Sharma, A., Gandhi, S.G., Ohri, P., Bhardwaj, R., & Ahmad, P. (2019). Supplementation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) alleviates cadmium toxicity in *Solanum lycopersicum* by modulating the expression of secondary metabolites. *Chemosphere*, 230, 628-639.

Khosravi, A., Zarei, M., & Ronaghi, A. (2018). Effect of PGPR, phosphate sources and vermicompost on growth and nutrients uptake by lettuce in a calcareous. *Soil Journal plant Nutrition*, 41, 80–89.

Kifle, M. H., & Laing, M. D. (2016). Effects of selected diazotrophs on maize growth. *Frontiers in plant science*, 7, 1429.

Kim, M.J., Kwak, H.S., & Kim, S.S. (2018). Effects of germination on protein,  $\gamma$ -aminobutyric acid, phenolic acids, and antioxidant capacity in wheat. *Molecules*, 23, 22-44.

Kloepper, J.W., & Schroth, M.N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria* Vol. 2, 879-882.

Kloepper, J.W., Zablutowicz, R.M., Tipping, E.M., & Lifshitz, R. (1991). Inorganic plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizer. In: *The Rhizosphere and Plant Growth*, 1, 315–326.

Kolb W., Martin P. (1985) Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indole acetic acid. In: Klingmüller W (ed) *Azospirillum* III: genetics, physiology, ecology. Springer, Berlin, 215–221

Komaikul, J., Kitisripanya, T., Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B., Tanaka, H., & Putalun, W. (2019). Improvement of stilbenoid production by 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in white mulberry (*Morus alba* L.) callus cultures. *Natural product research*, 33, 2762-2769.

Korenblum, E., Massalha, H., & Aharoni, A. (2022). Plant–microbe interactions in the rhizosphere via a circular metabolic economy. *The Plant Cell*, 34(9), 3168-3182.

Kostopoulou, Z., Therios, I., & Molassiotis, A. (2014). Resveratrol and its combination with  $\alpha$ -tocopherol mediate salt adaptation in citrus seedlings. *Plant physiology and biochemistry*, 78, 1-9.

Kováčik, J., Klejdus, B., Bačkor, M., & Repčák, M. (2007). Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant science*, 172, 393-399.

Kraiser, T., Gras, D.E., Gutiérrez, A.G., González, B., & Gutiérrez, R.A. (2011). A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *Journal of experimental botany*, 62, 1455-1466.

Krapp, A. (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current opinion in plant biology*, 25, 115-122.

Kruse, J., Abraham, M., Amelung, W., Baum, C., Bol, R., Kühn, O., & Leinweber, P. (2015). Innovative methods in soil phosphorus research: A review. *Journal of plant nutrition and soil science*, 178, 43-88.

Krystyna, Z., & Milena, P. (2017). Possibility to predict the yield of potatoes grown under two crop production systems on the basis of selected morphological and physiological plant indicators. *Plant soil and environment*, 63, 165-170.

Kumar, A. J. A. Y., Vandana, R. S., Singh, M., & Pandey, K.D. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). A promising approach for disease management. *Microbes and environmental management*. 1, 195-209.

Kumar, A., Sharma, S., Mishra, S., & Dames, J. F. (2015). Arbuscular mycorrhizal inoculation improves growth and antioxidative response of *Jatropha curcas* (L.) under Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> salt stress. *Plant biosystems-an international journal dealing with all aspects of plant biology*, 149, 260-269.

Kumar, A., Prasad, A., Sedlářová, M., Ksas, B., Havaux, M., & Pospíšil, P. (2020). Interplay between antioxidants in response to photooxidative stress in *Arabidopsis*. *Free radical biology and medicine*, 160, 894-907.

Kumar, A., Maurya, B. R., & Raghuwanshi, R. (2014). Isolation and characterization of PGPR and their effect on growth, yield and nutrient content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 3, 121-128.

Kumar, N., & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology reports*, 4, 86-93.

Kumari, P., Meena, M., & Upadhyay, R.S. (2018). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from the rhizosphere of *Vigna radiata* (mung bean). *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 155-162.

Kumari, A., Goyal, R.K., Choudhary, M., & Sindhu, S.S. (2016). Effects of some plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strains on growth and flowering of chrysanthemum. *Journal of crop and weed*, 12, 7-15.

Kurepa J., Shull T.E., Karunadasa SS., & Smalle JA. (2018). Modulation of auxin and cytokinin responses by early steps of the phenylpropanoid pathway. *BMC plant piology*, 18, 2-78.



Kurokura, T., Hiraide, S., Shimamura, Y., & Yamane, K. (2017). PGPR improves yield of strawberry species under less-fertilized conditions. *Environmental control in biology*, 55, 121-128.

Lami, M. J., Adler, C., Caram-Di Santo, M. C., Zenoff, A. M., de Cristóbal, R. E., Espinosa-Urgel, M., & Vincent, P. A. (2020). *Pseudomonas stutzeri* MJL19, a rhizosphere-colonizing bacterium that promotes plant growth under saline stress. *Journal of applied microbiology*, 129, 1321-1336.

Larsson, S. (2007). The “new” chemosystematics: Phylogeny and phytochemistry. *Phytochemistry*, 68, 2904-2908.

Lattanzio, V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction 50. *Journal of natural products*, 35, 1543-1580.

Lee, H.Y., & Yoon, G.M. (2018). Regulation of ethylene biosynthesis by phytohormones in etiolated rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Molecules and cells*, 41, 311.

Lenin, G., & Jayanthi, M. (2012). Indole acetic acid, gibberellic acid and siderophore production by PGPR isolates from rhizospheric soils of *Catharanthus roseus*. *International journal pharmaceutical and biological archive*, 3, 933-8.

Li, F.T., Qi, J.M., Zhang, G.Y., Lin, L.H., Fang, P.P., Tao, A.F., & Xu, J.T. (2013). Effect of cadmium stress on the growth, antioxidative enzymes and lipid peroxidation in two kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) plant seedlings. *Journal of integrative agriculture*, 12, 610-620.

Li, H., Qiu, Y., Yao, T., Ma, Y., Zhang, H., & Yang, X. (2020). Effects of PGPR microbial inoculants on the growth and soil properties of *Avena sativa*, *Medicago sativa*, and *Cucumis sativus* seedlings. *Soil and tillage research*, 199, 45-77.

Li, H., Lei, P., Pang, X., Li, S., Xu, H., Xu, Z., & Feng, X. (2017). Enhanced tolerance to salt stress in canola (*Brassica napus* L.) seedlings inoculated with the halotolerant *Enterobacter cloacae* HSNJ4. *Applied soil ecology*, 119, 26-34.

- Li, T., Li, Y., Sun, Z., Xi, X., Sha, G., Ma, C., & Zheng, X. (2021). Resveratrol alleviates the KCl salinity stress of *Malus hupehensis* Rhed. *Frontiers in plant science*, 12.
- Li, X.G., Zhang, T.L., Wang, X.X., Hua, K., Zhao, L., & Han, Z.M. (2013). The composition of root exudates from two different resistant peanut cultivars and their effects on the growth of soil-borne pathogen. *International journal of biological sciences*, 9, 2-164.
- Li, X., Li, Y., Ahammed, G. J., Zhang, X. N., Ying, L., Zhang, L., & Han, W. Y. (2019). RBOH1-dependent apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates epigallocatechin-3-gallate-induced abiotic stress tolerance in *Solanum lycopersicum* L. *Environmental and experimental botany*, 161, 357-366.
- Li, M., Xu, J., Wang, X., Fu, H., Zhao, M., Wang, H., & Shi, L. (2018). Photosynthetic characteristics and metabolic analyses of two soybean genotypes revealed adaptive strategies to low-nitrogen stress. *Journal of plant physiology*, 229, 132-141.
- Li, Z., Jiang, H., Qin, Y., Yan, H., Jiang, X., & Qin, Y. (2021). Nitrogen deficiency maintains the yield and improves the antioxidant activity of *Coreopsis tinctoria* Nutt. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 85, 1492-1505.
- Liebgoat, P. P., Amouric, A., Comte, A., Tholozan, J. L., & Lorquin, J. (2009). Hydroxytyrosol from tyrosol using hydroxyphenylacetic acid-induced bacterial cultures and evidence of the role of 4-HPA 3-hydroxylase. *Research in microbiology*, 160, 757-766.
- Liu, D. (2021). Root developmental responses to phosphorus nutrition. *Journal of integrative plant biology*, 63, 1065-1090.
- Liu, H., Liang, C., Ma, L., Liu, J., & Wang, Q. (2021). Analysis of antioxidant response in pomelo fruitlets subjected to external injury stress: Significance of naringin biosynthesis. *LWT*, 150, 111908.

