

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO EN CHILE CHILTEPÍN (*CAPSICUM ANNUUM* VAR. *GLABRIUSCULUM*) POR MEDIO DEL USO DE *BACILLUS* SPP. NATIVOS

POR:

MARIBEL MENDOZA ALATORRE

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

OCTUBRE DE 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Asunto: **Liberación Tesis**

Chihuahua, Chih., 5 de octubre del 2023

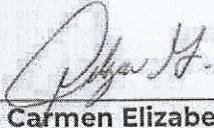
M.A.P. TERESA VIRIDIANA ESPINOZA MOLINA
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
PRESENTE. -

Los que suscriben, informamos a usted que se llevó a cabo la revisión de la tesis titulada: **"Tolerancia al estrés hídrico en chile chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabrisculum*) con el uso de *Bacillus spp. nativos*."** presentada por la estudiante **Maribel Mendoza a la Torre** con número de matrícula **291285**, alumna del programa de **Maestría en Ciencias en Biotecnología**.

Se le fueron indicadas al estudiante las correcciones que eran necesarias efectuar, y después de realizarse lo anterior y verificar que las mismas fueron atendidas, manifestamos que el documento en cuestión, cumple con los requisitos de calidad y originalidad señalados por el Comité de Tesis y por la Facultad de Ciencias Químicas, por lo que autorizamos que sea impresa para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

ATENTAMENTE

"LUCHAR PARA LOGRAR, LOGRAR PARA DAR"



Dra. María Carmen Elizabeth Delgado
Gardea
Director



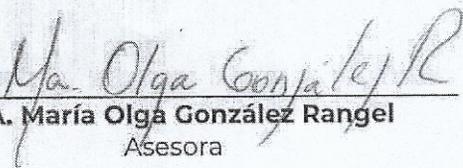
Dr. Jared Hernández Huerta
Codirector Externo



Dra. María del Rocío Infante Ramírez
Asesora



Dra. Virginia Guadalupe Nevárez
Moorillón
Asesora



M.A. María Olga González Rangel
Asesora



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

25 de Septiembre de 2023

M.A.P. TERESA VIRIDIANA ESPINOZA MOLINA
Secretario de Investigación y posgrado
Facultad de Ciencias químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
Presente.-

Por medio de la presente hago constar que la alumna **Maribel Mendoza Alatorre**, con matrícula 291285, cumplió con el desarrollo de su proyecto de tesis que se titula:

“Tolerancia al estrés hídrico en chile chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabiusculum*)
con el uso de *Bacillus* spp. Nativos”

El cual fue revisado y liberado para su registro correspondiente.

Atentamente,

Dra. María Carmen Elizabeth Delgado Gardea
Director de Tesis

Dr. Jared Hernández Huerta
Director Externo

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a la universidad Autónoma de Chihuahua y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por los recursos otorgados.

Mi agradecimiento sincero a la Facultad de Ciencias Químicas y especialmente al laboratorio de Biotecnología II, por acogerme y convertirse en otro hogar para mí.

Agradezco de corazón al Laboratorio de Microbiología, Fitopatología y Fisiología Poscosecha de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, por recibirme una vez más, por el inmenso apoyo aportado para la realización de este trabajo.

Mi gratitud a mi directora de tesis, la Dra. María Carmen Elizabeth Delgado Gardea, por la oportunidad que me brindó, por sus aportaciones y palabras de aliento.

A mi codirector, el Dr. Jared Hernández Huerta, por su apoyo incondicional, su constante atención y disposición. Por el esfuerzo y compromiso otorgados.

Mi agradecimiento y admiración a las Doctoras María del Rocío Infante, Guadalupe Virginia Nevárez y María Olga González por compartirme un poco de su experiencia, enriquecer mi conocimiento y la calidad de este trabajo.

A los laboratorios de Química I, Microbiología III, Biotecnología I, III y IV, a la Dra. Blanca Estela Sánchez, al Dr. Carlos Espinoza Hicks, a la Dra. María del Rosario Peralta, al Dr. Edward Espinoza y a mis compañeros Alejandro Solís, Noé Corral y Aldo Gutiérrez, por su valiosa contribución.

A mis amigas Margarita García, Nohemí Reaza, Mariana Acosta y Brenda Julián, por la compañía en esta etapa, por sus aportaciones, los cafecitos y por tantas risas. Fui muy feliz por tenerlas en mi maestría.

A mi novio, Jorge Daniel Payán por su amor y confianza, por su guía y por compartirme la nobleza de su ser.

A mis padres Maribel Alatorre Salgado y Socorro Mendoza Orozco por enseñarme a amar, por creer en mí, por su respaldo absoluto y por la constante inspiración.

A mis hermanas Vanessa Rubí, Diana Laura y a mi pequeño Sushi Gilberto por participar de cada sueño, por saber escuchar y acompañar.

DEDICATORIA

A Dios, inspiración y fuerza de cada paso que doy.

«No se accede a la verdad sino a través del amor»

Agustín de Hipona



ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. ANTECEDENTES	5
4.1 Importancia del chile chiltepín	5
4.1.1 Importancia y taxonomía del género <i>Capsicum</i>	5
4.1.2 Distribución e importancia del chile chiltepín.....	6
4.1.3 Requerimientos climáticos	6
4.1.4 Descripción morfológica y perfil fitoquímico del chiltepín.....	7
4.1.6 Variabilidad genética del chiltepín	8
4.1.7 Propagación del chiltepín.....	9
4.1.8 Plagas y enfermedades	9
4.1.9 Domesticación y cultivo del chiltepín.....	10
4.1.10 Limitantes en la producción de chile chiltepín	11
4.2 La sequía y sus implicaciones en la agricultura.....	12
4.3 Estrés hídrico en el chile chiltepín	16
4.4 Estrategias de resistencia vegetal a la sequía	17
4.5 Mecanismos de respuesta vegetal al estrés	20
4.5.1 Adaptabilidad morfológica.....	21
4.5.2 Regulación estomática.....	22
4.5.3 Ajuste osmótico.....	23
4.5.4 Sistema antioxidante.....	25
4.5.5 Síntesis de proteínas	27
4.5.6 Regulación hormonal	28
4.5.7 Transducción de señales	29
4.5.8 Regulación genética	30
4.6 PGPR como inductoras de tolerancia a la sequía.....	31
4.7 <i>Bacillus</i> spp. como PGPR e inductores de tolerancia a la sequía.....	34
4.8 Mecanismos de acción de <i>Bacillus</i> spp. en la promoción de crecimiento vegetal e inducción de resistencia a sequía.....	37
4.8.1 Producción de AIA	37
4.8.2 Producción de Sideróforos.....	38
4.8.3 Solubilización de fósforo	39
4.8.4 Solubilización de zinc.....	40
4.8.5 Producción de amonio	41
4.8.6 Producción de osmoprotectantes.....	42



4.8.7 Producción de exopolisácaridos.....	42
4.8.8 Producción de antioxidantes	43
4.8.9 Regulación hormonal	43
4.8.10 Regulación genética	44
V. JUSTIFICACIÓN	45
VI. HIPÓTESIS	46
VII. OBJETIVOS	46
7.1 Objetivo General:	46
7.2 Objetivos Particulares:.....	46
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
8.1 Aislamiento e identificación de los aislados	47
8.1.1 Colecta de muestras	47
8.1.2 Aislamiento de <i>Bacillus</i> spp.	47
8.1.3 Identificación morfológica y bioquímica de <i>Bacillus</i> spp.	48
8.1.4 Elaboración del cepario.....	48
8.1.5 Extracción de ADN.....	49
8.1.6 Identificación molecular.....	50
8.1.7 Secuenciación	51
8.2 Promoción de crecimiento vegetal.....	51
8.2.1 Promoción de germinación <i>in vitro</i>	51
Desinfección de semilla	51
Inoculación con <i>Bacillus</i> spp.....	52
Parámetros de germinación, índices y características morfológicas	52
8.2.2 Promoción de crecimiento en invernadero	52
Producción de plántulas	53
Inoculación con <i>Bacillus</i> spp.....	54
Parámetros vegetativos y pigmentos fotosintéticos	54
8.3 Caracterización de <i>Bacillus</i> spp. como PGPR	55
8.3.1 Solubilización de fósforo	55
8.3.2 Producción de amonio	56
8.3.3 Producción de sideróforos	56
8.3.4 Solubilización de zinc.....	57
8.3.5 Producción de exopolisácaridos.....	57
8.4 Inducción de resistencia a estrés hídrico	57
8.4.1 Determinación de la concentración de polietilenglicol	58
8.4.2 Resistencia de <i>Bacillus</i> spp. al polietilenglicol.....	58
8.4.3 Inducción de resistencia a sequía <i>in vitro</i>	59
8.4.4 Inducción de resistencia a sequía <i>in vivo</i>	59
Producción de plántulas	59



Inoculación de plántulas	60
Aplicación del estrés.....	60
Evaluación.....	60
8.5 Análisis estadístico.....	61
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
9.1 Aislamiento e identificación de los aislados	62
9.1.1 Identificación morfológica y bioquímica de <i>Bacillus</i> spp.	62
9.1.2 Extracción de ADN.....	64
9.1.3 Identificación molecular.....	66
9.2 Evaluación de la promoción de crecimiento.....	68
9.2.1 Promoción de germinación <i>in vitro</i>	68
Parámetros de germinación e índices	68
Parámetros vegetativos.....	73
Anatomía de la raíz	76
9.2.2 Promoción de crecimiento en invernadero	79
9.3 Caracterización de <i>Bacillus</i> spp. como PGPR	87
9.3.1 Solubilización de fósforo	87
9.3.2 Producción de amonio	87
9.3.3 Producción de sideróforos	90
9.3.4 Solubilización de zinc.....	92
9.3.5 Producción de exopolisácaridos.....	93
9.4 Inducción de resistencia a estrés hídrico	94
9.4.1 Determinación de la concentración de polietilenglicol	94
9.4.2 Resistencia de <i>Bacillus</i> al polietilenglicol	99
9.4.3. Inducción de resistencia a sequía <i>in vitro</i>	101
9.4.4 Inducción de resistencia a sequía <i>in vivo</i>	104
X. CONCLUSIONES.....	110
10. 1 Perspectivas y sugerencias	111
XI. BIBLIOGRAFÍA	112
XII. APÉNDICES.....	129



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fórmulas para la determinación de parámetros de germinación.	53
Tabla 2. Composición de la solución nutritiva Soluponics Universal Steiner.	54
Tabla 3. Fórmulas para la determinación de pigmentos fotosintéticos.	55
Tabla 4. Fórmulas para la determinación del índice y eficiencia de solubilización.	56
Tabla 5. Fórmulas para la determinación de prolina y RWC.	61
Tabla 6. Pruebas bioquímicas para la identificación de cepas bacterianas.	62
Tabla 7. Descripción morfológica de las colonias de <i>Bacillus</i> spp. en medio de cultivo TSA.	64
Tabla 8. Concentración y pureza del ADN.	65
Tabla 9. Identificación molecular de las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	67
Tabla 10. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en los parámetros de germinación del chiltepín bajo condiciones <i>in vitro</i>	70
Tabla 11. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en parámetros vegetativos del chiltepín bajo condiciones <i>in vitro</i>	75
Tabla 12. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en altura, longitud de raíz y diámetro de tallo del chiltepín bajo condiciones <i>in vivo</i>	82
Tabla 13. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en la biomasa fresca del chiltepín bajo condiciones <i>in vivo</i>	84
Tabla 14. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en la biomasa seca del chiltepín bajo condiciones <i>in vivo</i>	84
Tabla 15. Efecto del estrés hídrico en los parámetros vegetativos del chiltepín bajo condiciones <i>in vitro</i>	99
Tabla 16. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en parámetros vegetativos del chiltepín bajo condiciones de estrés <i>in vitro</i>	104
Tabla 17. Nivel de estrés, contenido relativo de agua y prolina en hojas chiltepín bajo condiciones de estrés hídrico en invernadero.	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo fenológico del chile chiltepín bajo condiciones controladas.	11
Figura 2. Monitor de Sequía en México al 31 de julio de 2023.	15
Figura 3. Estrategias de resistencia a la sequía en plantas.	19
Figura 4. Interacción entre los mecanismos de respuesta a la sequía en plantas.	21
Figura 5. Ciclo de vida de <i>B. subtilis</i>	36
Figura 6. Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal e inducción de resistencia a sequía de <i>Bacillus</i> spp.	38
Figura 7. Sitio de muestreo.	47
Figura 8. Caracterización microscópica y morfología colonial de las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	63
Figura 9. Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa al 2%.	65
Figura 10. Valor de absorbancia a distintas longitudes de onda en las muestras de ADN extraído.	66
Figura 11. Dinámica de germinación de semillas de chiltepín tratadas con <i>Bacillus</i> spp. bajo condiciones <i>in vitro</i>	70
Figura 12. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en el índice de vigor e índice de germinación del chiltepín bajo condiciones <i>in vitro</i>	72
Figura 13. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en el crecimiento <i>in vitro</i> de plántulas de chiltepín.	74
Figura 14. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en el peso fresco e índice de esbeltez del chiltepín bajo condiciones <i>in vitro</i>	75
Figura 15. Análisis PCA y de conglomerados con K-medias de parámetros vegetativos en plántulas de chiltepín tratadas con <i>Bacillus</i> spp. bajo condiciones <i>in vitro</i>	76
Figura 16. Anatomía de raíces secundarias de plántulas de chiltepín tratadas con <i>Bacillus</i> spp.	78
Figura 17. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en la anatomía de raíz del chiltepín.	78
Figura 18. Temperatura y humedad relativa en el invernadero durante el desarrollo de plántulas de chiltepín tratadas con <i>Bacillus</i> spp.	79
Figura 19. Dinámica de crecimiento de plántulas de chiltepín tratadas con <i>Bacillus</i> spp.	80
Figura 20. Dinámica de desarrollo foliar en plántulas de chiltepín tratadas con <i>Bacillus</i> spp.	80
Figura 21. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en chiltepín bajo condiciones <i>in vivo</i>	81
Figura 22. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en el número de hojas y área foliar del chiltepín bajo condiciones <i>in vivo</i>	83
Figura 23. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en los pigmentos fotosintéticos del chiltepín bajo condiciones <i>in vivo</i>	85
Figura 24. Análisis PCA de parámetros vegetativos en plántulas de chiltepín tratadas con <i>Bacillus</i> spp. bajo condiciones <i>in vivo</i>	86
Figura 25. Solubilización de fósforo en las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	88
Figura 26. Índice de solubilización de fósforo en las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	88



Figura 27. Ensayo de Nessler en las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	89
Figura 28. Producción de amonio en las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	90
Figura 29. Producción de sideróforos en las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	91
Figura 30. Índice de producción de sideróforos de las cepas <i>Bacillus</i> spp.	91
Figura 31. Solubilización de zinc en las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	92
Figura 32. Índice y eficiencia de solubilización de zinc en las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	93
Figura 33. Producción de exopolisácaridos en las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	94
Figura 34. Dinámica de sobrevivencia de plántulas de chiltepín tratadas con <i>Bacillus</i> spp. bajo condiciones de estrés <i>in vitro</i>	95
Figura 35. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en la sobrevivencia de plántulas de chiltepín estresadas bajo condiciones <i>in vitro</i>	96
Figura 36. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en plántulas de chiltepín estresadas bajo condiciones <i>in vitro</i>	97
Figura 37. Efecto del estrés hídrico en la sobrevivencia y peso fresco del chiltepín bajo condiciones <i>in vitro</i>	98
Figura 38. Efecto del estrés hídrico en plántulas y raíz principal de chiltepín bajo condiciones <i>in vitro</i>	98
Figura 39. Tasa de sobrevivencia y número de cepas de <i>Bacillus</i> spp. tolerantes a distintas concentraciones de PEG.	100
Figura 40. Viabilidad celular de <i>Bacillus</i> spp. en distintas concentraciones de PEG.	100
Figura 41. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en la sobrevivencia y esbeltez del chiltepín bajo condiciones de estrés <i>in vitro</i> (PEG 30%)	101
Figura 42. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en plántulas de chiltepín estresadas bajo condiciones <i>in vitro</i> (PEG 30%)	103
Figura 43. Monitoreo de temperatura y humedad relativa en el invernadero durante el desarrollo de chiltepín bajo condiciones de estrés.	105
Figura 44. Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> spp. en plántulas de chiltepín bajo condiciones de estrés <i>in vivo</i>	105
Figura 45. Dinámica del nivel de humedad en el sustrato.	106
Figura 46. Dinámica del NDVI.	107
Figura 47. Correlación entre el nivel de humedad del sustrato y el NDVI.	108



LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
ABA	Ácido Abscísico
ACC	1-Aminociclopropano-1-Carboxilato
AIA	Ácido Indol-3-Acético
AG₃	Ácido Giberélico
AN	Agar Nutritivo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APX	Ascorbato Peroxidasa
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
BR	Brasinoesteroides
CAT	Catalasa
CDPK	Proteína Quinasa Dependiente de Calmodulina
CE	Conductividad Eléctrica
CN	Caldo Nutritivo
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
CTAB	Bromuro de Cetiltrimetilamonio
DDS	Días Después de la Siembra
DDT	Días Después del Trasplante
DO	Densidad Óptica
ET	Etileno
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FAOSTAT	Anuario Estadístico de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GAS	Giberelinas
GB	Glicina Betaína
GR	Glutación Reductasa
GTP	Guanosina trifosfato
HSP	Proteínas de Choque Térmico
IG	Índice de Germinación
IPCC	Panel Intergubernamental del Cambio Climático
IST	Resistencia Sistémica Inducida
IVG	Índice de Velocidad de Germinación
JA	Ácido Jasmónico
LEA	Proteínas Abundantes de Embriogénesis Tardía
MAPK	Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos
NPs	Nanopartículas
NRPS	Péptidos Sintetas No Ribosomales
PCR	Cadena en Reacción de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PGPR	Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal
PIB	Producto Interno Bruto
PKY	Pikovskaya
POD	Peroxidasa
PSI	Libras de Presión



RIDER	Resiliencia y Resistencia a la Sequía Inducida por Rizobacterias
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RWC	Contenido Relativo de Agua
SA	Ácido Salicílico
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SOC1	Supresor de Sobreexpresión de Constantes 1
SOD	Superóxido dismutasa
TG	Tasa de Germinación
TMG	Tiempo Medio de Germinación
TS	Tasa de Supervivencia
TSA	Agar Soya Trypticaseína
TSB	Caldo Soya Trypticaseína
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonia / mL
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VMG	Velocidad Media de Germinación

I. RESUMEN

Tolerancia al estrés hídrico en Chile chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) por medio del uso de *Bacillus* spp. nativos

El chiltepín es una planta semicultivada de alto valor comercial, además, representa un recurso genético valioso. Sin embargo, diversos factores como la sequía limitan su producción. Una alternativa sostenible es el tratamiento con Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR). El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la capacidad de *Bacillus* spp. aislados de suelos áridos en la promoción de crecimiento e inducción de tolerancia a estrés hídrico en chiltepín. Para ello, se estableció un diseño completamente al azar y se empleó la prueba de separación de medias con Scott-Knott ($\alpha = 0.05$). A partir de muestras de suelo se aislaron once cepas de *Bacillus* spp., de las cuales siete fueron identificadas como *B. cereus*, dos cepas más identificadas como *B. thuringiensis*, una cepa correspondiente a *B. wiedmannii* y una cepa a *B. subtilis*. Las semillas tratadas mejoraron los parámetros de germinación con incrementos de 46% en la tasa de germinación, 22% en la velocidad media e índice de velocidad de germinación. Además, aumentaron 65 y 100% los índices de vigor y de germinación, respectivamente. En contraste, se observó una reducción del 6% en el tiempo medio de germinación. En condiciones de invernadero, las plántulas inoculadas con *Bacillus* spp. presentaron 10, 14, 70 y 38% mayor longitud de raíz, diámetro de tallo, peso fresco de hojas y contenido de clorofila a, respectivamente. Todas las cepas mostraron la capacidad de solubilizar fósforo, zinc, producir amonio, sideróforos y exopolisacáridos como mecanismos de promoción. Por otra parte, al considerar el efecto en los parámetros vegetativos y en la tasa de sobrevivencia de plántulas, se determinó que 30% de polietilenglicol (PEG) 6000 induce estrés hídrico en chiltepín. Las cepas de *Bacillus* spp. mostraron resistencia a la sequía y viabilidad celular hasta PEG 40%. Así mismo, los tratamientos mejoraron hasta 68% la sobrevivencia *in vitro* de las plántulas estresadas. Además, mitigaron los síntomas de estrés hídrico severo en las plántulas e incrementaron 51% el contenido relativo de agua en hojas bajo condiciones de invernadero. La cepa Bc25-7 mostró el mayor potencial para promover el crecimiento, resistir el estrés hídrico e inducir tolerancia en plántulas de chiltepín mediante mecanismos como la producción de amonio, sideróforos, exopolisacáridos, solubilización de zinc y fósforo.

Palabras clave: Chiltepín, *Bacillus* spp., estrés hídrico

II. ABSTRACT

Tolerance to drought stress in chiltepin chili (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) through native *Bacillus* spp.

Chiltepin is a semi-cultivated high commercial value plant, in addition, it represents a valuable genetic resource. However, several factors including drought limit its production. A sustainable alternative is the treatment with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). The present study aimed to evaluate *Bacillus* spp. ability, isolated from arid soils, in growth promotion and tolerance induction to water stress in chiltepin. Thus, a completely randomized design was established, and the Scott-Knott media separation test ($\alpha = 0.05$) was used. Eleven strains of *Bacillus* spp. were isolated from soil samples, of which seven were identified as *B. cereus*, two strains identified as *B. thuringiensis*, a strain corresponding to *B. wiedmannii* and a strain to *B. subtilis*. Treated seeds improved the germination parameters with increases of 46% in germination rate, 22% in mean speed and germination speed index. In addition, vigor and germination indices increased by 65 and 100%, respectively. In contrast, a 6% reduction in mean germination time was observed. Under greenhouse conditions, seedlings inoculated with *Bacillus* spp. presented 10, 14, 70, and 38% greater root length, stem diameter, leaves fresh weight, and chlorophyll a content, respectively. All strains showed the ability to solubilize phosphorus, zinc, produce ammonium, siderophores, and exopolysaccharides as promotion mechanisms. Besides, considering the effect on vegetative parameters and seedling survival rate, it was determined that 30% of polyethylene glycol (PEG) 6000 induces water stress in chiltepin. *Bacillus* spp. strains showed resistance to drought and cell viability up to PEG 40%. Likewise, treatments improved the *in vitro* survival of stressed seedlings by up to 68%. In addition, strains mitigated the severe water stress symptoms in seedlings and increased the relative water content in leaves by 51%, under greenhouse conditions. Strain Bc25-7 showed the greatest potential to promote growth, resist water stress, and induce tolerance in chiltepin seedlings through mechanisms such as ammonium production, siderophores, exopolysaccharides, and zinc, and phosphorus solubilization.

Keywords: Chiltepin, *Bacillus* spp., drought stress

III. INTRODUCCIÓN

La sequía es una de las principales limitantes para la agricultura moderna al causar estrés severo en la fisiología de las plantas (Del Toro y Kretzschmar, 2020; Ahluwalia *et al.*, 2021). Los efectos adversos se han intensificado como consecuencia del cambio climático (Seleiman *et al.*, 2021). En la última década las pérdidas económicas globales alcanzaron los 37 mil millones de dólares (FAO, 2021). Además, se proyecta que para el año 2050 serán necesarias un millón de hectáreas adicionales para garantizar la seguridad alimentaria mientras se prevé una reducción del 50% en la disponibilidad de agua (Gupta *et al.*, 2021).

Se han desarrollado distintas estrategias para soportar condiciones de estrés hídrico en los cultivos, entre ellas el uso de nanopartículas, acolchado, modificaciones genéticas, aplicación de hidrogeles, osmoprotectantes y antioxidantes (Seleiman *et al.*, 2021; Ullah *et al.*, 2019). Una alternativa sostenible para disminuir el estrés hídrico es el tratamiento de cultivos con Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

Las PGPR actúan mediante distintos mecanismos de acción que se interconectan y trabajan de forma sinérgica. Entre ellos se encuentra la producción de fitohormonas, producción de sideróforos, producción de amonio, solubilización de fósforo, producción de osmoprotectantes y regulación de la expresión de genes asociada a la actividad antioxidante (Rashid *et al.*, 2021). Especies de los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Myroides*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Providencia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* han sido reportadas como PGPR e inductores en el alivio del estrés por sequía (Chandra *et al.*, 2021). El interés por el uso de *Bacillus* spp. en la agricultura ha tomado gran relevancia, debido a que diversos estudios demuestran su potencial en la promoción de crecimiento y bioprotección de cultivos ante condiciones de estrés por agentes bióticos y abióticos.

Por otra parte, *Capsicum annuum* var. *glabrisculum*, conocido de forma común como chiltepín, es un chile semidoméstico de importancia gastronómica y cultural, que recientemente ha incrementado su demanda debido a que se considera un



producto hortícola de alto valor para el mercado, el cual paga entre \$800.00 y 1200.00 pesos / kg (Caughey *et al.*, 2020). Sin embargo, se encuentra bajo presión antropogénica, ya que la recolección se realiza mediante la extracción directa de la planta, para la posterior obtención del fruto (Mares y Valiente, 2019); esta deforestación, ha ocasionado una reducción de la proporción de plantas en vida silvestre (Vázquez *et al.*, 2020). Otro factor que afecta la producción de chiltepín es la baja tasa de germinación, considerada como la principal limitante agronómica para su domesticación (Alcalá *et al.*, 2019). En la actualidad *C. annum* var. *glabrisculum* forma parte de los programas prioritarios de conservación *in situ* en el mundo (Castañeda *et al.*, 2016). El establecimiento del chiltepín podría favorecer su conservación (Pérez *et al.*, 2022), sin embargo, el norte de México presenta alta vulnerabilidad al déficit hídrico (Ortega *et al.*, 2018), presentando sequía prolongada en categorías extrema y excepcional de julio 2020 a 2022 (CONAGUA, 2023). De esta forma la sequía representa una amenaza para la repoblación de chiltepín en el estado Chihuahua. Una alternativa para favorecer su establecimiento es el uso de bacterias del género *Bacillus*.

El estudio de la aplicación de *Bacillus* spp. en distintas especies del género *Capsicum* ha sido reportado por varios autores. Yasin *et al.* (2018) utilizaron PGPR para evaluar la tolerancia a estrés salino en plantas de *C. annum* L. y demostraron la regulación de procesos fisiológicos y bioquímicos, así como una mayor producción de biomasa vegetal. En un trabajo similar, se demostró el potencial de *B. amyloliquefaciens* para mantener el crecimiento y robustecer las respuestas a estrés hídrico, salino y por alta concentración de metales pesados en plantas de *C. annum* cv. *Geumsugangsan* (Kazerooni *et al.*, 2021). Existe poca evidencia del uso de PGPR para promover el crecimiento en plantas de *C. annum* var. *glabrisculum* (Huerta *et al.*, 2010; García *et al.*, 2018). Hasta donde nuestro conocimiento llega, no existe otro estudio en donde se utilice *Bacillus* spp. como mitigadores de estrés hídrico.

IV. ANTECEDENTES

4.1 IMPORTANCIA DEL CHILE CHILTEPÍN

4.1.1 Importancia y taxonomía del género *Capsicum*

El género *Capsicum* se distribuye ampliamente en el mundo, comprende un grupo de plantas herbáceas pertenecientes a la familia de las solanáceas (Vázquez *et al.*, 2020). A partir de su diversidad morfológica y molecular se distinguen 43 especies; de las cuales se reportan seis cultivadas: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. praetermissum* (Osuna *et al.*, 2023; Hernández *et al.*, 2020; Zamljen *et al.*, 2020). El género tiene su centro de origen en América central y América del sur, no obstante, diversos estudios con isoenzimas han demostrado que el oriente de México es el centro de diversificación y domesticación de *C. annuum*, la especie cultivada de mayor importancia. En México, el chile es considerado uno de los principales vegetales por su valor gastronómico y cultural (Vázquez *et al.*, 2020). Se estima que ha sido parte de la alimentación al menos por los últimos 6000 años, además, existe evidencia de su uso desde épocas prehispánicas en combinación con otros cultivos como el maíz, la calabaza y el frijol (Aguilar *et al.*, 2021; Rosenswig, 2010). El empleo del chile en la alimentación se encuentra ampliamente extendido debido a su sabor, pungencia y propiedades nutrimentales. Estudios realizados por Hernández *et al.* (2020) confirmaron la presencia de carotenoides, alcaloides, flavonoides, vitamina C, E y capsaicinoides en *C. annuum*. Comúnmente se consume fresco o industrializado, además se utiliza con fines medicinales, en la industria farmacéutica y cosmetológica (Aguilar *et al.*, 2021). En la actualidad el cultivo de chile presenta importancia económica y alimentaria a nivel mundial. De acuerdo con el anuario estadístico de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT) en 2021 se registraron más de 2 millones de hectáreas cosechadas de pimientos verdes en el mundo, además de 1.6 millones de hectáreas de chiles y pimientos secos, con un rendimiento promedio de 2.98 toneladas/hectárea y una producción total de 4,839,309 toneladas. A nivel nacional el valor total de la producción de chile superó los 36,000 millones de pesos en 2022. El estado de Chihuahua fue el principal productor, con más de 60,000 toneladas (SIAP, 2023).

4.1.2 Distribución e importancia del chile chiltepín

El chile chiltepín (*C. annuum* var. *glabrisculum*) es una variedad considerada como el ancestro silvestre de *C. annuum* var. *annuum*. Comprende especies silvestres y semidomésticas distribuidas en regiones de Colombia, Perú, México, sur de Estados Unidos y centro América. En México, se distribuye desde la costa pacífico hasta Chiapas (Ricardez *et al.*, 2021; Hayano *et al.*, 2016). De acuerdo con Martínez *et al.* (2020) el centro de origen del chiltepín se remonta a dos puntos en el país, los municipios de Ocampo y Tehuacán en los estados de Tamaulipas y Puebla, respectivamente. En el norte de México, el chiltepín se distribuye en los estados de Coahuila, Nuevo León, Sinaloa, Baja California, Sonora y Chihuahua (Hayano *et al.*, 2016). De forma común se conoce como chiltepín, chile piquín, amashito, pimienta de la montaña, pimienta de pájaros, entre otros (Ricardez *et al.*, 2021).

Su uso es principalmente alimentario y se caracteriza por la acumulación de capsaicinoides, que le atribuye el segundo lugar en ají más picante en el país (100,000 a 200,000 SHU), después del habanero, según la escala de Scoville (Hayano *et al.*, 2016). Es consumido tanto en su estado inmaduro como condimento o fruto fresco, o bien en estado maduro formando parte de comidas típicas, en salmuera o escabeche (Mares y Valiente, 2019). Además de ser apreciado por sus atributos nutrimentales, presenta propiedades nutraceuticas debido a su contenido en compuestos fenólicos con capacidad antioxidante y posee relevancia cultural significativa (Ricardez *et al.*, 2021). Adicionalmente, es apreciado por su perfil aromático (Mares y Valiente, 2019).

4.1.3 Requerimientos climáticos

El chiltepín se adapta favorablemente a climas áridos y templados, típicamente en una altitud menor a los 1300 msnm (Vázquez *et al.*, 2020). Sin embargo, ocasionalmente se encuentra a altitudes superiores a los 2000 msnm. Se desarrolla adecuadamente a temperaturas entre 15 y 35 °C. No obstante, el chiltepín es una

especie susceptible a temperaturas por debajo de los 0 °C. Crece de forma favorable a un fotoperiodo de 14 h luz, humedad relativa entre 75 a 100% y precipitaciones promedio entre los 300 a 1000 mm por año. En su hábitat natural *C. anuum* var. *glabrisculum* se asocia a especies arbustivas silvestres como *Prosopis velutina* Woot y *Lysiloma watsonii* Rose, las cuales favorecen el crecimiento y desarrollo mediante la formación de un microclima bajo su dosel (Mares y Valiente, 2019).

4.1.4 Descripción morfológica y perfil fitoquímico del chiltepín

El chiltepín es un arbusto perenne o de hoja caduca, de hábitos herbáceo a trepador, que en su hábitat natural vive entre 5 y 8 años, con una altura promedio de 55 cm (aunque puede superar los 150 cm), con tallos delgados y ramificados. En general, la planta se caracteriza por presentar peciolo largos (15 a 20 mm) y delgados, láminas foliares lanceoladas a ovaladas, de 1 a 4 cm de ancho por 2 a 6 cm de largo. Produce flores solitarias con copa y corola blancas, de 6 a 9 mm de diámetro. El cáliz es delgado, de tonalidad verde, con una longitud de 2 a 3 mm. El ovario es cónico de 2.5 mm de largo mientras que el estilo mide 4 mm. Los estambres se componen de anteras que varían de tonalidades moradas a azuladas y filamentos con una longitud entre 1.5 y 2.5 mm. Los frutos son bayas pequeñas (0.2 a 0.5 g), compactas, de forma ovoide a globosa, con una longitud de 8 a 10 mm. Son de coloración verde en la etapa inmadura, tornándose naranja a púrpura y finalmente rojo en el estado maduro (Vázquez *et al.*, 2020; Jiménez *et al.*, 2022; Mares y Valiente, 2019; Martínez *et al.*, 2020). El color de fruto varía en función del contenido de clorofila, carotenoides y flavonoides en las distintas etapas fenológicas. La clorofila desaparece en el estado maduro mientras que el color rojo característico se atribuye a la acumulación de licopersinas (Vázquez *et al.*, 2020). De forma similar, se reporta la degradación del ácido ascórbico con la senescencia del fruto (Caughey *et al.*, 2020). Las semillas son blancas a amarillentas, de 2.5 a 3 mm de longitud y se caracterizan por tornarse a tonalidad marrón al perder su viabilidad (Mares y Valiente, 2019).



El contenido fitoquímico del chiltepín incluye capsaicinoides, carotenoides, compuestos fenólicos, flavonoides y ácido ascórbico. Estos compuestos son responsables de las características sensoriales del fruto, además de considerarse como componentes bioactivos con potencial antioxidante. El perfil fitoquímico del fruto está asociado al lugar y temporada de cosecha, exposición a la radiación UV, modificaciones genéticas en la semilla, disponibilidad de agua y otras condiciones ambientales. Un ejemplo es el incremento en la acumulación de capsaicinoides en función de la temperatura (Vázquez *et al.*, 2020). Los capsaicinoides son metabolitos secundarios, del tipo alcaloide, cuya síntesis se origina en la testa de la semilla. La capsaicina y dihidrocapsaicina constituyen el 90% de los capsaicinoides encontrados en la semilla de Chile. Sin embargo, se conocen otros compuestos dentro de este grupo como la nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina (Martínez *et al.*, 2020). En general, se ha observado que los capsaicinoides en el fruto se encuentran en un rango entre 16 y 31.84 mg Caps g⁻¹. Por otra parte, los carotenoides, son un grupo de compuestos entre los que destacan la capsantina y capsorubina, moléculas bioactivas que contribuyen en la coloración del fruto, uno de los atributos de calidad más reconocidos en el chiltepín. Además, son apreciados por su potencial expectorante, descongestionante y fungicida (Vázquez *et al.*, 2020).

4.1.6 Variabilidad genética del chiltepín

El Chile chiltepín se caracteriza por presentar una alta variabilidad genética y fenotípica que se observa en el comportamiento germinativo de las semillas, en la morfología de la planta, en las características del fruto (color, forma, tamaño, sabor, contenido fitoquímico) y en la susceptibilidad ante patógenos (Mares y Valiente, 2019; Hayano *et al.*, 2016). Las condiciones ambientales como la tasa de precipitación, tipo de suelo, condiciones de temperatura, humedad e intensidad lumínica acentúan la plasticidad fenotípica (Martínez *et al.*, 2020; Mares y Valiente, 2019; Ricardez *et al.*, 2021). Esta variabilidad se traduce en una alta adaptabilidad a condiciones ambientales diversas. Además, el chiltepín es genéticamente compatible con las especies domesticadas de *Capsicum*, por lo cual se considera

un valioso reservorio de genes primarios para aumentar la resistencia a fitopatógenos, plagas y condiciones ambientales desfavorables, así como para mejorar la productividad y rendimiento en pimientos de interés agronómico (Murillo *et al.*, 2015; Alcalá *et al.*, 2019). Por ejemplo, Osuna *et al.* (2023) observaron la variabilidad de la respuesta a condiciones de estrés salino y su efecto en la adaptabilidad del chiltepín, atribuida a la base genética.

4.1.7 Propagación del chiltepín

La diseminación del chiltepín se da a través del tracto digestivo de aves que consumen el fruto y posteriormente liberan la semilla (Vázquez *et al.*, 2020). Algunas de las especies que contribuyen en la dispersión son *Pitangus sulfuratus Linnaeus*, *Mimus polyglottos Linnaeus* y *Toxostoma curvirostre Swainson*. En algunos estudios se ha reportado que la capsaicina actúa como intermediario en la diseminación, ya que tiene efecto en la retención de la semilla en el tracto digestivo de las aves. Esto se asocia con la distancia de dispersión. No obstante, esta especie se ha propagado también de forma asexual mediante técnicas de propagación *in vitro*, enraizamiento de esquejes y formación de acodos aéreos, con ventajas como la reducción en el tiempo de obtención de las plantas y la eliminación de la segregación genética (Mares y Valiente, 2019).

4.1.8 Plagas y enfermedades

De acuerdo con la literatura, las plagas más comunes del chiltepín son el picudo del pimiento (*Anthonomus eugenii*), ácaros (*Tetranychus urticae*), escarabajos de mayo (*Phyllophaga* spp. y *Anomala* spp.), mosca minadora serpentina americana (*Liriomyza trifolii*), mosca blanca (*Bemisia tabaci*), piojo harinoso (*Planococcus* sp.) y áfidos de las especies *Myzus persicae* y *Aphis gossypii* (Caughey *et al.*, 2020; Mares y Valiente, 2019). Las enfermedades más severas son causadas por *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* y *Phytophthora capsici*. También destacan las enfermedades víricas ocasionadas por el virus del mosaico amarillo del chiltepín, el

virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) y el virus de la nervadura amarilla del chile huasteco (PHV). Afortunadamente, el chiltepín ha mostrado resistencia a géneros como Tobamovirus, Potyviridae, Geminiviridae y endornavirus del pimiento morrón (BPEV) (Mares y Valiente, 2019). Otros ecotipos han mostrado alta resistencia al PHV (Martínez *et al.*, 2020). Estos resultados confirman su potencial como recurso genético (Mares y Valiente, 2019).

4.1.9 Domesticación y cultivo del chiltepín

Recientemente el interés en la producción de chile chiltepín se ha incrementado a causa de la alta demanda del fruto que, además, se considera un producto premium por el mercado, el cual paga hasta \$1,500.00 pesos/kg. Adicionalmente, se ha reportado su uso potencial en la elaboración de productos artesanales con valor agregado en comunidades de importancia turística (Cosío, 2021). De acuerdo con el anuario estadístico de la producción agrícola (SIAP) para el año 2022, el estado de Sonora fue el único productor de chile chiltepín verde reportado a nivel nacional, con una superficie cosechada de 20 hectáreas, rendimiento promedio de 0.78 toneladas/hectárea, una producción de 15.60 toneladas y un valor total de producción de más de 6 millones de pesos. Las estadísticas de la producción en el estado de Chihuahua no se presentan debido a que no existen datos oficiales registrados (SIAP, 2023).

Se considera un cultivo silvestre o semidomesticado ya que se ha establecido en superficies menores a una hectárea, bajo sistemas de producción agroforestales, en asociación con otros cultivos principales y en pequeños invernaderos como monocultivo semidoméstico con comportamiento anual. El sombreado parcial (35%) ha mostrado ser el mejor sistema de producción de chiltepín en términos del rendimiento del fruto. Además, disminuye ciertos desordenes fisiológicos incluyendo daños por viento, altas temperaturas, quemaduras de sol, presencia de pájaros, insectos y enfermedades. La fenología de *C. annuum* var. *glabrisculum* bajo condiciones controladas se observa en la Figura 1. Entre las prácticas de cultivo reportadas se incluye la aplicación de micorrizas (*Glomus intraradices* y *Glomus fasciculatum*) y el tratamiento del cultivo con vermicomposta (*Pontoscolex*

corethrurus) (Mares y Valiente, 2019). Del mismo modo, la poda ha sido recomendada en el desarrollo de plantas silvestres como práctica para mejorar la floración y fructificación.