Liu, Y., Wu, L., Deng, Z., & Yu, Y. (2021). Two putative parallel pathways for naringenin biosynthesis in *Epimedium wushanense*. *The royal society of chemistry advances*, 11, 13919-13927.

Lobato, M.A. (2015). Estudio de la variabilidad morfológica de la colección de germoplasma de *Capsicum* spp. Del centro de investigación Caribia de CORPOICA. Tesis de maestría.

Lobato, M.A., Pérez-Rodríguez, M.M., Ortiz, R., Lucero G., & Cohen A. (2019). *In vitro* inhibition of *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxisporum* and *Verticillium dahliae* by native plant growth promotion rhizobacteria strains from Mendoza. XXXVII reunion anual SBCuyo. P 92.

Lobato, M.A., Pérez-Rodríguez, M.M., Ortiz, R., Monasterio, R.P., & Cohen, A.C. (2021). Rhizobacteria improve the germination and modify the phenolic compound profile of pepper (*Capsicum annum* L.). *Rhizosphere*, 18, 100-334.

Lopes, M.J.S., Dias-Filho, M.B., Castro, T.H.R., & Silva, G.B. (2018). Light and plant growth-promoting rhizobacteria effects on *Brachiaria brizantha* growth and phenotypic plasticity to shade. *Grass and forage science*, 73, 493-499.

Lopez-Martinez, L., Oliart-Ros, R., Valerio-Alfaro, G., Lee, C., Parkin, K., & Garcia, H. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *Journal of food science and technology*, 42, 1187–1192.

Lu, T., Ke, M., Lavoie, M., Jin, Y., Fan, X., Zhang, Z., & Zhu, Y.G. (2018). Rhizosphere microorganisms can influence the timing of plant flowering. *Microbiome*, 6, 1-12.

Luna-Ruiz, J.D.J., Nabhan, G.P., & Aguilar-Meléndez, A. (2018). Shifts in plant chemical defenses of chile pepper (*Capsicum annum* L.) due to domestication in Mesoamerica. *Frontiers in ecology and evolution*, 6, 48.

- Ludwig-Müller, J. (2015). Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: balance between development and defense. *Journal of plant physiology*, 172, 4-12.
- Maas, E. V. (1990). 1990. Crop salt tolerance. *Agricultural salinity assessment and management. Am. Soc. Civil Eng., New York*, 2, 62-304.
- Macedo, W. R., Silva, G. H., Santos, M. F. C., Oliveira, A. P. S., & Souza, D. S. (2018). Physiologic and metabolic effects of exogenous kojic acid and tyrosol, chemicals produced by endophytic fungus, on wheat seeds germination. *Natural product research*, 32, 2692-2696.
- 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, 30-35.
- Maçik, M., Gryta, A., & Fraç, M. (2020). Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in agronomy*, 162, 31-87.
- Mahfuz, S., Shang, Q., & Piao, X. (2021). Phenolic compounds as natural feed additives in poultry and swine diets: a review. *Journal of animal science and biotechnology*, 12, 1-18.
- Mahmood, S., Daur, I., Al-Solaimani, S. G., Ahmad, S., Madkour, M. H., Yasir, M., & Ali, Z. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria and silicon synergistically enhance salinity tolerance of mung bean. *Frontiers in plant science*, 7, 8-76.
- Malhotra, H., Sharma, S., & Pandey, R. (2018). Phosphorus nutrition: plant growth in response to deficiency and excess. In *plant nutrients and abiotic stress tolerance*, 67, 171-190.
- Maqsood, M.A., Awan, U.K., Aziz, T., Arshad, H., Ashraf, N., & Ali, M. (2016). Nitrogen management in calcareous soils: problems and solutions. *Pakistan journal of agricultural sciences*, 53, 1-62.

Marinkovic, J., Bjelic, D., Tintor, B., Miladinovic, J., Dukic, V., & Dorđevic, V. (2018). Effects of soybean co-inoculation with plant growth promoting rhizobacteria in field trial. *Romanian biotechnological letters*, 23, 13-401.

Martin-Rivilla, H., Garcia-Villaraco, A., Ramos-Solano, B., Gutierrez-Manero, F., & Lucas, J. (2020). Metabolic elicitors of *Pseudomonas fluorescens* N 21.4 elicit flavonoid metabolism in blackberry fruit. *Journal of the science of food and agriculture*, 101, 205–214.

Mardani-Talaei, M., Nouri-Ganblani, G., Razmjou, J., Hassanpour, M., Naseri, B. & Asgharzadeh, A. (2016) Effects of chemical, organic and bio-Fertilizers on some secondary metabolites in the leaves of bell Pepper (*Capsicum annuum*) and their impact on life table parameters of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of economic entomology*, 109, 472–477.

Marusig, D., & Tombesi, S. (2020). Abscisic acid mediates drought and salt stress responses in *Vitis vinifera* A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8648.

Masciarelli, O., Llanes, A., & Luna, V. (2014). A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiological research*, 169, 609-615.

Matus, J. T. (2016). Transcriptomic and metabolomic networks in the grape berry illustrate that it takes more than flavonoids to fight against ultraviolet radiation. *Frontiers in plant science*, 7, 1337.

Mathew, S., & Abraham, T.E. (2006). Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid. *Critical reviews in microbiology*, 32, 115-125.

Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet franc, Merlot, and Pinot noir wines from British Columbia. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47, 4009-4017.

- Mechri, B., Tekaya, M., Hammami, M., & Chehab, H. (2019). Root verbascoside and oleuropein are potential indicators of drought resistance in olive trees (*Olea europaea* L.). *Plant physiology and biochemistry*, 141, 407-414.
- Medeiros, C. A., & Bettioli, W. (2021). Multifaceted intervention of *Bacillus* spp. against salinity stress and *Fusarium* wilt in tomato. *Journal of Applied Microbiology*, 131, 2387-2401.
- Mehmood, U., Inam-ul-Haq, M., Saeed, M., Altaf, A., Azam, F., & Hayat, S. (2018). A brief review on plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a key role in plant growth promotion. *Plant protection*, 2, 77-82.
- Meliani, A., Bensoltane, A., Benidire, L., & Oufdou, K. (2017). Plant growth-promotion and IAA secretion with *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Research & Reviews: Journal of botanical sciences*, 6, 16-24.
- Metin, T., Melek, E., Ertan, Y., Adem, G., Kenan, K., Aragöz, R., Kotan, and Atilla, D. 2014. Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. *Turkis journal of agriculture and forestry*, 38, 327-333.
- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19, 16240-16265.
- Minh, L. T., Khang, D. T., Ha, P. T. T., Tuyen, P. T., Minh, T. N., Quan, N. V., & Xuan, T. D. (2016). Effects of salinity stress on growth and phenolics of rice (*Oryza sativa* L.). *International Letters of Natural Sciences*, 57.
- Ministerio de Agricultura Ganaderia y Pesca de Argentina. (2021). 200 Millones de toneladas de cereales, oleaginosas y legumbres (Fertilidad y nutrición de suelos). Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe-maquinarias-nuevas-tecnologias-agtech-magyp.pdf>. Consultado: 28/04/2022.
- Miotto-Vilanova, L., Courteaux, B., Padilla, R., Rabenoelina, F., Jacquard, C., Clément, C., & Sanchez, L. (2019). Impact of paraburkholderia phytofirmans PsJN

on grapevine phenolic metabolism. *International journal of molecular sciences*, 20, 57-75.