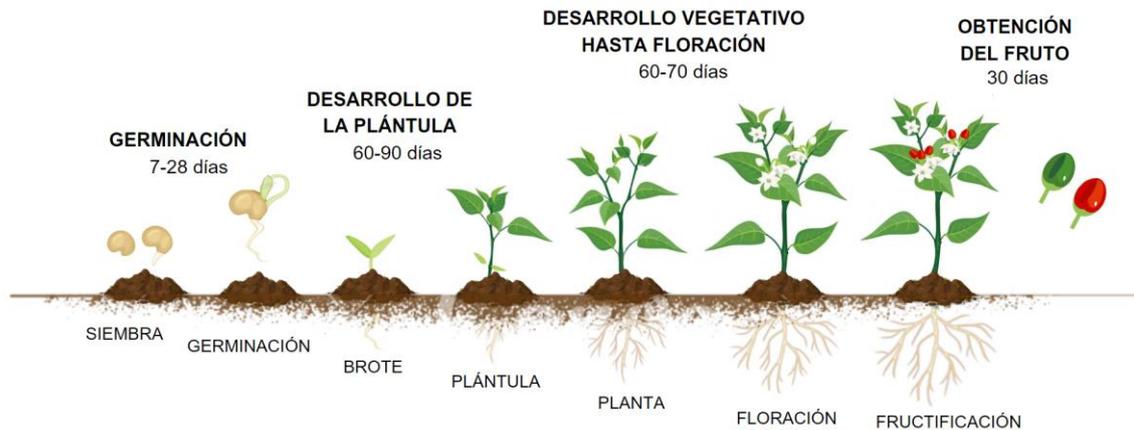


Figura 1. Desarrollo fenológico del chile chiltepín bajo condiciones controladas (Basado en Mares y Valiente, 2019).

4.1.10 Limitantes en la producción del chile chiltepín

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 establece las prácticas de manejo adecuadas para la cosecha del fruto, sin embargo, la literatura reporta que el chile chiltepín se encuentra bajo presión antropogénica ya que la recolección se realiza mediante extracción directa de la planta silvestre para la posterior obtención del fruto, esta deforestación ha ocasionado una reducción de la proporción de plantas en vida silvestre (Caughey *et al.*, 2020; Vázquez *et al.*, 2020). Adicional a la presión antropogénica, existen otros factores que afectan la producción de chiltepín silvestre como cambios en el manejo y contaminación del suelo (Jiménez *et al.*, 2022). En la actualidad *C. annum* var. *glabrisculum* forma parte de los programas prioritarios de conservación *in situ* en el mundo dentro de los programas de uso, manejo y conservación de recursos fitogenéticos (Castañeda *et al.*, 2016). De acuerdo con diversos autores el establecimiento del chiltepín en sistemas de monocultivo podría favorecer su conservación (Pérez *et al.* 2022; Riordan y Nabhan, 2019). A pesar del interés en la producción de chiltepín, el cultivo también

se ha visto limitado por la escasa información fisiológica y ambiental, susceptibilidad a patógenos, baja tasa de germinación, alta variabilidad y bajos rendimientos observados (Ricardez *et al.*, 2021).

4.2 LA SEQUÍA Y SUS IMPLICACIONES EN LA AGRICULTURA

El sector agrícola enfrenta diversos factores que limitan la producción y reducen el rendimiento de los cultivos. Estos agentes limitantes pueden ser estresores de tipo biótico, como patógenos y plagas, o de tipo abiótico. Una planta se encuentra bajo condición de estrés abiótico cuando se presenta una disfunción causada por cualquier factor del entorno que ocasiona efectos adversos en el funcionamiento normal del sistema (Benaissa y Djebbar, 2022). Los principales factores abióticos que limitan la producción son el estrés hídrico, salino, térmico y contaminación por metales pesados. Debido al efecto invernadero, en los últimos 30 años se ha mostrado un incremento en la intensidad y frecuencia de eventos climáticos extremos alrededor del mundo, incluyendo alteraciones en los patrones de lluvia y temperatura (del Toro y Kretzschmar, 2020). Como consecuencia del incremento en la demanda de evaporación atmosférica se ha observado un aumento en eventos hidrológicos como la sequía (Vicente *et al.*, 2019). Adicionalmente, el calentamiento global causa una aceleración de la tasa de evapotranspiración que conduce a la reducción de la humedad del suelo en menor tiempo, incrementando la intensidad del déficit hídrico (García *et al.*, 2022). Además, en los últimos 50 años el contenido de agua subterránea en el planeta se ha reducido en un 50%. Otra causa importante de la sequía son las aberraciones en la circulación de la atmósfera que conduce la humedad de los océanos del mundo a los continentes, para su depósito en glaciares, acuíferos y lagos, mientras que el resto de la humedad fluye a través de suelos, plantas y ríos (Ault, 2020). Vicente *et al.* (2019) definen la sequía como un “fenómeno climático caracterizado por una anomalía en la disponibilidad de agua con respecto a la climatología a largo plazo”. Este fenómeno complejo afecta los ecosistemas y las actividades humanas en una región y periodo específicos y la gravedad depende de características como la duración, severidad, frecuencia y magnitud. En un estudio se determinó que de 1860 a 1980 alrededor del 10% de la superficie global estuvo afectada por este

fenómeno; a partir de 1980 comenzó un incremento en los episodios de sequía que se intensificó significativamente después del año 2010 (Vicente *et al.*, 2019). Se estima que para el año 2050 la mitad de la extensión mundial presentará sequías, principalmente en las regiones áridas del planeta. De forma similar, Hatfield y Dold (2019) proyectaron que, de mantenerse el incremento en las emisiones de CO₂, la temperatura global incrementará entre 2.6 y 4.8 °C durante el siglo XXI. Como resultado del incremento en la temperatura se espera también un aumento en la tasa de evaporación superficial y una variación significativa en la precipitación.

La sequía tiene implicaciones significativas en la biodiversidad, en los ciclos biogeoquímicos, en el almacenamiento de nutrientes, calidad del aire y agua dulce, así como en los procesos de desertificación y degradación de suelos. De acuerdo con la literatura, una reducción de la humedad del suelo provoca una disminución significativa de la población microbiana encargada de la degradación de materia orgánica, afectando de este modo el intercambio de carbono entre el suelo y la atmósfera. Del mismo modo, se reporta una reducción en la emisión de NO y N₂O y en la mineralización del nitrógeno en suelos afectados por la sequía. La disminución de la humedad en suelo incrementa a su vez la concentración de partículas de polvo y de contaminantes como el ozono troposférico reduciendo la calidad del aire. Además, existe una compleja correlación entre eventos hidrológicos extremos y fenómenos como incendios forestales. De forma similar, la sequía causa una disminución de la proporción y calidad de agua dulce en el mundo debido al incremento en la salinidad, disminución de la proporción de oxígeno disuelto, incremento de la temperatura y concentración de contaminantes en el agua. Del mismo modo, se ha observado un incremento en el tiempo de residencia causado por la disminución del flujo hídrico en los ríos. Esto genera un mayor riesgo de formación de algas. La sequía tiene efectos adversos en la biodiversidad y vida silvestre al ocasionar una reducción en la disponibilidad de alimento y agua para consumo, provocando incrementos en la migración, incidencia de enfermedades, mortalidad e, incluso, extinción de especies. Por fortuna, los efectos provocados por la sequía, incluso por sequía severa son, generalmente, transitorios hasta que se recupera el nivel normal de humedad (Vicente *et al.*, 2019).

De acuerdo con el índice de aridez, propuesto por la FAO, más de la mitad de la superficie nacional se clasifica como regiones áridas y semiáridas, particularmente



en el centro y norte del país (IPCC, 2019). Un estudio realizado por Ortega *et al.* (2018) reportó que el 52.2% del territorio nacional presenta vulnerabilidad al déficit hídrico en categorías alta a muy alta. Los estados más afectados se ubican en el norte y Altiplano Mexicano debido a la geomorfología de la Tierra. Las cordilleras Sierra Madre Oriental y Sierra Madre Occidental actúan como barreras topográficas del vapor de agua. Adicionalmente, el sistema de alta presión subtropical ubicado entre las latitudes 15 a 30 °N y el limitado acercamiento a la zona de convergencia intertropical provocan que las regiones del norte del país presenten climas secos (Escalante y Nuñez, 2017). Los episodios de sequía extrema registradas en el norte de México corresponden a los periodos 1953 a 1957, 1972 a 1979, 1985 a 1988, 1996 a 2003, 2010 a 2012 (Llanes *et al.*, 2018; Escalante y Nuñez, 2017). En los años 2011 y 2012 se presentó el déficit hídrico más severo en los últimos 70 años afectando al 80% del territorio nacional (Ortega *et al.*, 2018). De acuerdo con lo reportado por Escalante y Nuñez (2017), el norte y noroeste de México se enfrenta a una sequía cada 4.0 años, con una permanencia de 2.2 años. Chihuahua es el estado que presenta los mayores efectos adversos a causa de eventos hidrológicos extremos en el país (Ortega *et al.*, 2018). A partir de la segunda mitad del siglo pasado se ha registrado un decremento significativo en la precipitación dentro del territorio estatal, causado por una sequía que se intensificó en la década de 1990, especialmente en el suroeste de Chihuahua (Cerano, 2009). De acuerdo con el Monitor de Sequía en México, hasta julio de 2023, Chihuahua fue uno de los estados más afectados. El 99.2% de la superficie presentó algún grado de sequía, además de registrarse en categorías de moderada y alta intensidad (Figura 2). La cobertura de sequía severa clasificada dentro de la categoría D2 cubrió el 13.4% de la superficie estatal correspondiente a 20 municipios (CONAGUA, 2023).

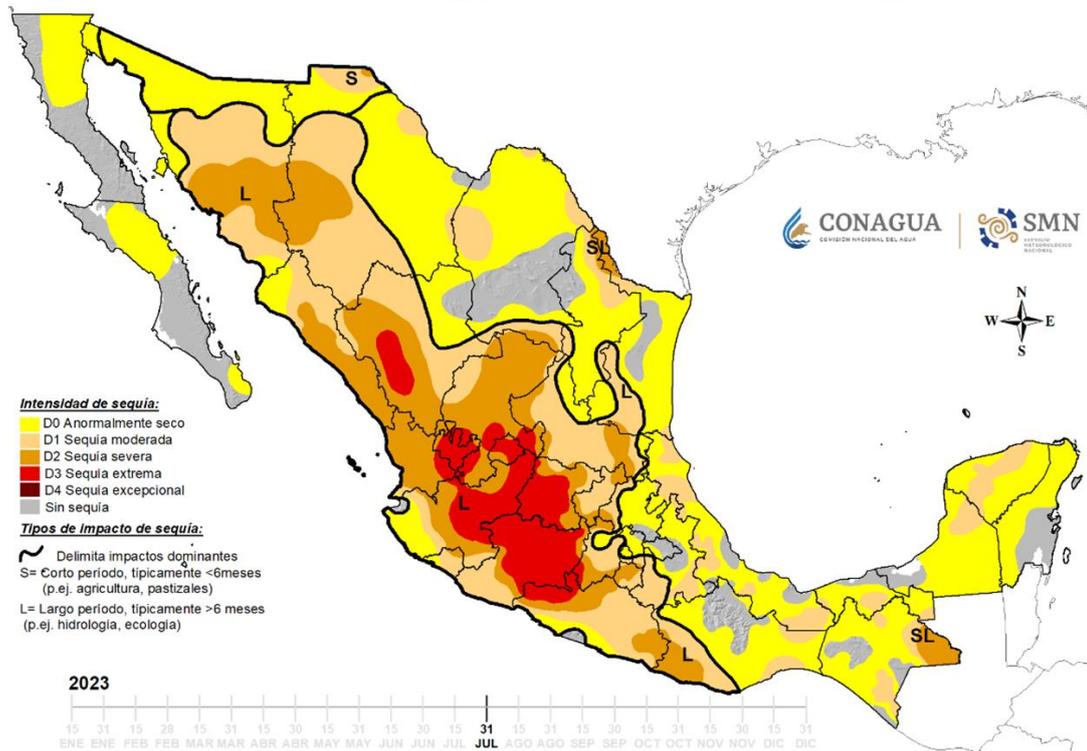


Figura 2. Monitor de Sequía en México al 31 de julio de 2023. Obtenido del Servicio Meteorológico Nacional-CONAGUA, 2023.

En el área agrícola, la sequía se define como la reducción en la disponibilidad del recurso hídrico en la rizósfera de las plantas, convirtiéndose en uno de los principales retos para la agricultura moderna (del Toro y Kretschmar, 2020). Se estima que las pérdidas económicas globales en la producción de cultivos a causa de la sequía en los últimos 10 años rondan los \$30 billones de dólares. Además, se proyecta que para el año 2050 serán necesarias un millón de hectáreas adicionales para garantizar la seguridad alimentaria a causa del acelerado crecimiento demográfico (Gupta *et al.*, 2020). Estas proyecciones exigen eficientizar el uso del agua en la agricultura. Otro aspecto de importancia es que en la actualidad más del 70% del agua dulce disponible se emplea en la agricultura (Martignago *et al.*, 2020). Además, solamente el 31% de la superficie nacional dedicada a la producción corresponde a regadío, mientras que el 69% es agricultura de temporal. Los eventos de sequía afectan principalmente a los cultivos de temporal (Escalante y Nuñez, 2017).

4.3 ESTRÉS HÍDRICO EN EL CHILE CHILTEPÍN

Cuando la tasa de transpiración es mayor que el contenido de agua absorbida se presenta el déficit hídrico en las plantas (Martignago *et al.*, 2020). El estrés afecta inicialmente la función estomática (regulada por factores como la densidad, tamaño y modulación de apertura) y con ello el intercambio de gases, conduciendo a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species) y al desarrollo de estrés oxidativo. A causa del cierre estomático se produce una acumulación de iones de calcio intracelular; comúnmente el inositol trifosfato (IP₃) induce la liberación del Ca²⁺ almacenado en el retículo endoplasmático mientras que iones de potasio son expulsados hacia el medio extracelular (Yang *et al.*, 2021). Esto ocasiona un incremento de la salinidad y de la presión osmótica (Martignago *et al.*, 2020). Los cambios en la presión de turgencia actúan como percepción celular de la condición de estrés, a partir de los cuales, se desencadena el proceso de transducción de señales. Hormonas vegetales, ROS, IP₃, ácido fosfatídico y Ca²⁺ actúan comúnmente como segundos mensajeros.

El principal indicador del déficit hídrico en las plantas es la apariencia de las hojas. Por ejemplo, el deterioro en el proceso de mitosis y la reducción de la expansión celular, provocan una observable disminución en altura y área foliar en plantas sometidas a estrés. De forma similar, se reporta un incremento en el grosor de hojas y una aceleración en el proceso de senescencia foliar, como resultado de los cambios en la presión de turgencia y en el contenido de fotoasimilados. Además, se ha observado una tendencia al enrollamiento de hojas por la pérdida de presión en la epidermis. Estas alteraciones en la morfología foliar afectan la tasa fotosintética neta y el proceso de transpiración (Yang *et al.*, 2021). Deligoz y Gur (2015) reportaron también la inhibición de la división celular y del crecimiento de tallo, mientras que otros autores han observado niveles superiores de lignina en plantas con bajo contenido de agua. Del mismo modo, se han reportado cambios en la arquitectura de la raíz bajo condiciones de déficit hídrico. Generalmente, hay una elongación y ramificación del sistema radicular. Otros cambios morfológicos observados son: engrosamiento de la cutícula, aumento del tejido empalizado del mesófilo y reducción del tejido esponjoso (Yang *et al.*, 2021). Las condiciones de

sequía severa provocan además una disminución en la concentración y en la actividad de enzimas como la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (RuBisCo). Del mismo modo, la fotosíntesis se afecta con la destrucción estructural de las membranas tilacoidales en donde se llevan a cabo procesos como la absorción y transformación de la energía lumínica. También se ha reportado una disminución significativa en el contenido de clorofila, especialmente de clorofila a (Fang y Xiong, 2015). Esta disminución conduce a cambios en la pigmentación de la planta hacia tonalidades marrón-amarillo. Por otra parte, el estrés hídrico aumenta la concentración de hormonas vegetales como el ácido indol-3-acético (AIA), ácido abscísico (ABA) y etileno. Por el contrario, se observa una reducción en el contenido de citocininas. Finalmente, la escasez de agua altera la expresión genética (Yang *et al.*, 2021). Estos efectos limitan el crecimiento y la producción eficiente de biomasa vegetal e incluso pueden conducir a la muerte de las plantas (Osmolovskaya *et al.*, 2018).

El chiltepín se ve afectado en distintas etapas fenológicas por el déficit hídrico. Durante la fase vegetativa se presenta una disminución significativa de biomasa aérea y radicular. Mientras que la concentración de prolina y de azúcares solubles totales aumenta bajo condiciones de estrés, hay una reducción en el contenido de polifenoles. Por otro parte, el déficit hídrico retrasa la floración, la primera bifurcación del tallo principal y la maduración del fruto. Durante la fase reproductiva aumenta la concentración de prolina, mientras se mantiene el contenido relativo de agua (RWC) y disminuye el número y peso de los frutos (Ricardez *et al.*, 2021). Martínez *et al.* (2020) reportaron la susceptibilidad de *C. anuum* var. *glabrisculum* al estrés hídrico, causante de alteraciones en la conductancia estomática y en la tasa fotosintética en plantas sometidas a estrés durante todas las etapas de crecimiento, afectando significativamente la productividad y rendimiento.

4.4 ESTRATEGIAS DE RESISTENCIA VEGETAL A LA SEQUÍA

El estrés hídrico es considerado un evento dinámico e impredecible. No obstante, las plantas son capaces de sobrevivir en condiciones de baja disponibilidad de agua debido a que han desarrollado adaptaciones evolutivas a nivel morfológico,

anatómico y celular. La capacidad de las plantas para detectar señales de escasez de agua y para desarrollar diversas estrategias de afrontamiento en respuesta se define como resistencia a la sequía. La resistencia es considerada una característica sofisticada que involucra procesos altamente complejos y puede presentarse a distintos niveles (Fang y Xiong, 2015). De acuerdo con la literatura, existen cuatro estrategias distintas adaptadas por las plantas para desarrollar resistencia a la sequía (Figura 3). La primera de ellas se conoce como escape e implica la regulación de los ciclos vegetativo y reproductivo en función de la disponibilidad del recurso hídrico (Basu *et al.*, 2016). La finalidad de esta estrategia es evitar que la planta se encuentre en desarrollo al momento de enfrentar un episodio severo de sequía (Fang y Xiong, 2015). Para ello, se acelera el proceso de floración y la reserva de nutrientes que, posteriormente, son usados para mejorar el rendimiento (Zia *et al.*, 2021). El escape a la sequía implica la integración de la señalización de ABA y de la señal del fotoperiodo que permite la activación del locus de floración. Posterior a la percepción foliar, la señal es transmitida al meristemo apical de los brotes para que ocurra la transición floral. Los genes involucrados en esta estrategia de resistencia son GI, gen de fotoperiodo activado por ABA y los factores de unión ABF que actúan sobre el gen floral SOC1. Comúnmente, el escape se presenta en plantas anuales (Martignago *et al.*, 2020). La segunda estrategia de defensa es la evitación, la cual se caracteriza por la capacidad de las plantas para mantener un alto potencial hídrico en condiciones de escasez de agua con la finalidad de prevenir el daño tisular. La evitación permite a la planta desarrollarse y mantener los procesos fisiológicos normales mediante adaptaciones estructurales y metabólicas. Las adaptaciones incluyen la reducción en la transpiración por el cierre estomático, la acumulación de cera en la superficie foliar, el enrollamiento de hojas y ajustes en la tasa de crecimiento en función de la severidad del estrés. Adicionalmente, se puede enriquecer la captura de agua mediante el desarrollo radicular y la acumulación hídrica en órganos de reserva (Fang y Xiong, 2015). La evitación es una respuesta temporal a condiciones de estrés moderadas, ya que evitar la deshidratación puede tener efectos adversos en el crecimiento y rendimiento (Martignago *et al.*, 2020). Otro mecanismo de resistencia a la sequía es la tolerancia. La tolerancia permite mantener las actividades fisiológicas aun cuando los recursos se ven comprometidos, mediante vías genéticas y metabólicas complejas que incluyen la regulación osmótica,

defensa antioxidante, señalización hormonal y regulación de la expresión de genes asociados a la respuesta a estrés. Sin embargo, la tolerancia es un mecanismo de respuesta energéticamente costoso (Zia *et al.*, 2021). Generalmente, la estrategia de tolerancia es activada por el ácido giberélico (AG₃) en respuesta a la señalización modulada por el regulador transcripcional DELLA (Martignago, *et al.*, 2020). El cuarto mecanismo se denomina recuperación de la sequía y se relaciona con la capacidad vegetal para reanudar el crecimiento y las actividades fisiológicas tras la exposición a estrés hídrico severo (Fang y Xiong, 2015). La tolerancia y la recuperación de la sequía, son mecanismos de interés para lograr mantener el crecimiento y la producción en plantas de interés agrícola.

Los indicadores considerados para evaluar el grado de resistencia son las características morfológicas, el potencial hídrico, la naturalización de la presión osmótica y la estabilidad de la membrana celular (Chandra *et al.*, 2021). Otro aspecto significativo de la resistencia a la sequía son las penalizaciones en el crecimiento y rendimiento de los cultivos debido a que la capacidad vegetal de tolerar el estrés hídrico es limitada (Martignago *et al.*, 2020). Por otra parte, la velocidad de respuesta es un factor determinante para la sobrevivencia de los individuos ante condiciones desfavorables como el déficit hídrico (Takahashi *et al.*, 2020).

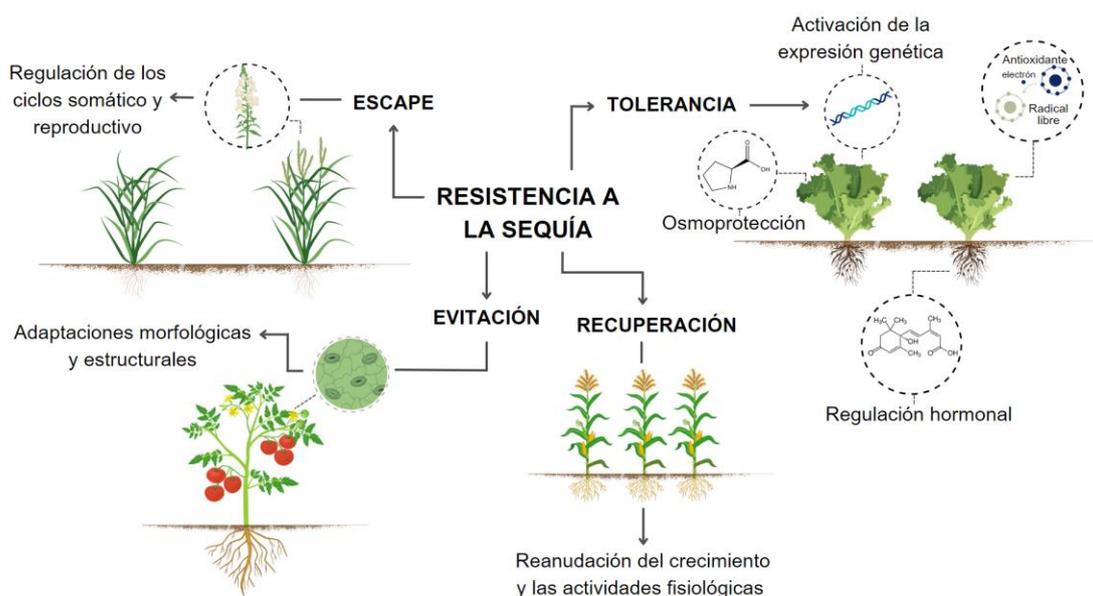


Figura 3. Estrategias de resistencia a la sequía en plantas. Las líneas continuas indican los cuatro tipos de resistencia vegetal al estrés hídrico (Basado en Fang y Xiong, 2015; Martignago *et al.*, 2020).

Las plantas se clasifican en tres categorías en función de su capacidad de respuesta al estrés hídrico: xerófitas (individuos que crecen en regiones áridas), mesófilas (plantas ubicadas en áreas semiáridas a semihúmedas) e hidrófilas (plantas que se desarrollan en climas húmedos). La mayoría de las plantas cultivadas pertenecen al grupo de las mesófilas (Fang y Xiong, 2015).

4.5 MECANISMOS DE RESPUESTA VEGETAL AL ESTRÉS

Las plantas responden al déficit hídrico con un sofisticado sistema regulador que comprende adaptaciones estructurales, fisiológicas y moleculares, a partir de la transducción de señales (Bandurska, 2022). La respuesta incluye la señalización hidráulica, corrientes eléctricas, biosíntesis y transporte de fitohormonas, adaptación del perfil metabólico, péptidos móviles, calcio, ROS y ARNm (Takahashi *et al.*, 2020). La Figura 4 resume la interacción entre los principales mecanismos de respuesta a estrés hídrico.

El primer evento que desencadena el estrés por sequía es la pérdida de agua celular en la planta (Zhao & Dai, 2015). La raíz es el órgano principal de captación de agua, por ello, la señalización comienza con la percepción del estímulo en el sistema radicular y el consecuente aumento en la síntesis de ABA. Posteriormente la señal es transferida a órganos distantes de las plantas a través del xilema a una velocidad de hasta 1m/min (Martignago *et al.*, 2020; Takahashi *et al.*, 2020; Fang y Xiong, 2015). En respuesta, los estomas se cierran parcialmente, alterando así la transpiración y el metabolismo del carbono. Posteriormente, se incrementa la producción de osmolitos con la finalidad de mantener la presión de turgencia en la membrana y se eleva la concentración de enzimas protectoras contra el daño oxidativo. En etapas tardías de exposición al estrés se producen respuestas de señalización específicas para la expresión genética y para la producción de hormonas vegetales que activan el sistema antioxidante, protegen la integridad de la membrana, mantienen la homeostasis y previenen el daño celular (Fang y Xiong, 2015).

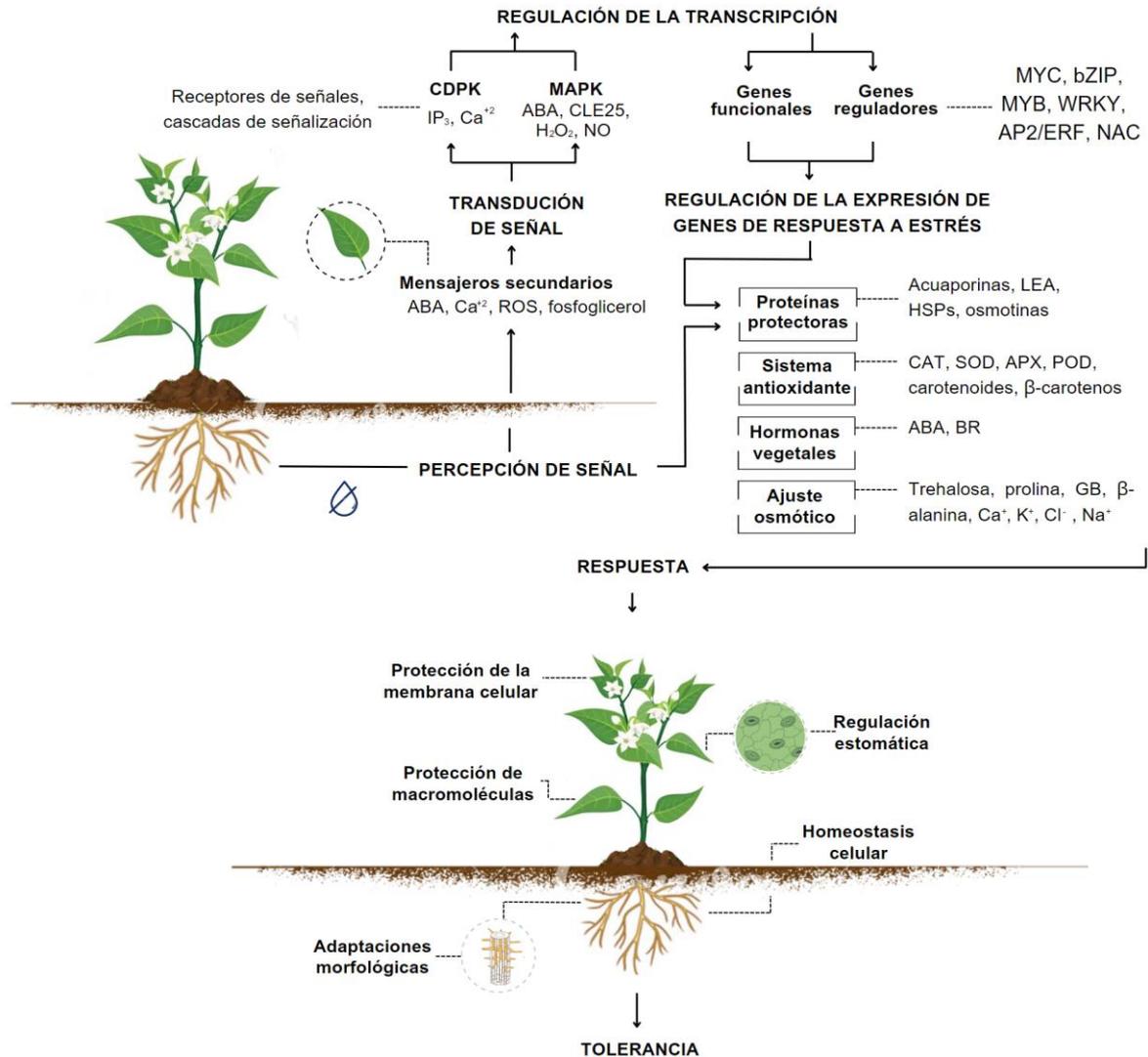


Figura 4. Interacción entre los mecanismos de respuesta a la sequía en plantas. Las líneas continuas indican las rutas desencadenadas tras la percepción del déficit hídrico en la raíz hasta la adaptación al estrés. Líneas punteadas describen las moléculas involucradas en el proceso y los distintos mecanismos de respuesta vegetal.

4.5.1 Adaptabilidad morfológica

Diversos estudios han demostrado que las plantas pueden desarrollarse en condiciones de estrés abiótico a través de adaptaciones morfológicas en órganos como hojas y raíces. La escasez de agua y, por consiguiente, la pérdida de turgencia ocasionan enrollamiento foliar y marchitez, síntomas visibles del estrés hídrico (Zia *et al.*, 2021). La marchitez es un movimiento pasivo que reduce la

pérdida excesiva de agua. Otras plantas presentan fototropismo que les permite disponer la lámina foliar en dirección paralela a la incidencia solar reduciendo la exposición directa a la radiación y, por lo tanto, la tasa de transpiración. El enrollamiento de hojas también mejora la condición hídrica debido a que disminuye la superficie foliar expuesta a la incidencia (Fang y Xiong, 2015). Otro mecanismo de defensa de las plantas es el incremento en la producción de cera. La cera actúa como una barrera hidrofóbica de protección de la epidermis, además regula la pérdida de agua y permeabilidad (Martignago *et al.*, 2020). Las plantas resistentes a la sequía presentan otras modificaciones estructurales xeromórficas como menor tamaño y mayor grosor de hojas, tricomas epidérmicos que reducen la transpiración y reflejan la luz, incremento en el grosor del tejido empalizado, estomas pequeños y densos, haz vascular desarrollado que favorece el transporte y retención de nutrientes y agua y esclerénquima fortificado que actúa como tejido de protección (Fang y Xiong, 2015). Del mismo modo, la modificación de la arquitectura radicular se asocia con la resistencia a la sequía, ya que las plantas presentan la capacidad de adaptar las características de la raíz como longitud, grosor, densidad y distribución, en función de la humedad del suelo, proceso conocido como hidrotropismo (Zia *et al.*, 2021).

4.5.2 Regulación estomática

Los estomas son aperturas naturales ubicadas en la parte aérea de las plantas, se encuentran rodeados de dos células protectoras especializadas que regulan el flujo entre el medio intra y extracelular a través de cambios en la presión de turgencia (Martignago *et al.*, 2020). Estas estructuras tienen un papel esencial en el intercambio de gases, garantizando la absorción de CO₂ necesaria para la fotosíntesis y el proceso de transpiración (Fang y Xiong, 2015). El cierre de estomas es una respuesta primaria ante el estrés hídrico que disminuye la pérdida de agua durante la transpiración (Gupta *et al.*, 2020). Sin embargo, también ocasiona una disminución en la asimilación de carbono y puede conducir al sobrecalentamiento de la planta (Martignago *et al.*, 2020). Además, otros procesos fisiológicos como la fotosíntesis, el crecimiento y la productividad se ven comprometidos (Gupta *et al.*, 2020). La regulación estomática depende del potencial hídrico y de la presión

osmótica, particularmente del movimiento de iones de K^+ a través de los canales y bombas transmembrana. La actividad de las proteínas de unión a GTP, proteínas de unión al ABA, receptores de luz y receptores de acetilcolina también participan en el cierre y apertura de estomas (Fang y Xiong, 2015). Durante el estrés hídrico el movimiento es mediado en gran medida por la concentración de ABA (Gupta *et al.*, 2020). Para ello, el péptido CLE25 se une a receptores BAM, causando un incremento de la concentración de ABA (Martignago *et al.*, 2020).

4.5.3 Ajuste osmótico

Uno de los principales mecanismos de tolerancia a la sequía es la osmorregulación (Zia *et al.*, 2021). Se denomina ajuste osmótico a la capacidad vegetal para reducir el potencial osmótico mediante la disminución del contenido de agua en el interior de la célula, el aumento de solutos y la reducción del volumen. Los objetivos de la osmorregulación son disminuir la energía libre de agua intracelular, mantener un equilibrio entre el potencial hídrico en el interior y exterior de la célula y posibilitar la absorción de agua incluso con menor potencial hídrico extracelular (Yang *et al.*, 2021). La disminución del potencial hídrico permite mantener la turgencia aún bajo condiciones de estrés (Takahashi *et al.*, 2020). Además, la osmorregulación mantiene la estructura y tasa fotosintética, participa en la captación de radicales libres, actúa como amortiguador de pH, contribuye a la reducción del estrés oxidativo y a la estabilización de membranas, proteínas y enzimas (Fang y Xiong, 2015; Zia *et al.*, 2021).

Los osmoprotectantes u osmolitos son pequeñas moléculas de carga neutra, baja toxicidad y alta capacidad de retención hídrica que se acumulan en el citoplasma (Ozturk *et al.*, 2021). Estas moléculas son capaces de estabilizar la membrana a través de interacciones hidrofílicas entre las proteínas y los lípidos que la constituyen (Zia *et al.*, 2021). Adicionalmente, los osmoprotectantes mantienen la hidratación de la capa superficial proteica y la distribución espacial de macromoléculas (Fang y Xiong, 2015). Los osmolitos pueden clasificarse en iones inorgánicos y solutos orgánicos (Ozturk *et al.*, 2021). Los carbohidratos solubles, aminoácidos y compuestos de amonio cuaternario pertenecen al grupo de los



solutos orgánicos y se caracterizan por su bajo peso molecular y alta solubilidad (Yang *et al.*, 2021). Algunos de los azúcares solubles que actúan como osmoprotectores son la glucosa, sacarosa, galactinol, rafinosa y trehalosa (Ozturk *et al.*, 2021). La importancia del metabolismo de los azúcares para promover la tolerancia a la sequía en plantas está bien documentada; las rutas de los carbohidratos incrementan la reserva energética y estabilizan el metabolismo (Ozturk *et al.*, 2021). En sustitución de las moléculas de agua, escasas por sequía severa, los azúcares solubles forman puentes de hidrógeno con las proteínas para mantener su conformación y funcionalidad (Yang *et al.*, 2021). Por otro lado, destacan los compuestos de amonio cuaternario como la betaína, prolina, glicina betaína (GB) y poliaminas. La prolina tiene múltiples efectos en la mitigación del estrés abiótico en las plantas; primeramente, forma un esqueleto hidrofóbico que protege de la deshidratación y estabiliza las estructuras celulares y macromoléculas, reduce el daño en las membranas tilacoidales y regula las funciones mitocondriales (Ozturk *et al.*, 2021). Actúa, además, como quelante de oxígeno singlete o del radical hidroxilo disminuyendo el efecto adverso provocado por los radicales libres e induciendo la actividad enzimática antioxidante. También tiene la propiedad de evitar la aglutinación de proteínas desnaturalizadas y con ello reduce la interferencia con las actividades fisiológicas normales (Yang *et al.*, 2021). Finalmente, ajusta el potencial redox y disminuye la acidez celular (Fang y Xiong, 2015). La biosíntesis de prolina se lleva a cabo en las mitocondrias, posteriormente es almacenada en las vacuolas y cuando se presenta un episodio de sequía es transportada al citoplasma para aumentar la concentración de solutos y hacer posible la absorción de agua (Takahashi *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2021). Bajo condiciones de estrés, la concentración de prolina se eleva sustancialmente (100 veces por encima de la concentración normal) y llega a representar el 80% de la totalidad de aminoácidos libres. No obstante, se reporta que la acumulación de prolina es dependiente de la etapa fenológica y del comportamiento celular. De forma similar, la GB es una sustancia anfótera e hidrosoluble valiosa en la respuesta de defensa vegetal (Ozturk *et al.*, 2021). La importancia de la GB durante el estrés se debe a su actividad en la protección de la membrana tilacoidal, en la estabilización del fotosistema II (PSII), de las oxidasas terminales y de las enzimas que interfieren en el ciclo dicarboxílico, contribuyendo a mantener la tasa de

respiración y fotosíntesis (Yang *et al.*, 2021). Otros osmoprotectantes solubles reportados son el manitol, D inositol, sorbitol y β -alanina (Ozturk *et al.*, 2021).

Por otra parte, los iones inorgánicos como el Ca^+ , K^+ , Cl^- y Na^+ se acumulan en la vacuola y citosol vegetal y actúan como osmolitos (Zia *et al.*, 2021). Generalmente, los iones inorgánicos controlan el potencial osmótico en las vacuolas contribuyendo al sostenimiento de la presión de turgencia (Fang y Xiong, 2015). Los iones que participan en la regulación osmótica provienen del medio extracelular y se asocian con las bombas de iones, tal es el caso de la bomba $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{H}^+$. Al regular la concentración de iones inorgánicos se presentan cambios en la estructura y funcionalidad celular. Por ejemplo, la acumulación de iones de Na^+ está documentada en plantas xerófitas adaptadas a estrés por sequía (Yang *et al.*, 2021). Un aspecto importante que contribuye a la osmorregulación son las adaptaciones en los canales de iones y agua que controlan el movimiento de nutrientes y humedad (Fang y Xiong, 2015).

La osmorregulación es una respuesta temporal, ya que la presión de turgencia no se puede mantener bajo condiciones prolongadas de estrés hídrico (Yang *et al.*, 2021).

4.5.4 Sistema antioxidante

Los radicales libres son especies químicas activas que ejercen efectos celulares dañinos debido a la alta capacidad de oxidación de moléculas (Yang *et al.*, 2021). Entre las ROS se encuentra el radical superóxido O_2^- , el radical hidroxilo OH^- , el peróxido de hidrógeno H_2O_2 , el radical hidroxilo OH^- y el radical peróxido orgánico ROO^- . Los radicales libres ejercen diversos efectos citotóxicos como la degradación de la membrana celular debido a la peroxidación de los ácidos grasos insaturados que constituyen los fosfolípidos de la bicapa, alteración de macromoléculas como proteínas (mediante la fragmentación de la cadena peptídica, oxidación del centro activo, alteraciones en los residuos de aminoácidos y pérdida parcial o total de función), degradación y cambios en el material genético al interactuar con las bases nitrogenadas y con las moléculas de desoxirribosa y daños en los canales y proteínas de membrana que provocan incrementos en la permeabilidad de la

membrana, fuga de iones, alteraciones en el metabolismo y muerte celular (Fang y Xiong, 2015).