Mirzaei, M., Ladan Moghadam, A., Hakimi, L., & Danaee, E. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) improve plant growth, antioxidant capacity, and essential oil properties of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) under water stress. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 10, 3155-3166.

Mitran, T., Meena, R.S., Lal, R., Layek, J., Kumar, S., & Datta, R. (2018). Role of soil phosphorus on legume production. In *legumes for soil health and sustainable management*, 6, 487-510.

Mohammadkhani, N., Heidari, R., Abbaspour, N., & Rahmani, F. (2014). Evaluation of salinity effects on ionic balance and compatible solute contents in nine grape (*Vitis L.*) genotypes. *Journal of plant nutrition*, 37, 1817-1836.

Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M.D.R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y.E., Santiago-Saenz, Y., Castañeda-Lucio, M., & Muñoz-Rojas, J. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas*, 17, 24-34.

Moncada, A., Miceli, A., & Vetrano, F. (2021). Use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and organic fertilization for soilless cultivation of basil. *Scientia horticultrae*, 275, 109-733.

Montes-Hernández, S., López-López, P., Hernández-Verduzco, S., & Ramírez-Meraz, M. (2010). Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género *Capsicum* que crecen y se cultivan en México (Informe Final).

Morales, M., & Munné-Bosch, S. (2019). Malondialdehyde: facts and artifacts. *Plant physiology*, 180, 1246-1250.

Morton, M. J., Awlia, M., Al-Tamimi, N., Saade, S., Pailles, Y., Negrão, S., & Tester, M. (2019). Salt stress under the scalpel—dissecting the genetics of salt tolerance. *The plant journal*, 97, 148-163.

Moreau, D., Bardgett, R.D., Finlay, R.D., Jones, D.L., & Philippot, L. (2019). A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. *Functional ecology*, 33, 540-552.

Moscone, E.A., M.A. Scaldaferrò, M., & Grabièle, N.M. (2007). The evolution of chili peppers (*Capsicum*-Solanaceae): a cytogenetic perspective. VIth International Solanaceae Conference: Genomics Meets Biodiversity. *Acta Horticulturae*, 745, 137-170.

Moussi, K., Nayak, B., Perkins, L. B., Dahmoune, F., Madani, K., & Chibane, M. (2015). HPLC-DAD profile of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extract of *Rhamnus alaternus* L. *Industrial crops and products*, 74, 858-866.

Moustaine, M., Elkahkahi, R., Benbouazza, A., Benkirane, R., & Achbani, E. (2017). Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth in tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) and characterization for direct PGP abilities in Morocco. *International journal of environment, agriculture and biotechnology*, 2, 590–595.

Moustaine, M., Elkahkahi, R., Benbouazza, A., Benkirane, R., & Achbani, E.H. (2017). Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and characterization for direct PGP abilities in Morocco. *International journal of environment, agriculture and biotechnology*, 2, 238-708.

Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology*, 59, 651-681.

Muñoz-Mayor, A., Pineda, B., Garcia-Abellán, J. O., Antón, T., Garcia-Sogo, B., Sanchez-Bel, P., & Bolarin, M. C. (2012). Overexpression of dehydrin tas14 gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato. *Journal of plant physiology*, 169, 459-468.

Muthukumar, T., & Udaiyan, K. (2018). Coinoculation of bioinoculants improve *Acacia auriculiformis* seedling growth and quality in a tropical Alfisol soil. *Journal of forestry research*, 29, 663-673.



- Nabti, E., Bensidhoum, L., Tabli, N., Dahel, D., Weiss, A., Rothballer, M., & Hartmann, A. (2014). Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosimicrobium* sp. strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. *European journal of soil biology*, *61*, 20-26.
- Naccarato, A., Furia, E., Sindona, G., & Tagarelli, A. (2016). Multivariate class modeling techniques applied to multielement analysis for the verification of the geographical origin of chili pepper. *Food chemistry*, *206*, 217-222.
- Naili, F., Neifar, M., Elhidri, D., Cherif, H., Bejaoui, B., Aroua, M., & Cherif, A. (2018). Optimization of the effect of PGPR-based biofertilizer on wheat growth and yield. *Biometrics & biostatistics international journal*, *7*, 226-232.
- Nasab, R. S., Yali, M. P., & Bozorg-Amirkalaei, M. (2018). Effects of humic acid and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on induced resistance of canola to *Brevicoryne brassicae* L. *Bulletin of entomological research*, *109*, 479-489.
- Neelapu, N.R.R., Deepak, K.G.K., & Surekha, C. (2015). Transgenic plants for higher antioxidant. *Managing Salt Tolerance in Plants: Molecular and Genomic Perspectives*, *5*, 391-395.
- Nicola, L., Vrhovsek, U., Soini, E., Insam, H., & Pertot, I. (2016). Phlorizin released by apple root debris is related to apple replant disease. *Phytopathologia mediterranea*, *45*, 432-437.
- Nosheen, A., Naz, R., Tahir, A.T., Yasmin, H., Keyani, R., Mitrevski, B., & Hussain, I. (2018). Improvement of safflower oil quality for biodiesel production by integrated application of PGPR under reduced amount of NP fertilizers. *PloS one*, *13*, 17-38.
- O'Callaghan, K.J., Dixon, R.A., & Cocking, E.C. (2001). *Arabidopsis thaliana*: a model for studies of colonization by non-pathogenic and plant-growth-promoting rhizobacteria. *Functional plant biology*, *28*, 975-982.

Odoh, C.K. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a bioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiolgy. A review. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 5, 123-142.

Ogugua, U. V., Ntushelo, K., Makungu, M. C., & Kanu, S. A. (2016). Effect of *Bacillus subtilis* BD233 on seedlings growth of sweet pepper (*Capsicum annuum*), Swiss chard (*Beta vulgaris*) and lettuce (*Lactuca sativa*). In *VII International Symposium on Seed, Transplant and stand establishment of horticultural crops*, 120, 201-210.

Ogneva, Z.V., Volkonskaia, V.V., Dubrovina, A.S., Suprun, A.R., Aleynova, O.A., & Kiselev, K. V. (2021). Exogenous Stilbenes Improved Tolerance of *Arabidopsis thaliana* to a Shock of Ultraviolet B Radiation. *Plants*, 10, 12-82.

Olatunji, T.L., & Afolayan, A.J. (2018). The suitability of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) for alleviating human micronutrient dietary deficiencies: A review. *Food science & nutrition*, 6, 2239-2251.

Ordookhani, K., Sharafzadeh, S., & Zare, M. (2011). Influence of PGPR on growth, essential oil and nutrients uptake of sweet basil. *Advances in environmental biology*, 5, 672-677.

Ornelas-Paz, J., Martínez-Burrola, J.M., Ruiz-Cruz, S., Santana-Rodríguez, V., Ibarra Junquera, V., Olivas, G.I., & Pérez-Martínez, J.D. (2010). Effect of cooking on the capsaicinoids and phenolics contents of Mexican peppers. *Food Chemistry*, 119, 1619–1625.

Ortega-García, F., & Peragón, J. (2009). The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual). *Journal of the science of food and agriculture*, 89, 1565-1573.

Pagnani, G., Pellegrini, M., Galieni, A., D'Egidio, S., Matteucci, F., Ricci, A., & Del Gallo, M. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in *Cannabis sativa* 'Finola' cultivation: An alternative fertilization strategy to improve plant growth and quality characteristics. *Industrial crops and products*, 123, 75-83.

Pagnani, G., Galieni, A., Stagnari, F., Pellegrini, M., Del Gallo, M., & Pisante, M. (2020). Open field inoculation with PGPR as a strategy to manage fertilization of ancient Triticum genotypes. *Biology and fertility of soils*, *56*, 111-124.

Paiva, L.B.D., Goldbeck, R., Santos, W.D.D., & Squina, F.M. (2013). Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, *49*, 395-411.

Pan, J., Peng, F., Xue, X., You, Q., Zhang, W., Wang, T., & Huang, C. (2019). The growth promotion of two salt-tolerant plant groups with PGPR inoculation: a meta-analysis. *Sustainability*, *11*, 3-78.

Panuccio, M.R., Papalia, T., Attinà, E., Giuffrè, A., & Muscolo, A. (2019). Use of digestate as an alternative to mineral fertilizer: effects on growth and crop quality. *Archives of agronomy and soil science*, *65*, 700-711.

Panpatte, D.G., Jhala, Y.K., Shelat, H.N., & Vyas, R.V. (2016). *Pseudomonas fluorescens*: a promising biocontrol agent and PGPR for sustainable agriculture. In *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*, *10*, 257-270.

Pardey, C., García, M., & Cabrera, F.A.V. (2006). Caracterización morfológica de cien introducciones de Capsicum del Banco de Germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. *Acta Agronómica*, *55*, 1-10.

Parađiković, N., Teklić, T., Zeljković, S., Lisjak, M., & Špoljarević, M. (2019). Biostimulants research in some horticultural plant species—A review. *Food and energy security*, *8*, 2-162.

Park, J. H., Tran, L. H., & Jung, S. (2017). Perturbations in the photosynthetic pigment status result in photooxidation-induced crosstalk between carotenoid and porphyrin biosynthetic pathways. *Frontiers in plant science*, *8*, 19-92.

Park, S.Y., & Shim, S.H. (2014). Characterization of metabolites from cultures of *Cellulosimicrobium cellulans*. *Journal of the korean society for applied biological chemistry*, *57*, 481-484.

Parmar, N., & Dufresne, J. (2011). Beneficial interactions of plant growth promoting rhizosphere microorganisms. *In bioaugmentation, biostimulation and biocontrol*, 20, 27-42.

Paredes, M., & Espinosa, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28, 61-70.

Parray, J.A., Jan, S., Kamili, A.N., Qadri, R.A., Egamberdieva, D. & Ahmad, P. (2016). Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35, 877- 902.

Pathak, R., Shrestha, A., Lamichhane, J., & Gauchan, D.P. (2017). PGPR in biocontrol: mechanisms and roles in disease suppression. *International journal of agronomy and agricultural*, 11, 69-80.

Patil, V. (2011). Production of indole acetic acid by *Azotobacter* sp. *Recent research in Science and Technology*, 3, 12-14.

Paucar-Menacho, L.M., Martinez-Villaluenga, C., Dueñas, M., Frias, J., & Peñas, E. (2017). Optimization of germination time and temperature to maximize the content of bioactive compounds and the antioxidant activity of purple corn (*Zea mays* L.) by response surface methodology. *Journal of food science and technology*, 76, 236–244.

Pawlus, A.D., Waffo-Téguo, P., Shaver, J., & Merillon, J.M. (2012). Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a review. *Oeno One*, 46, 57-111.

Pérez-Rodríguez, M. M., Pontin, M., Lipinski, V., Bottini, R., Piccoli, P., & Cohen, A. C. (2020). *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum brasilense* increase yield and fruit quality of tomato under field conditions. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20, 1614-1624.

Pérez-Rodríguez, M.M., Piccoli, P., Anzuay, M.S., Baraldi, R., Neri, L., Taurian, T., Lobato-Ureche, M., & Cohen, A.C., (2020). Native bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Solanum lycopersicum* L. increase tomato seedling growth under a reduced fertilization regime. *Scientific reports*, 10, 1–14.

Pérez-Labrada, F., López-Vargas, E.R., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., Benavides-Mendoza, A., & Juárez-Maldonado, A. (2019). Responses of tomato plants under saline stress to foliar application of copper nanoparticles. *Plants*, *8*, 151-155.

Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., & Vianello, A. (2013). Plant flavonoids—biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *International journal of molecular sciences*, *14*, 14950-14973.

Petridis, A., Therios I., Samouris G., Tananaki C. (2012). Salinity-induced changes in phenolic compounds in leaves and roots of four olive cultivars (*Olea europaea* L.) and their relationship to antioxidant activity. *Environmental and experimental botany*, *79*, 37-43,

Phale, S. (2018). Isolation and screening of multifunctional plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from onion rhizosphere (*Allium cepa*). *Journal of bioprocessing and biotechniques*, *8*, 3-32.

Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W.H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, *11*, 789-799.

Pickersgill, B. (1969). The archaeological record of chile peppers (*Capsicum* spp.) and the sequence of plant domestication in Peru. *American Antiquity*, *34*, 54–61.

Piccoli, P., Travaglia C., Cohen, A., Sosa, C.P., Masuelli, R., & Bottini R. (2011). An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. *Plant Growth Regulation*, *64*, 207–10.

Pii, Y., Borruso, L., Brusetti, L., Crecchio, C., Cesco, S., & Mimmo, T. (2016). The interaction between iron nutrition, plant species and soil type shapes the rhizosphere microbiome. *Plant Physiology and Biochemistry*, *99*, 39-48.

Pii, Y., Graf, H., Valentinuzzi, F., Cesco, S., & Mimmo, T. (2017). The effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on the growth and quality of

strawberries. *In VIII international symposium on mineral nutrition of fruit crops*, 1217, 231-238.

Pilco-Quesada, S., Tian, Y., Yang, B., Repo-Carrasco-Valencia, R., & Suomela, J.P. (2020). Effects of germination and kilning on the phenolic compounds and nutritional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Journal of cereal science*, 94, 29-96.

Pillai, B., & Swarup, S. (2002). Elucidation of the flavonoid catabolism pathway in *Pseudomonas putida* PML2 by comparative metabolic profiling. *Applied and Environmental microbiology*, 68, 143–151.

Pingali, P.L. (2012). Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 12302-12308.

Pinto, C.M.F., Dos Santos, I.C., De Araujo, F.F., & Da Silva, T.P. (2016). Pepper importance and growth (*Capsicum* spp.). In *Production and breeding of chilli peppers (Capsicum spp.)*, 1. 1-25).

Poethig, R.S. (2010). The past, present, and future of vegetative phase change. *Plant physiology*, 154, 541-544.

Porcel, R., Zamarreño, Á.M., García-Mina, J.M., & Aroca, R. (2014). Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. *BMC plant biology*, 14, 1-12.

Prasad, R., Kumar, M., & Varma, A. (2015). Role of PGPR in soil fertility and plant health. In *Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants*, 10, 247-260.

Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in environmental science and biotechnology*, 13, 63-77.

Prasad, J.K., Gupta, S.K. & Raghuwanshi, R. (2017) Screening multifunctional plant growth promoting rhizobacteria strains for enhancing seed germination in

wheat (*Triticum aestivum* L.). *International journal of agricultural research*, 12, 64-72.

Prasannakumar, S.P., Gowtham, H.G., Hariprasad, P., Shivaprasad, K., & Niranjana, S.R. (2015). *Delftia tsuruhatensis* WGR-UOM-BT1, a novel rhizobacterium with PGPR properties from *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz also suppresses fungal phytopathogens by producing a new antibiotic—AMTM. *Letters in applied microbiology*, 61, 460-468.

Puri, N., Rathore, A., Dharmdeep, G., Vairagare, S., Prasad, B.R., Priyadarshini, R., & Singh, H.P. (2018). A clinical study on comparative evaluation of the effectiveness of carbamazepine and combination of carbamazepine with baclofen or capsaicin in the management of trigeminal neuralgia. *Nigerian journal of surgery*, 24, 95-99.

Purwanto, P., Yuwariah, Y., Sumadi, S., & Simarmata, T. (2016). Nitrogenase activity and IAA production of indigenous diazotroph and its effect on rice seedling growth. *Agrivita, journal of agricultural science*, 39, 31-37.

Purwanto, P., & Suharti, W.S. (2021). Nutrient uptake, chlorophyll content, and yield of rice (*Oryza sativa* L.) under the application of PGPR consortium. *Biosaintifika: Journal of biology & biology education*, 13, 10-21.

Qiang-Sheng, W. U., Guo-Huai, L. I., & Ying-Ning, Z. O. U. (2011). Improvement of root system architecture in peach (*Prunus persica*) seedlings by arbuscular mycorrhizal fungi, related to allocation of glucose/sucrose to root. *Notulae botanicae horti agrobotanici cluj-napoca*, 39, 232-236.

Quintal, J.E.D.A.B. (2015). Mecanismos de tolerancia a salinidad en plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis doctoral.