La formación de especies reactivas de oxígeno ocurre principalmente en el cloroplasto debido al bajo suministro de moléculas de NADP^+ provocado por el bloqueo en la fijación de CO_2 . Como resultado se incrementa la transferencia de electrones a O_2 (Yang *et al.*, 2021). Además, se producen en otros compartimentos celulares, en el apoplasto se forman por la acción de la NADPH oxidasa asociada a la membrana celular. Los radicales O_2^- y H_2O_2 se producen en la cadena respiratoria de electrones en mitocondrias, mientras que en los peroxisomas se sintetiza H_2O_2 por acción de la enzima glicolato oxidasa durante la conversión de glicolato a glioxalato (Zia *et al.*, 2021).

Bajo condiciones normales la generación y eliminación dinámica de las ROS se encuentra en equilibrio. Sin embargo, el estrés hídrico conduce a la acumulación de estos productos (Fang y Xiong, 2015). La respuesta antioxidante puede darse mediante dos tipos de moléculas: antioxidantes de naturaleza enzimática o no enzimática. Al primer grupo pertenecen enzimas como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y peroxidasa (POD) (Zia *et al.*, 2021). La enzima metálica SOD es la primera línea de defensa del sistema antioxidante, principalmente funciona eliminando el radical O_2^- mientras produce O_2 y H_2O_2 . Por su parte, la APX participa en la vía: ácido ascórbico-glutación, en la cual el ácido ascórbico actúa como donante de electrones para producir ácido monodehidroascorbato. Otro ejemplo, son las enzimas CAT y POD, principal vía de eliminación de H_2O_2 . La CAT es un tetrámero presente en los peroxisomas que se caracteriza por presentar un grupo hemo y actuar convirtiendo H_2O_2 en O_2 y H_2O (Yang *et al.*, 2021). Otras enzimas antioxidantes importantes son la glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasa, deshidroascorbato reductasa, monodehidroascorbato reductasa, tiorredoxina peroxidasa, peroxirredoxina, polifenol oxidasa y oxidasa alternativa (Fang y Xiong, 2015). Algunas de estas enzimas participan en la detoxificación de ROS mediante el ciclo del glutatión en el estroma de algunos organelos o en el citosol (Zia *et al.*, 2021). Por otra parte, la vía antioxidante no enzimática se compone de sustancias reductoras como el α -tocoferol (Fang y Xiong, 2015; Takahashi *et al.*, 2020).

Además, se ha reportado el potencial antioxidante del glutatión, carotenoides, β -carotenos, flavonoides, prolina y ascorbato (Zia *et al.*, 2021; Branduska, 2022).

4.5.5 Síntesis de proteínas

Diversos autores han reportado cambios en el proteoma de las plantas sometidas a estrés. En general, el estrés osmótico y los desbalances en la temperatura causan una disminución en el contenido total de proteínas atribuido a la hidrólisis proteica, oxidación en los procesos de síntesis y desnaturalización. Sin embargo, otro grupo de proteínas se acumula en el medio intracelular como parte de los mecanismos de resistencia. A este grupo pertenecen las proteínas abundantes de embriogénesis tardía (LEA), proteínas de choque térmico (HSPs), acuaporinas y osmotinas (Ozturk *et al.*, 2021). La sobreexpresión de proteínas como LEA y HSP incrementan la capacidad de adhesión a moléculas de agua, participan en el secuestro de iones durante los procesos de deshidratación celular y mantienen la integridad y funcionalidad de otras proteínas (Zia *et al.*, 2021). La protección y estabilización proteica reduce el efecto ambiental en el metabolismo intracelular (Yang *et al.*, 2021).

La síntesis de HSP ocurre cuando la temperatura aumenta entre 5-10°C. Estas actúan como chaperonas moleculares, promoviendo el plegamiento, unión y degradación de otras proteínas (Fang y Xiong, 2015). Por otro parte, LEA es una familia proteica constituida en una alta proporción de aminoácidos polares, cualidad que le confiere hiperhidrofilicidad. Generalmente, son proteínas de entre 10-30 KDa con alta estabilidad térmica, ricas en lisina, serina y glicina. La proteína LEA no tiene una estructura secundaria estable, en cambio presentan una α -hélice facultativa. Son sintetizadas durante la formación de la semilla, no obstante, la región promotora de muchos de los genes LEA responde al incremento en la concentración de ABA, esto favorece la sobreexpresión bajo condiciones de estrés (Yang *et al.*, 2021). Las proteínas LEA mantienen la funcionalidad celular al participar en la distribución y retención de agua intracelular, actuar como acompañantes moleculares, unirse a iones inorgánicos para evitar intoxicación celular por acumulación, controlar la expresión genética y reducir la deshidratación

tisular (Fang y Xiong, 2015). Las deshidrinas son proteínas miembros de la familia LEA-II, son moléculas de respuesta a estrés hídrico que participan en la regulación osmótica y en el mantenimiento de la estabilidad proteica mediante interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas (Ozturk *et al.*, 2021). Otro grupo de proteínas sobreexpresadas durante el estrés hídrico son las acuaporinas, proteínas intrínsecas en la membrana plasmática y vacuola, presentes en tejidos con alto flujo de agua, que forman canales selectivos de humedad y actúan como transportadores de agua regulando el transporte pasivo en función del gradiente de presión osmótica (Fang y Xiong, 2015). Las acuaporinas en la vacuola participan en la regulación de la turgencia, mientras que en la membrana facilitan el transporte de agua transmembrana en favor del gradiente de potencial hídrico (Yang *et al.*, 2021). Además, se expresan en el tejido vascular favoreciendo el transporte a través de tejidos (Fang y Xiong, 2015). De forma similar, las osmotinas, proteínas de 24 KDa ricas en cisteína, protegen la integridad celular al evitar disrupciones estructurales y metabólicas (Ozturk *et al.*, 2021).

4.5.6 Regulación hormonal

El ABA es una hormona vegetal que participa en la respuesta a múltiples factores ambientales causantes de estrés abiótico (Zia *et al.*, 2021). Su biosíntesis inicia en la raíz, posteriormente, la señal es transmitida a la parte aérea a través de los haces vasculares (Yang *et al.*, 2021). La biosíntesis de ABA se reproduce principalmente en el tejido aéreo, debido a que la pérdida de turgencia activa la biosíntesis y acumulación en hojas para la regulación estomática (Takahashi *et al.*, 2020). La señal es detectada por las células protectoras induciendo el cierre estomático (Yang *et al.*, 2021). Otra función del ABA es la inducción de la expresión de genes biosintéticos para la acumulación de aminoácidos de cadena ramificada como la isoleucina, leucina y valina, y de azúcares como la glucosa y fructosa (Takahashi *et al.*, 2020). Existe una amplia diversidad de moléculas receptoras del ABA incluyendo quinasas, fosfatasa y proteínas con actividad ubiquitina, que generalmente, funcionan modulando la actividad de proteínas de señalización (Yang *et al.*, 2021). El ABA actúa en condiciones de estrés bajo diafonía sinérgica o antagónica con otras fitohormonas. La modulación en la arquitectura de las raíces

esta mediada por la acción del ABA, el etileno (ET) y auxinas. Además, el déficit hídrico disminuye la concentración de giberelinas (GAS) y citocininas mientras aumenta la concentración del ácido jasmónico (JA), ET y ácido salicílico (SA). La ausencia de citocininas también afecta la dominancia apical radicular, mientras que el ácido indol-3-acético (AIA) y el ácido giberélico (AG₃) inducen la síntesis de raíces verticales y profundas (Branduska, 2022; Zia *et al.*, 2021). Por otro lado, un estudio realizado por Martignago *et al.* (2020) mostró la capacidad de los receptores de brasinoesteroides (BR) para desencadenar vías específicas de hidrotropismo en la raíz como mecanismo de resistencia en *Arabidopsis thaliana*.

4.5.7 Transducción de señales

La transducción de ABA tiene múltiples efectos en la planta además del cierre estomático y la regulación de la expresión genética. Un ejemplo es la producción de la enzima prolina-5-carboxilato reductasa (P5CR) que participa en la producción y acumulación de prolina (Fang y Xiong, 2015).

Generalmente, la señalización consiste en la fosforilación y desfosforilación de residuos de serina y treonina, activando de esta forma factores de transcripción. Se han descrito diversas familias de factores de transcripción como parte de la respuesta vegetal a estrés, entre ellas APETALA2/los factores de unión al elemento sensible al etileno, cremallera de leucina (bZIP), dedos de zinc, NAM-ATAF_{1/2}-CUC₂ MYB, factores de unión a elementos sensibles a deshidratación, NAC, entre otras (Fang y Xiong, 2015).

Los productos de la expresión genética son factores de transcripción, proteínas transmembrana y metabolitos enzimáticos. Distintas quinasas han sido estudiadas por su potencial en la regulación de la respuesta a sequía. Los principales mensajeros secundarios son el fosfoglicerol, diacilglicerol, además de ABA, Ca⁺² y ROS (Fang y Xiong, 2015).

Existen dos vías para la transducción de señales inducida por sequía. La primera vía es la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Yang *et al.*, 2021). El ABA, CLE25, H₂O₂, y NO actúan en la vía de señalización MAPK

(Takahashi *et al.*, 2020). En particular, la transducción de señales regulada por ROS constituye una vía de resistencia a estrés hídrico mediante la síntesis de proteínas que regulan el ajuste osmótico y la defensa antioxidante (Fang y Xiong, 2015). La segunda vía es la cascada de la proteína quinasa dependiente de calmodulina (CDPK) regulada por Ca^{2+} . Una fase importante en la señalización es el aumento en el flujo de Ca^{2+} (Takahashi *et al.*, 2020). La enzima fosfolipasa C cataliza la reacción de hidrólisis de la proteína intrínseca de la membrana plasmática en IP3 y diesterftaleína glicerol. El IP3 permite el inicio de la cascada de señalización al inducir la liberación del Ca^{2+} del retículo endoplasmático (Yang *et al.*, 2021). Además, el movimiento de iones de Ca^{2+} es activado por H_2O_2 (Takahashi *et al.*, 2020). También la expresión de proteína LEA está asociada a la señalización por CDPK (Yang *et al.*, 2021).

4.5.8 Regulación genética

Los patrones de expresión genética se ven altamente modificados en condiciones de estrés (Zia *et al.*, 2021). Los genes expresados por sensibilidad a la sequía se clasifican en dos grupos: genes funcionales y genes reguladores (Fang y Xiong, 2015). Los genes funcionales codifican para acuaporinas, deshidrinas, proteínas de choque térmico, proteínas estabilizadoras, proteínas abundantes de embriogénesis tardía, entre otras (Zia *et al.*, 2021). Mientras que los genes reguladores pueden codificar para factores de transcripción como bZIP, MYB, NAC, WRKY, MYC y AP2/ERF. Un ejemplo es la expresión de NCED3, gen importante en la biosíntesis de ABA. El péptido CLE25 y el factor de transcripción NGA1 regulan la expresión de NCED3 (Takahashi *et al.*, 2020). Además, los genes reguladores codifican proteínas que intervienen en la percepción y amplificación en la cascada de señalización incluyendo quinasas ribosómicas, receptoras, reguladoras de la expresión, entre otras; o bien, genes que regulan la expresión de segundos mensajeros y la transducción enzimática. Entre ellos enzimas como la fosfolipasa C y la fosfolipasa D (Yang *et al.*, 2021).

La sobreexpresión inducida por estrés de los compuestos involucrados en la respuesta vegetal ha mejorado la resistencia a sequía. Por mencionar algunos

ejemplos la expresión del gen ZEP que codifica para la zeaxantina epoxidasa implicada en la biosíntesis de ABA por la vía de los carotenoides, el gen ATGPX3, que produce la enzima glutatión peroxidasa de particular importancia en la homeostasis de H₂O₂ en plantas de *Arabidopsis thaliana*, el gen TPS1 que codifica para la trehalosa y el gen AQP RWC3 que codifica para acuaporinas y mejora la conductividad hidráulica de la raíz. Este último es regulado por el promotor inducible SWPA2 (Fang y Xiong, 2015).

En investigaciones recientes se han reportado también modificaciones epigenéticas en condiciones de déficit hídrico, incluyendo la acetilación de histonas, metilación del ADN y remodelación de la cromatina. Estas modificaciones conducen a alteraciones en la expresión genética a nivel transcripcional y postranscripcional, comúnmente transitorias, sin embargo, algunas modificaciones persisten para enfrentar posteriores estreses, fenómeno conocido como “memoria de estrés de la planta” (Bandurska, 2022).

4.6 PGPR COMO INDUCTORES DE TOLERANCIA A LA SEQUÍA

Se han propuesto distintas estrategias para mejorar la tolerancia a estrés hídrico en plantas. Estas incluyen el enriquecimiento de la rizósfera con materia orgánica, aplicación exógena de fitohormonas, osmoprotectantes, antioxidantes, nutrición equilibrada, captación de agua de lluvia, uso de aguas residuales, acolchado, “seed priming”, aplicación de nanopartículas (NPs), uso de hidrogeles, edición del genoma, entre otras (Zia *et al.*, 2021). Un ejemplo de los reguladores de crecimiento empleados son el AG₃, JA y ABA. De forma similar, se reporta la aplicación exógena de osmoprotectantes como la prolina, GB, poliaminas, trehalosa y manitol, así como la aplicación de metaloides y minerales como el silicio, selenio y potasio (Seleiman *et al.*, 2021). Otra estrategia es el uso de acolchado, el cual permite reducir la pérdida de agua por evaporación y retiene la humedad en el suelo. Por otra parte, el cebado de las semillas o seed priming es una técnica que consiste en hidratar parcialmente las semillas para inducir el metabolismo de germinación sin alcanzar la emergencia de la radícula, mejorando la tasa y uniformidad de germinación e incrementando la tolerancia a estrés fisiológico (Hussain *et al.*, 2019). Con respecto a las NPs, estas presentan una alta especificidad e importantes propiedades

fisicoquímicas como su elevada área superficial, reactividad y diversidad en la morfología de la partícula. Para mitigar el estrés hídrico se han empleado nanopartículas de silicio, óxido de zinc, hierro, dióxido de titanio, plata y cobre (Seleiman *et al.*, 2021). Las NPs modulan la actividad de las acuaporinas, mejoran la fotosíntesis y aumentan la concentración de antioxidantes. No obstante, presentan ciertos inconvenientes; producen efectos citotóxicos, desbalances hidráulicos, nutrimentales e incrementan la producción de ROS (Ahluwalia *et al.*, 2021). Por otra parte, los hidrogeles son polímeros tridimensionales que permiten la absorción y retención de una elevada cantidad de agua en sus espacios intermoleculares, con la ventaja de que reducen la necesidad del riego frecuente (Seleiman *et al.*, 2021). Están constituidos de materiales biodegradables, biocompatibles y económicos (Ahluwalia *et al.*, 2021). Se ha reportado que la aplicación de hidrogeles mejora las características del suelo, reduce la conductividad hidráulica y la pérdida de agua por evaporación (Seleiman *et al.*, 2021). Sin embargo, esta técnica requiere instalaciones y equipo especializado (Hussain *et al.*, 2019). Además, los polímeros se desgastan perdiendo efectividad por el uso. En el mismo orden, otras adecuaciones son necesarias para su uso comercial; debido a su alta capacidad de retención de agua en ocasiones limitan la posibilidad de absorción por las plantas (Ahluwalia *et al.*, 2021). Otra estrategia para reducir los efectos del déficit hídrico es la ingeniería genética a través de herramientas como mejoramiento tradicional, molecular y la selección de marcadores, sin embargo, la sobreexpresión de genes de respuesta a estrés generalmente afecta la tasa de crecimiento vegetal (Seleiman *et al.*, 2021). Además, la edición del genoma requiere tiempo, personal y equipo especializado. Otro inconveniente es que la sequía es un problema multigenético con múltiples vías de respuesta implicadas (Ahluwalia *et al.*, 2021).

Una alternativa sostenible para resolver los efectos del estrés hídrico en la agricultura es el tratamiento con PGPR (Chandra *et al.*, 2021). Las plantas y los microorganismos interactúan en la rizósfera a través de distintos mecanismos que incluyen el comensalismo, mutualismo, neutralidad, competitividad y exploración (Ullah *et al.*, 2019). El término PGPR fue propuesto por Kloepper & Schroth en 1978, para referirse a un grupo heterogéneo de bacterias presentes en la rizósfera, las cuales tienen la capacidad de secretar distintas moléculas químicas que participan



en la regulación de procesos fisiológicos y mejoran la absorción de nutrientes en las plantas, conduciendo a la promoción de crecimiento vegetal, a la protección contra fitopatógenos y a la inducción de resistencia contra estresores abióticos (Basu *et al.*, 2021). En este contexto se ha empleado el término tolerancia sistémica inducida (IST), refiriéndose a los cambios físicos y químicos producidos en las plantas por acción de los microorganismos, los cuales resultan en un incremento de la tolerancia a estrés abiótico (Etesami y Maheshwari, 2018). Las bacterias y hongos del suelo incluso proporcionan efectos benéficos a las plantas bajo condiciones de estrés simultáneas (Bruno *et al.*, 2020). Recientemente, se han reportado estudios que muestran el potencial de rizobacterias para mitigar los efectos del déficit hídrico en distintos cultivos de interés mediante un proceso denominado resiliencia y resistencia a la sequía inducida por rizobacterias (RIDER) (Kaushal y Wani, 2016). De acuerdo con Ullah *et al.* (2019) la interacción con las PGPR tiene efectos benéficos significativos frente a condiciones de escasez de agua en plantas cultivadas como maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), vid (*Vitis vinífera*), soya (*Glycine max*), *Arabidopsis thaliana*, *C. annuum*, entre otras. Especies de los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Myroides*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Providencia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* se han reportado como promotores de crecimiento e inductores en el alivio del estrés por sequía (Chandra *et al.*, 2021). De Vries *et al.* (2020) indicaron que los microorganismos del suelo pueden soportar estrés ambiental debido a la capacidad de respuesta desencadenada ante condiciones adversas. Los mecanismos microbianos de resistencia incluyen adaptaciones morfológicas y alteraciones en la pared celular, esporulación, formación de biopelículas y estrategias de osmoprotección. La aplicación de PGPR en especies del género *Capsicum* ha sido reportada por varios autores. Yasin *et al.* (2018) utilizaron rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal para evaluar la tolerancia a estrés salino en plantas de *C. annuum* L. y demostraron la regulación de procesos fisiológicos y bioquímicos, así como una mayor producción de biomasa vegetal. En un trabajo similar se demostró el potencial de *B. amyloliquefaciens* para mantener el crecimiento y robustecer las respuestas a estrés hídrico, salino y por alta concentración de metales pesados en plantas de *C. annuum* cv. Geumsugangsan (Kazerooni *et al.*, 2021). Huerta *et al.*, 2010 y García *et al.*, 2018 reportaron el uso

de *A. brasiliensis*, *B. amyloliquefaciens* y *A. halopraeferens* para promover el crecimiento en plantas de chiltepín. Sin embargo, no existe otro estudio donde se evalué el efecto de *Bacillus* spp. como mitigadores de estrés hídrico.

4.7 *Bacillus* spp. COMO PGPR E INDUCTOR DE TOLERANCIA A LA SEQUÍA

El género *Bacillus* comprende un grupo de bacterias Gram positivas, descrito por primera vez por Ferdinand Julius Cohn en 1872. Actualmente, abarca más de 300 especies caracterizadas por la formación de endosporas, estructuras de resistencia que permiten sobrevivir en condiciones ambientales adversas. Las especies de *Bacillus* pertenecen al Reino Bacteria; Filo Firmicutes, Clase Bacilli; Orden Bacillales y Familia Bacillaceae (Kovács, 2019). Son organismos aerobios o anaerobios facultativos, quimioheterótrofos y de distribución ubicua (Miljaković *et al.*, 2020). Presentan morfología bacilar y tamaño variable (0.3 a 2.2 μm de ancho por 1.2 a 7 10 μm de largo). Además, la mayoría de las especies son móviles (Oana *et al.*, 2015). Generalmente, las colonias de *Bacillus* spp. presentan una textura granulada, sin embargo, en función de la especie pueden desarrollarse colonias suaves y húmedas. Presentan elevación aplanada, elevada o convexa. Usualmente la consistencia es cremosa pero también es común encontrar consistencias mucoides y secas. En particular, las colonias de *B. subtilis* presentan una consistencia mucosa envuelta en una matriz membranosa que produce una costra al desecarse (Garrity *et al.*, 2009). Dentro del género se distinguen dos subgrupos en función de la similitud genética y bioquímica. El grupo *subtilis* constituido de especies como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. sonorensis*, *B. tequilensis* y *B. velezensis* (Oana *et al.*, 2015). Por otra parte, el grupo *cereus* comprende especies como *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. wiedmannii*, *B. mycoides* y *B. pseudomycoides*. Los subgrupos se caracterizan por poseer un genoma altamente conservado (Ehling *et al.*, 2019).

El género corresponde a especies endémicas del suelo (Ehling *et al.*, 2019). No obstante, se encuentra ampliamente distribuido por el mundo debido a su capacidad para producir endosporas resistentes a fluctuaciones de pH, temperatura y condiciones osmóticas (Bardin *et al.*, 2015). Las endosporas de *Bacillus* spp. son estructuras de latencia (Oana *et al.*, 2015), que contienen en el compartimento más

interno un núcleo deshidratado constituido de ADN, ribosomas, proteínas, iones metálicos divalentes, ácido dipicolínico (DPA) y receptores para la germinación. El DPA forma complejos con cationes (DPA-CA^{2+}) que representan hasta el 15% del peso fresco total de la espora. Estos complejos reducen el contenido de agua en el interior, aumentando la resistencia a la desecación por calor. A su vez, los iones de calcio participan en el mantenimiento de la latencia. El compartimiento interno es rodeado por una capa de peptidoglicano, que mantiene la espora comprimida, y por la cubierta de esporas, constituida de aproximadamente 70 proteínas reticuladas. La cubierta brinda protección contra enzimas hidrolíticas y proporciona flexibilidad a la estructura. En algunas especies como *B. anthracis*, *B. thuringiensis* y *B. cereus* se forma otra capa externa: el exosporio, capa proteica que, a diferencia del resto, se encuentra adherida débilmente (Checinska *et al.*, 2015; Ehling *et al.*, 2019).

La formación de endosporas permite a *Bacillus* spp. diseminarse y desarrollarse en ecosistemas acuáticos y terrestres (Tejera *et al.*, 2011). En las plantas, la producción de exudados de la raíz permite reclutar a los microorganismos benéficos contribuyendo a la formación del rizomicrobioma. Posteriormente, la colonización de la rizósfera favorece el establecimiento de la interacción planta-microorganismo (Tian *et al.*, 2021). La expresión de múltiples genes microbianos asociados a la quimiotaxis, motilidad celular y producción de metabolitos secundarios son necesarios para el éxito de la colonización de la raíz. Generalmente, las especies de *Bacillus* requieren 24 h para desarrollar una biopelícula y comenzar el proceso de colonización (Miljaković *et al.*, 2020).

En condiciones favorables *Bacillus* spp. crece de forma exponencial, mediante bipartición, presentándose así la fase de crecimiento vegetativo (Figura 5). La fase de esporulación dura aproximadamente 8 h e inicia cuando se presenta algún tipo de estrés, como alta densidad de población, escasez de nutrientes, salinidad, baja disponibilidad de agua, temperatura, pH, etc. La señal desencadena la síntesis de diversos factores transcripcionales (Checinska *et al.*, 2015). En respuesta, la célula vegetativa es dividida de forma asimétrica, de la división resultan una célula madre y la inmersión de una preespora. Posteriormente, la preespora es embebida por la célula madre y recubierta de capas protectoras constituidas por componentes proteicos, peptidoglicano y células germinales. Enseguida ocurre la deshidratación y maduración de la preespora. Finalmente, se presenta la lisis de la célula madre

mediante muerte celular programada y la endospora es liberada. La endospora permanece viable en el ambiente hasta que las condiciones del medio son favorables para iniciar los procesos metabólicos y generar una célula vegetativa (Tejera *et al.*, 2011). Para ello, se libera el DPA e inicia la germinación tras la hidratación de la espora. Las endosporas de *Bacillus* spp. pueden llegar a permanecer viables por extensos periodos, incluso en un estudio se reportó la germinación de esporas conservadas de *B. sphaericus* después de 25 a 40 millones de años de latencia (Checinska *et al.*, 2015).

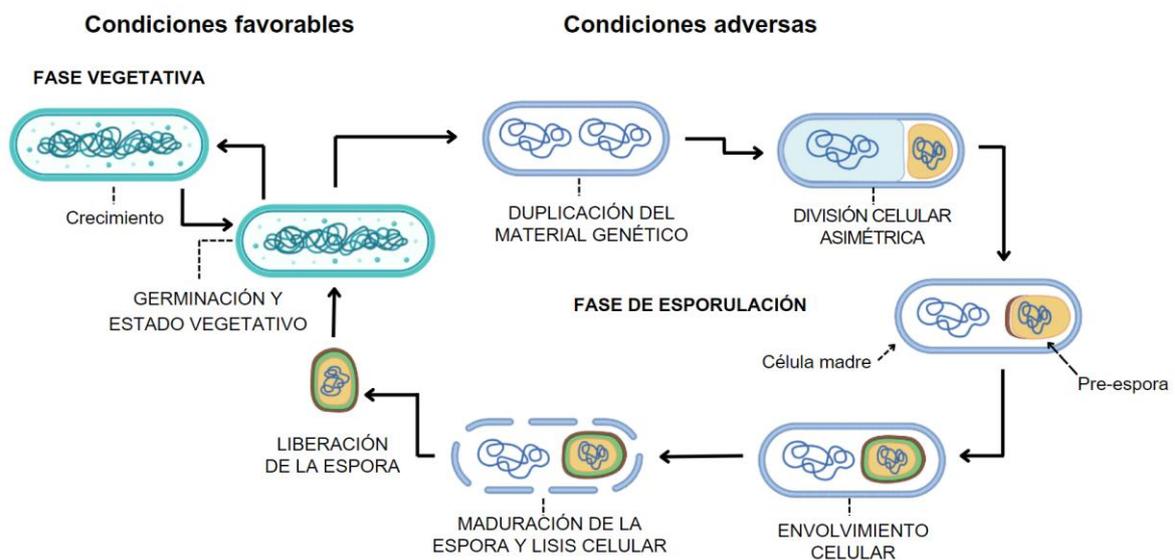


Figura 5. Ciclo de vida de *B. subtilis*. Las líneas continuas representan la transición entre las etapas que constituyen la fase vegetativa y fase de esporulación, las líneas punteadas describen las distintas etapas del ciclo (Basado en Tejera *et al.*, 2011).

Debido a sus características fisiológicas y metabólicas, las especies de *Bacillus* spp. se han empleado en la industria, farmacéutica y agricultura. Recientemente el interés por el uso *Bacillus* spp. en la agricultura ha tomado relevancia como parte del desarrollo de estrategias sostenibles para promover el crecimiento vegetal y para combatir distintas condiciones de estrés por agentes bióticos y abióticos. De acuerdo con Kashyap *et al.* (2019) la incorporación al suelo de *Bacillus* spp. para promover el crecimiento vegetal se ha realizado en cultivos como tomate (*Solanum lycopersicum*), cacahuate (*Arachis hypogaea*), banana (*Musa spp.*), arroz (*Oryza sativa*), pepino (*Cucumis sativus*), canola (*Brassica napus*), garbanzo (*Cicer arietinum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), maíz, algodón (*Gossypium spp.*), papa

(*Solanum tuberosum*), entre otros. También se ha reportado su uso en la mitigación del estrés hídrico en plantas de maíz (Ghazy & Sahar, 2021), tomate (Gowtham *et al.*, 2020), trigo (Zafar *et al.*, 2019) y chile (Lim y Kim, 2013). Las especies más estudiadas incluyen *B. amyloliquefaciens* (Kumar *et al.*, 2016), *B. subtilis* (Cochard *et al.*, 2022; Gowtham *et al.*, 2020), *B. licheniformis* (Rashid *et al.*, 2021; Sheteiwy *et al.*, 2021), *B. xiamenensis* (Amna *et al.*, 2019) y *B. megaterium* (Rashid *et al.*, 2021).

4.8 MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Bacillus* spp. EN LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL E INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A SEQUÍA.

La literatura reporta distintos mecanismos que se interconectan y trabajan de forma sinérgica para favorecer el crecimiento vegetal y la protección de plantas ante condiciones de estrés abiótico (Abril *et al.*, 2017). Entre ellos se encuentra la producción de AIA, sideróforos, solubilización de fósforo, solubilización de zinc, producción de amonio, osmoprotectantes, exopolisácaridos, antioxidantes, regulación hormonal y modulación de la expresión genética. La Figura 6 resume estos mecanismos.

4.8.1 Producción de AIA

El AIA es una fitohormona, perteneciente al grupo de las auxinas, implicada en la regulación de aspectos como la dominancia apical, elongación de brotes, diferenciación radicular, formación de raíces secundarias, disposición foliar en tallo, formación de pigmentos e inducción de resistencia en plantas (Hasuty *et al.*, 2018). La producción de auxinas se ve influenciada por factores ambientales como el pH y la temperatura, además, la presencia y concentración de los precursores afecta la acumulación de la fitohormona (Napitupulu *et al.*, 2019). Algunos microorganismos son capaces de producir AIA a través de la ruta dependiente de L-triptófano. Específicamente las especies de *Bacillus* han sido reportadas por producir AIA como parte de su metabolismo. De acuerdo con Moustaine *et al.* (2017) la inoculación de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L) con aislados

de *Bacillus* spp. incrementa el contenido de AIA y la longitud del sistema radicular. Cochard *et al.* (2022) mostraron la capacidad de *B. subtilis* para producir entre 3.53 y 6.1 mg/L de AIA a través de la ruta dependiente de triptófano.

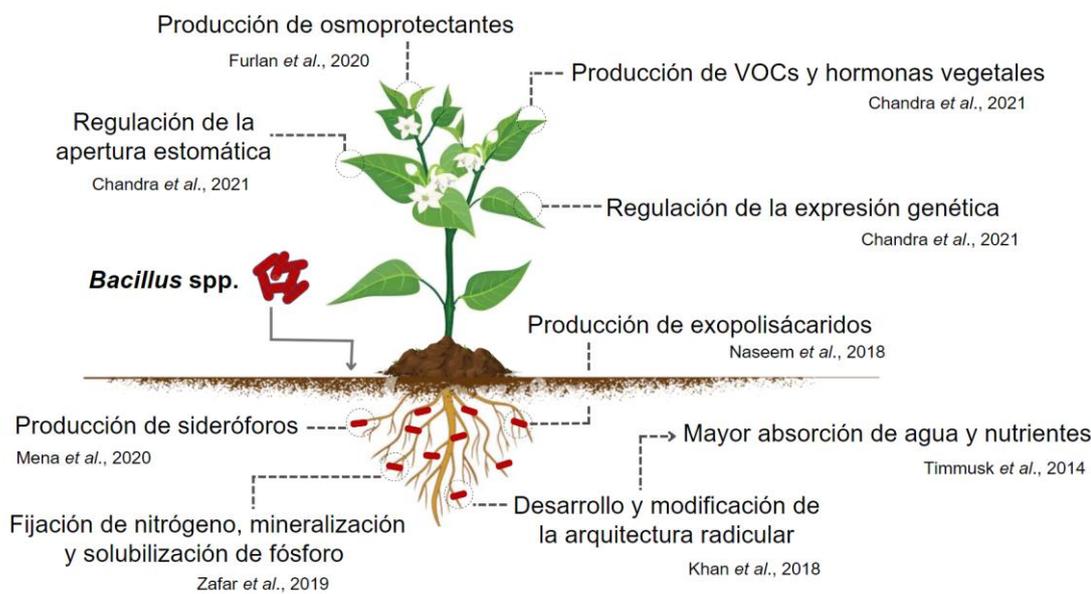


Figura 6. Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal e inducción de resistencia a sequía en *Bacillus* spp. La línea continua representa la aplicación de *Bacillus* spp. al suelo. Líneas punteadas indican los mecanismos de acción.

4.8.2 Producción de Sideróforos

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de todos los organismos (Khan *et al.*, 2018). En las plantas interviene en la síntesis de clorofila y participa en la actividad enzimática actuando como cofactor, además, es esencial para mantener la estructura y funcionalidad de los cloroplastos. El hierro es el cuarto elemento más abundante en la litósfera (Rout y Sahoo, 2015); por lo general, se encuentra en altas cantidades en los suelos, sin embargo, la atmósfera aeróbica y el pH biológico oxidan el Fe^{+3} a polímeros de oxihidróxido insolubles que reducen su disponibilidad en el medio y limitan la posibilidad de absorción por las plantas (Paul y Dubey, 2015). Su deficiencia se manifiesta por medio de clorosis férrica y afecta la producción de cultivos al disminuir el rendimiento y calidad de los

productos agrícolas (Mimmo *et al.*, 2014; Rout y Sahoo, 2015). Los sideróforos, producto del metabolismo secundario de algunos microorganismos, son péptidos no ribosómicos que actúan como agentes quelantes específicos de iones férricos secretados cuando el contenido de hierro es limitado (Khan *et al.*, 2018). Son compuestos de bajo peso molecular con alta afinidad por este y otros metales (Vinale & Sivasithamparam, 2020). La biosíntesis de sideróforos se lleva a cabo a partir de operones que involucran al menos 5 genes. Una vez transcrito, el péptido se ensambla mediante péptidos sintetas no ribosomales (NRPS). Así mismo, la producción de sideróforos está regulada por el contenido de hierro en el medio (Khan *et al.*, 2018). Se ha reportado la capacidad de *Bacillus* spp. para transformar el hierro insoluble (Fe^{+3}) a su forma soluble (Fe^{+2}) permitiendo así la absorción por parte de las plantas y su utilización en el metabolismo vegetal. Esto tiene un efecto positivo directo sobre el crecimiento radicular y sobre la producción de auxinas endógenas en distintos cultivos de interés agrícola (Kashyap *et al.*, 2019). De acuerdo con Rashid *et al.* (2021) los sideróforos producidos por *B. megaterium* promueven el crecimiento en plantas de trigo y fortalecen la respuesta al ataque de fitopatógenos. Del mismo modo, Ghazy y Sahar (2021) mostraron el potencial de *Bacillus subtilis* para producir sideróforos en plantas de maíz bajo condiciones de estrés biótico.

4.8.3 Solubilización de fósforo

El fósforo (P) es un nutriente mineral esencial en el metabolismo vegetal. La presencia de fósforo en las plantas se asocia con el desarrollo radicular, solidez del tallo, formación de flores y semillas, resistencia a enfermedades, fijación de nitrógeno (en leguminosas) y calidad del fruto. Comúnmente es un elemento limitante en el desarrollo de los cultivos. La dinámica del fósforo en el suelo implica procesos fisicoquímicos (sorción-desorción) y biológicos (inmovilización-mineralización) (Goswami *et al.*, 2019). El P se precipita en suelos calcáreos al reaccionar con iones de Ca^{+2} y en suelos ácidos al interactuar con iones de Al^{+3} y Fe^{+3} altamente reactivos, causando la inmovilización del mineral (Hao *et al.*, 2002). Los microorganismos solubilizadores de P son capaces de liberar ácidos orgánicos para disolver los complejos fosfatados, mejorando así la absorción vegetal del



nutriente. De esta forma, la producción de ácidos orgánicos conduce a la acidificación del medio, el fosfato unido al catión es sustituido por H^+ liberando el P inmovilizado. El anión $H_2PO_4^-$ es una de las principales formas solubles del fosfato inorgánico. Entre los principales ácidos sintetizados por los microorganismos para solubilizar el fósforo se encuentran el ácido glucónico, oxálico, cítrico, láctico, tartárico y aspártico. También se liberan protones a partir de NH_4^+ . Así mismo, la liberación de fosfato orgánico (4 – 90% en el suelo), también se ve favorecida por la inoculación de microorganismos capaces de producir enzimas fosfatasas, fitasas, fosfonatasas y liasas C-P, que permiten liberar el P mediante la escisión de enlaces fosfatados. Esto es especialmente útil cuando la producción de enzimas de origen vegetal se ve limitada por las condiciones del medio (Goswami *et al.*, 2019). En suelos con baja humedad y poca aireación la solubilización de minerales como el fósforo se vuelve más lenta (Zhang *et al.*, 2014). Especies del género *Bacillus* se han reportado como solubilizadores de fósforo. Kumar *et al.* (2016) evaluaron el potencial de *B. amyloliquefaciens* en sinergia con *Pseudomonas putida* para promover el crecimiento de plantas de garbanzo. Los resultados demuestran una mejora en plantas sometidas a estrés hídrico asociada al incremento en la absorción de fósforo. Otros autores han estudiado el efecto de *B. megaterium* para mejorar la nutrición vegetal de este nutriente en plantas de trigo expuestas a baja disponibilidad de agua (Rashid *et al.*, 2021).

4.8.4 Solubilización de zinc

El zinc (Zn) es un micronutriente que desempeña funciones críticas en las plantas (Kumar *et al.*, 2019). Es un componente estructural e interviene en la funcionalidad enzimática contribuyendo como cofactor (Eshaghi *et al.*, 2019). Participa en la síntesis de carbohidratos, aminoácidos, ARN y ADN. Además, se asocia a la producción y fertilidad del polen e interviene en las respuestas de defensa a patógenos. Sin embargo, la deficiencia de Zn en los cultivos es común (Kumar *et al.*, 2019). Generalmente, el Zn se encuentra presente en el suelo en las formas químicas ZnO , $ZnSO_4$, $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$, ZnS , $ZnFe_2O_4$ y $ZnCO_3$. No obstante, la disponibilidad de este se encuentra limitada debido a que las plantas absorben el nutriente como catión Zn^{2+} (Ditta *et al.*, 2022). La disponibilidad de este elemento

es limitada debido a la falta de reciclaje de los residuos agrícolas, la fertilización excesiva, la escasez de materia orgánica y la aplicación de agricultura intensiva. Entre los factores que limitan la absorción del Zn destacan la humedad del suelo, pH, concentración total de zinc, materia orgánica, condiciones redox, actividad microbiana en la rizósfera, concentración de macronutrientes y otros elementos traza (Kumar *et al.*, 2019). La deficiencia es común en suelos calcáreos, sódicos, salinos, arenosos, de textura gruesa, mal drenados y erosionados (Ditta *et al.*, 2022). El Zn es el micronutriente con mayor deficiencia en las plantas, la cual altera el proceso de fotosíntesis, el metabolismo del nitrógeno, disminuye la floración, retrasa el crecimiento, reduce la productividad y la calidad del fruto (Eshaghi *et al.*, 2019; Ditta *et al.*, 2022). Los síntomas de deficiencia de Zn en las plantas son una disminución significativa de la altura y la aparición de manchas marrones necróticas (Eshaghi *et al.*, 2019). Diversos autores mencionan que el tratamiento con PGPR aumenta la biodisponibilidad y movilidad del zinc en la rizósfera. Las PGPR transforman el Zn de su forma insoluble a la forma disponible para su absorción por las raíces (Kumar *et al.*, 2019). La biodisponibilidad se lleva a cabo a través de mecanismos como la acidificación, quelación, reacciones de intercambio, producción de sideróforos y liberación de ácidos orgánicos (Eshaghi *et al.*, 2019). Las especies de *Bacillus* spp. pueden ser empleadas como biofertilizantes de zinc en suelos donde la concentración es alta, pero se encuentra en su estado insoluble o en combinación con fertilizantes económicos en suelos pobres (Ditta *et al.*, 2022). En otros estudios se observó que *B. amyloliquefaciens* y *B. megaterium* presentaron la capacidad de solubilizar Zn como mecanismo de promoción del desarrollo vegetal y protección contra estrés abiótico en plantas de Chile (Kazerooni *et al.*, 2021; Bhatt y Maheshwari, 2020). Además, se reporta la biofortificación de Zn en cereales al inocular cepas de *Bacillus* spp. (Ahmad *et al.*, 2023; Yadav *et al.*, 2022).