Radhakrishnan, R., & Lee, I.J. (2016). Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. *Plant physiology and biochemistry*, 109, 181-189.

- Ragab, A. S., Van Fleet, J., Jankowski, B., Park, J. H., & Bobzin, S. C. (2006). Detection and quantitation of resveratrol in tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of agricultural and food chemistry*, *54*, 7175-7179.
- Rahimi, S., Talebi, M., Baninasab, B., Gholami, M., Zarei, M., & Shariatmadari, H. (2020). The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in improving iron acquisition by altering physiological and molecular responses in quince seedlings. *Plant physiology and biochemistry*, *155*, 406-415.
- Rahimi, Y., Taleei, A., & Ranjbar, M. (2018). Long-term water deficit modulates antioxidant capacity of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Scientia horticulturae*. *237*, 36–43.
- Rajput, L. U. B. N. A., Imran, A., Mubeen, F. A. T. H. I. A., & Hafeez, F. Y. (2013). Salt-tolerant PGPR strain *Planococcus rifietoensis* promotes the growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in saline soil. *Pakistan journal of botany*, *45*, 1955-1962.
- Ramel, F., Mialoundama, A. S., & Havaux, M. (2013). Nonenzymic carotenoid oxidation and photooxidative stress signalling in plants. *Journal of experimental botany*, *64*, 799-805.
- Rani, A., Vats, S. K., Sharma, M., & Kumar, S. (2011). Catechin promotes growth of *Arabidopsis thaliana* with concomitant changes in vascular system, photosynthesis and hormone content. *Biologia plantarum*, *55*, 779-782.
- Rana, A., Saharan, B., Joshi, M., Prasanna, R., Kumar, K., & Nain, L. (2011). Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annals of microbiology*, *61*, 893-900.
- Redondo-Gómez, S., Romano-Rodríguez, E., Mesa-Marín, J., Sola-Elías, C., & Mateos-Naranjo, E. (2022). Consortia of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated from Halophytes Improve the Response of Swiss Chard to Soil Salinization. *Agronomy*, *12*, 100-468.



- Reginato, M., Luna, V., & Papenbrock, J. (2021). Current knowledge about Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> effects on plants: what is different in comparison to NaCl? *Journal of plant research*, *134*, 1159-1179.
- Rêgo, M.C.F., Ilkiu-Borges, F., De Filippi, M.C.C., Gonçalves, L.A., & Da Silva, G. B. (2014). Morphoanatomical and biochemical changes in the roots of rice plants induced by plant growth-promoting microorganisms. *Journal of Botany*, *1*, 1-11.
- Riaz, U., Murtaza, G., Anum, W., Samreen, T., Sarfraz, M., & Nazir, M. Z. (2021). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as biofertilizers and biopesticides. *Microbiota and Biofertilizers*, *1*, 181-196.
- Rivas-San Vicente, M., & Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of experimental botany*, *62*, 3321-3338.
- Riviere, C., Pawlus, A. D., & Merillon, J. M. (2012). Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural product reports*, *29*, 1317-1333.
- Robledo-Buriticá, J., Aristizábal-Loaiza, J.C., Ceballos-Aguirre, N., & Caba-Cendales, T. (2018). Influence of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on blackberry (*Rubus glaucus* Benth. cv. thornless) growth under semi-cover and field conditions. *Acta agronómica*, *67*, 258-263.
- Roca, M., & Pérez-Gálvez, A. (2020). Profile of Chlorophyll Catabolites in Senescent Leaves of *Epipremnum aureum* Includes a Catabolite Esterified with Hydroxytyrosol 1-O-Glucoside. *Journal of Natural Products*, *83*, 873-880.
- Rodrigues, M. J., Monteiro, I., Placines, C., Castaneda-Loaiza, V., Ślusarczyk, S., Matkowski, A., & Custodio, L. (2019). The irrigation salinity and harvesting affect the growth, chemical profile and biological activities of *Polygonum maritimum* L. *Industrial crops and products*, *139*, 111-510.

Roig, J.M., Occhiuto, P., Piccolo, R.J., & Galmarini, C.R. (2009). Evaluación de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. en germoplasma argentino de pimiento para pimentón. *Horticultura argentina*, 28, 5-9.

Rout, G.R., & Sahoo, S. (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. *Reviews in agricultural science*, 3, 1-24.

Roy S.J., Negrão, S., Tester, M. (2014). Salt resistant crop plants. *Current opinion in biotechnology* 26, 115-124.

RoyChowdhury, A., Bagchi, A., & Sengupta, C. (2016). Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from agricultural field and their potential role on germination and growth of spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants. *International journal of current agricultural sciences*, 6, 128-131.

Ruggiero, A., Landi, S., Punzo, P., Possenti, M., Van Oosten, M. J., Costa, A., & Batelli, G. (2019). Salinity and ABA seed responses in pepper: Expression and interaction of ABA core signaling components. *Frontiers in plant science*, 10, 120 - 304.

Safdar, H., Amin, A., Shafiq, Y., Ali, A., Yasin, R., Shoukat, A., & Sarwar, M. I. (2019). A review: Impact of salinity on plant growth. *Natural sciences*, 17, 34-40.

Saghafi, D., Ghorbanpour, M., & Lajayer, B. A. (2018). Efficiency of Rhizobium strains as plant growth promoting rhizobacteria on morpho-physiological properties of *Brassica napus* L. under salinity stress. *Journal of soil science and plant nutrition*, 18, 253-268.

Sales, J. M., & Resurreccion, A. V. (2014). Resveratrol in peanuts. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(6), 734-770.

Sapre, S., Gontia-Mishra, I., & Tiwari, S. (2018). Klebsiella sp. confers enhanced tolerance to salinity and plant growth promotion in oat seedlings (*Avena sativa*). *Microbiological research*, 206, 25-32.

- Sapre, S., Gontia-Mishra, I., & Tiwari, S. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria ameliorates salinity stress in pea (*Pisum sativum*). *Journal of plant growth regulation*, 41, 647-656.
- Saito K, Yonekura-Sakakibara K, Nakabayashi R, Higashi Y, Yamazaki M, Tohge T, Fernie, A.R. (2013) The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity. *Journal plant physiology biochemistry*, 72, 21–34.
- Saleh, B.K., Omer, A., & Teweldemedhin, B. (2018). Medicinal uses and health benefits of chili pepper (*Capsicum* spp.): a review. *MOJ food processing and technology*, 6, 325-328.
- Salehi, B., Hernández-Álvarez, A.J., Del Mar Contreras, M., Martorell, M., Ramírez-Alarcón, K., Melgar-Lalanne, G., & Sharifi-Rad, J. (2018). Potential phytopharmacy and food applications of *Capsicum* spp.: A comprehensive review. *Natural product communications*, 13.
- Salomon, M.V., Bottini R., de Souza Filho, G.A., Cohen, A.C., Moreno D., Gil M., & Piccoli, P. (2014) Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine. *Physiol plant*, 151,359–374.
- Samanta, A., Das, G., & Das, S.K. (2011). Roles of flavonoids in plants. *Carbon*, 100, 12-35.
- Samaniego-Gámez, B.Y., Garruña, R., Tun-Suárez, J.M., Kantun-Can, J., Reyes-Ramírez, A., & Cervantes-Díaz, L. (2016). *Bacillus* spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants. *Chilean journal of agricultural research*, 76, 409-416.
- Samarah, N.H., Wang, H., & Welbaum, G.E. (2016). Pepper (*Capsicum annuum*) seed germination and vigour following nanochitin, chitosan or hydropriming treatments. *Seed science and technology*, 44, 609–623.

Sánchez, R.M., Dunel Guerra, L., & Scherger, M. (2015). Evaluación de las áreas bajo riego afectadas por salinidad y/o sodicidad en Argentina. Repositorio cenpat-conicet. Disponible en: <http://repositorio.cenpat-conicet.gob.ar/88>.

Sanchita, Trivedi, R., Asif, M.H., & Trivedi, P.K. (2018). Dietary plant miRNAs as an augmented therapy: cross-kingdom gene regulation. *RNA biology*, *15*, 1433-1439.