4.8.5 Producción de amonio

La producción microbiana de amonio se asocia a la fijación de nitrógeno, es decir, a la conversión de nitrógeno atmosférico (N_2) en amoniaco (NH_3). La capacidad de los microorganismos del suelo para producir amonio disponible para las plantas

contribuye al aumento de biomasa y rendimiento vegetal (Kumar y Saraf, 2015). Además, las PGPR pueden liberar amonio a partir de compuestos orgánicos nitrogenados. *B. licheniformis* tiene la capacidad de producir amonio en plantas de cacahuate sometidas a estrés salino (Goswami *et al.*, 2014). Estudios similares han establecido el potencial de *B. xiamenensis* para incrementar la producción de amonio en conjunto con otras actividades promotoras de crecimiento en plantas de caña estudiadas bajo distintos tipos de estrés biótico y abiótico (Amna *et al.*, 2019).

4.8.6 Producción de osmoprotectantes

De modo complementario la inoculación de PGPR aumenta la concentración de prolina (Furlan *et al.*, 2020). La concentración de prolina es un marcador bioquímico en la determinación de tolerancia a sequía. Plantas del género *Trigonella* han robustecido su nivel de respuesta a estrés al ser tratadas con *B. subtilis*, asociado al aumento en el contenido de prolina. Del mismo modo, *B. altitudinis* incrementa la acumulación de prolina en plantas de arroz que enfrentan una disminución en la disponibilidad de agua, al mismo tiempo que desempeña otras actividades promotoras de crecimiento (Kumar *et al.*, 2017).

4.8.7 Producción de exopolisacáridos

Los exopolisacáridos (EPS) son biopolímeros de alto peso molecular secretados por los microorganismos y formados a partir de la unión de monosacáridos mediante enlaces glucosídicos. Los EPS se dividen en homo y heteropolímeros en función del tipo de monómeros que componen la macromolécula. Algunos EPS se mantienen unidos a la membrana a través de enlaces covalentes mientras que otros se secretan completamente al medio extracelular. Los EPS se distinguen de las biopelículas, las cuales se constituyen de un conjunto de células adyacentes y envueltas en una matriz extracelular compuesta en su mayor fracción por EPS y en menor medida por proteínas, ácidos nucleicos, iones y sales minerales (Blake *et al.*, 2021). Los EPS son esenciales para la protección de la célula de la desecación, la exposición a rayos UV, estrés osmótico, pH desfavorables, agentes

antimicrobianos, oxidantes, metales pesados y predación. Además, son importantes en la agregación celular, adhesión a superficies y en la síntesis de las biopelículas (Nwosu *et al.*, 2019). La producción de EPS por *Bacillus* spp. para distintos fines está bien documentada (Huang *et al.*, 2022). En la agricultura son de interés como mecanismo de acción para mitigar el estrés hídrico debido a que muestran propiedades higroscópicas e hidrofilizantes, que favorecen la hidratación y disminuyen la desecación (Kaniz *et al.*, 2023). Andy *et al.* (2023) reportaron rendimientos elevados de EPS producidos por *B. cereus* y *B. haynesii*. En otro estudio, se determinó que los EPS producidos por *B. subtilis* se constituyen de peptidoglicano, ácido murámico, glucosa, galactosa, manosa e inositol. Además, se reportaron alteraciones en los procesos hidrológicos del suelo incluyendo la reducción de las tasas de evaporación y el incremento en la retención y absorción de agua (Kaniz *et al.*, 2023).

4.8.8 Producción de antioxidantes

Como respuesta a la afectación estomáca las plantas son capaces de aumentar los niveles de producción de antioxidantes como SOD, CAT, APX y GR. La producción enzimática se amplía a través de la inoculación de PGPR del género *Bacillus* (Gowtham *et al.*, 2020). Aislados de *Bacillus* fueron probados para evaluar la modulación del daño oxidativo en plantas de maíz mediante la evaluación de la actividad de GR y APX (Moreno *et al.*, 2020). En otro estudio Lozo *et al.* (2022) mostraron la mitigación del daño oxidativo en *C. annuum* L. en respuesta a la sequía con los tratamientos *B. safensis* SS-2.7 y *B. thuringiensis* SS-29.2, los cuales redujeron la acumulación de H₂O₂ al incrementar la concentración enzimática de APX, POD, SOD y GR.

4.8.9 Regulación hormonal

Las PGPR producen una variedad de reguladores de crecimiento como el AIA, AG₃ y citocininas que promueven las tasas de germinación de semillas, el crecimiento de raíces, área foliar, contenido de clorofila, magnesio, nitrógeno, proteínas,

favorecen la actividad hidráulica, la tolerancia a la sequía y retrasan la senescencia (Ahemad y Khan, 2012). Otra alteración en la concentración de reguladores de crecimiento es la disminución del etileno; la regulación positiva de la síntesis de etileno es una respuesta común ante condiciones de estrés, para lo cual se requiere el precursor aminociclopropano-1-carboxilato (ACC). Algunos PGPR producen ACC desaminasa, escindiendo el ACC en cetobutirato y amonio (Etesami y Maheshwari, 2018). La alteración de la cantidad de etileno por las rizobacterias puede deberse a la regulación en los genes *acs* y *aco* que codifican la ACC sintasa y la ACC oxidasa, respectivamente (Chandra *et al.*, 2021). Diversos autores han estudiado la inducción de resistencia a sequía en plantas tras la inoculación de especies del género *Bacillus* a través de la producción de ACC desaminasa en cultivos como tomate y trigo (Gowtham *et al.*, 2020; Zafar *et al.*, 2019).

4.8.10 Regulación genética

Las PGPR participan en la regulación de la expresión de genes asociados a la actividad enzimática y hormonal (Chandra *et al.*, 2021). Cambios en la acumulación de proteínas relacionadas con la respuesta vegetal al estrés han sido reportados por varios autores. Lim y Kim (2013) evaluaron alteraciones en la expresión de los genes *Cadhn*, *VA*, *sHSP* y *CaPR-10* de plantas de Chile (*C. annuum*) que codifican para la proteína similar a la deshidrina, la ATPasa vacuolar, la proteína citoplasmática de choque térmico pequeña clase I y la proteína relacionada con la patogénesis 10, respectivamente. Las plantas tratadas con *Bacillus licheniformis* mostraron un incremento en la acumulación de proteínas. También ha sido reportado el incremento en los niveles de antioxidantes como el fenol y flavonoide, de osmoprotectores y de hormonas vegetales, incluyendo la regulación al alza de GAS y AIA y a la baja de ácido abscísico (ABA) (Sheteiwiy *et al.*, 2021).

V. JUSTIFICACIÓN

El chile chiltepín tiene importancia cultural y gastronómica en México. Además, su cultivo representa un alto potencial económico para el estado de Chihuahua debido a la creciente demanda y al elevado precio en el mercado. La domesticación del chiltepín, además, garantiza su establecimiento, conservación y uso como recurso genético, debido a que, al considerarse el ancestro común de otras especies de chile cultivados, muestra mayor adaptabilidad a condiciones de estrés biótico y abiótico. En este estudio se pretende contribuir a su domesticación y establecimiento aportando una solución biológica a una de las principales problemáticas actuales para la producción de alimentos: el estrés causado por el déficit hídrico. Para ello, se plantea evaluar la colaboración de especies del género *Bacillus* como promotores de crecimiento vegetal y bioprotectores de plantas de chiltepín durante épocas de sequía a partir de cepas nativas presentes en suelos áridos y semiáridos de la región productora centro-sur del estado.



VI. HIPÓTESIS

La aplicación de *Bacillus* spp. nativos del suelo de Chihuahua promueve el crecimiento e induce tolerancia al estrés hídrico en *Capsicum annuum* var. *glabrisculum*.

VII. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General:

Caracterizar cepas de *Bacillus* spp. nativas del suelo de Chihuahua, con capacidad de promover el crecimiento vegetal e inducir tolerancia al estrés hídrico en *Capsicum annuum* var. *glabrisculum*.

7.2 Objetivos Particulares:

Aislar e identificar cepas de *Bacillus* spp. de la región productora del estado de Chihuahua.

Evaluar el potencial de *Bacillus* spp. como promotores de crecimiento vegetal e inductores de tolerancia a estrés hídrico en *Capsicum annuum* var. *glabrisculum* en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

Evaluar los principales mecanismos de acción de *Bacillus* spp. para promover el crecimiento vegetal e inducir tolerancia a estrés hídrico en *Capsicum annuum* var. *glabrisculum*.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS

8.1.1 Colecta de muestras

Para el aislamiento de *Bacillus* spp. se colectaron 75 muestras representativas de suelo de 15 lotes comerciales de chile de la zona agrícola ubicada en Meoqui, Chihuahua, México ($28^{\circ}23'23''$ N, $105^{\circ}37'25''$ O) (Figura 7). El muestreo se realizó en enero de 2022 colectando suelo a 20 cm de profundidad a partir de cinco puntos diagonales de cada lote. Las muestras se etiquetaron y trasladaron a 4°C para su procesamiento.



Figura 7. Sitio de muestreo. Mapa de lotes de chile jalapeño que indica los sitios de muestreo de suelo, en la región de Lázaro Cárdenas, Municipio de Meoqui, Chihuahua. Google Earth, 2023

8.1.2 Aislamiento de *Bacillus* spp.

El proceso de aislamiento de *Bacillus* spp. se realizó en el laboratorio de Microbiología Aplicada, Fitopatología y Fisiología Postcosecha (MAFFP) de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH). El aislamiento de las bacterias se efectuó de acuerdo con la metodología propuesta por Astorga *et al.* (2014). Para ello, se seleccionó una muestra de cada lote, considerando como criterio de elección la muestra con mayor contenido visual de materia orgánica. Después, se disolvieron 0.5 g de suelo en 4.5 mL de solución



salina estéril (0.85%) en tubos de ensayo y se mantuvieron en agitación constante por 3 min en un vórtex (Daigger Genie, Buffalo Grove, USA). Posteriormente, se aplicó un tratamiento térmico a 80° C durante 10 min en baño María (Fisher Isotemp, Modelo 228, Waltham, USA). Enseguida, se realizaron microdiluciones seriadas hasta el factor de dilución 10⁻⁶, de acuerdo con la metodología propuesta por Corral *et al.* (2012). Para ello, se tomaron 20 µL de la solución de suelo y 180 µL de agua destilada (H₂O_d) (Facultad de Ciencias de Químicas UACH, Chihuahua, México) para cada dilución. La siembra se realizó en placa con medio de cultivo agar nutritivo (AN) (BD Bioxon®, Cuautitlán Izcalli, México) empleando un replicador de acero inoxidable estéril. Las cajas fueron selladas y se incubaron (Barnstead Modelo 310 Lab Line Imperial III, Woonsocket, USA) a 28 ± 2 °C por 24 h. Finalmente las colonias que mostraron las características macroscópicas típicas del género *Bacillus* fueron subcultivadas hasta la obtención de colonias puras.

8.1.3 Identificación morfológica y bioquímica de *Bacillus* spp.

Las cepas bacterianas se sometieron a pruebas bioquímicas y fisiológicas estándar de acuerdo con lo propuesto por Schaad *et al.* (2001). Para la identificación de las cepas se realizaron las pruebas de movilidad por gota pendiente (Covadonga y de Sillóniz, 2010), tinción de Gram, tinción de endospora con técnica de Schaeffer-Fulton (Mormak y Casida, 1985) y la prueba de solubilidad en hidróxido de potasio (KOH). Además, se revisaron sus características microscópicas y morfología colonial según lo descrito por Garrity *et al.* (2009).

8.1.4 Elaboración del cepario

La elaboración del cepario se realizó en el laboratorio de Biotecnología II de la Facultad de Ciencias Químicas; para ello, se sembraron las colonias puras en placa con medio de cultivo agar soya tripticaseína (TSA) (Bioxon® 210800, Cuautitlán Izcalli, México) mediante la técnica de estriado compacto y se incubaron a 28 ± 2 °C por 48 h (incubadora de baja temperatura Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA). Transcurrido el periodo de incubación se transfirió el crecimiento bacteriano a tubos criogénicos con 2 mL de medio de cultivo caldo soya tripticaseína (TSB) (Bioxon®, Cuautitlán Izcalli, México) adicionado con glicerol (J.



T. Baker, Xalostoc, México) (30%). Los tubos se mantuvieron a -20°C en un congelador (Sumilabch ©, Culiacán, México) hasta su uso.

8.1.5 Extracción de ADN

Para la extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano se empleó el método modificado de fenol-cloroformo propuesto por Bardakci y Skibinski (1994). Inicialmente, se agregaron 1.5 mL de crecimiento bacteriano, previamente crecido en medio de cultivo TSB e incubado a 30°C durante 24 h, en microtubos y se centrifugaron (Eppendorf 5804 R, Hamburgo, Alemania) a 12,000 rpm y 4°C durante 5 min. La centrifugación se repitió dos a tres veces hasta la obtención del pellet bacteriano. Posteriormente, se llevó a cabo la lisis celular mediante la adición de 100 μL de dodecilsulfato sódico (SDS) (Laboratory reagents Chemicals Ltd., Inglaterra) al 10%, 100 μL de cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 5M y 100 μL de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Después, se homogenizó el contenido en vórtex Mixer (Labnet, modelo VX-200, Nueva Jersey, USA) durante 3 min y se incubó a 65°C por 10 min. Para la eliminación de la fracción orgánica se añadió un volumen 1:1 de fenol cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) (Fenol (CTR Scientific, Nuevo León, México), Cloroformo (J.T. Baker, Pensilvania, USA), Alcohol isoamílico (CTR Scientific, Nuevo León, México)) y se centrifugó a 12,000 rpm, 4°C durante 5 min. Para precipitar el ADN, se transfirió la fase acuosa superior a tubos limpios y se añadieron 500 μL de isopropanol (CTR Scientific, Nuevo León, México), la agitación se realizó cuidadosamente y se mantuvo en congelación a -20°C . Después de 24 h se centrifugó a 12,000 rpm / 4°C durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Para la eliminación de sales se realizaron 2 lavados con 300 μL de etanol (HYCEL, Jalisco, México) (70%) centrifugando a 12,000 rpm y 4°C durante 10 min en cada lavado. Posteriormente, se eliminaron los restos de etanol en el concentrador de vacío (Eppendorf 5301, Hamburgo, Alemania). El precipitado obtenido fue resuspendido en 50 μL de Buffer Tris 10 mM-EDTA 1mM (TE 10:1, pH 8.0) (Tris-HCl (USB, Ohio, USA), EDTA (Laboratorios LAITZ, Ciudad de México, México) y se almacenó a -20°C hasta su uso.



Para determinar la presencia e integridad del ADN en las muestras se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) al 1%. El gel se suplementó con bromuro de etidio (Sigma Aldrich, Missouri, USA) al 0.01%. Cada carril se constituyó de 2 μ L de buffer de carga Buffer 5X Green (GoTaq FlexiBuffer Promega, Wisconsin, USA) y 4 μ L de la muestra de ADN. Además, se emplearon 2 μ L del marcador de peso molecular DNA Ladder G2101 (Promega, 100bp DNA Ladder). El gel se corrió en una cámara de electroforesis (Thermo Scientific Easycast, modelo B1A, Massachusetts, USA), con fuente de poder (Bio-Rad, modelo PowerPac 300, California, USA) durante 60 min a 70 voltios (V); como buffer de corrida se empleó solución de TBE 1X pH 8 (Tris-Base (J.T. Baker, Pensilvania, USA), Ácido bórico (J.T. Baker, Pensilvania, USA), EDTA 0.5 M (Laboratorios LAITZ, Ciudad de México, México). El gel se visualizó en un sistema de fotodocumentación (Kodak Gel Logic 100 Digital Imaging System, Rochester, USA) empleando el software Kodak 1D 3.6.5. K2. Posteriormente, se determinó la concentración y pureza del ADN mediante un bioespectrofotómetro (Basic Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con el procesador SW-Version: 4.2.3.0.

8.1.6 Identificación molecular

Para la identificación molecular se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del fragmento ARNr 16S. La mezcla de reacción se preparó con los siguientes componentes de Thermo Scientific (Massachusetts, USA): buffer Taq 1x con KCl, $MgCl_2$ 2.5 mM, dNTP'S 0.2 mM, ADN polimerasa Taq 0.25 U y H_2O . Posteriormente se agregaron 2.5 μ L de los primers 27F- 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' y 1492R- 5' TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3' (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA) y el ADN a una concentración de 10 ng/ μ L. La PCR se realizó empleando un termociclador (Labnet, modelo TC-020-24), bajo el siguiente programa de amplificación: 10 min de desnaturalización inicial a 95 °C seguido de 30 ciclos de amplificación (1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de alineamiento a 50° C y 1.5 min de extensión a 72 °C), seguidos de 10 min de extensión final a 72 °C (Linares *et al.*, 2020).

Para visualizar el producto de la PCR se utilizó un gel de agarosa al 1.5% adicionado con bromuro de etidio (0.01%). Como marcador de peso molecular el

1Kb (O' GeneRuler 1Kb Thermo Scientific, Massachusetts, USA). El gel se corrió a 100 V durante 90 min y posteriormente se visualizó en el fotodocumentador.

8.1.7 Secuenciación

Los fragmentos amplificados fueron enviados a Macrogen Crop (Rockville, Maryland, USA) para su secuenciación mediante el método de Sanger. A partir de las secuencias Forward y Reverse se construyeron las secuencias consenso y se enviaron al NCBI (National Center for Biotechnology Information) para obtener el número de acceso. Finalmente se realizó la búsqueda de secuencias homólogas con la herramienta nBLAST del banco de genes del NCBI.

8.2 PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL

8.2.1 Promoción de germinación *in vitro*

La promoción de germinación en chiltepín por *Bacillus* spp., se estableció bajo un diseño completamente al azar con once tratamientos y cuatro grupos control (n = 4). Los tratamientos fueron *B. cereus* (Bc16-4, Bc16-5, Bc25-3, Bc25-4, Bc25-7, Bc30-1 y Bc30-2), *B. thuringiensis* (Bt22-1 y Bt25-6), *B. wiedmannii* (Bw19-1) y *B. subtilis* (Bs22-3). Para los controles positivos se emplearon la cepa comercial QST 713 de *B. subtilis* (Serenade® ASO, Bayer, Barcelona, España) (BsQ) y una cepa de *B. thuringiensis* perteneciente al cepario de Biotecnología II (BtBII) (control interno). Para los controles negativos se utilizaron semillas tratadas con agua destilada estéril (C_{H2O}) y medio de cultivo (C_N).

Desinfección de semilla

Se emplearon semillas de *C. annuum* var. *glabrisculum* extraídas de plantas silvestres de la localidad de Chínipas, Chihuahua (27 24' 0 N, 108 32' 0 W). Un total de 25 semillas se seleccionaron y desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% (v/v) (CLORALEX®, Monterrey, México), se mantuvieron en agitación constante durante 5 min empleando un shaker digital (Thermo Scientific MAXQ 4450, Massachusetts, USA), posteriormente se realizaron tres enjuagues con H₂O_d estéril de 5 min cada uno. Enseguida se sumergieron en H₂O_d estéril durante 24 h.

*Inoculación con *Bacillus* spp.*

Para inocular las semillas se trataron con soluciones bacterianas previamente crecidas en caldo nutritivo (CN) (Bioxon®, Cuautitlán Izcalli, México) y ajustadas, mediante espectrofotometría de luz UV visible (Thermo Scientific Evolution 60S, Massachusetts, USA) a una concentración de 1×10^8 UFC/mL. Enseguida se colocaron en agitación constante a 150 rpm y 28°C durante 1 h, posteriormente se descartó la solución bacteriana y se colocaron en cajas Petri con papel absorbente estéril previamente humedecido con 8 mL de H₂O. Las placas fueron selladas y colocadas en una cámara de germinación a un fotoperiodo de 16 h luz a 28 °C y 8 h oscuridad a 25 °C.

Parámetros de germinación, índices y características morfológicas

La germinación fue controlada durante 19 d después de la siembra (DDS) para determinar la tasa de germinación (TG), el tiempo medio de germinación (TMG), el índice de velocidad de germinación (IVG) y la velocidad media de germinación (VMG) (Tabla 1). Los índices de vigor (IV), esbeltez (IE) y de germinación (IG) se emplearon como indicadores del potencial fisiológico de la semilla. Además, se evaluaron parámetros vegetativos y anatomía de la raíz en 5 plántulas de cada repetición. Para determinar el peso fresco total se empleó una balanza analítica (OHAUS, modelo E01140, New Jersey, USA), mientras que la altura, raíz y diámetro de tallo se determinaron mediante el programa de procesamiento ImageJ 1.53t. El ancho de la raíz y del tejido conectivo se obtuvo mediante la toma de fotografías con la cámara ocular UCMOS USB 2.0 (Toup Tek, Hangzhou, China) acoplada al microscopio triocular Leica DM1000 (Wetzlar, Alemania) bajo el objetivo 4x. Posteriormente se procesaron las fotografías con el software de control de cámara Toupview x86 (Toup Tek, Hangzhou, China) a una distancia de 1000 px partiendo de la cofia de raíces secundarias.

8.2.2 Promoción de crecimiento en invernadero

La promoción de crecimiento en invernadero se estableció bajo un diseño completamente al azar con 4 tratamientos (Bs22-3, Bc25-4, Bc25-7 y Bc30-2) y tres

grupos control (n=6). Como grupos control se emplearon las cepas BsQ y BtBII y plántulas tratadas con H₂Od (C-).

Tabla 1. Fórmulas para la determinación de parámetros de germinación.

Parámetro	Fórmula	Referencia
TG (%)	$(N/A) * 100$	N es el número de semillas emergidas y A es el total de semillas.
TMG (d)	$n_t * t_i / n_{total}$	n _t es el número de semillas emergidas en intervalo de tiempo, t _i es el intervalo de tiempo y n _{total} es el número de semillas emergidas.
VMG (semillas/día)	1/t	G ₁ , G ₂ , G _n es número de plántulas normales calculadas en el primer recuento, el segundo recuento y el último recuento y N ₁ , N ₂ , N _n es el número de días desde la siembra hasta el primer, segundo y último recuento
IVG	$(G_1/N_1) + (G_2/N_2) + \dots + (G_n/N_n)$	De Moraes (2018)
IV	TG x Altura (mm)	Abdul & Anderson (1973)
IE	Altura (cm) / Diámetro tallo (mm)	Sáenz <i>et al.</i> (2014)
IG	$(TG \times Longitud_{raíz} / TG_{Control} \times Longitud_{raíz\ Control}) \times 100$	Zucconi <i>et al.</i> (1981)

Producción de plántulas

Para evaluar la promoción de crecimiento en invernadero se produjeron plántulas a partir del proceso de desinfección y siembra de semillas previamente descrito. El trasplante se realizó cuando las plántulas presentaron 3 - 4 hojas verdaderas (60 DDS). Como sustrato se utilizó Peat Moss (Cosmopeat®, San Salvador Huixcolotla, México) estéril (121°C y 15 PSI, 40 min), el cual fue humedecido hasta saturación con H₂Od. Las plántulas se colocaron en invernadero y se monitorearon las condiciones de temperatura y humedad durante todo el experimento con Termohigrómetro RH and Temp datalogger Version 1.5. (CEM DT-172, Monterrey, México). El riego se realizó con una frecuencia de 48 a 72 h con H₂Od y se aplicó solución nutritiva Soluponics Universal Steiner (Tabla 2) (Inverfarms Hidroponía México, Santiago de Querétaro, México) cada 7 d a pH 6.0; CE 1,250 µS (pH Hanna HI98100 Checker® Plus, Bogotá, Colombia; CE HM Digital Tester Sensor AquaPro®, Carson, USA).

Tabla 2. Composición de la solución nutritiva Soluponics Universal Steiner (Inverfarms®).

Macronutrientes		Micronutrientes	
Nitrógeno (N)	175 ppm	Hierro (Fe-EDTA)	15 ppm
Fósforo (P)	47 ppm	Manganeso (Mn-EDTA)	0.8 ppm
Potasio (K)	313 ppm	Zinc (Zn-EDTA)	0.3 ppm
Calcio (Ca)	181 ppm	Cobre (Cu-EDTA)	0.06 ppm
Magnesio (Mg)	49 ppm	Boro (B)	0.4 ppm
Azufre (S)	112 ppm	Molibdeno (Mo)	0.06 ppm

Inoculación con Bacillus spp.

La primera inoculación se realizó el día del trasplante aplicando 5 mL de esporas (1×10^8 UFC/mL) a la base de cada plántula. Para obtener la solución de esporas se aplicó tratamiento térmico a un cultivo bacteriano líquido (28 °C y 150 rpm, 48 h) con baño María a 80 °C durante 10 min seguido de una centrifugación (3,000 rpm, 10 °C, 10 min). Después de tres lavados consecutivos con H₂O_d estéril se tomó lectura de la DO a 600 nm y se ajustó la concentración. La inoculación se repitió en tres ocasiones con una frecuencia de 15 d.

Parámetros vegetativos y pigmentos fotosintéticos

Para evaluar la dinámica de crecimiento se registró la altura y el número de hojas de las plántulas cada 15 d. La evaluación de parámetros vegetativos se llevó a cabo 36 días después del trasplante (DDT) considerando la altura, número de hojas, área foliar, diámetro de tallo, longitud de raíz, biomasa y contenido de pigmentos.

La longitud de raíz, altura de la planta y diámetro de tallo se determinaron empleando un vernier con calibrador digital (Surtek, Guadalajara, México). El área foliar se calculó acorde con la metodología descrita por Patrignani y Ochsner (2015). Para ello, las plantas fueron deshojadas y dispuestas de forma individual sobre una base oscura. Enseguida se tomaron y procesaron fotografías con el programa Canopeo versión 1.1.7. Para la determinación de la biomasa se separaron las plantas en órganos vegetales: hoja, raíz y tallo. Inicialmente se tomó el peso fresco de cada órgano en una balanza analítica y posteriormente se colocaron en bolsas de papel dentro de una estufa de secado (Shel Lab, Cornelius, USA) a 50 °C durante 48 h hasta la deshidratación total de los órganos, finalmente

se tomó lectura del peso seco. La extracción y cuantificación de pigmentos se determinó según la metodología desarrollada por Wellburn (1994). Para ello se homogenizaron 0.1 g de tejido foliar en 4 mL de acetona al 80% (v/v) y se conservaron en oscuridad 24 h. Enseguida se midió la DO a 470, 645 y 663 nm por espectrofotometría. El contenido de clorofila a, b y carotenoides (mg g⁻¹ de tejido fresco) se calcularon a partir de las fórmulas descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Fórmulas para la determinación de pigmentos fotosintéticos.

Parámetro	Fórmula	Referencia
Clorofila a	$Chl\ a = 12.21 \times A_{663} - 2.81 \times A_{645} \times 4\ mL\ (1000 \times 0.1\ g)$	
Clorofila b	$Chl\ b = 20.13 \times A_{645} - 5.03 \times A_{663} \times 4\ mL\ (1000 \times 0.1\ g)$	Wellburn (1994)
Carotenoides	$Car = (1000 \times A_{470} - 3.27_{Chl\ a} - 104_{Chl\ b}) / 229 \times 4\ mL\ (1000 \times 0.1\ g)$	

8.3 CARACTERIZACIÓN DE *Bacillus* spp. COMO PGPR

Para determinar los mecanismos de acción empleados en la promoción de crecimiento se evaluó la capacidad de solubilización de fósforo, zinc, producción de sideróforos, amonio y exopolisacáridos de las cepas de *Bacillus* spp. Los mecanismos de acción se establecieron bajo un diseño completamente al azar con 11 tratamientos (Bc16-4, Bc16-5, Bw19-1, Bt22-1, Bs22-3, Bc25-3, Bc25-4, Bt25-6, Bc25-7, Bc30-1, Bc30-2) y dos grupos control (BsQ y BtBII).

8.3.1 Solubilización de fósforo

Para evaluar la capacidad de solubilización de fósforo se inocularon 0.5 µL de crecimiento bacteriano (1x10⁸ UFC/mL) en cada placa con medio de cultivo Pikovskaya (Ca₃(PO₄)₂ 5 g (Food Technology Trading, Cuautitlan Izcalli, México), NaCl 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) MgSO₄·7H₂O 0.1 g (J. T. Baker, Xalostoc, México), MnSO₄ · 2H₂O 0.004 g (Desarrollo de Especialidades Químicas, Nuevo León, México), FeSO₄ 0.004 g (J. T. Baker, Xalostoc, México), KCl 0.2 g (J. T. Baker, Xalostoc, México), dextrosa 10 g (J. T. Baker, Xalostoc, México), extracto de levadura 0.5 g (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), agar 15 g (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France), púrpura de bromocresol 0.1 g (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), 1 L de H₂O, pH 7 ± 0.2)

(Pikosvskaya, 1948). Las placas fueron incubadas a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 72 h ($n = 5$) y la presencia de una zona clara alrededor de las colonias indicó la capacidad de solubilización. La evaluación cuantitativa se realizó a las 24, 48 y 72 h mediante la determinación del índice de solubilización (SI) (Tabla 4). La medición del diámetro de la colonia y de la zona del halo se realizó mediante el programa de procesamiento ImageJ 1.53t.

Tabla 4. Fórmulas para la determinación del índice y eficiencia de solubilización.

Parámetro	Fórmula	Referencia
SI	SI = diámetro de la colonia c + diámetro de la zona del halo / diámetro de la colonia	Sati y Prabha (2019)
SE	SI = diámetro de la colonia c + diámetro de la zona del halo	Sharma <i>et al.</i> (2014)

8.3.2 Producción de amonio

La producción de amonio se evaluó mediante el ensayo de Nessler (Cappucino y Sherman, 1992) adaptado a microplaca. Para ello se inocularon 10 mL de caldo de peptona con 100 μL de crecimiento bacteriano (1×10^8 UFC/mL) y se incubaron a $28 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 5 d. Enseguida se centrifugó a 5,000 rpm y 4°C durante 5 min. La reacción se realizó añadiendo 20 μL del sobrenadante, 20 μL del reactivo de Nessler y 160 μL de H_2O libre de amonio ($n = 4$). El reactivo de Nessler (yoduromercuriato potásico alcalino) se preparó mezclando las soluciones A (NaOH 16 g, H_2O 50 mL) y B (IK anhidro 7 g, I_2Hg 10 g, H_2O 50 mL). La reacción positiva se observó mediante un cambio colorimétrico hacia tonalidades amarillo-marrón. Finalmente, para la estimación matemática de la concentración de amonio se determinó la DO a 450 nm en el lector multimodal Varioskan y se realizó una curva de calibración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0, 5, 10, 50, 75, 100, 200, 400, 500, 600 $\mu\text{L}/\text{mL}$) con cuatro repeticiones por estándar.

8.3.3 Producción de sideróforos

La producción de sideróforos se evaluó con la técnica de Sulfonato Cromo Azurol (CAS) desarrollada por Schwyn & Neilands (1987). Para preparar la mezcla azul verde oscura se añadieron 60.5 mg de Cromo Azurol S (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) a 10 mL de una solución de hierro (FeCl_3 1 mM, HCl 10 mM (J.T. Baker,

Pensilvania, USA)). Por otro lado, se disolvieron 72.9 mg de CTAB en 40 mL de H₂O_d y se incorporaron a la solución CAS. Para la evaluación se preparó el medio sólido CAS añadiendo la mezcla azul verde oscura a 1 L de AN, posteriormente se realizó la inoculación por aguja con las cepas de *Bacillus* spp. y se incubó a 28 °C durante 72 h para evaluar la formación de un halo amarillo-naranja alrededor de la colonia.

8.3.4 Solubilización de zinc

Para evaluar la capacidad de solubilización de zinc se inocularon 0.5 µL de crecimiento (1×10^8 UFC/mL) en cada placa con medio de cultivo Bunt & Rovira (Dextrosa 10 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, KCl 0.2 g, K₂HPO₄ 0.1 g, MgSO₄ 0.2 g, Agar 15 g, 1 L de H₂O_d, pH 7 ± 0.2) suplementado con ZnO 0.1% (p/v) (Almacén, Facultad de Ciencias Químicas), como fuente insoluble de zinc. Las placas fueron incubadas a $28 \pm 2^\circ$ C durante 10 d. La presencia de una zona clara alrededor de las colonias indicó la capacidad de solubilización. La eficiencia de la solubilización de zinc (SE) y SI se calcularon con las fórmulas descritas en la Tabla 4 (n = 5).

8.3.5 Producción de exopolisácaridos

La producción de exopolisácaridos se determinó mediante método gravimétrico (Moghannem *et al.*, 2018). Para ello se inocularon 10 mL de medio de cultivo EPS (K₂HPO₄ 1.5 g, KH₂PO₄ 0.2 g, MgSO₄ 7H₂O 0.2 g, CaSO₄ 2H₂O 0.1 g (Productos Químicos Monterrey, Nuevo León, México), FeCl₃ 0.002g, extracto de levadura 0.5 g, sacarosa 20 g (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), H₂O_d 1 L, pH 7 ± 0.2) con 40 µL del crecimiento bacteriano (1×10^8 UFC/mL) y se incubaron a 150 rpm y 28°C durante 10 d. Posteriormente se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se centrifugó a 4,500 rpm y 4 °C durante 10 min. Finalmente se decantó el sobrenadante y se secó a 50 °C para obtener el peso seco del precipitado.

8.4 INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A ESTRÉS HÍDRICO

La determinación de la concentración de polietilenglicol y la resistencia de *Bacillus* spp. al estrés hídrico se establecieron bajo un diseño completamente al azar con 5

tratamientos (P10, P20, P30, P40 y P50) y un grupo control (P0). Por otra parte, en la evaluación *in vitro* de la inducción de resistencia a estrés en chiltepín por *Bacillus* spp. se emplearon 13 tratamientos y dos grupos control ($n = 9$). Los tratamientos fueron BsQ, BtBII, Bc16-4, Bc16-5, Bw19-1, Bt22-1, Bs22-3, Bc25-3, Bc25-4, Bt25-6, Bc25-7, Bc30-1, Bc30-2. Para los grupos control se emplearon agua destilada (C+) y una solución de polietilenglicol 6000 (PEG) al 30% (C-).

8.4.1 Determinación de la concentración de polietilenglicol

El estrés hídrico se indujo 20 DDS en cajas Petri con 25 semillas mediante la aplicación de 10 mL de polietilenglicol 6000 (PEG) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) al 10% (Yang *et al.*, 2007). Las cajas se conservaron en el cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz a 28 °C y 8 h de oscuridad a 25 °C. La evaluación de la tasa de sobrevivencia (TS) se realizó al día 17 después de la aplicación del PEG.

Con la finalidad de establecer la concentración de polietilenglicol adecuada para simular estrés hídrico en semillas de *C. annuum* var. *glabrisculum* se estableció la siguiente metodología: plántulas de 18 DDS se trasladaron directamente a un tubo de ensayo estéril, el cual contenía un mL de polietilenglicol a las concentraciones 10, 20, 30, 40 y 50% y un control sin PEG (P10, P20, P30, P40, P50 y P0, respectivamente). En total se utilizaron 10 tubos por concentración. Después de 5 d se realizó la evaluación de la TS de las plántulas y parámetros vegetativos como peso fresco, altura, longitud de raíz y diámetro de tallo.

8.4.2 Resistencia de *Bacillus* spp. al polietilenglicol

Posteriormente, se realizó un ensayo para evaluar la resistencia de las cepas de *Bacillus* spp. a distintas concentraciones de polietilenglicol según la técnica descrita por Yadav *et al.* (2022). Para ello se utilizó una microplaca con 180 μ L de medio de cultivo CN adicionado con PEG a distintas concentraciones (P10, P20, P30, P40, P50 y P0). Se centrifugaron 5 mL de cada crecimiento bacteriano (1×10^8 UFC/mL) a 5,000 rpm, 4°C durante 5 min. Después se decantó y resuspendió el pellet en 0.5 mL de solución salina estéril 0.85%. Enseguida se inocularon los pocillos con 20 μ L de la suspensión bacteriana y se mantuvieron en una incubadora a 28°C durante

96 h ($n = 4$). Para evaluar el crecimiento bacteriano se realizó una medición de la DO a 600 nm en un lector multimodal Varioskan Flash (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) y se calculó la TS de cada bacteria con relación al control (P0). Para agrupar a las bacterias según su adaptabilidad al estrés hídrico se emplearon las siguientes categorías: 0.0 a 0.1 cepas altamente sensibles, 0.10 a 0.45 cepas sensibles, 0.45 a 0.6 cepas moderadamente sensibles, 0.6 a 0.75 cepas moderadamente tolerantes, 0.75 a 0.9 cepas tolerantes y de 0.9 a 1.0 cepas altamente tolerantes. Para evaluar cualitativamente la viabilidad se aplicaron 10 μ L de resazurina al 0.03 M (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) en cada pocillo; el viraje de azul a tonalidades rosas indicó la viabilidad celular (Candeias *et al.*, 1998).

8.4.3 Inducción de resistencia a sequía *in vitro*

Una vez determinada la concentración de PEG y la capacidad de crecimiento de los *Bacillus* spp. en PEG, se llevó a cabo la evaluación del potencial para inducir resistencia a la sequía en semillas. Plántulas de 23 DDS se trasladaron a tubos de ensayo estéril con un mL de PEG al 30%. Después de 5 d se realizó la evaluación de la TS y parámetros vegetativos como altura, longitud de raíz y diámetro de tallo, según lo descrito en los apartados anteriores.

8.4.4 Inducción de resistencia a sequía *in vivo*

La inducción de resistencia en invernadero se estableció bajo un diseño completamente al azar con cinco tratamientos (BtBII, Bc25-3, Bt25-6, Bc25-7 y Bc30-2) y tres grupos control ($n = 6$). Como control positivo se empleó el producto comercial Xp Amino (C_{xpA}) (Agroscience®, Jalisco, México), como control negativo (C-) se trataron plántulas con H_2O_d y como control absoluto (C_{abs}) se emplearon plántulas sin tratamiento y sin estrés.

Producción de plántulas

Para evaluar la inducción de resistencia al estrés hídrico en plántulas se desinfectaron y sembraron semillas. El trasplante se realizó cuando las plántulas presentaron 3 - 4 hojas verdaderas (40 DDS). Las plántulas se colocaron en vasos de plástico con Peat Moss estéril humedecido en invernadero y se monitorearon las

condiciones de temperatura y humedad durante todo el experimento. El riego se realizó con una frecuencia de 48 a 72 h con H₂O y se aplicó solución nutritiva Soluponics Universal Steiner cada 7 d.

Inoculación de plántulas

La primera inoculación se realizó el día del trasplante aplicando 5 mL de esporas (1×10^8 UFC/mL) a la base de cada plántula. La inoculación se repitió en tres ocasiones con una frecuencia de 15 d, hasta la inducción del estrés hídrico.

Aplicación del estrés

La inducción del estrés hídrico se realizó 35 DDT mediante retención de agua por 7 d (Lozo *et al.*, 2022). Para ello, se regaron las plántulas hasta saturación, manteniendo los vasos durante 30 seg en 500 mL de H₂O, enseguida se decantó el exceso y después de 1 h se determinó la humedad del sustrato (3 Way Soil Meter, Cookmaster, Tijuana, México). Posteriormente se suspendió el riego durante 7 d y se monitoreó la humedad cada 24 h en una escala 1-10, considerando que el sustrato estaba seco por debajo de un valor de 3.

Evaluación

La evaluación se llevó a cabo cada 24 h determinando el Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI) con FIELDSCOUT® CM 1000 NDVI Meter (Spectrum Technologies Inc, Aurora, USA) después de la inducción al estrés. Posteriormente se determinó el contenido de prolina y el contenido relativo de agua en las hojas (RWC). La estimación de la prolina total se realizó con el método de Bates (1973): se homogenizaron 0.5 g de tejido foliar en 10 mL de ácido sulfosalicílico acuoso al 3% (p/v) y posteriormente se pasó por filtración (Papel filtro # 2 Whatman 1002-185, GE HealthCare Technologies Inc, Maidstone, Reino Unido). Enseguida se tomaron 2 mL de filtrado y se adicionaron 2 mL de CH₃COOH glacial (CTR, Nuevo León, México) y 2 mL de ninhidrina ácida (ninhidrina 1.25 g (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), CH₃COOH glacial 30 mL, H₃PO₄ 6 M 20 mL (Fermont, Nuevo León, México)). La mezcla se colocó en baño María a 100 °C durante 1 h y se detuvo la reacción colocando los tubos en hielo por 10 min.

Posteriormente, se agregaron 4 mL de tolueno en campana de extracción (Fisher Hamilton, Reno, USA) y se agitó vigorosamente durante 20 a 30 seg. Finalmente se tomó lectura de la absorbancia del sobrenadante a 520 nm, empleando tolueno como blanco. Para estimar el contenido total de prolina se realizó una curva de calibración de L-Prolina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) con los estándares 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 μM ($n = 4$). El contenido de prolina y RWC en las hojas se determinaron con las fórmulas descritas en la Tabla 5.

Tabla 5. Fórmulas para la determinación de prolina y RWC.

Parámetro	Fórmula	Referencia
Prolina (μM / g de hoja)	$\text{Prolina} = \frac{[(\mu\text{g de prolina} * \text{mL tolueno}) / 115.5 \mu\text{g} / \mu\text{M}]}{(\text{g muestra} / \text{g muestra})}$	Bates (1973)
RWC (%)	$\text{RWC} (\%) = \frac{[(\text{FW} - \text{DW}) / (\text{WT} - \text{DW})] \times 100^*}{1}$	Murali <i>et al.</i> (2021)

*FW es el peso fresco después de cosechar la plántula, WT es el peso de hojas saturadas sumergidas en H_2O durante 4 h (peso turgente) y DW es el peso seco constante.

8.5 Análisis estadístico

En los ensayos de promoción de germinación, promoción de crecimiento, mecanismos de promoción de crecimiento e inducción *in vitro* e *in vivo* de tolerancia a la sequía, se analizaron los datos con ANOVA y separación de medias con la prueba de Scott-Knott ($\alpha = 0.05$). Para determinar la concentración PEG se realizó un análisis de correlación de Pearson entre TS de las plántulas y las distintas concentraciones. En el ensayo de inducción de tolerancia a estrés hídrico *in vivo* se realizó un análisis de correlación de Pearson entre la humedad del sustrato y el NDVI. Para seleccionar los aislados con mayor potencial de promoción de crecimiento se realizó un análisis de componentes principales con los parámetros vegetativos y la agrupación de las cepas con K-medias (3 conglomerados). Los análisis se realizaron con los softwares estadísticos InfoStat 2020d y Minitab® 2021 20.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS

9.1.1 Identificación morfológica y bioquímica de *Bacillus* spp.

Se obtuvieron 42 cepas puras, a las cuales se asignó una clave basada en el número del lote de procedencia. A partir de la técnica de gota pendiente se descartaron las bacterias sin movimiento aparente y se seleccionaron 16 colonias las cuales mostraron mayor movilidad. La totalidad de las cepas aisladas resultaron positivas a la prueba de solubilidad en KOH y tinción de Gram (Tabla 6). Posteriormente, se descartaron 5 bacterias por no presentar endosporas. El resto de las bacterias aisladas mostró endosporas elipsoidales, de posición subterminal o centrales típicas del género *Bacillus*. A partir de las pruebas de identificación macro y microscópica se seleccionaron las bacterias: L16-4, L16-5, L19-1, L22-1, L22-3, L25-3, L25-4, L25-6, L25-7, L30-1 y L30-2 (Figura 8).

Tabla 6. Pruebas bioquímicas para la identificación de cepas bacterianas.

Cepa	Movilidad	Prueba de KOH	Tinción de Gram	Tinción de endosporas	Posición de endosporas
L16-1	+	+	+	-	-
L16-4	+	+	+	+	Central
L16-5	+	+	+	+	Central
L19-1	+	+	+	+	Central
L20-1	+	+	+	-	-
L22-1	+	+	+	+	Central
L22-2	+	+	+	-	-
L22-3	+	+	+	+	Central
L23-1	+	+	+	-	-
L25-3	+	+	+	+	Central
L25-4	+	+	+	+	Central
L25-6	+	+	+	+	Subterminal
L25-7	+	+	+	+	Subterminal
L26-1	+	+	+	-	-
L30-1	+	+	+	+	Central
L30-2	+	+	+	+	Central

Las bacterias se caracterizaron por la formación de colonias beige a blanquecinas, de consistencia cremosa y forma circular a irregular, con tamaños de 2 a 7 mm de diámetro, presentaron bordes aserrados o enteros (Tabla 7). La mayoría de las cepas presentó elevación plana, textura rugosa y transparencia opaca, con

excepción de L22-3 que mostró textura lisa, elevación convexa, además de consistencia mucóide y transparente. La morfología colonial y los resultados de las pruebas bioquímicas son consistentes con las características reportadas en la literatura para especies del género *Bacillus* (Garrity *et al.*, 2009).

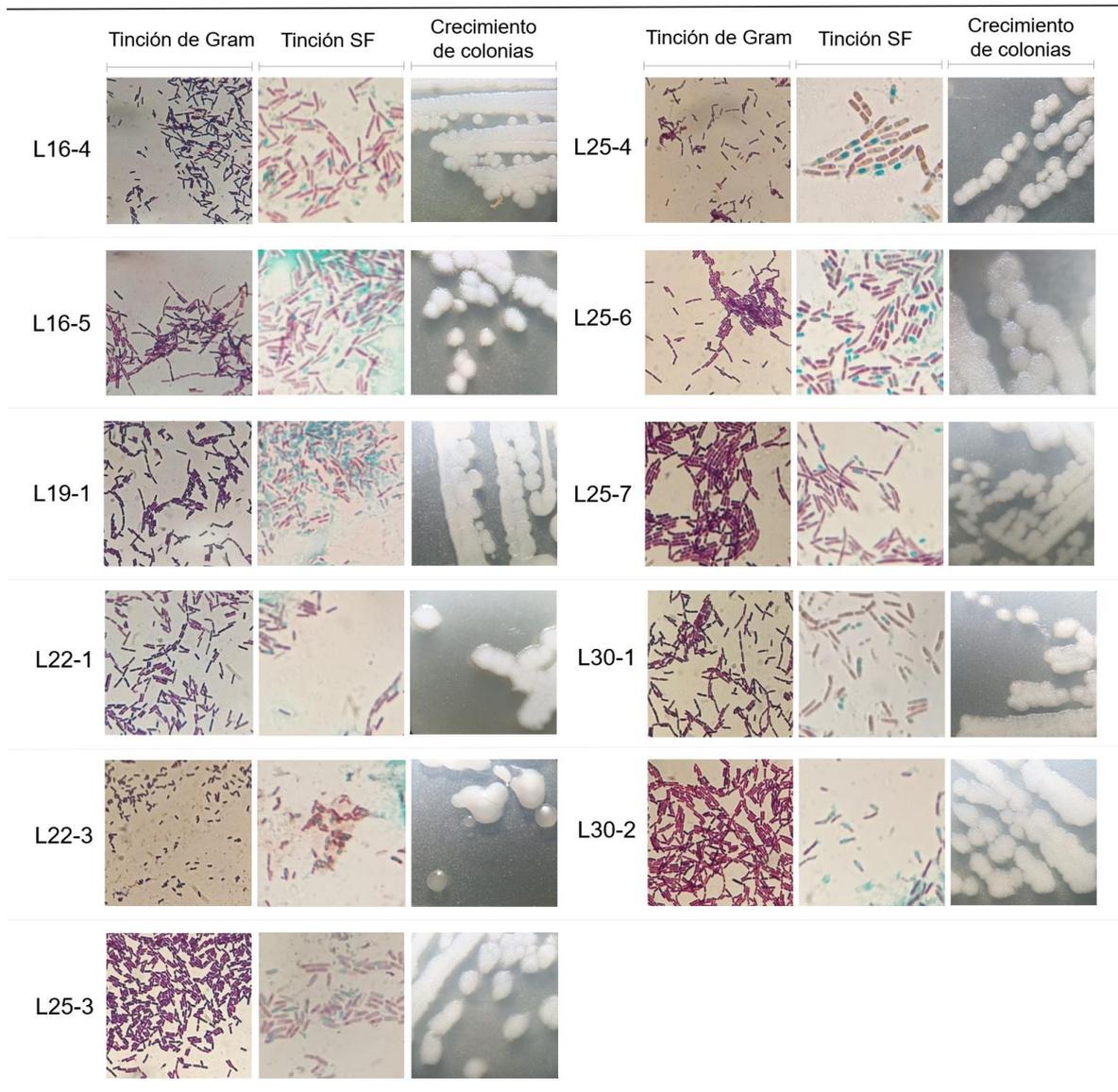


Figura 8. Caracterización microscópica y morfología colonial de las cepas de *Bacillus* spp. Tinción de Gram, tinción de Schaeffer-Fulton y crecimiento de las colonias. Las tinciones se visualizaron en microscopio triocular Leica DM1000 bajo el objetivo 100x. Las imágenes de la derecha corresponden al crecimiento de las colonias en medio de cultivo agar tripticaseína incubados a 28 °C por 24 h.

Tabla 7. Descripción morfológica de las colonias de *Bacillus* spp. en medio de cultivo TSA.

Cepa	*Tamaño	Borde	Textura	Elevación	Consistencia	Transparencia
L16-4	Pequeña	Entero	Rugosa	Plana	Suave	Opaca
L16-5	Mediana	Aserrado				
L19-1	Pequeña					
L22-1						
L22-3	Mediana	Entero	Lisa	Convexa	Mucoide	Transparente
L25-3		Aserrado				
L25-4						
L25-6	Pequeña	Entero	Rugosa	Plana	Suave	Opaca
L25-7		Aserrado				
L30-1						
L30-2	Mediana					

*Se clasifican como pequeñas colonias de 1 mm de diámetro, medianas de 2 mm y grandes > 3. (Vargas y Kuno, 2014).

9.1.2 Extracción de ADN

La integridad del ADN extraído se visualizó en el gel de agarosa debido a la capacidad del colorante fluorescente bromuro de etidio para actuar como agente intercalante entre las bases nitrogenadas (Green y Sambrook, 2019). Las bandas definidas y discretas en la parte superior del gel en los carriles 2 al 4 corresponden a ADN integro (Figura 9). Se descartó la presencia de material genético degradado debido a que no se observaron bandas desvanecidas a través de los carriles (Salazar *et al.*, 2013). Por otra parte, la concentración y pureza de las muestras se determinaron mediante la medición de la absorbancia a distintas longitudes de onda en el biospectrofotómetro (Figura 10). De acuerdo con Green y Sambrook (2018), los anillos aromáticos que forman parte de la estructura de los ácidos nucleicos se caracterizan por absorber la luz UV; las bases púricas y pirimídicas alcanzan absorbancias máximas a 260 nm, por esta razón, esta longitud de onda se considera estándar para la cuantificación de muestras de ADN. Sin embargo, la medición por espectrofotometría es sensible a diversas sustancias interferentes como proteínas, nucleótidos, ARN y otros contaminantes. La absorbancia establecida para medir la concentración de los grupos aromáticos de las proteínas y compuestos fenólicos es de 280 nm. De esta forma, la proporción entre las absorbancias 260 y 280 nm funciona como el principal indicador de pureza del ADN. La relación óptima 260/280 es de 1.8 a 2.0 (Bunu *et al.*, 2020). Por otro parte, los

residuos de sales caotrópicas se absorben a 230 nm y la relación 260/230 es una medida secundaria de pureza, en la cual se consideran deseables valores superiores a 1.8 (Boesenberg *et al.*, 2012; Mancera, 2020). En este estudio se obtuvo una concentración media de 421 ng/μL, una relación de absorbancias 260/280 de 1.88 y 260/230 de 1.8 (Tabla 8). Las muestras de ADN que presentaron bandas integras en el gel de electroforesis, además de valores de pureza adecuados y concentraciones superiores a 25 ng/μL, fueron seleccionadas para la amplificación por PCR.

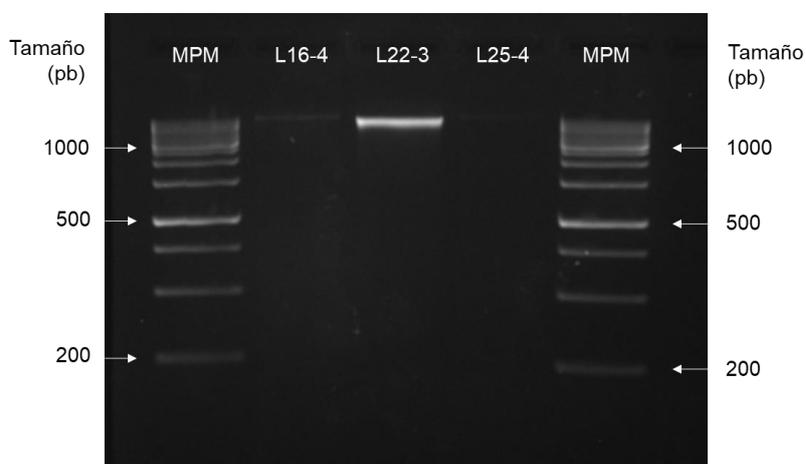


Figura 9. Imagen representativa de la electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los carriles 1 y 5 corresponden al marcador de peso molecular (1Kb), carril 2 al 4 al ADN de las cepas L16-4, L22-3 y L25-4, respectivamente.

Tabla 8. Concentración y pureza del ADN.

Aislado	Concentración (ng/ μL)	Pureza	
		A260/A280	A260/A230
L16-4	221.3	1.95	2.06
L16-5	268.9	1.93	1.97
L19-1	1102.3	1.99	2.24
L22-1	82.0	1.88	1.67
L22-3	55.3	1.97	1.04
L25-3	179.4	1.87	1.87
L25-4	101.1	1.74	1.44
L25-6	189.1	1.82	1.62
L25-7	738.0	1.78	1.97
L30-1	253.9	1.78	1.79
L30-2	1440.2	1.98	2.17

*Determinación en bioespectrofotómetro con el procesador SW-Version: 4.2.3.0

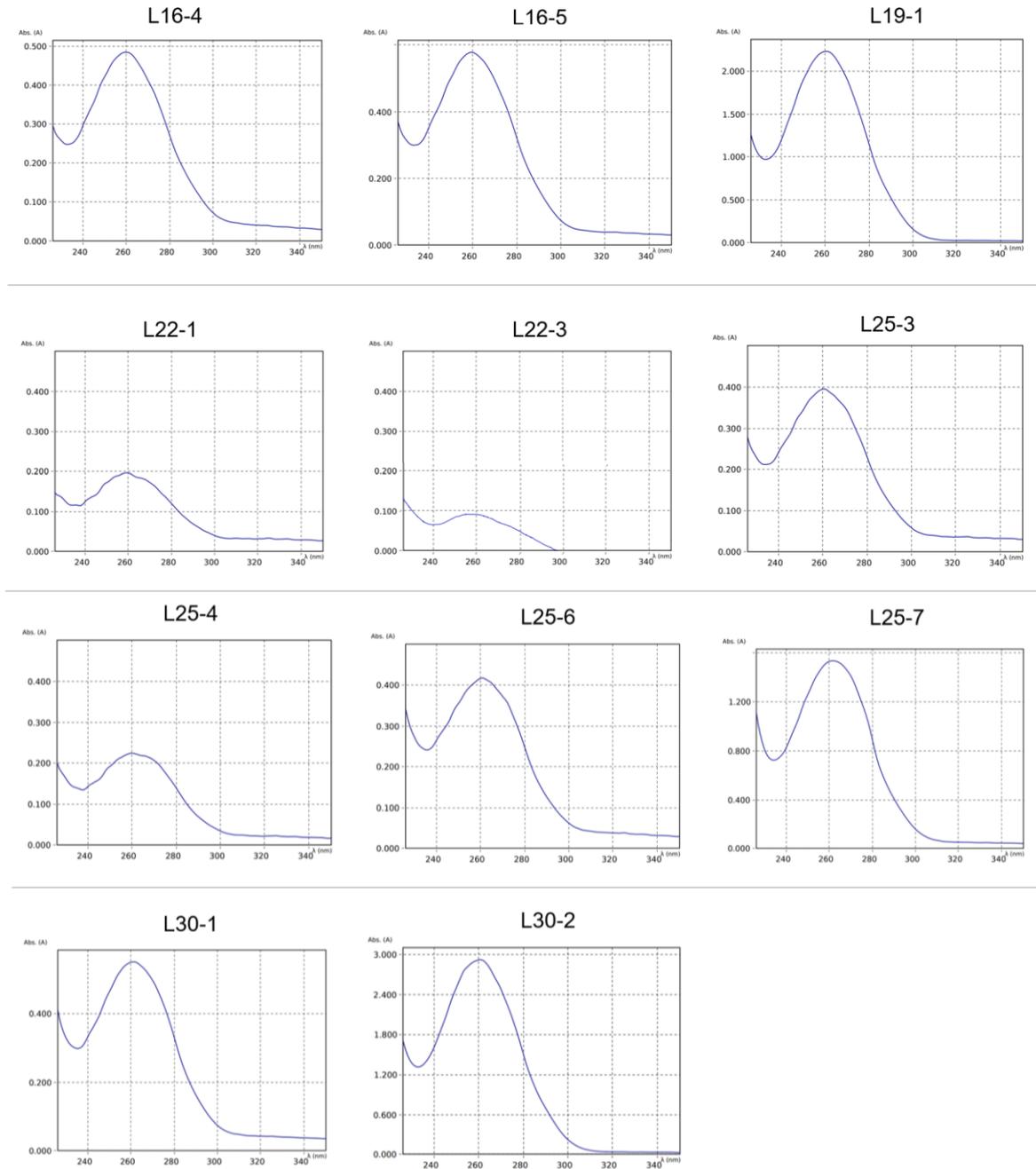


Figura 10. Valor de absorbancia a distintas longitudes de onda en las muestras de ADN extraído. Datos obtenidos en biospectrofotómetro con el procesador SW-Version: 4.2.3.0.

9.1.3 Identificación molecular

De la secuenciación del fragmento ARNr 16S se obtuvieron secuencias ensambladas con una longitud media de 1450 pb. De acuerdo con la evaluación de secuencias, el 90% de las cepas pertenece a *Bacillus* grupo *cereus* y solamente una cepa corresponde a *Bacillus* grupo *subtilis* (Tabla 9). Las cepas L16-4 y L16-5

presentaron una similitud de 99.86% con *B. cereus* (MK780061.1). De forma similar L25-3 (100% de similitud con MT332156.1), L25-4 (99.72% de similitud con KT720292.1), L25-7 (99.93% de similitud con MT492023.1), L30-1 (100% de similitud con MN746202.1) y L30-2 (99.93% de similitud con MK592620.1) se identificaron como *B. cereus*. Por otra parte, las cepas L22-1 y L25-6 presentaron un 99.79 y 99.93% de similitud con *B. thuringiensis* (OM648228.1 y OP359440.1, respectivamente). La cepa L19-1 se identificó como *B. wiedmannii* por presentar un 99.86% de similitud con MT124531.1. Finalmente, la cepa L22-3 reveló un 100% de similitud con *B. subtilis* (KU922339.1). Estos resultados son similares a los reportados por Hernández *et al.* (2023) quienes identificaron 21 cepas como *B. cereus* y una más como *B. thuringiensis* a partir de muestras edáficas de la misma zona productora. Dentro de las especies del grupo *B. cereus* se observó una alta homogeneidad genética. De acuerdo con la literatura, el gen 16S ARNr se encuentra altamente conservado entre las especies de *Bacillus*. Particularmente, *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. wiedmannii* presentan una alta similitud genética que dificulta su identificación (Adeoti *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022).

Distintos autores han evaluado el uso de *B. subtilis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* como promotores de crecimiento vegetal (Cochard *et al.*, 2022; Antil *et al.*, 2022; Jo *et al.*, 2020) e inductores de tolerancia a estrés abiótico (Gowtham *et al.*, 2020, Saad y Abo-Koura, 2018; Lozo *et al.*, 2022). En un estudio reciente, Karimzad *et al.*, (2023) reportaron la actividad bioprotectora de *B. wiedmannii* como método novedoso para incrementar el rendimiento bajo condiciones de estrés por sequía.

Tabla 9. Identificación molecular de las cepas de *Bacillus* spp.

Cepa	Identificada como	Número de Acceso	% Similitud	Accesión (Secuencia de referencia)	Similitud de nucleótidos
Bc16-4	<i>B. cereus</i>	OR533503	99.86	MK780061.1	1446/1448
Bc16-5	<i>B. cereus</i>	OR533504	99.86	MK780061.1	1449/1451
Bw19-1	<i>B. wiedmannii</i>	OR533505	99.86	MT124531.1	1448/1450
Bt22-1	<i>B. thuringiensis</i>	OR533506	99.79	OM648228.1	1456/1459
Bs22-3	<i>B. subtilis</i>	OR533507	100.00	KU922339.1	1450/1450
Bc25-3	<i>B. cereus</i>	OR533509	100.00	MT332156.1	1447/1447
Bc25-4	<i>B. cereus</i>	OR533510	99.72	KT720292.1	1446/1450
Bt25-6	<i>B. thuringiensis</i>	OR533511	99.93	OP359440.1	1448/1449
Bc25-7	<i>B. cereus</i>	OR533512	99.93	MT492023.1	1451/1452
Bc30-1	<i>B. cereus</i>	OR533513	100.00	MN746202.1	1449/1449
Bc30-2	<i>B. cereus</i>	OR533514	99.93	MK592620.1	1440/1441

*Análisis de secuencia basado en el fragmento ARNr 16S y porcentajes de similitud con secuencias homologas disponibles en el banco de genes del NCBI.

9.2 EVALUACIÓN DE LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO

9.2.1 Promoción de germinación *in vitro*

Parámetros de germinación e índices

La baja tasa de germinación y la elevada variabilidad en la capacidad germinativa se consideran las principales limitantes agronómicas para la domesticación del chiltepín (Alcalá *et al.*, 2019; López *et al.*, 2020). Cano *et al.* (2015) evaluaron la cinética de imbibición y distribución de biomasa de semillas de *C. annuum* var. *glabrisculum* y demostraron que, debido a que la cubierta seminal es permeable, el proceso de absorción de agua no se ve limitado por ninguna barrera física, por lo tanto, la baja tasa de germinación se atribuye directamente a la latencia fisiológica natural de la semilla. Otros estudios han reportado que este mecanismo incluye proteínas de latencia y regulación hormonal y actúa como ventaja evolutiva al impedir la germinación en sitios de baja disponibilidad de recursos como el agua, luz y nutrientes, favoreciendo la adaptación a condiciones ambientales adversas (Alcalá *et al.*, 2019). Además, se sugiere que altas concentraciones de capsaicina en la semilla bloquean el proceso de germinación (Quintero *et al.*, 2018).

Se han evaluados tratamientos térmicos, mecánicos, hormonales y químicos para incrementar la tasa de germinación del chiltepín, entre ellos destaca la aplicación exógena de giberelinas, nitrato de potasio y peróxido de hidrogeno (Cano *et al.*, 2015). López *et al.* (2020) presentaron una tasa del 71% al exponer la semilla a luz solar, mientras que Alcalá *et al.* (2019) reportaron una capacidad germinativa del 69% cuando se aplica AG₃ en combinación con escarificación mecánica. Otros estudios demuestran que el chile chiltepín tratado con AG₃ (400 ppm) y un fotoperiodo de 10 horas luz alcanza una germinación del 90% al 21 DDS (Araiza *et al.*, 2011). En este estudio evaluamos el efecto del tratamiento biológico mediante la aplicación de *Bacillus* spp. La dinámica de germinación se muestra en la Figura 11. El registro comenzó el día 6 DDS al iniciar el desarrollo radicular. Esto coincide con la reportado en la literatura (5-15 DDS) (Araiza *et al.*, 2011; Cano *et al.*, 2015). El comportamiento fue variable en función del tratamiento. Al día 19 el control tratado con medio de cultivo alcanzó una tasa de germinación media del 84%, en comparación las cepas Bc25-4, Bc30-2 y Bc25-7 alcanzaron un 91, 89 y 88%,

respectivamente. Las diferencias estadísticas en la TG se evaluaron al día 11 DDS considerando que el control negativo superó el 50% (Tabla 10). Para ese momento el 45.4% de los tratamientos mostraron diferencias con respecto al control (56%) alcanzando una tasa de hasta 74% (Bc25-4 y Bc25-7). Del mismo modo, se presentaron diferencias entre los controles tratados con medio cultivo (C_N) y el control con agua destilada (C_{H_2O}), sugiriendo un efecto adverso en la germinación de chiltepín al tratar la semilla con medio. Varios autores han reportado que *Bacillus* spp. promueve la germinación de especies del género *Capsicum*. Sosa *et al.* (2019) al inocular semillas de chile habanero (*C. chinense* Jacq.) con *Bacillus* sp. CBCRF12 observaron un incremento del 3% en la tasa de germinación. De forma similar, Chowdhury *et al.* (2020) encontraron un aumento del 24% en la tasa de germinación de pimientos al ser tratados con *Bacillus* sp. LBF-01. Bolaños *et al.* (2021) reportaron 23.61% mayor germinación en semillas de chile (*C. annuum* L.) inoculadas con *B. licheniformis* M2-7. En otro estudio, *Bacillus* sp. BSp.3/aM aumentó 4.25% la germinación de *C. annuum* L. cv. G-4 (Jayapala *et al.*, 2019), mientras que Yildirim *et al.* (2021) reportaron un incremento del 14.68% en chiles cv. “Kandil Dolma” tratados con *B. subtilis*. Los incrementos en la tasa de germinación pueden atribuirse a la producción de reguladores de crecimiento de origen bacteriano, como las giberelinas, citocininas y auxinas, debido a que existe una relación directa entre la concentración de fitohormonas y el estado fisiológico de la semilla de chiltepín (López *et al.*, 2020). Las giberelinas inducen la movilización de nutrientes y la síntesis de hidrolasas que actúan en la degradación de los productos de almacenamiento que constituyen el endospermo (Vieira *et al.*, 2002). De acuerdo con Chowdhury *et al.* (2020), la producción de reguladores de crecimiento destaca como el principal mecanismo de *Bacillus* sp. LBF-01 involucrado en la germinación de semillas de chile.

El incremento en la capacidad germinativa observada en este estudio, incluso en el control, puede atribuirse al pretratamiento de la semilla en H_2O_d descrita por Quintero *et al.* (2018) como “hydropriming”, debido a que la imbibición produce una alteración hidrofóbica que estimula los procesos metabólicos necesarios para la germinación (Yildirim *et al.*, 2021).

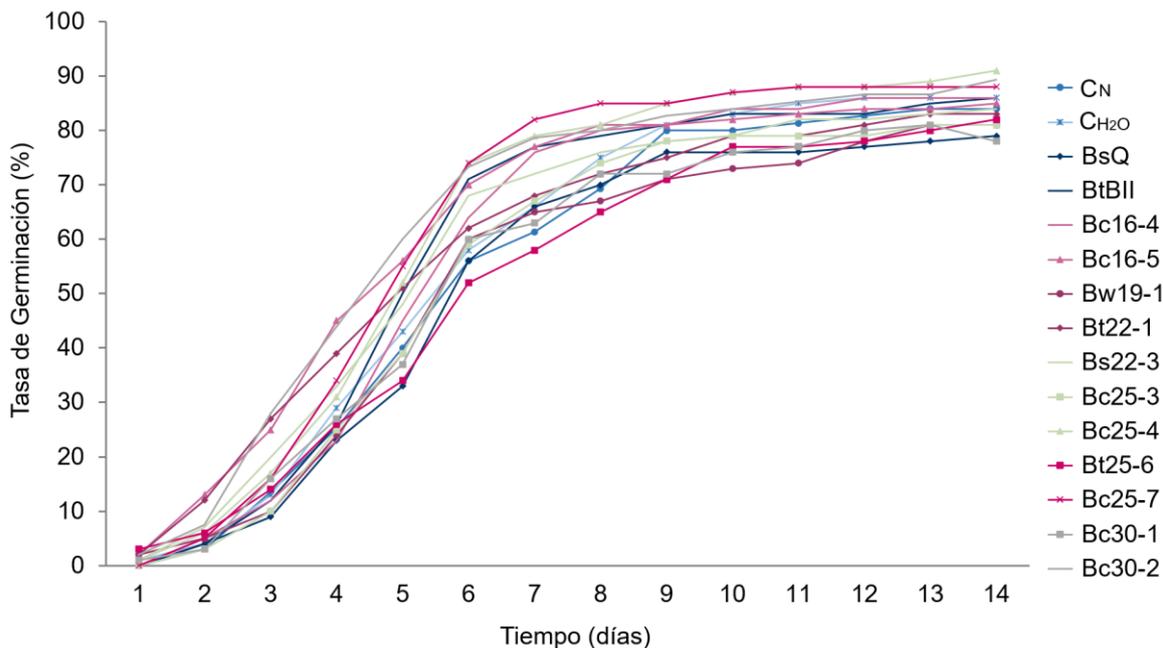


Figura 11. Dinámica de germinación de semillas de chiltepin tratadas con *Bacillus* spp. bajo condiciones *in vitro*.

Tabla 10. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en los parámetros de germinación del chiltepin bajo condiciones *in vitro*.

Tratamiento	TG (%)	VMG (semillas/día)	TMG (días)	IVG
C _N	56 ± 8.6 b	0.888 ± 0.14 b	7.45 ± 0.20 a	8.878 ± 1.40 b
CH ₂ O	58 ± 16.1 b	0.944 ± 0.19 b	7.43 ± 0.41 a	9.437 ± 1.91 b
BsQ	56 ± 14.6 b	0.851 ± 0.12 b	7.50 ± 0.36 a	8.506 ± 1.29 b
BtBII	71 ± 3.8 a	1.006 ± 0.13 a	7.36 ± 0.13 a	10.057 ± 1.32 a
Bc16-4	64 ± 9.8 b	0.974 ± 0.17 b	7.45 ± 0.32 a	9.740 ± 1.69 b
Bc16-5	70 ± 11.5 a	1.154 ± 0.10 a	6.99 ± 0.14 b	11.545 ± 1.06 a
Bw19-1	60 ± 11.3 b	0.871 ± 0.11 b	7.34 ± 0.17 a	8.707 ± 1.14 b
Bt22-1	62 ± 11.3 b	1.058 ± 0.21 a	7.02 ± 0.36 b	10.580 ± 2.15 a
Bs22-3	68 ± 7.3 a	1.025 ± 0.10 a	7.18 ± 0.28 b	10.250 ± 1.03 a
Bc25-3	59 ± 8.2 b	0.896 ± 0.07 b	7.46 ± 0.10 a	8.958 ± 0.72 b
Bc25-4	74 ± 2.3 a	1.080 ± 0.00 a	7.26 ± 0.08 a	10.802 ± 0.08 a
Bt25-6	52 ± 11.7 b	0.854 ± 0.12 b	7.33 ± 0.19 a	8.540 ± 1.25 b
Bc25-7	74 ± 6.9 a	1.099 ± 0.10 a	7.27 ± 0.16 a	10.991 ± 0.99 a
Bc30-1	60 ± 8.6 b	0.894 ± 0.13 b	7.33 ± 0.08 a	8.937 ± 1.34 b
Bc30-2	73 ± 9.9 a	1.167 ± 0.14 a	7.02 ± 0.10 b	11.669 ± 1.47 a

*TG (11 DDS), VMG, TMG e IVG (15 DDS) en semillas tratadas. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Otro aspecto de importancia es la preselección de la semilla ya que este procedimiento asegura la viabilidad de la misma (López *et al.*, 2020).

Por otra parte, los índices de vigor y de germinación se emplearon como indicadores de la potencia de la semilla en el proceso de germinación (Figura 12). Reed *et al.* (2022) mencionan que el índice de vigor reúne las propiedades para determinar el rendimiento potencial de las semillas viables durante el proceso de germinación. Las bacterias Bs22-3, Bc25-4, Bc25-7 y Bc30-2 mostraron un incremento en el índice de vigor de 65.16% (Apéndice I). Mientras que el resto de los tratamientos no presentaron diferencias significativas. En comparación, Chowdhury *et al.* (2020) reportó un aumento en el índice de vigor de hasta 592.8% en semillas chile tratadas con *Bacillus* sp. LBF-01. En otro estudio, Jayapala *et al.* (2019) observaron un incremento del 8.35% en el índice de vigor en plantas de chile mediante bioprimering con carboximetilcelulosa como agente adherente a *Bacillus* sp. BSp.3/aM. Resultados similares se encontraron al evaluar el índice de germinación, indicador que permite integrar el porcentaje de germinación y el crecimiento de las raíces (Zucconi *et al.*, 1981). Las bacterias Bs22-3, Bc16-5, Bc25-4, Bc25-7 y Bc30-2 mostraron valores estadísticamente superiores al control (98.94%) con una media de 200.26%. En contraste, la cepa Bw19-1 disminuyó considerablemente el índice de germinación. Estos resultados son superiores a los reportados por Jayapala *et al.* (2019), quienes obtuvieron un incremento del índice de 9.59% con el tratamiento de *Bacillus* sp., en comparación con las plántulas control. El aumento en el índice de germinación puede atribuirse a la producción de auxinas exógenas (Yildirim *et al.*, 2021), las cuales permiten el desarrollo radicular temprano (López *et al.*, 2020), mediante la división celular y la extensibilidad de la pared por acción enzimática (Bewley, 1997). Estos resultados sugieren que el tratamiento con las cepas del género *Bacillus* favorece el establecimiento exitoso de las plántulas mediante el desarrollo acelerado de raíces que permite la búsqueda de humedad en el suelo y el crecimiento rápido de los brotes con la finalidad de alcanzar la superficie.

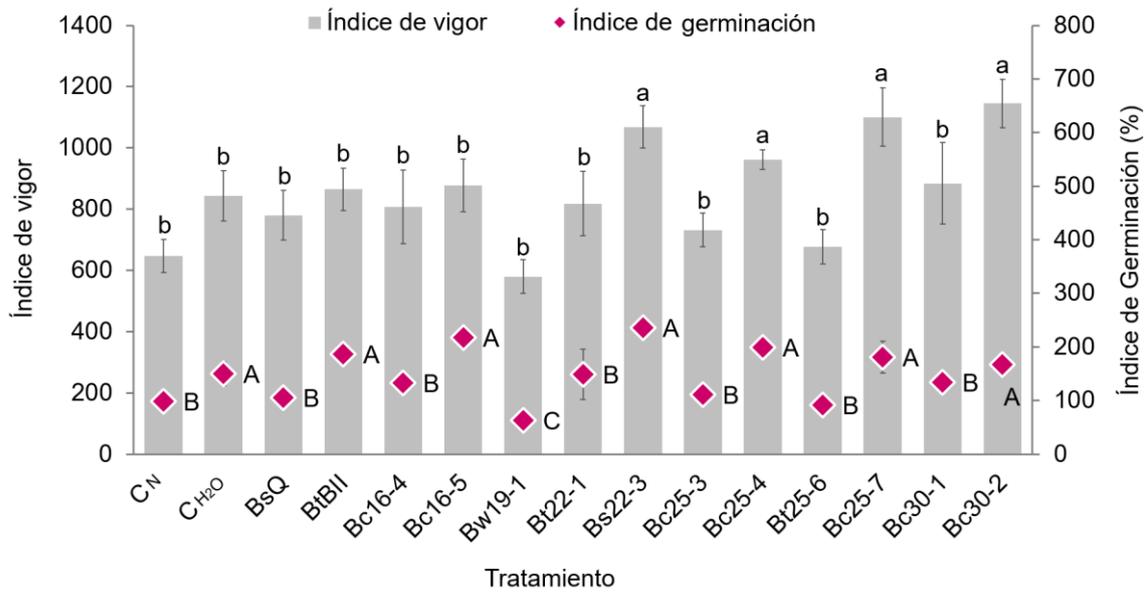


Figura 12. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en el índice de vigor e índice de germinación del chiltepin bajo condiciones *in vitro*. Índices en semillas tratadas al día 11 DDS. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones. Las barras en los rectángulos y rombos indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Los parámetros de VMG, TMG e IVG fueron calculados considerando el número de semillas germinadas hasta el día 15 debido a la estabilización del comportamiento observada en ese momento. La media general del tiempo de germinación para las semillas de chiltepin fue de 7.3 días, en comparación con el MGT reportado en *Capsicum chinense* Jacq. (6.72 días) y *Capsicum frutescens* L. (8.8 días) (Sosa *et al.*, 2019; Dutta *et al.*, 2019). Las cepas Bc16-5, Bt22-1, Bs22-3 y Bc30-2 redujeron el tiempo de germinación hasta 0.46 días. Esto es consistente con los resultados reportados por Sosa *et al.* (2019) quienes presentaron una reducción de 0.66 días en la germinación de semillas inoculadas con *Bacillus* sp. CBCRF12. En otro reporte, *B. subtilis* Bs1 y *B. mojavencis* ApBm disminuyeron significativamente el tiempo de germinación en semillas de *C. annum* (Yildirim *et al.*, 2021). Los tratamientos mostraron un comportamiento similar en la VMG e IVG. De acuerdo con los parámetros evaluados seis de las bacterias aceleran el proceso de germinación en chiltepin. El tratamiento Bc30-2 mostró mayor velocidad al superar al control con 0.279 semillas germinadas/día. Este resultado es superior a lo reportado en la literatura (0.017 semillas/día) (Sosa *et al.*, 2019). La aceleración del

proceso de germinación se atribuye a la producción bacteriana de enzimas y sideróforos (Yildirim *et al.*, 2021) y es de particular interés en condiciones de estrés (Reed *et al.*, 2022).

Parámetros vegetativos

Las características morfológicas de las plántulas fueron evaluadas mediante parámetros vegetativos (Figura 13). En todos los parámetros se encontraron diferencias significativas. Las cepas Bs22-3, Bc25-7, Bc30-1 y Bc30-2 mostraron un incremento significativo en altura de plántulas comparadas con el control (11.7 mm) con una media de 15.15 mm (Tabla 11). Mientras que las plántulas tratadas con la cepa Bw19-1 presentaron una disminución significativa de la longitud de vástago con un promedio de 9.7 mm. El efecto adverso de la inoculación de semillas con Bw19-1 se observó considerablemente en la longitud de raíz. Por el contrario, cinco de los tratamientos evaluados presentaron medias estadísticamente superiores al control con un aumento en longitud de raíz y diámetro de tallo de hasta 85.83 y 15.66%, respectivamente. Otros autores han reportado que el tratamiento de semillas de chile con bacterias del género *Bacillus* favorece el desarrollo radicular temprano de las plántulas (Yildirim *et al.*, 2021). Con excepción de Bc16-4 y Bw19-1, la totalidad de los tratamientos incrementaron significativamente el peso fresco de las plántulas (Figura 14). De forma similar, Sosa *et al.*, (2020) presentaron incrementos del 12.26, 12.72 y 6.93% en altura, diámetro de tallo y peso fresco, respectivamente, en plantas de chile habanero tratadas con *Bacillus* sp. CBCC57. Este efecto positivo en el desarrollo vegetal se asocia a la producción AIA de origen bacteriano, el cual induce la formación de raíces mejorando la absorción de agua y nutrientes (Chowdhury *et al.* 2020). Por otra parte, el índice de esbeltez, calculado como la relación entre la altura y el diámetro del cuello de la raíz, se empleó como un indicador de la calidad y resistencia de las plántulas (Sáenz *et al.*, 2014). Valores por debajo de 6.0 corresponden a plantas de buena calidad (Acevedo *et al.*, 2020). Los tratamientos Bs22-3, Bc25-7 y Bc30-2 mostraron plantas más esbeltas en comparación con el control, mientras que Bc16-4 y Bw19-1 presentaron valores significativamente inferiores en el índice correspondientes a plantas más robustas. En este estudio también se presentaron diferencias entre los

controles C_{H_2O} y C_N en la mayoría de los parámetros vegetativos y de germinación evaluados, razón por la cual se recomienda evitar el uso de medio de cultivo como recurso para la aplicación de *Bacillus* spp.