Santos, R. M., Kandasamy, S., & Rigobelo, E. C. (2018). Sugarcane growth and nutrition levels are differentially affected by the application of PGPR and cane waste. *Microbiologyopen*, *7*, 6-17.

Sarma, B.K., & Singh, U.P. (2003). Ferulic acid may prevent infection by *Sclerotium rolfsii* in *Cicer arietinum*. *World journal of microbiology and biotechnology*, *19*, 123-127.

Sarma, B.K., Singh, D.P., Mehta, S., Singh, H.B., & Singh, U.P. (2002). Plant growth-promoting rhizobacteria-elicited alterations in phenolic profile of chickpea (*Cicer arietinum*) infected by *Sclerotium rolfsii*. *Journal of phytopathology*, *150*, 277-282.

Savci, S. (2012). An agricultural pollutant: chemical fertilizer. *International journal of environmental science and development*, *3*, 1-73.

Sayyed, R.Z., Chincholkar, S.B., Reddy, M.S., Gangurde, N.S., & Patel, P.R. (2013). Siderophore producing PGPR for crop nutrition and phytopathogen suppression. In *bacteria in agrobiolgy*, *9*, 449-471.

Schubert, S., Neubert, A., Schierholt, A., Sümer, A., & Zörb, C. (2009). Development of salt-resistant maize hybrids: the combination of physiological strategies using conventional breeding methods. *Plant science*, *177*, 196-202.

Schultz, J.C., Appel, H.M., Ferrieri, A.P., & Arnold, T.M. (2013). Flexible resource allocation during plant defense responses. *Frontiers in plant science*, *4*, 3-24.

Sen, S., & Chandrasekhar, C.N. (2014). Effect of PGPR on growth promotion of rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress. *Asian journal of plant science and research*, 4, 62-67.

Shahid, S.A., Zaman, M., & Heng, L. (2018). Soil salinity: historical perspectives and a world overview of the problem. In *guideline for salinity assessment, mitigation and adaptation using nuclear and related techniques*, 1, 43-53.

Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21, 12-16.

Shahnaz, G., Shekoofeh, E., Kourosh, D., & Moohamadbagher, B. (2011). Interactive effects of silicon and aluminum on the malondialdehyde (MDA), proline, protein and phenolic compounds in *Borago officinalis* L. *Journal of medicinal plants research*, 5, 5818-5827.

Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Asaf, S., Khan, M. A., Kang, S. M., & Lee, I. J. (2016). Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant physiology and biochemistry*, 106, 236-243.

Sharma, I.P., Chandra, S., Kumar, N., & Chandra, D. (2017). PGPR: heart of soil and their role in soil fertility. In *agriculturally important microbes for sustainable agriculture*, 5, 51-67.

Sharma, M., Sandhir, R., Singh, A., Kumar, P., Mishra, A., Jachak, S., & Roy, J. (2016). Comparative analysis of phenolic compound characterization and their biosynthesis genes between two diverse bread wheat (*Triticum aestivum*) varieties differing for chapatti (Unleavened Flat Bread) quality. *Frontiers in plant science*. 7, 18-70.

Sharafzadeh, S. (2012). Effects of PGPR on growth and nutrients uptake of tomato. *International journal of advances in engineering & technology*, 2, 27-33.

Sheteiwy, M. S., Shao, H., Qi, W., Hamoud, Y. A., Shaghaleh, H., Khan, N. U., ... & Tang, B. (2019). GABA-alleviated oxidative injury induced by salinity, osmotic

stress and their combination by regulating cellular and molecular signals in rice. *International journal of molecular sciences*, 20, 5709.

Shiragaki, K., Yokoi, S., & Tezuka, T. (2020). Phylogenetic analysis and molecular diversity of *Capsicum* based on DNA-ITS region. *Horticulturae*, 6, 4- 87.

Shu, K., Liu, X., Xie, Q., & He, Z. (2016). Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular plant*, 9, 34–45.

Shultana, R., Kee Zuan, A. T., Yusop, M. R., & Saud, H. M. (2020). Characterization of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria and the effect on growth and yield of saline-affected rice. *PLoS One*, 15, 9-22.

Sikora, B., & Nowaczyk, P. (2014). Application of rapd technique for identification of interspecific hybrids from genus *Capsicum*. *Acta scientiarum polonorum*, 13, 155-166.

Silva, G.H., de Souza, J. A. R., Macedo, W.R., & Pinto, F.G. (2021). Tyrosol, a phenolic compound from *Phomopsis* sp., is a potential biostimulant in soybean seed treatment. *Phytochemistry Letters*, 43, 40-44.

Singh, A., Jain, A., Sarma, B.K., Upadhyay, R.S., & Singh, H.B. (2014). Rhizosphere competent microbial consortium mediates rapid changes in phenolic profiles in chickpea during *Sclerotium rolfsii* infection. *Microbiological research*. 169, 353–360.

Singh, U. P., Sarma, B. K., & Singh, D. P. (2003). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria and culture filtrate of *Sclerotium rolfsii* on phenolic and salicylic acid contents in chickpea (*Cicer arietinum*). *Current microbiology*, 46, 131-140.

Singh, R. P., & Jha, P. N. (2016). The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS one*, 11, 6-18.

Singh, A., Maurya, S., Singh, R., & Singh, U.P. (2012). Antibiotic potential of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) against *Sclerotium rolfsii*. *Archives of phytopathology and plant protection*, 45, 1655-1662.

Singh PK, Singh R, Singh S. (2013). Cinnamic acid induced changes in reactive oxygen species scavenging enzymes and protein profile in maize (*Zea mays* L.) plants grown under salt stress. *Physiology and molecular biology of plants*, 19, 53-59.

Singh, B., Boukhris, I., Kumar, V., Yadav, A. N., Farhat-Khemakhem, A., Kumar, A., & Alghamdi, O.A. (2020). Contribution of microbial phytases to the improvement of plant growth and nutrition: a review. *Pedosphere*, 30, 295-313.

Singh, R. P., & Jha, P. N. (2016). The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plos one*, 11. 15-50.

Singh, A., Maurya, S., Singh, R., & Singh, U. P. (2012). Antibiotic potential of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) against *Sclerotium rolfsii*. *Archives of phytopathology and plant protection*, 45, 1655-1662.

Singh, I. (2018). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and their various mechanisms for plant growth enhancement in stressful conditions: a review. *European journal of biological research*, 8, 191-213.

Sivasakthi, S., Usharani, G., & Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African journal of agricultural research*, 9, 1265-1277.

Slininger, P.J., Burkhead, K.D., & Schisler, D.A. (2004). Antifungal and sprout regulatory bioactivities of phenylacetic acid, indole-3-acetic acid, and tyrosol isolated from the potato dry rot suppressive bacterium *Enterobacter cloacae* S11: t: 07. *Journal of industrial microbiology biotechnology*, 31, 517–524.

Smoleń, S., & Sady, W. (2009). The effect of various nitrogen fertilization and foliar nutrition regimes on the concentrations of sugars, carotenoids and phenolic compounds in carrot (*Daucus carota* L.). *Scientia horticulturae*. 120, 315–324.

Song, X., Liu, M., Wu, D., Griffiths, B. S., Jiao, J., Li, H., & Hu, F. (2015). Interaction matters: Synergy between vermicompost and PGPR agents improves soil quality, crop quality and crop yield in the field. *Applied soil ecology*, 89, 25-34.

Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold spring harbor perspectives in biology*, 3, 10-12.

Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold spring harbor perspectives in biology*, 3, 14-38.

Stamenov, D.R., Djuric, S.S., & Jafari, T.H. (2018). Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on the Germination and Early Growth of Onion (*Allium Cepa*). *World Academy of Science, Engineering and Technology, International journal of agricultural and biosystems engineering*, 5, 6-15.

Stanišić, M., Ćosić, T., Savić, J., Krstić-Milošević, D., Mišić, D., Smigocki, A., & Banjac, N. (2019). Hairy root culture as a valuable tool for allelopathic studies in apple. *Tree physiology*, 39, 888-905.