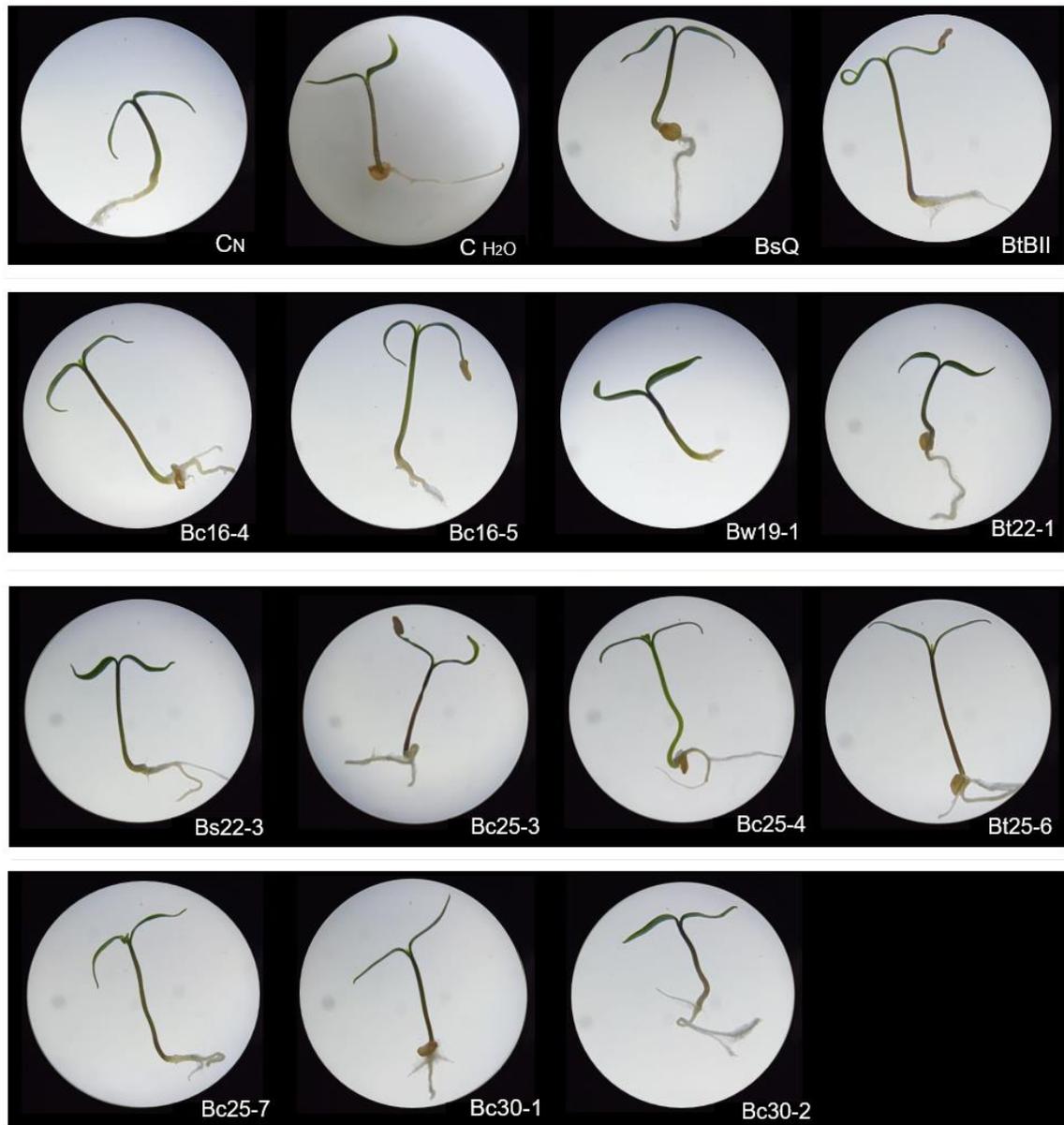


Figura 13. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en el crecimiento *in vitro* de plántulas de chiltepin. Imágenes representativas de las plántulas tratadas al día 19 DDS obtenidas con el estereoscopio Nikon SMZ 745T.

Tabla 11. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en parámetros vegetativos del chiltepín bajo condiciones *in vitro*. Longitud de raíz, diámetro de tallo y altura de plántulas tratadas al día 19 DDS. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	Altura (mm)	Diámetro de tallo (mm)	Longitud de raíz (mm)
C _N	11.702 ± 2.80 b	0.817 ± 0.251 b	9.740 ± 3.26 c
C _{H₂O}	14.889 ± 2.64 a	0.788 ± 0.107 b	14.034 ± 3.60 b
BsQ	14.138 ± 2.52 a	0.817 ± 0.154 b	10.268 ± 3.10 c
BtBII	12.120 ± 1.60 b	0.886 ± 0.084 a	13.950 ± 2.88 b
Bc16-4	12.513 ± 3.17 b	0.919 ± 0.185 a	11.273 ± 3.12 c
Bc16-5	12.594 ± 2.88 b	0.821 ± 0.089 b	15.495 ± 4.16 a
Bw19-1	9.707 ± 1.69 c	0.830 ± 0.161 b	5.822 ± 2.32 d
Bt22-1	13.286 ± 2.77 b	0.892 ± 0.131 a	12.360 ± 5.38 b
Bs22-3	15.720 ± 2.15 a	0.910 ± 0.078 a	18.100 ± 5.36 a
Bc25-3	15.564 ± 2.73 b	0.816 ± 0.109 b	10.365 ± 3.56 c
Bc25-4	12.986 ± 2.63 b	0.926 ± 0.119 a	14.700 ± 4.74 b
Bt25-6	13.351 ± 3.63 b	0.854 ± 0.159 b	9.727 ± 3.57 c
Bc25-7	14.807 ± 2.76 a	0.829 ± 0.109 b	13.110 ± 4.38 b
Bc30-1	14.574 ± 2.86 a	0.945 ± 0.193 a	12.082 ± 2.92 b
Bc30-2	15.645 ± 1.83 a	0.790 ± 0.113 b	12.670 ± 3.61 b

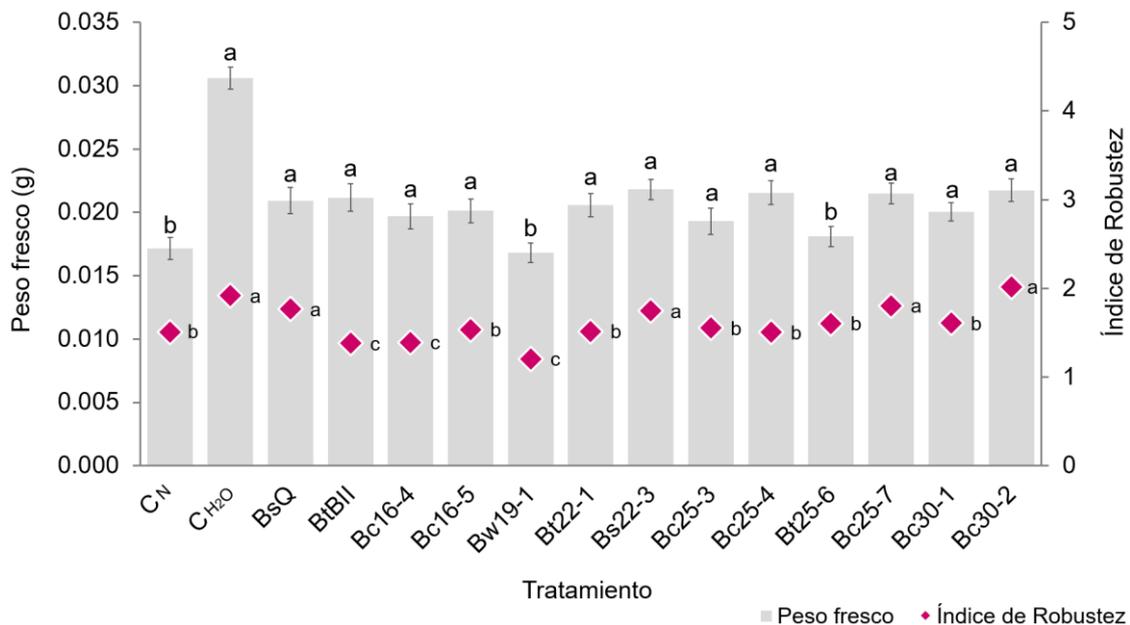


Figura 14. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en el peso fresco e índice de esbeltez del chiltepín bajo condiciones *in vitro*. Plántulas tratadas al día 19 DDS. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones. Las barras en los rectángulos y rombos indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

En el análisis PCA de los parámetros vegetativos del ensayo de promoción de germinación *in vitro*, el CP1 explicó el 63.2% y el CP2 el 23.4% de la variación de los datos (Figura 15). De acuerdo con el análisis de conglomerados de K-medias se encontró que el grupo con mayor efecto positivo en el crecimiento se integró por las bacterias Bs22-3, Bc30-1, BtBII, Bt22-1, Bc16-4, Bc16-5 correspondiente a los parámetros de peso fresco, altura, longitud de raíz y diámetro de tallo. Por otro lado, las bacterias Bc25-3, Bc25-7 y Bc30-2, junto con el control comercial mostraron un desempeño medio en la promoción de crecimiento considerando todos los parámetros. Finalmente, las bacterias Bt25-6, Bw19-1 y las plántulas sin tratamiento integraron el grupo de menor potencial como PGPR en chiltepín.

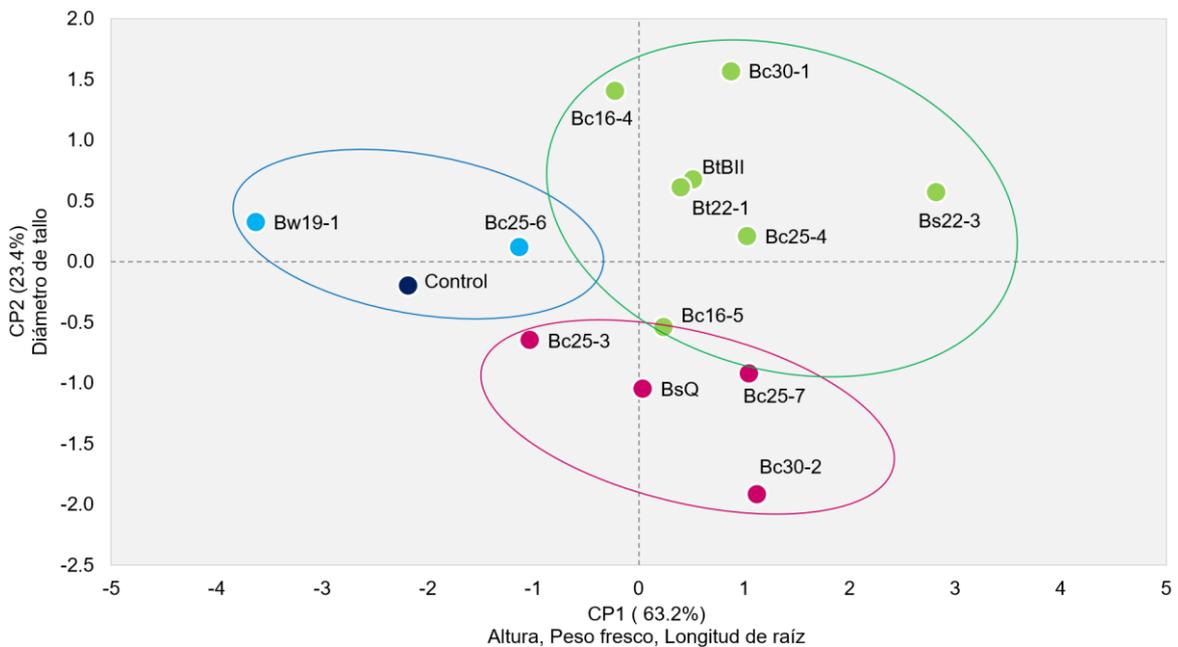


Figura 15. Análisis PCA y de conglomerados con K-medias de parámetros vegetativos en plántulas de chiltepín tratadas con *Bacillus* spp.

Anatomía de la raíz

De acuerdo con la literatura se han observado alteraciones en la arquitectura radicular de plantas tratadas con especies del género *Bacillus* (Gashash *et al.*, 2022). En este estudio se evaluó la anatomía de raíz de plántulas de chiltepín mediante la determinación del espesor de raíz y tejido conectivo en raíces secundarias (Figura 16). Las diferencias estadísticas observadas en los

tratamientos fueron similares en ambos parámetros (Apéndice II). Las plántulas tratadas con las bacterias Bw19-1 y Bc25-3 presentaron las raíces y el tejido vascular más delgados (Figura 17). Del mismo modo, las bacterias Bt25-6 y Bc25-7 mostraron medias estadísticamente inferiores al control. Las semillas tratadas con H₂O_d desarrollaron raíces secundarias más delgadas que las tratadas con medio de cultivo. El resto de los tratamientos no presentó diferencias estadísticas en tejido conectivo. Estos resultados difieren de lo reportado por Agami *et al.* (2016) quienes mostraron un incremento en el grosor del tejido conectivo en tallos de plántulas de albahaca (*Ocimum basilicum*) inoculadas con PGPR. Así mismo, Vieira *et al.* (2020) describieron modificaciones en la arquitectura radicular al evaluar variables como longitud, superficie radicular, diámetro de raíz y peso fresco en plantas de maíz tratadas. Estos autores resaltan la importancia del desarrollo radicular en etapas tempranas del crecimiento vegetal para garantizar la absorción de agua, iones y nutrientes y, con ello, la promoción del crecimiento en la parte aérea de la planta. Esta modulación del desarrollo radicular también se ha asociado con la respuesta vegetal a estrés. La organogénesis de la raíz se atribuye principalmente al incremento en las concentraciones de auxinas y citocininas mediada por los microorganismos del suelo. Además, los PGPR mejoran la biodisponibilidad de los nutrientes en la zona de la rizósfera (Grover *et al.*, 2021).

Estos resultados integrados con la evaluación de longitud muestran raíces más alargadas y delgadas en la mayoría de los tratamientos en comparación con el control. Esto podría deberse a la elongación de raíz inducida por las bacterias y podría representar una ventaja en la absorción de agua y nutrientes en suelo. Las raíces de mayor grosor observadas en el control también se pueden atribuir a la cercanía con la raíz principal. Se recomienda en futuros experimentos evaluar otros parámetros como número y longitud de raíces secundarias, así como considerar la distancia de medición a partir de la raíz principal.

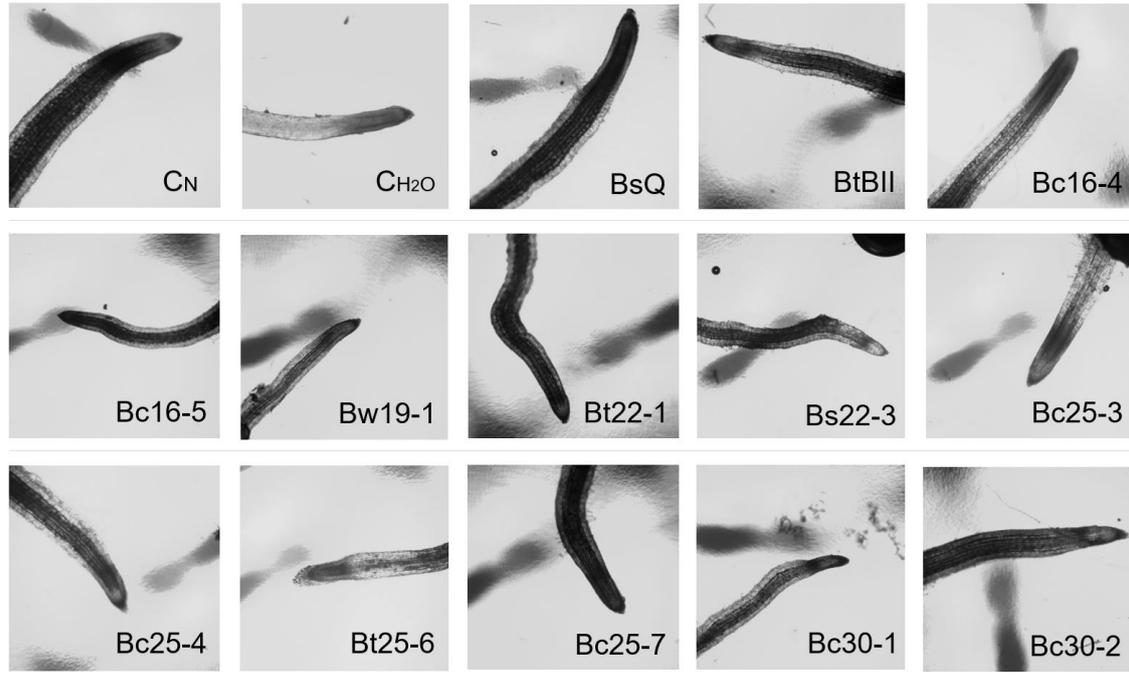


Figura 16. Anatomía de raíces secundarias de plántulas de chiltepín tratadas con *Bacillus* spp. Imágenes representativas al día 19 DDS, obtenidas con la cámara UCMOS USB 2.0 acoplada al microscopio triocular Leica DM1000 bajo el objetivo 4x.

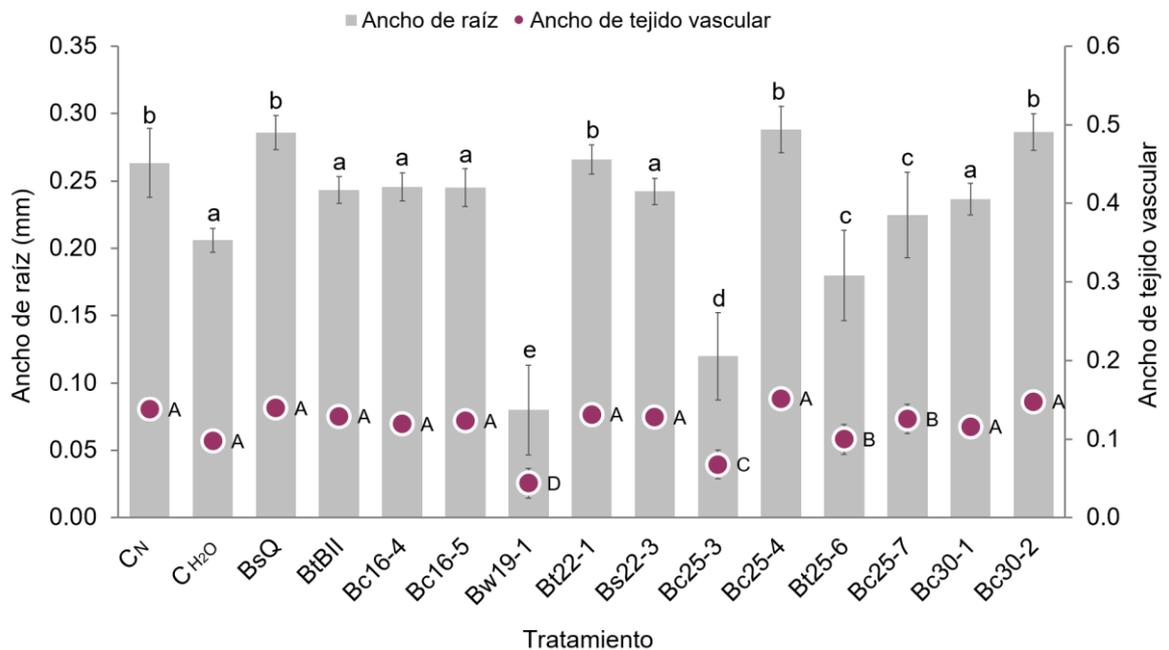


Figura 17. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en la anatomía de raíz del chiltepín. Espesor de raíz y sistema vascular en raíces secundarias de plántulas tratadas al día 19 DDS. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones. Las barras en los rectángulos y rombos indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

9.2.2 Promoción de crecimiento en invernadero

Las condiciones de temperatura y RH durante el desarrollo de las plántulas en invernadero se mantuvieron entre 4.7 a 57.0 °C y 2.3 a 90.1%, respectivamente (Figura 18). Las dinámicas de crecimiento y desarrollo foliar en función del tiempo se presentan en las Figuras 19 y 20; en ambos parámetros se observaron resultados favorables en las plántulas tratadas con las cepas de *Bacillus* spp. con excepción de la bacteria Bc25-4 (Figura 21). Los tratamientos Bc25-7 y Bs22-3 presentaron los valores más altos en altura, mientras que las plántulas tratadas con las bacterias Bc25-7 y Bc30-2 incrementaron la formación de hojas nuevas. De forma similar, Oluwatosin *et al.* (2022) evaluaron el crecimiento y el incremento progresivo en número de hojas de plantas de chile inoculadas con PGPR autóctonas y mostraron mayor desarrollo en los parámetros agronómicos evaluados.

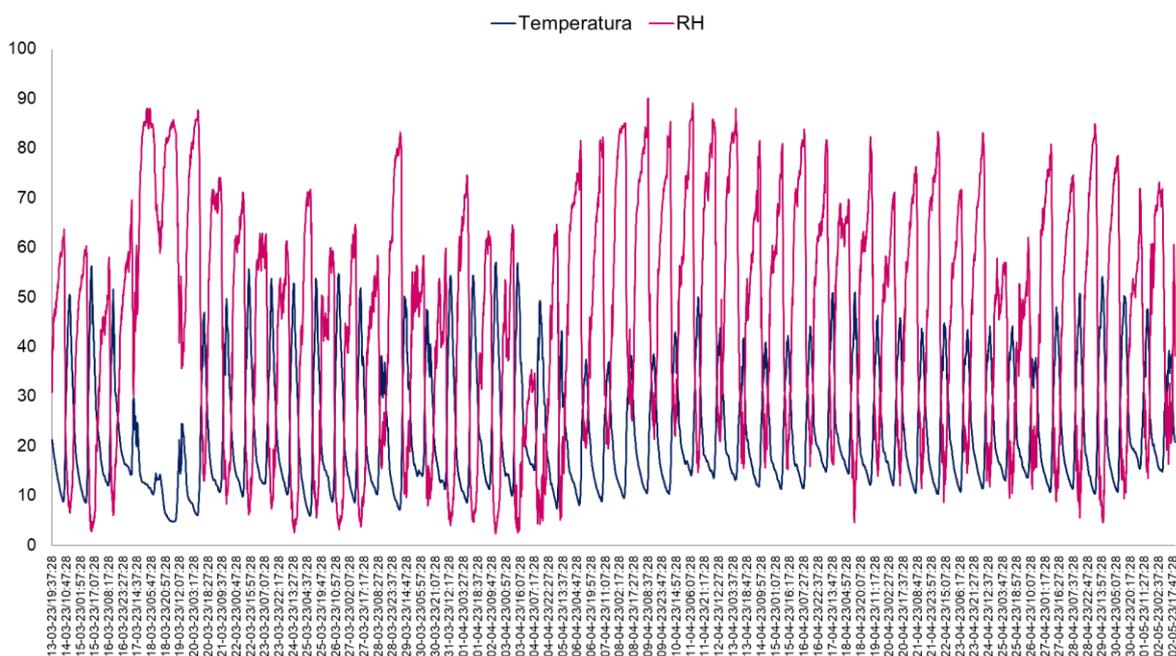


Figura 18. Temperatura y humedad relativa en el invernadero durante el desarrollo de plántulas de chiltepin tratadas con *Bacillus* spp.

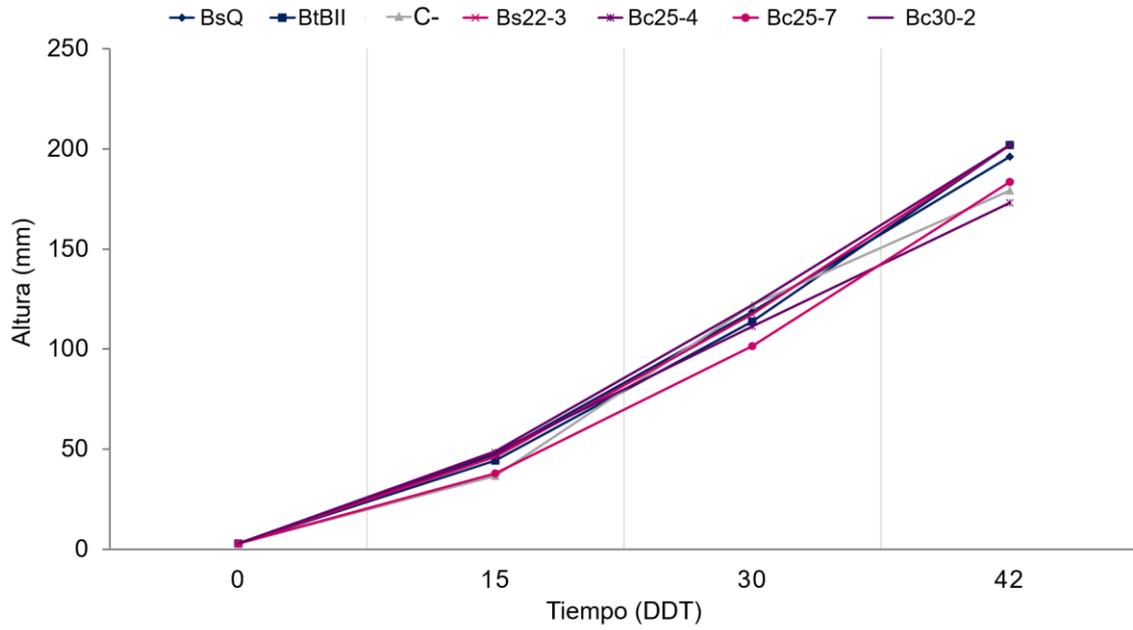


Figura 19. Dinámica de crecimiento de plántulas de chiltepín tratadas con *Bacillus* spp. bajo condiciones *in vivo*.

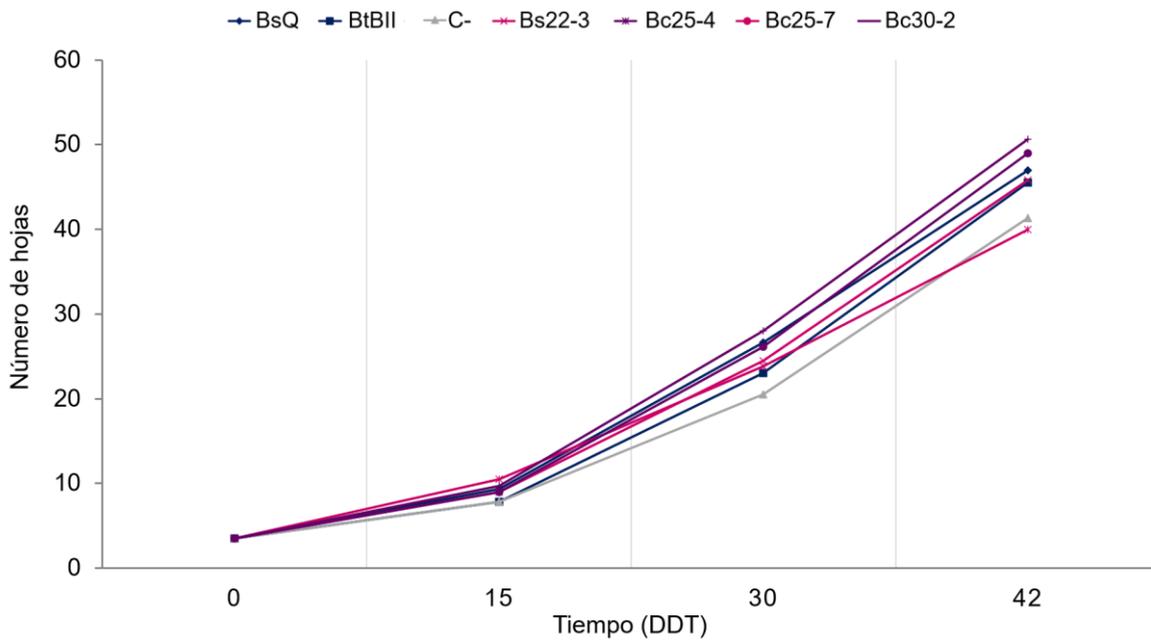


Figura 20. Dinámica de desarrollo foliar en plántulas de chiltepín tratadas con *Bacillus* spp. bajo condiciones *in vivo*.



Figura 21. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en chiltepín bajo condiciones *in vivo*. Plántulas tratadas al día 42 DDT. La escala de medición está dada en pulgadas.

No se observaron diferencias significativas en la altura y el diámetro de tallo, sin embargo, las bacterias incrementaron hasta 12.52 y 13.27% estas variables, respectivamente (Tabla 12). La falta de significancia estadística se debe a la considerable desviación estándar obtenida en los datos, esto podría atribuirse a la diversidad fenotípica propia de *C. annuum* var. *glabrisculum*. De acuerdo con Romero *et al.*, (2023) en el noroeste de México se presenta una alta variabilidad genética dentro de las poblaciones de chiltepín, esta variabilidad se aprecia en parámetros vegetativos de plantas desarrolladas bajo condiciones de crecimiento uniformes en invernadero. Por otro lado, las plántulas tratadas con las bacterias Bs22-3, Bc25-7 y Bc30-2 aumentaron significativamente la longitud de raíces con valores de 119.47, 115.10 y 117.98 mm respectivamente, en comparación con el control (105.62 mm). Esto es consistente con lo reportado en la literatura, incrementos de 38.8% en altura y 33.3% en longitud de raíz en plantas de chiltepín tratadas con *B. amyloliquefaciens* (García *et al.*, 2018). Incluso las especies del género *Bacillus* incrementan los parámetros de altura, diámetro de tallo y longitud de raíz en plantas de *Capsicum* sometidas a condiciones de estrés abiótico por salinidad, sequía y acumulación de metales pesados (Kazerooni *et al.*, 2021). Estos parámetros morfológicos se asocian al desarrollo vegetativo y a la mejora del rendimiento en los cultivos (Abdalla y Ibrahim, 2007). Además, el incremento en la

longitud de raíces favorece su uso como biofertilizante a través de una mayor absorción de agua y nutrientes (Sansinenea, 2019).

Tabla 12. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en altura, longitud de raíz y diámetro de tallo del chiltepín en condiciones de invernadero. Plántulas tratadas al día 42 DDT. Los datos están representados por la media de 6 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	Altura (mm)	Longitud de raíz (mm)	Diámetro de tallo (mm)
C -	179.3 ± 10.7 a	105.62 ± 8.34 b	2.63 ± 0.10 a
BsQ	196.2 ± 29.0 a	103.88 ± 9.31 b	2.82 ± 0.15 a
BtBII	202.0 ± 30.9 a	114.42 ± 11.3 a	3.00 ± 0.45 a
Bs22-3	201.8 ± 30.9 a	119.47 ± 12.4 a	2.82 ± 0.31 a
Bc25-4	173.0 ± 22.4 a	98.47 ± 14.2 b	2.80 ± 0.26 a
Bc25-7	201.8 ± 11.7 a	115.10 ± 8.36 a	2.98 ± 0.37 a
Bc30-2	183.0 ± 37.5 a	117.98 ± 12.7 a	2.68 ± 0.13 a

Los tratamientos de *Bacillus* no presentaron diferencias significativas en el número de hojas y área foliar al día 42 DDT (Figura 22). Sin embargo, la bacteria Bc30-2 incrementó 22.6% la formación de hojas nuevas, además se observó una expansión de la superficie foliar de hasta 42.2% al inocular las plantas con Bs22-3 (Apéndice III). Otros autores han reportado aumentos del 87.5 y 36.2% en número de hojas y área foliar, respectivamente, en plantas de chile jalapeño inoculadas con PGPR (Camacho *et al.*, 2022). De forma similar, Gou *et al.* (2020) probaron el efecto de cepas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Sinorhizobium* como biofertilizantes de plantas de chile y observaron incrementos en la longitud y ancho de hojas. Este efecto benéfico es atribuido principalmente a la modulación bacteriana de auxinas. De acuerdo con Jiménez *et al.* (2022) el incremento en la masa foliar del chiltepín aumenta la densidad estomática. Además, el crecimiento inicial acelerado de la superficie foliar durante la fase vegetativa tiene un efecto directo en el desarrollo de biomasa y rendimiento de los cultivos debido a que se asocia a la intercepción de luz y a la capacidad fotosintética (Rebetzke *et al.*, 2004; Lestari *et al.*, 2023). Así mismo, el desarrollo temprano del área foliar eficientiza el uso de agua al disminuir la pérdida por evapotranspiración del suelo y optimizar la transpiración (Rebetzke *et al.*, 2004).

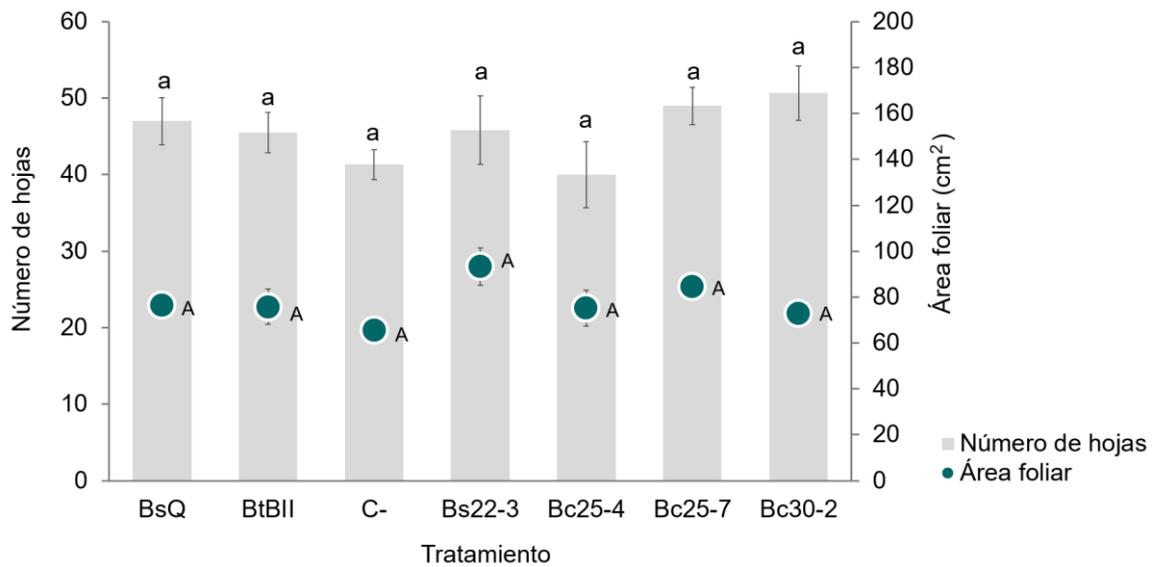


Figura 22. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en el número de hojas y área foliar del chiltepín. Plántulas tratadas y desarrolladas bajo condiciones de invernadero al día 42 DDT. Los datos están representados por la media de 6 repeticiones. Las barras en los rectángulos y rombos indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Los incrementos más altos en biomasa se observaron en las plántulas tratadas con la cepa Bc25-7, la cual incrementó un 47.78% el peso fresco total (Tabla 13). La biomasa foliar fresca fue estadísticamente superior en los tratamientos Bc25-7 y Bc30-2, con valores de 0.906 y 0.899 g, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron al evaluar el peso seco de las hojas, las plantas inoculadas con Bc25-7 presentaron valores superiores a los tratamientos Bs22-3 y Bt25-4 (Tabla 14). En contraste, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en peso fresco y seco de órganos como raíces y tallo. Otro estudio demuestra que el tratamiento con *B. amyloliquefaciens* aumenta 77 y 50% el peso fresco y seco, respectivamente, de *C. annuum* var. *aviculare* (García *et al.*, 2018). Hahm *et al.* (2017) también reportaron mayor biomasa en órganos como raíz y parte aérea de chile con el tratamiento de PGPR. El incremento en la biomasa total de plantas de chiltepín tratadas con *Bacillus* spp. se puede atribuir a una mayor acumulación de proteínas (García *et al.*, 2018). De acuerdo con Castillo *et al.* (2021) el aumento en el peso fresco de plantas de chile poblano se asocia con la mejora de la calidad del fruto.

Tabla 13. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en la biomasa fresca del chiltepín bajo condiciones *in vivo*.

Tratamiento	Peso fresco (g)			
	Hoja	Tallo	Raíz	Total
C -	0.524 ± 0.193 a	0.723 ± 0.185 a	1.326 ± 0.493 a	2.574 ± 0.724 b
BsQ	0.832 ± 0.186 a	0.815 ± 0.113 a	2.014 ± 0.419 a	3.661 ± 0.520 a
BtBII	0.863 ± 0.200 b	0.814 ± 0.141 a	2.036 ± 0.830 a	3.714 ± 0.981 a
Bs22-3	0.615 ± 0.173 b	0.808 ± 0.185 a	1.169 ± 0.418 a	2.591 ± 0.648 b
Bc25-4	0.472 ± 0.194 b	0.626 ± 0.124 a	1.776 ± 0.498 a	2.874 ± 0.709 b
Bc25-7	0.906 ± 0.084 a	0.899 ± 0.157 a	1.998 ± 0.810 a	3.802 ± 0.847 a
Bc30-2	0.899 ± 0.368 a	0.768 ± 0.215 a	1.416 ± 0.951 a	3.082 ± 1.438 b

*Peso fresco de hoja, tallo y raíz de plántulas tratadas al día 42 DDT. Los datos están representados por la media de 6 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

La inoculación de las plantas aumentó la concentración de pigmentos fotosintéticos en las hojas de chiltepín (Figura 23). El contenido de clorofila a resultó significativamente superior en todos los tratamientos y en la cepa BtBII con incrementos de hasta 42.26% al aplicar Bc25-7. Mientras el contenido de clorofila b en las plántulas tratadas con Bs22-3 fue estadísticamente superior al control (0.286 mg / g de peso fresco) y al resto de los tratamientos con un valor de 0.425 mg / g de peso fresco. Otros reportes presentan incrementos de 28.19% en clorofila a y 29.68% en clorofila b de plantas inoculadas (Hahm *et al.*, 2017).

Tabla 14. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en la biomasa seca del chiltepín bajo condiciones *in vivo*.

Tratamiento	Peso seco (g)			
	Hoja	Tallo	Raíz	Total
C -	0.172 ± 0.031 a	0.174 ± 0.035 a	0.172 ± 0.030 a	0.518 ± 0.064 a
BsQ	0.107 ± 0.043 b	0.161 ± 0.039 a	0.162 ± 0.045 a	0.429 ± 0.111 a
BtBII	0.149 ± 0.037 a	0.185 ± 0.023 a	0.187 ± 0.035 a	0.521 ± 0.162 a
Bs22-3	0.117 ± 0.045 b	0.173 ± 0.046 a	0.163 ± 0.032 a	0.453 ± 0.088 a
Bc25-4	0.118 ± 0.044 b	0.156 ± 0.038 a	0.166 ± 0.055 a	0.440 ± 0.088 a
Bc25-7	0.184 ± 0.020 a	0.206 ± 0.039 a	0.193 ± 0.031 a	0.583 ± 0.059 a
Bc30-2	0.189 ± 0.077 a	0.170 ± 0.054 a	0.137 ± 0.090 a	0.496 ± 0.183 a

*Peso seco de hoja, tallo y raíz de plántulas tratadas al día 42 DDT. Los datos están representados por la media de 6 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Resultados similares se observaron al evaluar el contenido de carotenoides, los tratamientos Bs22-3, Bc25-4 y Bc25-7 presentaron concentraciones de 0.350, 0.375 y 0.332 mg /g de peso fresco correspondiente a un incremento del 13.50, 21.59 y 7.72%, respectivamente, en comparación al control (Apéndice IV). Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura (Gou *et al.*, 2020; Yasin *et al.*, 2018; Kazerooni *et al.*, 2021). Mathivanan *et al.* (2017) mencionan que el contenido de clorofila y carotenoides es uno de los principales indicativos para determinar la asimilación fotosintética y la actividad metabólica de una planta. Además, la acumulación de pigmentos fotosintéticos en *C. annuum* var. *glabrisculum* es de especial importancia en etapas como floración y fructificación debido a la alta demanda de fotoasimilados para la formación del fruto (Martínez *et al.*, 2020). De esta forma, el contenido de clorofila a y b, presentes en el estado inmaduro, y de carotenoides, en la fase madura, afectan la calidad sensorial y nutricional del fruto. El β -caroteno y la zeaxantina son los principales carotenoides encontrados en el fruto del chiltepín en el noreste de México, estos presentan actividad provitamina A con capacidad antioxidante (Hayano *et al.*, 2016).