Steenackers, W., El Houari, I., Baekelandt, A., Witvrouw, K., Dhondt, S., Leroux, O., & Vanholme, B. (2019). cis-Cinnamic acid is a natural plant growth-promoting compound. *Journal of experimental botany*, 70, 6293-6304.

Sunar, K., Dey, P., Chakraborty, U., & Chakraborty, B. (2015). Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. *Journal of basic microbiology*, 55, 91-104.

Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Khan, M. S. I., Shahid, N., & Aaliya, K. (2017). Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Applied soil ecology*, 121, 102-117.

Tahir, M. & Aqeel, S.M. (2013). Plant Growth promoting rhizobacteria (PGPR): A budding complement of synthetic fertilizers for improving crop production. *Journal of life and social sciences*, 11, 1-7.

Tahiri, A.I., Meddich, A., Raklami, A., Alahmad, A., Bechtaoui, N., Anli, M., & Oufdou, K. (2022). Assessing the potential role of compost, PGPR, and AMF in



improving tomato plant growth, yield, fruit quality, and water stress tolerance. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22, 743-764.

Talaat, N. B., Ghoniem, A. E., Abdelhamid, M. T., & Shawky, B. T. (2015). Effective microorganisms improve growth performance, alter nutrients acquisition and induce compatible solutes accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants subjected to salinity stress. *Plant growth regulation*, 75, 281-295.

Taleisnik, E., Grunberg, K., & Santa María, G. (2008). *La salinización de suelos en la Argentina: su impacto en la producción agropecuaria*. Editorial universitaria de Córdoba.

Taleisnik, E., & López Launestein, D. (2011). Leñosas perennes para ambientes afectados por salinidad: Una sinopsis de la contribución argentina a este tema. *Ecología austral*, 21, 3-14.

Tarchoune, I., Baâtour, O., Harrathi, J., Cioni, P. L., Lachaâl, M., Flamini, G., & Ouerghi, Z. (2013). Essential oil and volatile emissions of basil (*Ocimum basilicum*) leaves exposed to NaCl or Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> salinity. *Journal of plant nutrition and soil science*, 176, 748-755.

Tavarini, S., Sgherri, C., Ranieri, A.M., & Angelini, L.G. (2015). Effect of nitrogen fertilization and harvest time on steviol glycosides, flavonoid composition, and antioxidant properties in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63, 7041–7050.

Tennakoon, P.L.K., Rajapaksha, R.M.C.P., & Hettiarachchi, L.S.K. (2019). Tea yield maintained in PGPR inoculated field plants despite significant reduction in fertilizer application. *Rhizosphere*, 10, 100-146.

Tenorio-Salgado, S., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R., Caballero-Mellado J., & Pérez-Rueda, E. (2013) Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered*, 5, 236-43.

Tirry, N., Kouchou, A., Laghmari, G., Lemjereb, M., Hnadi, H., Amrani, K., & El Ghachtouli, N. (2021). Improved salinity tolerance of *Medicago sativa* and soil enzyme activities by PGPR. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 31, 101-914.

Tozzi, F., Mariani, A., Vallone, R., & Morábito, J. (2017). Evolución de la salinidad de los suelos regadíos del río Tunuyán Inferior (Mendoza-Argentina). *Revista de la facultad de ciencias agrarias*, 49, 79-93.

Toussaint, J.P., Pham, T.T. M., Barriault, D., & Sylvestre, M. (2012). Plant exudates promote PCB degradation by a rhodococcal rhizobacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 95, 1589-1603.

Travaglia, C., Cohen, A.C., Reinoso, H., Castillo, C., & Bottini, R. (2007). Exogenous abscisic acid increases carbohydrate accumulation and redistribution to the grains in wheat grown under field conditions of soil water restriction. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), 285-289.

Travaglia, C., Balboa, G., Espósito, G., & Reinoso, H. (2012). ABA action on the production and redistribution of field-grown maize carbohydrates in semiarid regions. *Plant Growth Regulation*, 67(1), 27-34.

Turan, M., Gulluce, M., Cakmakci, R., Oztas, T., Sahin, F., Gilkes, R.J., & Prakongkep, N. (2010). The effect of PGPR strain on wheat yield and quality parameters. In *Proceedings of the 19th World Congress of Soil Science: Soil solutions for a changing world, Brisbane, Australia* (pp. 209-212).

Türk, B., Aşçıoğlu, T.K., Güleş, A., Okşar, R.E., Alan, Ö., & Şen, F. (2017). Effects of Plant Growth Promoting Microorganisms on Yield and Quality Parameters of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of applied biological sciences*, 3, 6-9.

Tuteja, N., Peter Singh, L., Gill, S. S., Gill, R., & Tuteja, R. (2012). Salinity stress: a major constraint in crop production. *Improving crop resistance to abiotic stress*, 7, 71-96.

USDA-ARS 2011. Grin species records of Capsicum. Beltsville, Maryland: National Germplasm Resources Laboratory.

Van Zonneveld, M., Ramirez, M., Williams, D.E., Petz, M., Meckelmann, S., Avila, T., & Scheldeman, X. (2015). Screening genetic resources of *Capsicum* peppers in their primary center of diversity in Bolivia and Peru. *Plos one*, 10, 20-63.

Verma, R. K., Sachan, M., Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Mishra, R.K., Tripathi, D.K., & Sharma, S. (2018). Role of PGPR in sustainable agriculture: molecular approach toward disease suppression and growth promotion. In *role of rhizospheric microbes in soil*, 4, 259-290.

Vives-Peris, V., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2018). Salt stress alleviation in citrus plants by plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* and *Novosphingobium* sp. *Plant cell reports*, 37, 11-43.

Wahyuni, Y., Ballester, A.R., Tikunov, Y., de Vos, R.C., Pelgrom, K.T., Maharijaya, A., & Bovy, A.G. (2013). Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. *Metabolomics*, 9, 130-144.

Walia, A., Guleria, S., Chauhan, A., & Mehta, P. (2017). Endophytic bacteria: role in phosphate solubilization. *Endophytes: crop productivity and protection*, 8, 61-93.

Walker, V., Couillerot, O., Von Felten, A., Bellvert, F., Jansa, J., & Maurhofer, M. (2012) Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions. *Plant soil*, 356,151–163.

Wang, C., Wu, J., Zhang, Y., & Lu, J. (2018). *Muscadinia rotundifolia* 'Noble' defense response to *Plasmopara viticola* inoculation by inducing phytohormone-mediated stilbene accumulation. *Protoplasma*, 255, 95-107.

Wang, C., Yang, H., Yue, L., Sun, W., Chen, F., Cao, X., & Xing, B. (2022). Physiological and molecular level understanding of advanced carbon dots to enhance maize drought tolerance: modulation of photosynthesis and signaling molecules. *Environmental Science: Nano*, 9(10), 3821-3832.

Wani, M.Y., Mehraj, S., Rather, R.A., Rani, S., Hajam, O.A., Ganie, N.A. & Kamili, A.S. (2018). Systemic acquired resistance (SAR): A novel strategy for plant protection with reference to mulberry. *International journal of chemical studies*, 2, 1184-1192.

Warwate, S. I., Kandoliya, U. K., Bhadja, N. V., & Golakiya, B. A. (2017). The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Biochemical Parameters of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) Seedling. *International journal of current microbiology applied sciences*, 6, 1935-1944.

Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolutions. *Journal of plant physiology* 144, 307–313.

Werner, T., & Schmülling, T. (2009). Cytokinin action in plant development. *Current opinion in plant biology*, 12, 527-538.

Wiesen, B., Krug, E., Fiedler, K., Wray, V., & Proksch, P. (1994). Sequestration of host-plant-derived flavonoids by lycaenid butterfly *Polyommatus icarus*. *Journal of chemical ecology*, 20, 2523-2538.

Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-19.

Wu, C.H., Dewir, Y.H., Hahn, E.J., & Paek, K.Y. (2006). Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *Journal of plant biology*, 49, 62-193.

Wu, H. (2018). Plant salt tolerance and Na<sup>+</sup> sensing and transport. *The crop journal*, 6, 215-225.

Xing, J., Cai, M., Chen, S., Chen, L., & Lan, H. (2013). Seed germination, plant growth and physiological responses of *Salsola ikonnikovii* to short-term NaCl stress. *Plant biosystems-an international journal dealing with all aspects of plant biology*, 147, 285-297.

Xu, G., Fan, X., & Miller, A.J. (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual review of plant biology*, 63, 153-182.

Xu, M., Rao, J., & Chen, B. (2019). Phenolic compounds in germinated cereal and pulse seeds: classification, transformation, and metabolic process. *Critical reviews in food science nutrition*, 60, 740–759.

Yang, W., Li, N., Fan, Y., Dong, B., Song, Z., Cao, H., & Fu, Y. (2021). Transcriptome analysis reveals abscisic acid enhancing drought resistance by regulating genes related to flavonoid metabolism in pigeon pea. *Environmental and experimental botany*, 191, 104-627.

Yasmin, F., Othman, R., & Maziz, M.N.H. (2020). Yield and nutrient content of sweet potato in response of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) inoculation and N fertilization. *Jordan journal of biological sciences*, 13, 117-122.

Yousef, N.M. (2018). Capability of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for producing indole acetic acid (IAA) under extreme conditions. *European Journal of biological research*, 8, 174-182.

Yuan, W.A.N.G., Wenqing, L.I., Binghai, D.U., & Hanhao, L.I. (2021). Effect of biochar applied with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on soil microbial community composition and nitrogen utilization in tomato. *Pedosphere*, 31, 872-881.

Zaheer, M. S., Raza, M. A. S., Saleem, M. F., Khan, I. H., Ahmad, S., Iqbal, R., & Manevski, K. (2019). Investigating the effect of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium pisi* on agronomic traits of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65, 1554-1564.

Zameer, M., Zahid, H., Tabassum, B., Ali, Q., Nasir, I. A., Saleem, M., & Butt, S. J. (2016). PGPR potentially improve growth of tomato plants in salt-stressed environment. *Turkish journal of agriculture-food science and technology*, 4, 455-463.

Zare, M., Ordookhani, K., & Alizadeh, O. (2011). Effects of PGPR and AMF on growth of two bred cultivars of tomato. *Advances in environmental biology*, 5, 2177-2181.

Zeffa, D.M., Fantin, L.H., Koltun, A., de Oliveira, A.L., Nunes, M.P., Canteri, M.G., & Gonçalves, L.S. (2020). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on co-inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean crop: a meta-analysis of studies from 1987 to 2018. *Peer j* 8, 7-16.

Zeng, J., Liu, X., Song, L., Lin, X., Zhang, H., Shen, C., & Chu, H. (2016). Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. *Soil biology and biochemistry*, 92, 41-49.

Zhalnina, K., Louie, K.B., Hao, Z., Mansoori, N., Da Rocha, U.N., Shi, S., & Firestone, M.K. (2018). Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nature Microbiology*, 3, 470–480.

Zhang, X.M., Zhang, Z.H., Gu, X.Z., Mao, S.L., Li, X.X., Chadœuf, J., & Zhang, B.X. (2016). Genetic diversity of pepper (*Capsicum* spp.) germplasm resources in China reflects selection for cultivar types and spatial distribution. *Journal of integrative agriculture*, 15, 1991-2001.

Zhang, M., Smith, J.A.C., Harberd, N.P., & Jiang, C. (2016). The regulatory roles of ethylene and reactive oxygen species (ROS) in plant salt stress responses. *Plant molecular biology*, 91, 651-659.

Zhang, X., McRose, D.L., Darnajoux, R., Bellenger, J.P., Morel, F.M., & Kraepiel, A. M. (2016). Alternative nitrogenase activity in the environment and nitrogen cycle implications. *Biogeochemistry*, 127, 189-198.

Zhang, J., Bai, R., Shang, M., Xu, X., Song, H., Zheng, S., & Xing, G. (2020). Identification of pepper genes involved in the response to CO<sub>2</sub> enrichment using RNA-Seq analysis. *Horticulture, environment, and biotechnology*, 62, 113-123.

Zhang, L., Cao, Y. Y., & Zhao, B. X. (2012). Effect of Peat Moss Substratum on Cucumber Growth and its Defence Related Enzymes. *Northern horticulture*, 1, 10-69.

Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, 61, 49-64.

# Anexo 1

## Análisis Físico Químico

Material: suelo

Ubicación: Facultad de Ciencias Agrarias

Año: 2019

### Determinaciones

pH:	7.61	Clasificación:	Neutro	TEXTURA:	Franco-limoso
-----	------	----------------	--------	----------	---------------

### Características de Salinidad y Sodicidad

Determinación	Conductividad Eléctrica Actual			RAS
Unidades:	mmhos/cm	dS/m	µmhos/cm	1,57
Cuantificación:	2.63	2.63	2630	
Clasificación:	NO SALINO			

### CATIONES

CATION	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>
Unidad: meq/l	26.36	19.27	1.5	7.39

### ANIONES

ANION	CO <sub>3</sub> <sup>=</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>
Unidad: meq/l	0.0	3.2	12.91	4.1

### Características de Fertilidad

Determinación	Mat-O	N-Total	Fosforo	Potasio	Calcio	Magnes.	Sodio	CIC	Boro	N-NO <sub>3</sub>	S
Unidades:	%	ppm	ppm	cmol+/Kg	cmol+/Kg	cmol+/Kg	cmol+/Kg	meq/100g	ppm	ppm	ppm
Resultado	0.90	73,5	3.1	1.9	2.6	0.2	0.7	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A



## ANALISIS FISICO-QUIMICO

### Datos Generales

Propietario: Vivero Productora	Establecimiento: Finca Maria	Extraída por: Cliente
Solicitante: Emiliano Malovini	Ubicación: 0	Fecha Ingreso: 21-09-21
Material: Suelo	Cultivo: -	Fecha Informe: 04-10-21
GPS:	Profundidad (cm):	Meta de producción: N/D
<b>ID Muestra: Suelo Vivero</b>	Observaciones: 0	Código laboratorio: M212678

### Determinaciones

pH: 8.1	Clasificación: MODERADAMENTE ALCALINO	TEXTURA: ARENOSO	68 (m%g)
%Arena: N/D		%Limo: N/D	%Arcilla: N/D

### Características de Salinidad y Sodicidad

Determinación	Conductividad Eléctrica Actual			RAS
Unidades:	mmhos/cm	dS/m	µmhos/cm	2.85
Cuantificación:	1.54	1.54	1541	
Clasificación:	NO SALINO			

### CATIONES

CATION	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>
Unidad: meq/l	4.66	0.6	1.85	4.63
Unidad: ppm	93	7	72	107

### ANIONES

ANION	CO <sub>3</sub> <sup>=</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>
Unidad: meq/l	0.0	3.3	3.5	4.9
Unidad: ppm	0.0	202	125	235

### Características de Fertilidad

Determinación	Mat-O	N-Total	Fosforo	Potasio	Calcio	Magnesio	Sodio	CIC	Boro	N-NO <sub>3</sub>	S
Unidades:	%	ppm	ppm	cmol+/Kg	cmol+/Kg	cmol+/Kg	cmol+/Kg	meq/100g	ppm	ppm	ppm
Resultado	0.24	175	8.0	1.6	7.5	0.2	0.7	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A

### Técnicas

Pretratamiento de muestras IRAM-SAGPyA 29578; Conductividad: ; pH: 1:2,5 IRAM 29410,; COX: IRAM-SAGyP 29571-2 Walker Black; Fósforo extraíble: Método Olsen IRAM-SAGyP 29570-2; Potasio intercambiable: Emisión; Nitrogeno Kjeldahl automatico; Cloruros: Mohr; Calcio y Magnesio: Complexometría, Sodio y Potasio: Emisión, Sulfatos: Gravimetría, Carbonatos y Bicarbonatos: Titulación, RAS: Matemático; Textura: Volumen de Sedimentación o Bouyoucos

<b>Comentarios</b>	<b>Análisis</b>
Los análisis de suelo de "Muy bajos," "Bajos" y "Medio" son considerados niveles "Sub-óptimos."	Ing. Agr. M. Regairaz Director Tecnico Tec. Qco. Guevara Alejandro Analista