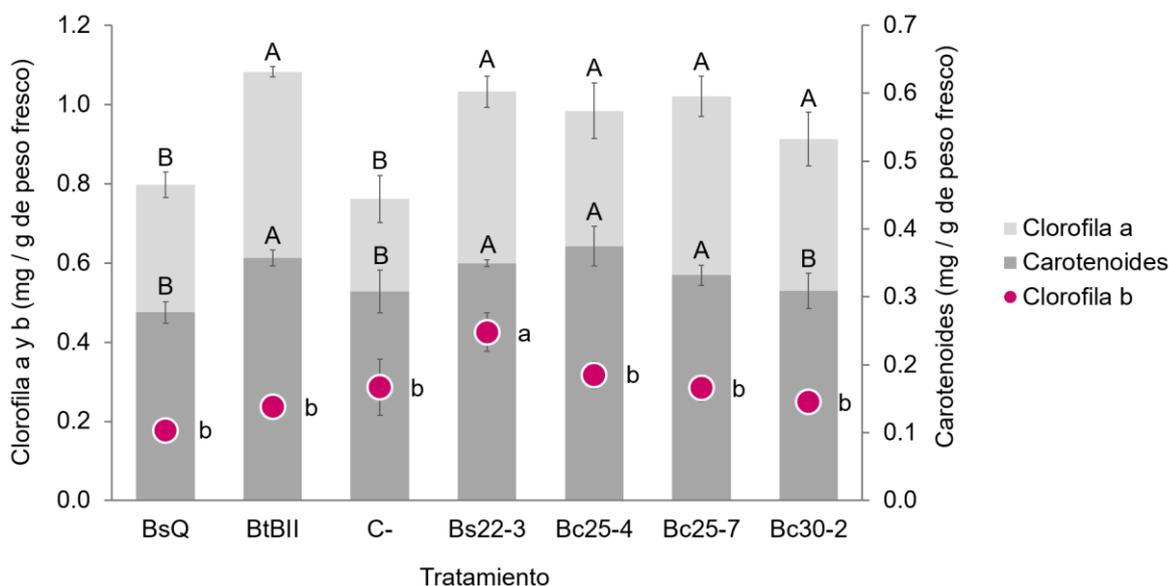


Figura 23. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en los pigmentos fotosintéticos del chiltepín. Plántulas tratadas al día 42 DDT. Los datos están representados por la media de 6 repeticiones. Las barras en los rectángulos y círculos indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

En el análisis PCA de los parámetros vegetativos del ensayo de promoción de crecimiento *in vivo*, el CP1 explicó el 57.1% y el CP2 el 21.2% de la variación de los datos (Figura 24). El tratamiento Bc25-7 en conjunto con los controles BsQ y BtBII presentaron el mayor efecto positivo en el crecimiento de chiltepín correspondiente a todos los parámetros vegetativos evaluados. Por otro lado, la cepa Bs22-3 mostró un efecto positivo en altura, diámetro de tallo, número de hojas, longitud de raíz y área foliar, mientras que el tratamiento Bc25-4 incrementó el peso fresco y diámetro de tallo. La aplicación de PGPR al suelo es una alternativa para sustituir fertilizantes y pesticidas en los cultivos hortícolas (Gou *et al.*, 2020). Estos resultados sugieren que la cepa Bc25-7 podría ser utilizada como biofertilizante en la producción de chile chiltepín.

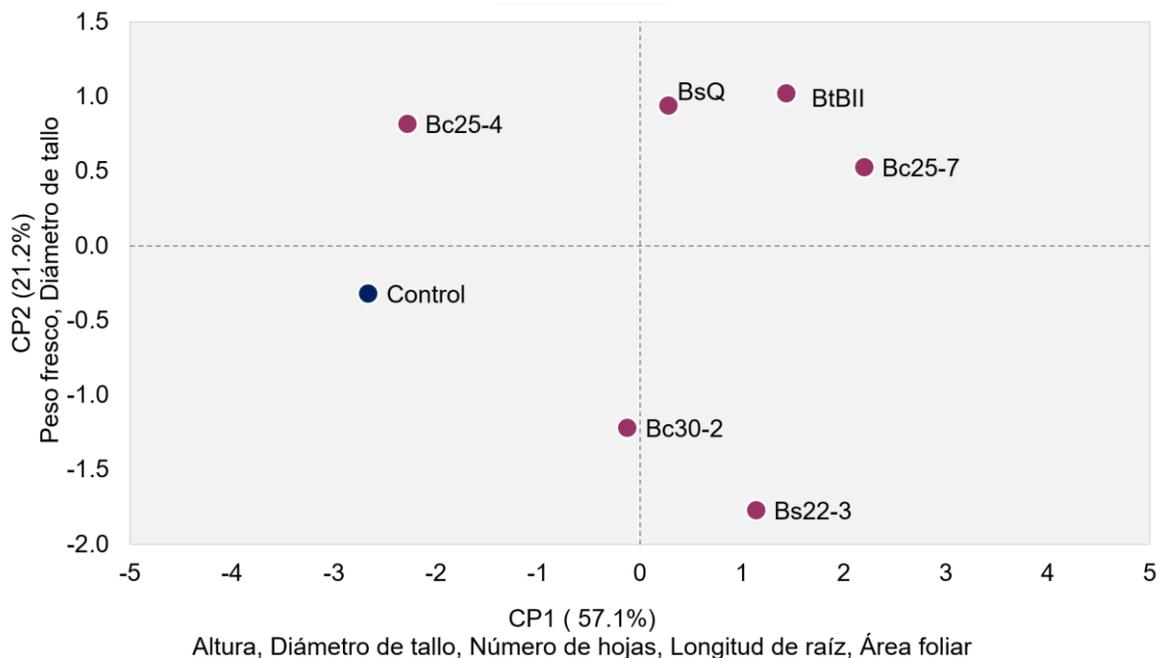


Figura 24. Análisis PCA de parámetros vegetativos en plántulas de chiltepín tratadas con *Bacillus* spp. bajo condiciones de invernadero.

9.3 CARACTERIZACIÓN DE *BACILLUS* spp. COMO PGPR

9.3.1 Solubilización de fósforo

La capacidad de solubilización del fósforo de su estado no asimilable (PO_4^{-3}) hacia su forma disponible (HPO_4^{-2} y $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$) ha sido reportada en distintos microorganismos del suelo incluyendo especies del género *Bacillus* (Kumar *et al.*, 2016). El índice de solubilización de las cepas aisladas se calculó considerando la relación entre el crecimiento de la colonia y el halo de esclarecimiento en medio de cultivo selectivo Pikovskaya. Todos los tratamientos mostraron la capacidad de solubilizar fósforo (Figura 25), además, se observó un incremento del índice en función del tiempo en todas las cepas de *Bacillus* (Figura 26). No se presentaron diferencias significativas entre las bacterias control (BsQ y BtBII) y los tratamientos evaluados a las 24, 48 y 72 h, con medias generales de 2.69, 2.84 y 3.09, respectivamente (Apéndice V). Mohamed *et al.* (2018) mostraron un índice de solubilización de 3.0 para *B. subtilis* a las 48 h de incubación en agar Pikovskaya. Mientras que Gohil *et al.* (2022) reportaron una mejora en la disponibilidad del elemento mediante la solubilización en *Bacillus* sp. PG-8 con un índice de 1.8 después de 72 h. El esclarecimiento del agar Pikovskaya se debe a la acidificación del medio por la transformación bacteriana del $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ a fosfatos di y monobásicos favorecida por la liberación de ácidos orgánicos como el ácido glucónico, oxálico, cítrico, láctico, tartárico y aspártico. Además, se atribuye a la acción de las enzimas fosfatasas que catalizan la hidrólisis de enlaces fosfatados (Corrales *et al.*, 2014; Goswami *et al.*, 2019). El crecimiento de las cepas de *Bacillus* en Pikovskaya evidencia la capacidad de solubilización ya que el fosfato tricálcico es insoluble y actúa como la única fuente de fósforo en el medio (Sánchez *et al.*, 2023).

9.3.2 Producción de amonio

El tetrayodomercuriato potásico (II) o reactivo de Nessler ($\text{K}_2 [\text{HgI}_4]$) es un compuesto ampliamente utilizado por su sensibilidad para detectar concentraciones bajas de NH_4 en soluciones alcalinas mediante la reacción: $\text{K}_2\text{HgI}_4 + \text{NH}_3 + \text{KOH} \rightarrow \text{Hg}_2\text{OINH}_2 + \text{KI} + \text{H}_2\text{O}$. La formación de un producto soluble de tonalidad naranja-marrón indica la capacidad de producción de amonio (Kolacinska & Koncki, 2014).

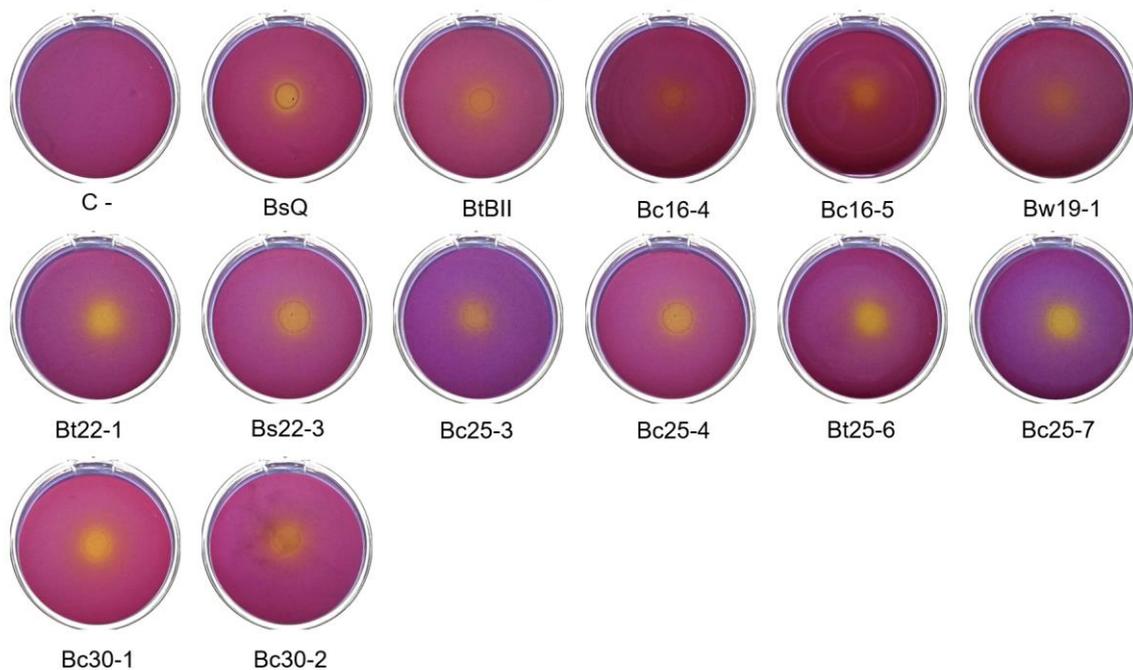


Figura 25. Solubilización de fósforo en las cepas de *Bacillus* spp. Crecimiento en medio Pikovskaya a las 24 h de incubación.

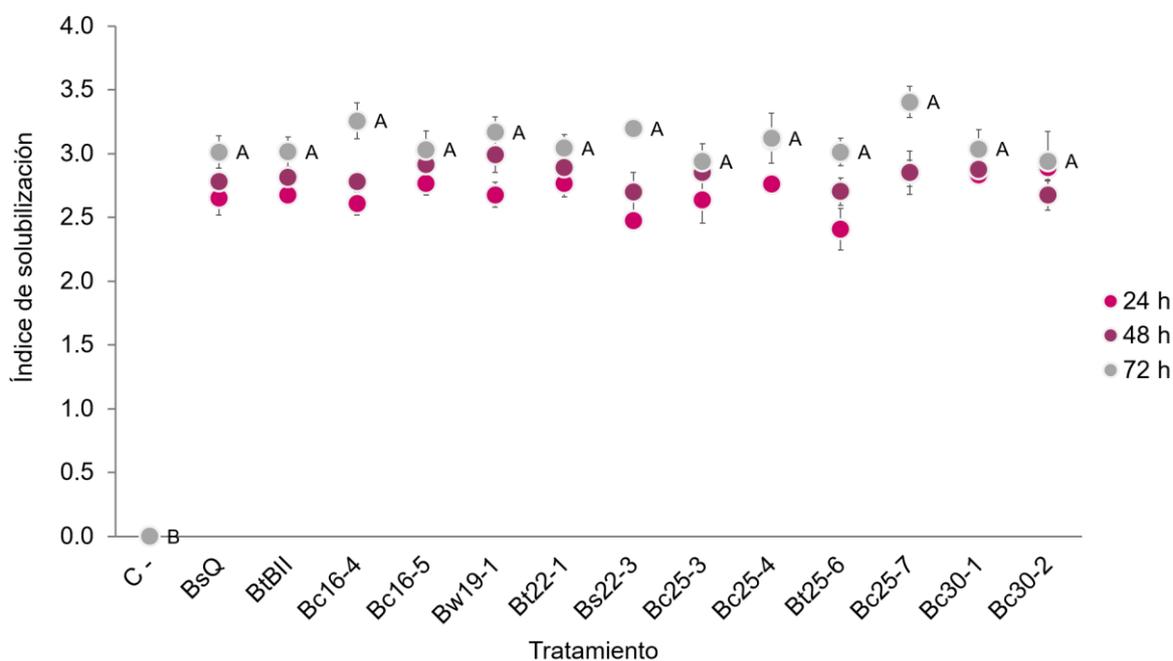


Figura 26. Índice de solubilización de fósforo en las cepas de *Bacillus* spp. Crecimiento en medio Pikovskaya a las 24, 48 y 72 h de incubación. Los datos están representados por la media de 5 repeticiones. Las barras en los círculos indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

En este estudio todas las cepas de *Bacillus* resultaron positivas para el ensayo de Nessler, sin embargo, el comportamiento fue significativamente distinto en los tratamientos evaluados (Figura 27). Mediante la curva de calibración se determinó la ecuación de la recta: concentración de NH_4 (mg/L) = $0.0022 \text{ Abs } 450 \text{ nm} + 0.0071$ con un valor de R^2 de 0.9948 (Apéndice VI). La producción de amonio a las 72 h de incubación se presenta en la Figura 28. El control positivo BsQ, así como la cepa aislada Bs22-3 presentaron las medias más bajas con $0.42 \mu\text{mol/mL}$, seguidos del control positivo BtBII ($1.60 \mu\text{mol/mL}$) (Apéndice VII). Las bacterias Bc16-5, Bc25-4 y Bc30-2 presentaron concentraciones moderadas de amonio con una media general de $2.97 \mu\text{mol/mL}$. En contraste la cepa Bt25-6 fue significativamente superior al resto de los tratamientos con una producción de $5.32 \mu\text{mol/mL}$. Estos resultados son consistentes con los reportados por Bhattacharyya *et al.* (2020) quienes presentaron concentraciones de NH_4^+ en un rango de 2.5 a $7.54 \mu\text{mol/mL}$ en *Bacillus* spp. Por otro lado, Abdelwahed *et al.* (2022) realizaron un ensayo en microplaca con la finalidad de reducir el impacto ambiental y el riesgo toxicológico del reactivo de Nessler y observaron una concentración máxima de amonio de 371 y $370 \mu\text{mol}$ para *B. inaquorsum* y *B. mojavensis*, respectivamente. El NH_4^+ producido por las PGPR contribuye al suministro de nitrógeno para la nutrición de las plantas y tiene un efecto directo sobre el desarrollo radicular (Bhattacharyya *et al.*, 2020). Así mismo, Wang *et al.* (2018) observaron mayor biomasa en plantas de Chile inoculadas con cepas de *Bacillus* productoras de amonio y aisladas de suelos salinos.



Figura 27. Ensayo de Nessler en las cepas de *Bacillus* spp. Producción de amonio a los 5 días de incubación en caldo de peptona. Cada pocillo contiene $20 \mu\text{L}$ de sobrenadante + $20 \mu\text{L}$ del reactivo de Nessler + $160 \mu\text{L}$ de H_2O libre de amonio. Cada tratamiento consistió en 4 repeticiones.

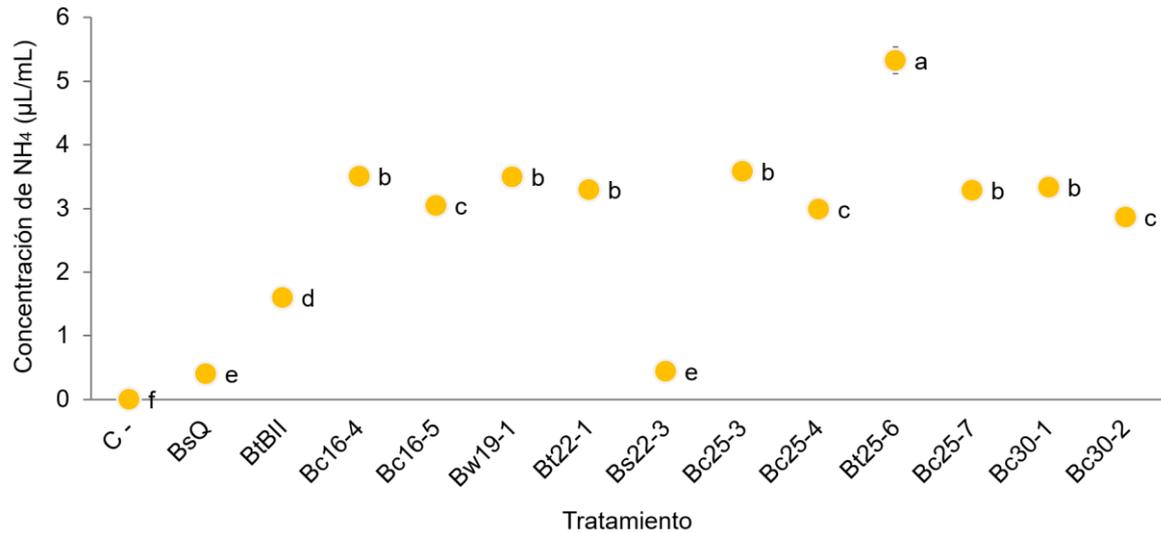


Figura 28. Producción de amonio en las cepas de *Bacillus* spp. Concentración a los 5 días de incubación en medio de cultivo caldo de peptona. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones. Las barras en los círculos indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

9.3.3 Producción de sideróforos

La producción de sideróforos de origen bacteriano promueve el crecimiento vegetal al mejorar la disponibilidad del hierro para las plantas, además, es uno de los principales mecanismos de control biológico debido a que las PGPR compiten con los fitopatógenos por este elemento esencial (Khan *et al.*, 2022). El empleo del medio azul-verde es una técnica universal que permite detectar la producción de sideróforos: el Cromo Azurol S, presente en el medio, es un colorante de alta afinidad al hierro, que presenta coloración azul cuando se encuentra unido a este elemento. En ausencia de hierro, el medio CAS se torna a coloraciones naranjas o amarillas (Elgazzar, 2017). En este estudio la producción de sideróforos se observó en la totalidad de los aislados evaluados (Figura 29). Las bacterias Bc25-7 y Bc30-1 mostraron los valores más altos en el índice de producción (2.72 y 2.92, respectivamente), siendo estadísticamente iguales a las bacterias control BsQ y BtBII (Figura 30), con un halo de 15.5 mm a las 72 h de incubación. El resto de los tratamientos presentaron una media general del índice de producción de 2.42. De forma similar, Kazerooni *et al.* (2021) encontraron que la totalidad de las cepas de *Bacillus* spp. aisladas de suelo produjeron sideróforos. Por otro lado, Kalam *et al.* (2020) reportaron que el 42.8% de las cepas de *Bacillus* spp. aisladas de suelo rizosférico

en tomate presentaron la mayor producción de sideróforos, con halos superiores a los 4 mm después de 72 h de incubación.

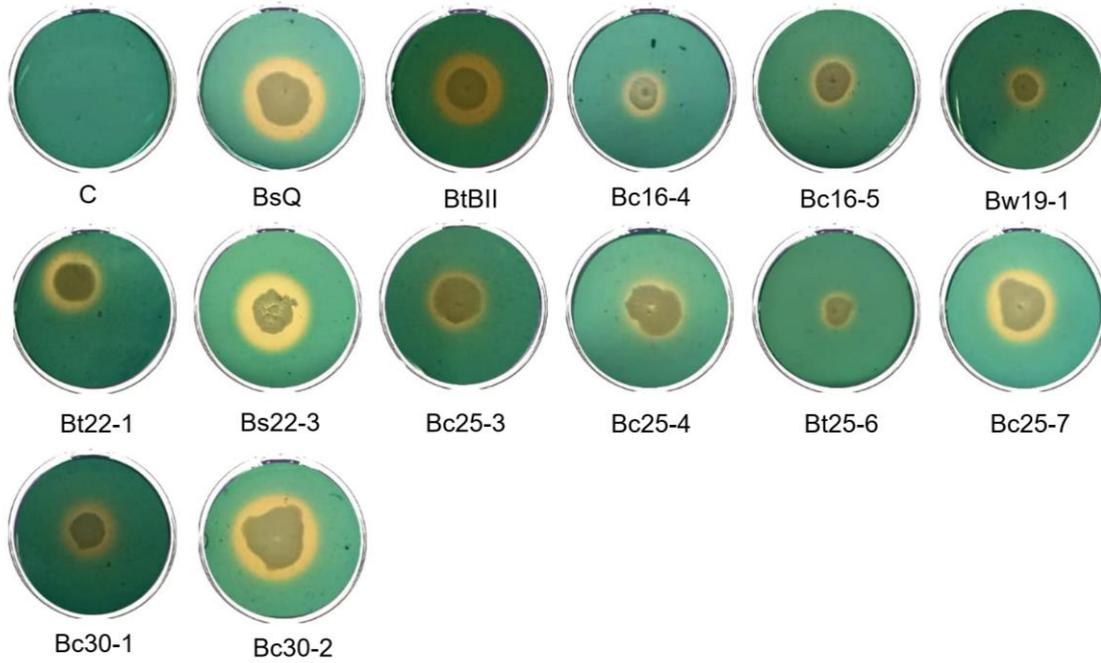


Figura 29. Producción de sideróforos en las cepas de *Bacillus* spp. Crecimiento en medio agar azul verde a las 72 h de incubación.

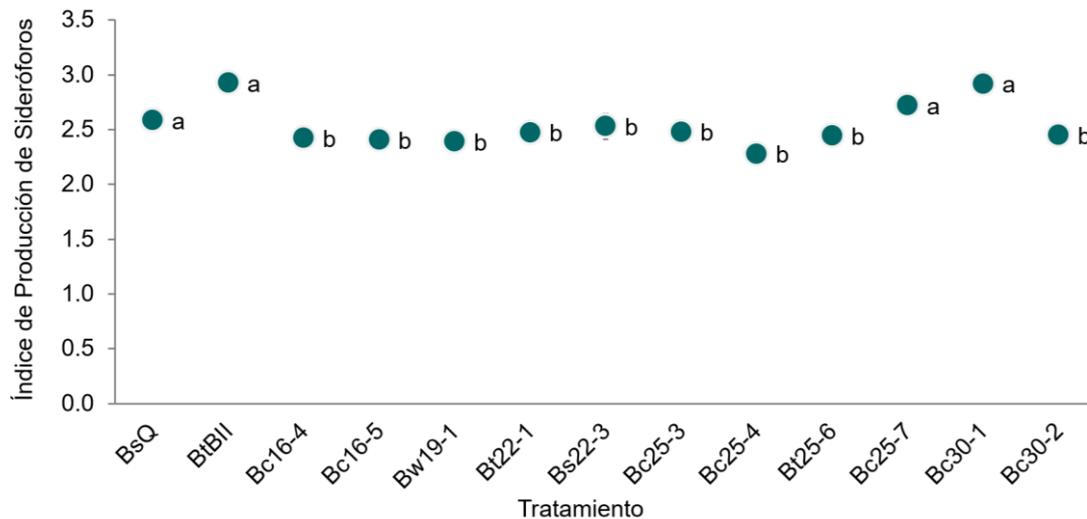


Figura 30. Índice de producción de sideróforos de las cepas *Bacillus* spp. Crecimiento en medio agar azul-verde a las 72 h de incubación. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones. Las barras en los círculos indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

De acuerdo con Nithyapriya *et al.* (2021), la bacillibacterina es el sideróforo predominante en *B. subtilis*, con alta capacidad de quelación de hierro en medios extracelulares.

9.3.4 Solubilización de zinc

La solubilización se evaluó en medio Bunt & Roviera adicionado con ZnO como fuente insoluble de zinc. Con excepción de la cepa Bs22-3, todos los tratamientos presentaron la capacidad de solubilización (Figura 31). No se observaron diferencias significativas en el SI y SE entre las cepas de *Bacillus* spp. evaluadas con medias generales de 2.81 y 180.79%, respectivamente (Figura 32, Apéndice VIII). Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura; Naseer *et al.* (2020) obtuvieron un SI de 2.78 y una SE del de 178.94%. En otro estudio, *Bacillus* sp. NCCP-49 presentó un SI y SE de 2.8 y 181.8%, respectivamente, al emplear el medio Bunt & Roviera suplementado con la misma fuente de zinc.

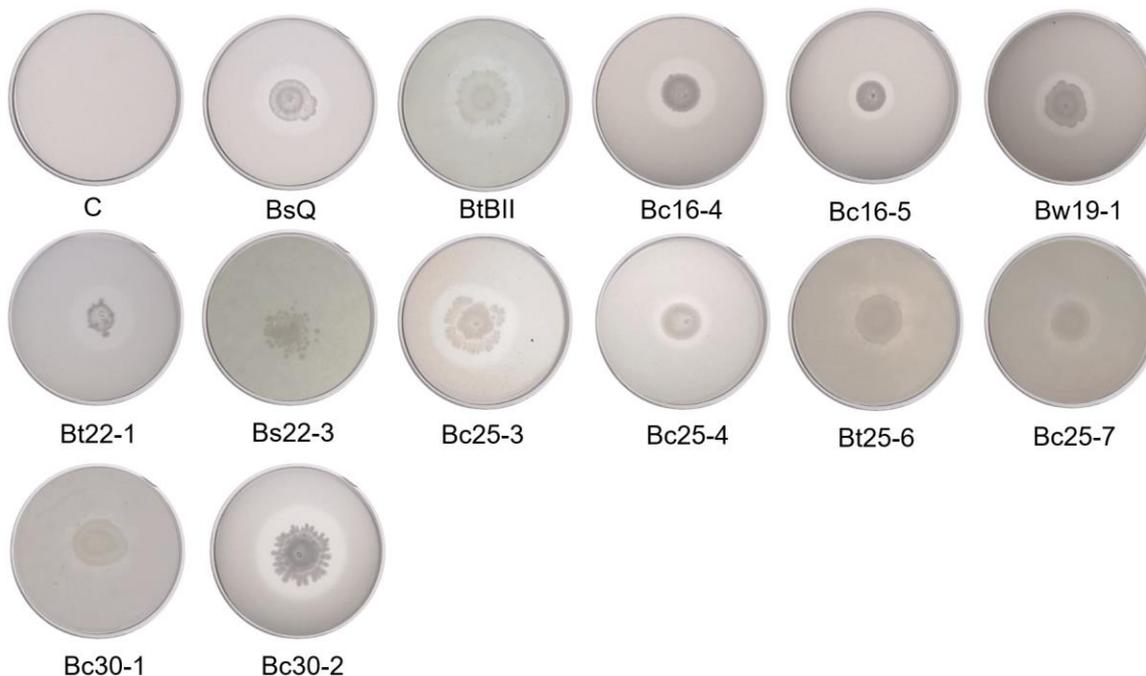


Figura 31. Solubilización de zinc en las cepas de *Bacillus* spp. Crecimiento en medio Bunt & Rovira suplementado con ZnO a los 10 días de incubación.

La capacidad de solubilización se atribuye a la producción de agentes quelantes y ácidos orgánicos (láctico, glucónico y oxálico), los cuales mejoran la disponibilidad del micronutriente en el medio (Ali *et al.*, 2023). En contraste, la cepa Bs22-3 no presentó halos de solubilización.

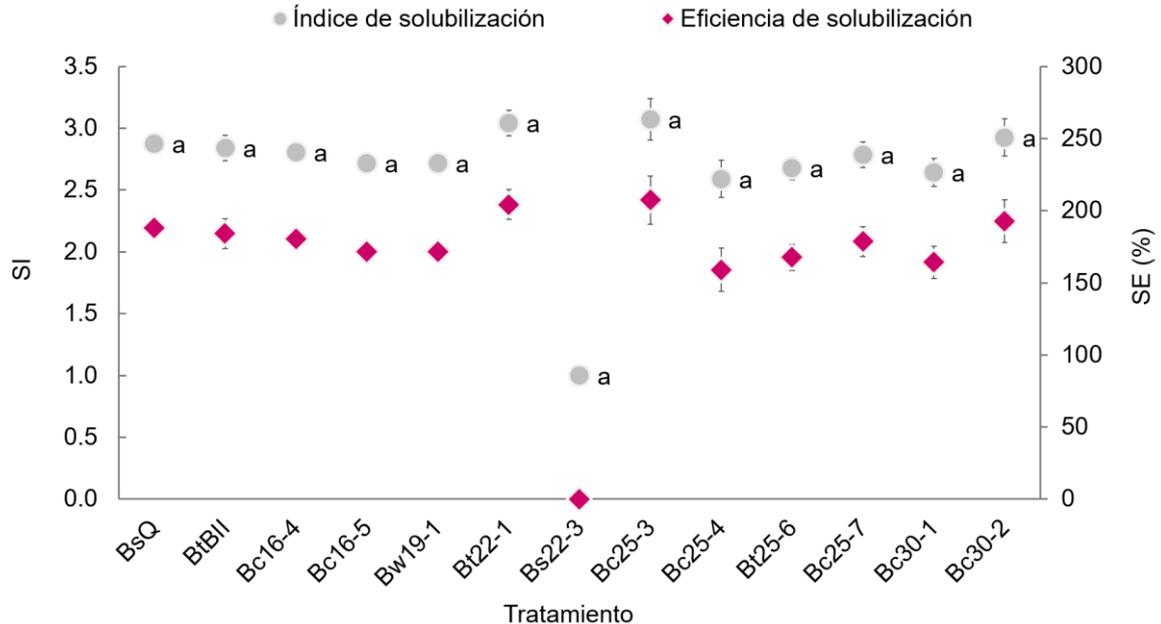


Figura 32. Índice y eficiencia de solubilización de zinc en las cepas de *Bacillus* spp. Crecimiento en medio Bunt & Rovira suplementado con ZnO a los 10 días de incubación. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones. Las barras en los rombos y círculos indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

9.3.5 Producción de exopolisacáridos

Las sustancias poliméricas de origen bacteriano se liberan como mecanismo de respuesta ante estrés fisiológico y representan un medio de protección para la planta huésped y la bacteria (Gohil *et al.*, 2022). En este estudio todas las bacterias presentaron la capacidad de producir EPS; el tratamiento Bs22-3 y el control positivo BsQ, mostraron los rendimientos más altos con valores de 2.53 y 2.36 g/L, respectivamente. De acuerdo con las categorías descritas por Nwosu *et al.* (2019), estas bacterias tienen alta capacidad de producción de EPS (Figura 33). De forma similar, Andy *et al.* (2023) reportaron rendimientos elevados en cepas de *B. cereus* y *B. haynesii* con 1.8 y 1.5 g/L de EPS, respectivamente. Por otro lado, las cepas

Bw19-1, Bc25-4, Bc25-7, Bc30-1 y Bc30-2 presentaron una producción moderada de EPS (0.68 g/L) y el resto de los aislados mostraron rendimientos bajos con una media general de 0.41 g/L. En otro estudio, el 20, 35 y 45% de las PGPB aisladas presentaron alto, moderado y bajo rendimiento de EPS, respectivamente (Nwosu *et al.*, 2019). Los EPS producidos por *Bacillus* spp. favorecen la adhesión celular, la agregación del suelo, incrementan la permeabilidad del agua, enriquecen la fertilidad y el acceso a recursos nutritivos (Bhagat *et al.*, 2021). La producción de EPS, además, es valiosa para la colonización de raíces, debido a que la producción de material fibrilar favorece la adhesión a la superficie radicular incluso en condiciones de escasez de agua (Rashid *et al.*, 2021).

Estos mecanismos de promoción de crecimiento explican el efecto positivo observado en las pruebas de promoción de crecimiento y germinación.

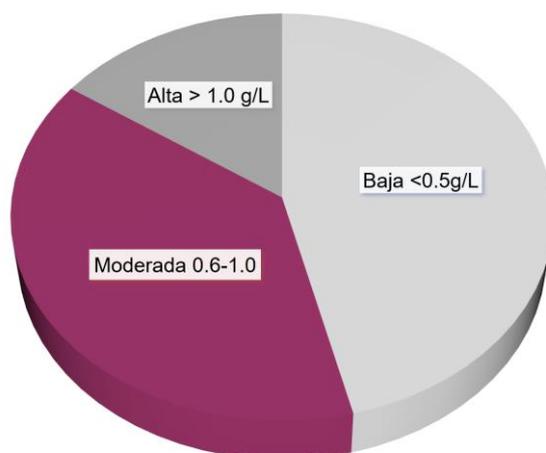


Figura 33. Producción de exopolisacáridos en las cepas de *Bacillus* spp. Clasificación de las cepas en función del rendimiento en la producción (Nwosu *et al.*, 2019).

9.4 INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A ESTRÉS HÍDRICO

9.4.1 Determinación de la concentración de polietilenglicol

El PEG 6000 es un compuesto ampliamente utilizado como agente estresante debido a que ajusta el potencial hídrico. Por su alto peso molecular, es incapaz de atravesar la pared celular, regulando así el flujo de agua hacia el medio extracelular

(Batool *et al.*, 2022). En este estudio, la inducción de tolerancia a sequía en chiltepín se evaluó mediante la aplicación de PEG (10%) a semillas previamente inoculadas con las cepas de *Bacillus* spp. La Figura 34 ilustra la dinámica de sobrevivencia de las plántulas. En general, se observó una disminución de la viabilidad a partir del día 11 después de la inducción del estrés, con excepción del control. Sin embargo, la TS fue variable en función del tratamiento. Las bacterias Bt25-6 y Bc25-7 mostraron mayor sobrevivencia al día 17 después de la adición de PEG con medias de 74 y 67%, respectivamente (Figura 35), en comparación con el resto de los tratamientos.

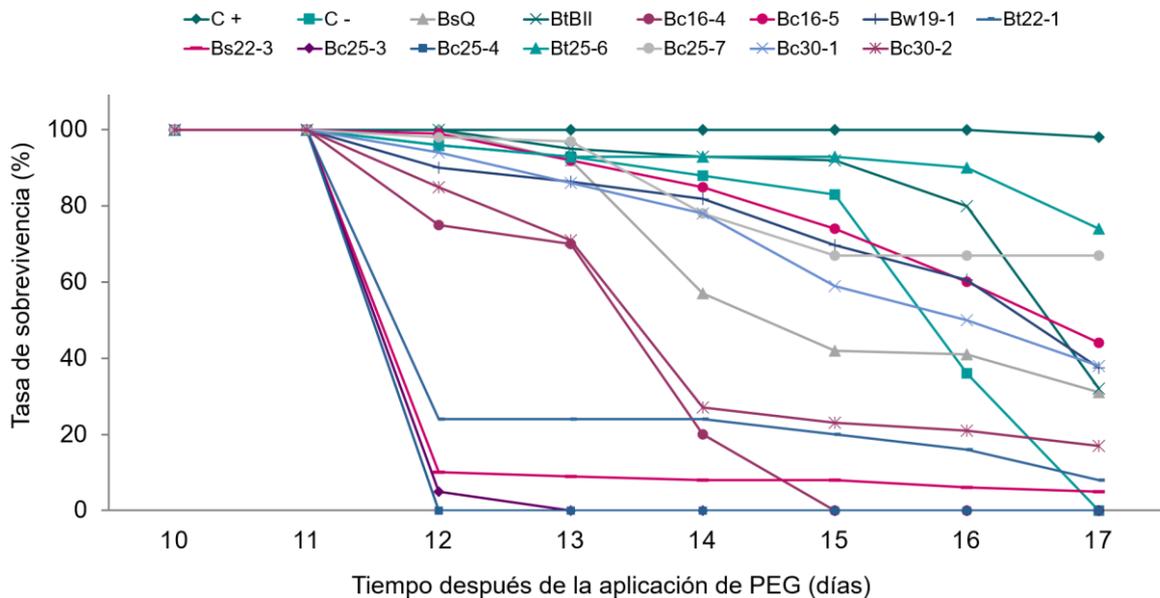


Figura 34. Dinámica de sobrevivencia de plántulas de chiltepín tratadas con *Bacillus* spp. bajo condiciones de estrés *in vitro*. El estrés se indujo mediante la aplicación de PEG (10%).

Además, las bacterias Bc16-5, Bw19-1 y Bc30-1 aumentaron la resistencia de las plántulas estresadas en condiciones *in vitro*. Estos resultados demuestran el potencial de Bt25-6 y Bc25-7 para inducir tolerancia a sequía en plantas de *C. annuum* var. *glabrisculum* (Figura 36). Sin embargo, este ensayo fue poco concluyente debido a que el control negativo no mostró efectos adversos al PEG (10%) en el periodo establecido en la literatura (Kazerooni *et al.*, 2021; Gangotri *et al.*, 2022). En contraste, Kaya & Banu (2019), reportaron respuestas fitotóxicas en jalapeño al emplear esta concentración al día 8 después de la aplicación del agente

estresor. Esto sugiere que el chile chiltepín presenta mayor adaptabilidad al estrés hídrico que otras variedades de *Capsicum annuum*.

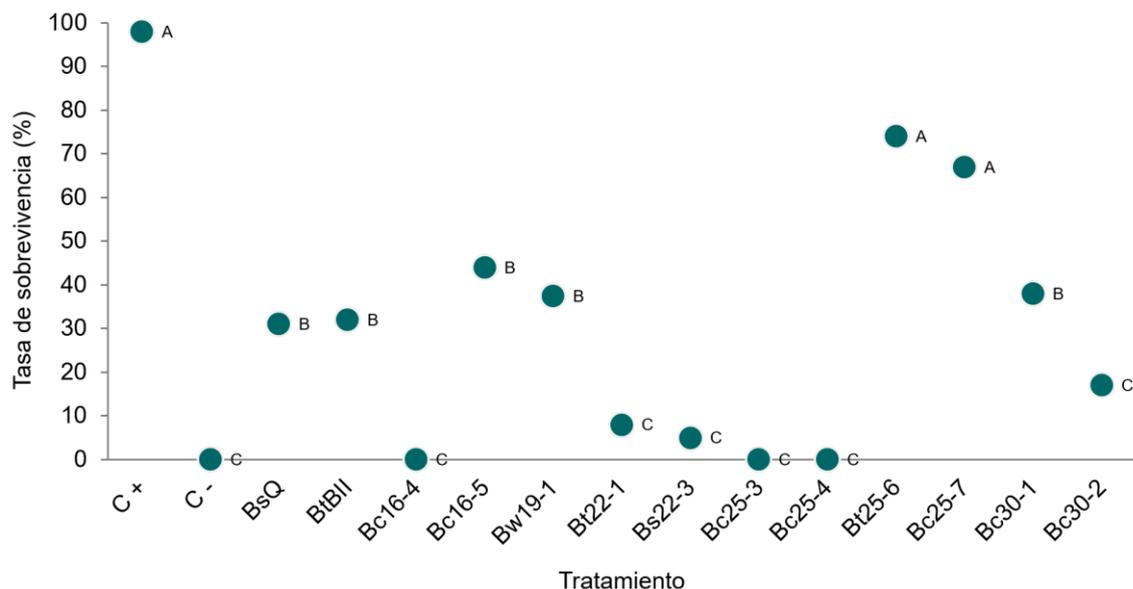


Figura 35. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en la sobrevivencia de plántulas de chiltepín estresadas (PEG 10%) bajo condiciones *in vitro*. La tasa de sobrevivencia de las plántulas tratadas al día 17 después de la inducción de estrés hídrico. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Con la finalidad de establecer la concentración adecuada de PEG 6000 para inducir efectos negativos en chiltepín se evaluaron las concentraciones P0, P10, P20, P30, P40 y P50 correspondientes a potenciales osmóticos de 0, -0.14, -0.49, -1.02, -1.75 y -2.68 MPa, respectivamente (Michel y Kaufmann, 1973). Se encontró una relación inversamente proporcional entre la tasa de sobrevivencia de las plántulas y la concentración de PEG ($r = -0.85$), con una sobrevivencia máxima del 40% en P50 (Figura 37). Las plántulas estresadas presentaron pérdida de turgencia, clorosis en la punta de las hojas cotiledonales, deformación del tallo y/o radícula (Figura 38). Además, se observó una reducción significativa en la mayoría de los parámetros vegetativos en P10, con excepción de la longitud de la raíz, que se redujo en P30 (Tabla 15). La afectación más grave se presentó de la siguiente manera: P30-P50 redujeron el peso fresco y altura en 30 y 19%, respectivamente. Los tratamientos P10-P50 redujeron el diámetro del tallo y el índice de esbeltez en un 36% y P40-P50 disminuyeron la longitud de la raíz en un 61%.



Figura 36. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en plántulas de chiltepín estresadas (PEG 10%) bajo condiciones *in vitro*. Plántulas tratadas al día 17 después de la inducción de estrés hídrico.

Este estudio es el primer reporte del empleo de PEG como simulador de estrés hídrico en chiltepín. No obstante, diversos estudios demuestran que el incremento en el nivel de déficit hídrico inducido con PEG reduce los parámetros de crecimiento y germinación en otras especies de Chile. Este efecto se puede atribuir en parte a la disminución de la solubilidad y disponibilidad del O₂ en una solución PEG de mayor concentración y viscosidad, lo cual afecta directamente la elongación de la raíz (Emmerich y Hardegee, 1990; Verslues, 1998). Poobalan *et al.* (2020) reportaron reducciones del 65.39 y 60.52% en altura y longitud de raíces de *C. annuum* L., *C. frutescens* L. y *C. baccatum* sometidos a estrés con PEG 6000 a -0.25 MPa. De forma similar, Sikha *et al.* (2013) observaron una disminución en la altura, longitud de raíz y peso fresco de *C. annuum* 'Solan Bharpur' al emplear PEG 10% como simulador del estrés; además reportaron efectos significativos en la respuesta fisiológica. Estos resultados sugieren que P30 es la concentración

adecuada para inducir estrés bajo condiciones *in vitro* y que *C. annuum* var. *glabriusculum* presenta mayor adaptabilidad al estrés hídrico que otras variedades de Chile. De acuerdo con la literatura, las poblaciones silvestres de Chile en México representan un importante recurso genético para el mejoramiento de otras especies debido a la alta plasticidad fenotípica y genética que se traduce en variaciones significativas en la respuesta y adaptabilidad a estrés abiótico (Osuna *et al.*, 2023).

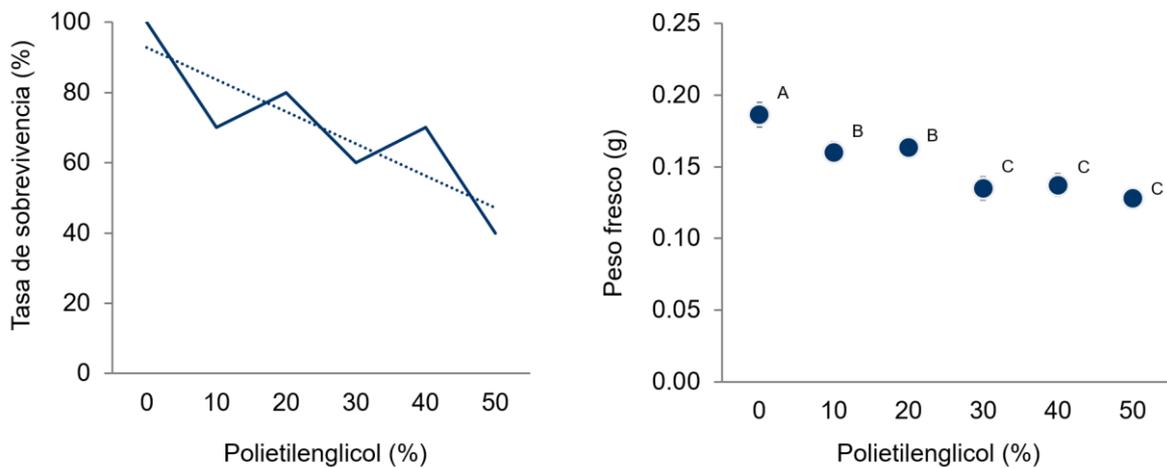


Figura 37. Efecto del estrés hídrico en la sobrevivencia y peso fresco del chiltepín bajo condiciones *in vitro*. TS y peso fresco de plántulas sometidas a estrés hídrico con distintas concentraciones de PEG. Los datos están representados por la media de 10 repeticiones. Las barras en los círculos indican el error estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).



Figura 38. Efecto del estrés hídrico en plántulas y raíz principal de chiltepín bajo condiciones *in vitro*. El estrés se indujo mediante la aplicación de distintas concentraciones de PEG.

Tabla 15. Efecto del estrés hídrico en los parámetros vegetativos del chiltepín bajo condiciones *in vitro*. Altura, longitud de raíz, diámetro de tallo e índice de esbeltez de plántulas sometidas a estrés hídrico con distintas concentraciones de polietilenglicol. Los datos están representados por la media de 10 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

PEG (%)	Altura (mm)	Longitud de raíz (mm)	Diámetro de tallo (mm)	Índice de esbeltez
0	15.55 ± 2.9 a	33.87 ± 9.8 a	0.89 ± 0.09 a	1.73 ± 0.27 a
10	12.72 ± 1.5 b	27.14 ± 9.3 a	0.58 ± 0.11 b	2.26 ± 0.52 b
20	13.92 ± 1.2 a	25.54 ± 9.9 a	0.61 ± 0.08 b	2.29 ± 0.37 b
30	13.16 ± 2.9 b	20.44 ± 6.7 b	0.55 ± 0.12 b	2.45 ± 0.75 b
40	11.99 ± 2.0 b	14.84 ± 4.2 c	0.52 ± 0.13 b	2.37 ± 0.44 b
50	12.26 ± 1.8 b	11.54 ± 3.4 c	0.54 ± 0.10 b	2.36 ± 0.75 b

9.4.2 Resistencia de *Bacillus* al polietilenglicol

Para clasificar a las bacterias tolerantes a estrés hídrico se consideró al menos el 60% en la tasa de sobrevivencia con relación al control (P0). El 30% de las cepas fueron sensibles a P30, mientras que el 38% presentaron alta tolerancia (Figura 39). Los tratamientos Bt25-6 y Bc30-2 fueron completamente tolerantes a la máxima concentración evaluada (P50). De acuerdo con la literatura, las bacterias resistentes a la sequía presentan valores de DO superiores a 0.5 con presiones osmóticas de - 0.1 MPa (Diabankana *et al.*, 2021). Otros autores han reportado tolerancia de *Bacillus* spp. al polietilenglicol; Ashry *et al.* (2022) reportaron que el 25% de PGPR aisladas de suelos áridos presentaron resistencia a la sequía bajo distintos potenciales hídricos (-0.15 a -1.2 MPa). En otro estudio, *B. megaterium* y *B. licheniformis* lograron crecer en el potencial hídrico más bajo en la evaluación (-0.73 MPa) (Rashid *et al.*, 2021). De forma similar, Diabankana *et al.* (2021) reportaron la adaptación de *B. mojavensis* PS17 hasta -2.2 MPa de presión osmótica. Esta adaptación al déficit hídrico se asocia a la producción de exopolisacáridos, fitohormonas, metabolitos secundarios y enzimas (Rashid *et al.*, 2021). Del mismo modo, la acumulación de osmolitos modula la composición de la membrana celular (Diabankana *et al.*, 2021). Otros autores atribuyen la resistencia de especies del género *Bacillus* a la formación de endosporas (Ashry *et al.*, 2022).

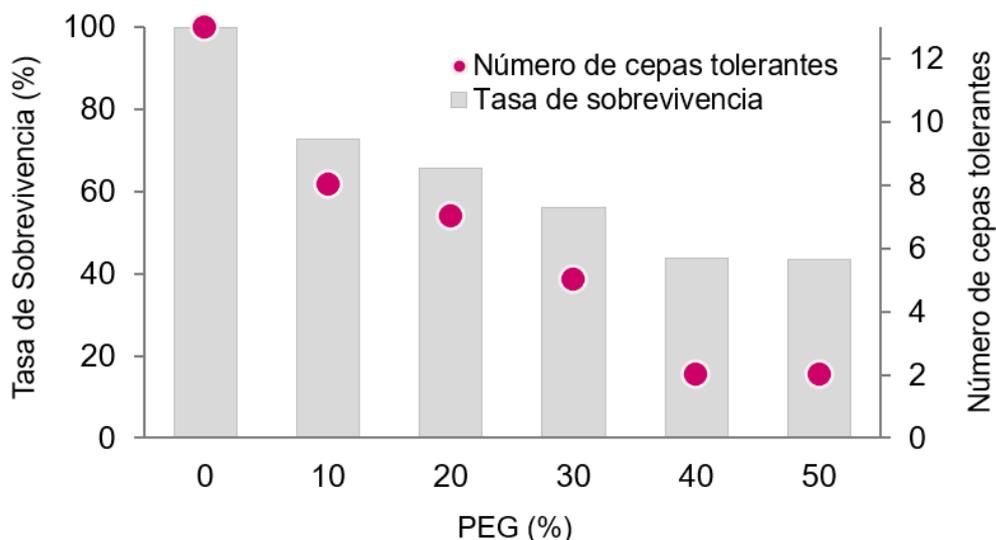


Figura 39. Tasa de sobrevivencia y número de cepas de *Bacillus* spp. tolerantes a distintas concentraciones de PEG. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones.

Por otra parte, el ensayo de viabilidad permitió determinar la presencia de células metabólicamente activas mediante el empleo de resazurina, un colorante azul, permeable a la membrana, que actúa como indicador redox al tornarse rosa fluorescente cuando se reduce a resorufina (Costa *et al.*, 2021). En este estudio, la viabilidad celular se presentó en todas las cepas hasta la exposición a P40, con excepción de Bs22-3, Bc25-3 y el control BsQ (Figura 40).

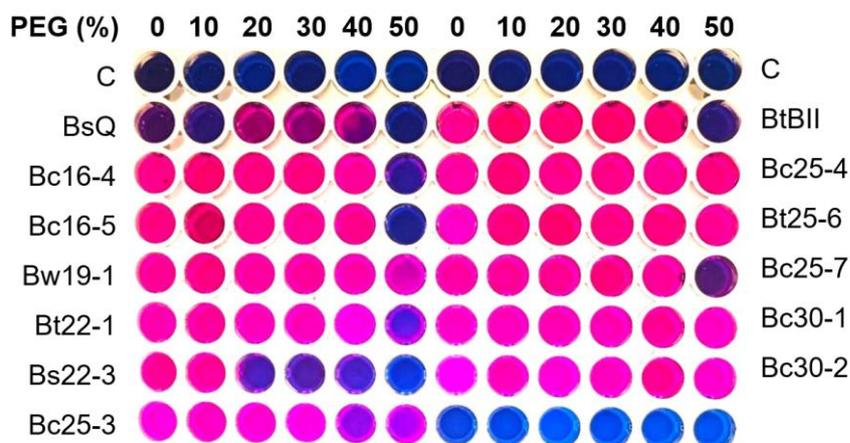


Figura 40. Viabilidad celular de *Bacillus* spp. en distintas concentraciones de PEG. El viraje se observó mediante la aplicación de resazurina (0.03 M).

9.4.3. Inducción de resistencia a sequía *in vitro*

Todos los tratamientos mejoraron la sobrevivencia de las plántulas estresadas con P30 (Figura 41). Las plántulas inoculadas con las cepas Bc25-3 y Bc25-7 presentaron los valores más altos en la tasa de sobrevivencia con 80 y 90%, respectivamente. Además, los tratamientos Bt25-6 y Bc30-2 mostraron un incremento del 48%, en comparación con el control. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura; Paul *et al.* (2022) mostraron que el tratamiento con *B. pseudomycooides*, *B. massilianrexius* y *B. thuringiensis* incrementó 30.55% la TS de plantas de trigo sometidas a déficit hídrico con PEG (10%). En otro estudio, *B. amyloliquefaciens* incrementó 55.29% la sobrevivencia de plantas de tomate bajo condiciones de sequía. Este efecto se asoció a la producción de biopelículas bacterianas (Wang *et al.*, 2019). Por otra parte, Zhou *et al.* (2016) comprobaron que el contenido de ABA es superior en plantas estresadas de *Arabidopsis thaliana* e inoculadas con *B. megaterium* BOFC15; atribuyendo a esta modulación, la señalización de múltiples repuestas adaptativas.

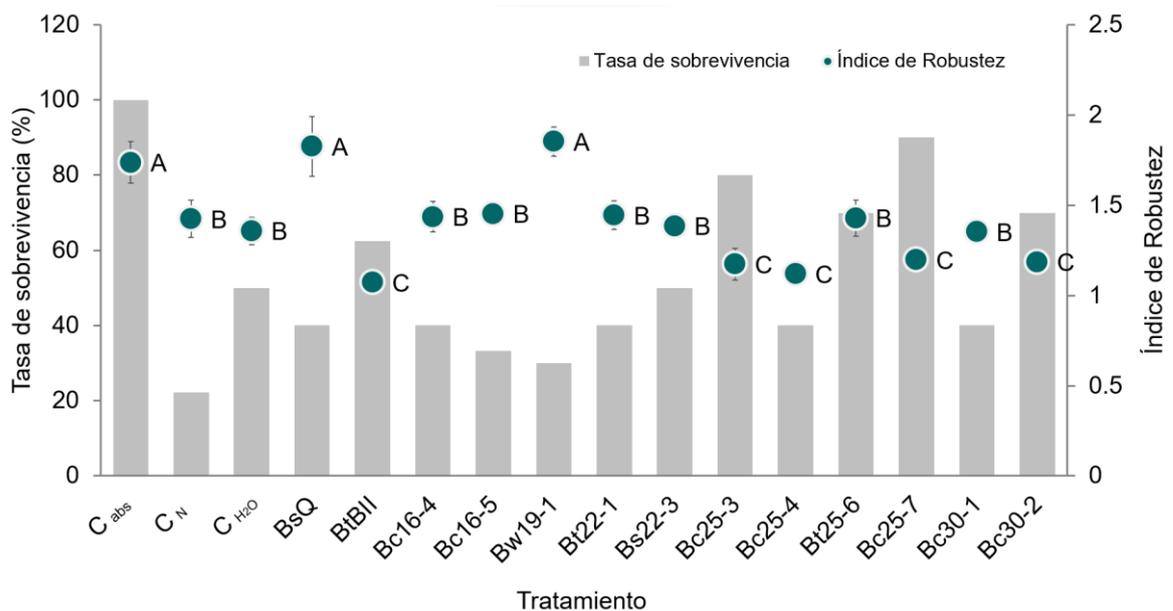


Figura 41. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en la sobrevivencia y esbeltez del chiltepín bajo condiciones de estrés *in vitro*. Tasa de sobrevivencia e índice de esbeltez de plántulas tratadas al día 7 después de la inducción de estrés hídrico con polietilenglicol (30%). Las barras en los círculos indican el error estándar. Los datos están representados por la media de 9 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Además del efecto en la sobrevivencia, las cepas de *Bacillus* spp. mejoraron la sintomatología de las plántulas de chiltepín. En este ensayo, los tratamientos Bt22-1, Bc25-3, Bt25-6 y Bc30-2 presentaron características morfológicas normales, mientras que el resto de las plántulas estresadas presentaron clorosis en las hojas cotiledonales, deformación del tallo, zonas necróticas en la radícula y/o pérdida de turgencia (Figura 42).

Respecto a los parámetros vegetativos, las plántulas tratadas con las bacterias presentaron diferencias significativas en comparación con el control negativo (Tabla 16). Los tratamientos Bw19-1 y Bt25-6 presentaron una altura 27.21% superior. Además, los tratamientos Bt22-1 y Bc30-1 mostraron un incremento del 18.22% en la longitud de raíz. Por otro lado, los tratamientos Bc25-3, Bc25-4, Bt25-6, Bc25-7 y Bc30-2 indujeron un aumento del 22.09% en el diámetro de tallo. Otros autores reportan la mitigación del déficit hídrico en plantas de *C. annuum* al emplear cepas de *Bacillus* spp. (Kazerooni *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2022). De acuerdo con Arun *et al.* (2020), la aplicación de PEG 6000 al 25% reduce significativamente la altura y longitud de la raíz en plántulas de arroz. No obstante, la inoculación con *B. megaterium* PB50 incrementa 26.37% la altura y 46.91% la longitud de raíz de las plantas estresadas. Además, los autores asocian esta respuesta a la reducción de la tasa de evapotranspiración y a la inducción del cierre estomático. Del mismo modo, se evaluó estrés hídrico en plantas de trigo (PEG 12%); las cepas *B. subtilis* 104 y 26D incrementaron 7.89% la altura de variedades sensibles a la sequía y 22.58% la altura de variedades resistentes. Con relación a la longitud de raíz, se reportaron incrementos de 11.84 y 18.96% en variedades tolerantes y sensibles, respectivamente (Lastochkina *et al.*, 2023). Por otra parte, el índice de esbeltez se empleó como indicativo de la condición de salud de las plántulas. Valores menores corresponden a plantas más robustas, es decir, plantas con mayor capacidad de adaptación a condiciones ambientales desfavorables (Borjas *et al.*, 2018). El 36.3% de los tratamientos disminuyeron significativamente el IE en comparación con el control. De acuerdo con estos resultados los tratamientos Bc25-3, Bt25-6, Bc25-7 y Bc30-2 contribuyen a mitigar el estrés hídrico en plántulas de chiltepín bajo condiciones *in vitro*.



Figura 42. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en plántulas de chiltepin estresadas bajo condiciones *in vitro*. Evaluación al día 7 después de la inducción de estrés hídrico con polietilenglicol (30%).

Tabla 16. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en parámetros vegetativos del chiltepín bajo condiciones de estrés *in vitro*. Altura, longitud de raíz, diámetro de tallo e índice de esbeltez de plántulas de *C. annum* var. *glabrisculum* sometidas a estrés hídrico con PEG (30%). Los datos están representados por la media de 9 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	Altura (mm)	Longitud de raíz (mm)	Diámetro de tallo (mm)	Índice de esbeltez
C _{abs}	13.134 ± 0.96	22.220 ± 4.03	0.778 ± 0.14	1.737 ± 0.34
C _{CN}	10.825 ± 2.42	19.350 ± 3.38	0.762 ± 0.06	1.424 ± 0.31
C _{H₂O}	9.694 ± 0.81	23.280 ± 3.74	0.731 ± 0.12	1.357 ± 0.22
BsQ	13.378 ± 2.63	11.864 ± 1.03	0.758 ± 0.16	1.826 ± 0.49
BtBII	9.901 ± 0.84	15.620 ± 3.87	0.936 ± 0.10	1.071 ± 0.15
Bc16-4	11.665 ± 1.75	20.500 ± 2.51	0.821 ± 0.08	1.435 ± 0.25
Bc16-5	11.721 ± 1.09	12.016 ± 2.89	0.811 ± 0.07	1.452 ± 0.16
Bw19-1	14.965 ± 1.89	9.949 ± 0.83	0.819 ± 0.14	1.852 ± 0.24
Bt22-1	11.61 ± 1.88	23.390 ± 6.39	0.808 ± 0.09	1.444 ± 0.23
Bs22-3	11.121 ± 1.34	18.440 ± 6.02	0.807 ± 0.07	1.385 ± 0.18
Bc25-3	10.472 ± 2.06	15.760 ± 5.47	0.900 ± 0.08	1.172 ± 0.26
Bc25-4	10.604 ± 1.74	20.350 ± 2.90	0.958 ± 0.10	1.120 ± 0.19
Bt25-6	12.57 ± 1.71	18.470 ± 3.55	0.898 ± 0.11	1.428 ± 0.30
Bc25-7	10.947 ± 1.04	16.380 ± 3.04	0.921 ± 0.09	1.197 ± 0.14
Bc30-1	10.344 ± 0.88	22.380 ± 4.25	0.771 ± 0.09	1.353 ± 0.14
Bc30-2	11.482 ± 1.58	19.230 ± 3.90	0.975 ± 0.07	1.185 ± 0.20

9.4.4 Inducción de resistencia a sequía *in vivo*

Las condiciones de temperatura y RH durante el desarrollo de las plántulas en invernadero se mantuvieron entre 4.7 - 57.0 °C y 2.3 – 90.1%, respectivamente (Figura 43). Las plántulas tratadas con Bt25-6 y Bc25-7 aminoraron los síntomas visuales de marchitez causada por estrés hídrico severo (pérdida de turgencia foliar y disminución de la tasa de crecimiento) en comparación con las plántulas sin inocular (control negativo), a pesar de que el sustrato presentó niveles similares de humedad (Figura 44). Con excepción del control absoluto que mantuvo valores por encima de 7.0, la humedad del sustrato en todos los tratamientos comenzó a disminuir a partir del día 5 después de la suspensión de riego (Figura 45).

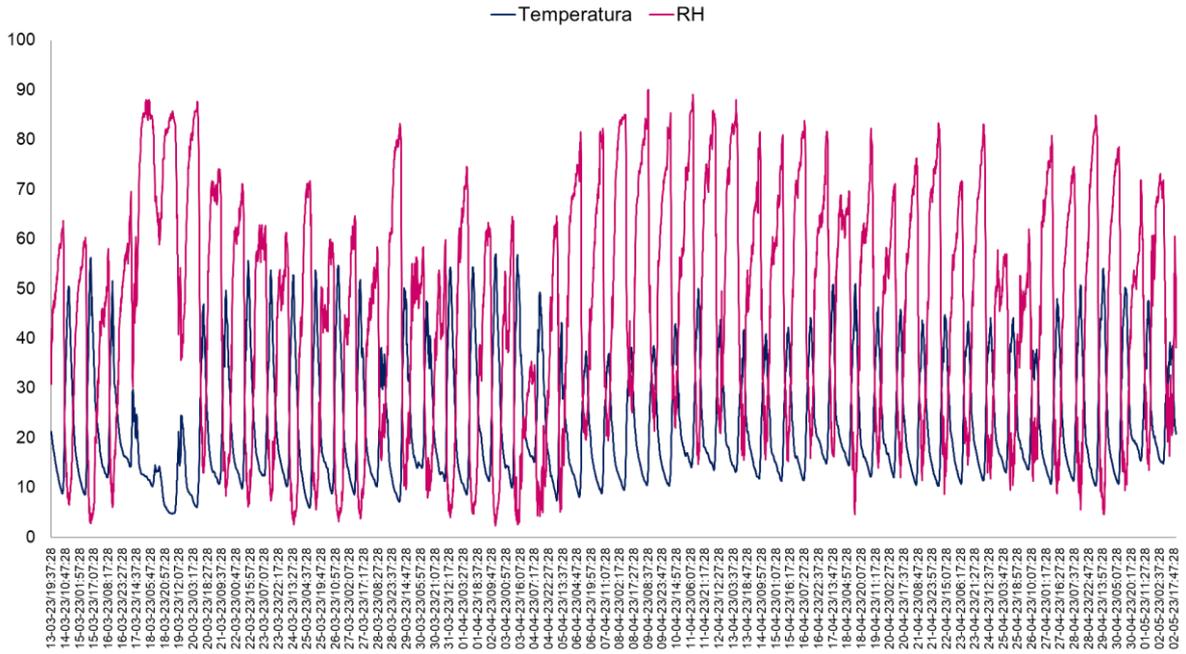


Figura 43. Monitoreo de temperatura y humedad relativa en el invernadero durante el desarrollo de chiltepín bajo condiciones de estrés. Evaluación durante el desarrollo de plántulas tratadas después del trasplante y durante la inducción de estrés hídrico.



Figura 44. Efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en plántulas de chiltepín bajo condiciones de estrés *in vivo*. Plántulas tratadas y sometidas a estrés hídrico mediante retención de agua por 7 d.

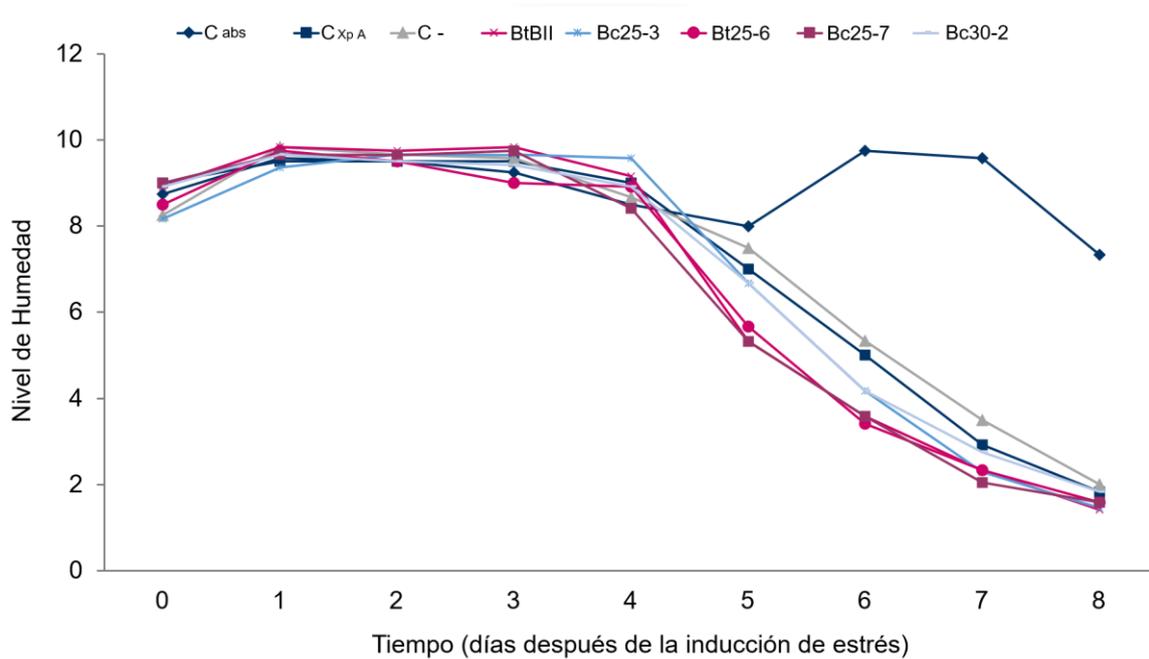


Figura 45. Dinámica del nivel de humedad en el sustrato. Comportamiento durante el periodo de inducción de estrés.

El Índice de Vegetación Diferencial Normalizada (NDVI) es una herramienta basada en sensores remotos que permite estimar la actividad fotosintética en función del contenido de pigmentos y de la estructura de dosel. El NDVI se obtiene mediante la relación matemática entre las reflectancias de la luz roja visible absorbida por la clorofila y la luz infrarroja cercana reflejada por la biomasa vegetal (Wang *et al.*, 2023). Diversos autores reportan el empleo del NDVI para determinar la condición de salud de los cultivos bajo condiciones de estrés biótico (Solano *et al.*, 2022; Hasan *et al.*, 2021; Buchailot *et al.*, 2022). En este estudio, el NDVI fue evaluado como indicador de la condición hídrica de las plántulas de chile chiltepín, ya que de acuerdo con Ihuoma y Madramootoo (2019) existe una correlación entre el NDVI y el índice de área foliar en plantas sometidas a estrés abiótico. El comportamiento observado se muestra en la Figura 46; el sustrato alcanzó el punto de saturación al día 30 después del trasplante, posteriormente se muestra un sostenimiento general del NDVI a las 24 h, sin embargo, existe una reducción observable del índice evaluado a las 48 h. Después de un periodo de recuperación en los siguientes días se observa una disminución del índice cuando el nivel de humedad del sustrato disminuyó por debajo de 4.0. Sin embargo, el NDVI mostró valores superiores a 0.65 durante toda la evaluación; con base en la clasificación descrita por Aziz *et al.*

(2018) los valores del índice corresponden a condiciones extremadamente húmedas. Estos resultados pueden atribuirse a un retraso frecuente en la respuesta de la planta a los cambios de humedad en el suelo. Adicionalmente, se reporta que el área foliar permanece verde después de la inducción del déficit hídrico (Felegari *et al.*, 2022). De acuerdo con el coeficiente de correlación de Pearson para las variables NDVI y humedad del sustrato ($r = 0.070$) existe poca evidencia de que el índice indique la condición de salud de plántulas en condiciones de estrés hídrico en chiltepín (Figura 47). Estos resultados difieren de los reportados por Ihuoma & Madramootoo (2019), quienes observaron que el déficit hídrico tiene efectos negativos sobre las estructuras de pigmento en las hojas de *C. annuum*, confirmando el uso potencial del NDVI como indicador del estrés por sequía. No obstante, los estudios actuales se centran en la búsqueda de un índice con mayor correlación. Además, se ha observado que a profundidades de 10 a 20 cm de suelo la correlación entre la humedad y el NDVI disminuye (Felegari *et al.*, 2022).

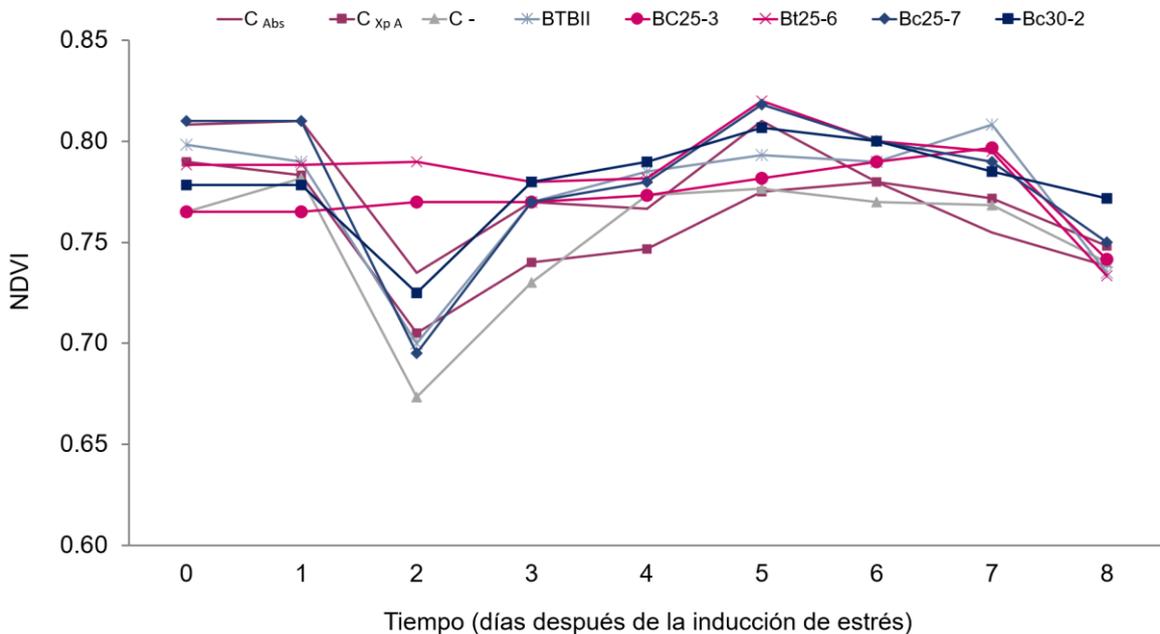


Figura 46. Dinámica del NDVI. Comportamiento del NDVI en plántulas de chiltepín inoculadas con cepas de *Bacillus* spp. y sometidas a estrés hídrico.

Mediante la curva de calibración se determinó la ecuación de la recta: concentración de L-Prolina (μm) = $0.0082 \text{ Abs } 520 \text{ nm} - 0.0071$ con un valor de R^2 de 0.988 (Apéndice IX). El contenido de prolina en las hojas de chiltepín en

condiciones de estrés hídrico se presenta en la Tabla 17. Las plantas del control absoluto, es decir, plántulas sin inocular y sin estresar, mostraron el contenido significativamente inferior de prolina con una media de $4.44 \mu\text{M} / \text{g}$ de hoja. En contraste, las plantas estresadas y no inoculadas al igual que el control tratado con el producto comercial, mostraron los niveles más altos con medias de 136.60 y $135.21 \mu\text{M} / \text{g}$ de hoja, respectivamente. De forma similar, Kazerooni *et al.* (2021) mostraron un incremento de 64.1% en la acumulación de prolina en plantas de *C. annuum* cv. *Geumsugangsan* tratadas con P10. Sin embargo, en este estudio los tratamientos mostraron 49.24% menos contenido de prolina en hojas, en comparación al control negativo. Esto difiere de lo reportado en la literatura, ya que diversos estudios presentan mayor acumulación de prolina en plantas inoculadas como mecanismo de resistencia asociado al mantenimiento de la funcionalidad celular (Kazerooni *et al.*, 2021; Gowtham *et al.*, 2020). Considerando la sintomatología de marchitez observada podemos concluir que existe una mitigación del estrés hídrico en plántulas de chiltepín tratadas con *Bacillus* spp. a través de mecanismos de acción no revisados en este estudio (actividad antioxidante, hormonal, activación de la expresión genética y/o síntesis de proteínas protectoras).

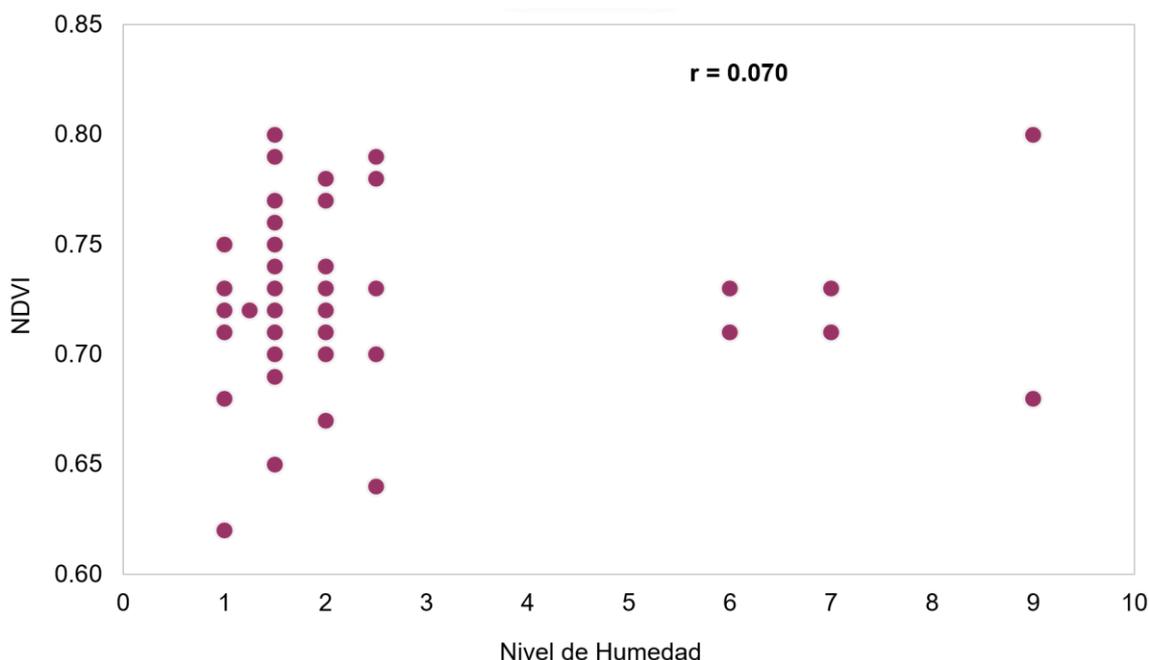


Figura 47. Correlación entre el nivel de humedad del sustrato y el NDVI. Coeficiente de correlación de Pearson en plántulas de chiltepín tratadas con *Bacillus* spp. al día 7 después de la inducción de estrés hídrico.

Tabla 17. Nivel de estrés, RWC y prolina en hojas chiltepín bajo condiciones de estrés *in vivo*.

Tratamiento	Prolina (μM / g de hoja)	RWC (%)	Nivel de estrés
C _{abs}	4.44 \pm 0.70 c	100.04 \pm 13.30 a	Sin estrés
C _{Xp A}	136.60 \pm 32.7 a	46.76 \pm 10.18 b	Moderado
C-	135.21 \pm 1.09 a	28.56 \pm 09.43 c	Severo
BtBII	63.03 \pm 14.6 b	50.49 \pm 12.45 b	Moderado
Bc25-3	73.92 \pm 10.0 b	54.63 \pm 17.31 b	Moderado
Bt25-6	62.26 \pm 1.57 b	46.17 \pm 13.68 b	Moderado
Bc25-7	84.77 \pm 14.1 b	57.71 \pm 21.54 b	Moderado
Bc30-2	53.55 \pm 13.3 b	45.64 \pm 07.58 b	Moderado

*Los datos están representados por la media de 6 y 3 repeticiones, respectivamente. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$). El nivel de estrés se clasificó según lo descrito por Bandurska (2022).

El RWC en hojas permite cuantificar el nivel de deshidratación de las plantas (Murali *et al.* 2021; Bandurska, 2022). En chiltepín, la retención de agua causó una reducción significativa de este parámetro (71.48%). En otro estudio, la aplicación de estrés severo (40% CC) en las variedades *C. annuum* L. KCa-4884 y G-4, provocó una disminución del 39.31 y 61.82% en el RWC, respectivamente (Sahitya *et al.*, 2019). La reducción del RWC indica una ralentización de la actividad metabólica e inhibición del crecimiento vegetal debido al desbalance entre la tasa de transpiración y el suministro de agua causado por el déficit hídrico (Murali *et al.*, 2021; Gowtham *et al.*, 2020). En este estudio, los tratamientos incrementaron 35.1% el contenido relativo de agua en las hojas, mostrando un comportamiento similar al control comercial (C_{Xp A}). Según las categorías descritas por Bandurska (2022), el tratamiento con *Bacillus* spp. disminuyó el nivel de estrés en las plántulas de chiltepín. Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura; Gupta *et al.* (2021) presentaron un aumento del 15.47% en el RWC de plantas de *C. annuum* L. tratadas con *B. amyloliquefaciens*, cuando se sometieron a estrés por sequía (80% CC). De forma similar, se reportó un incremento de hasta 38% en el RWC de plantas de tomate inoculadas con *B. subtilis* Rhizo SF 48 (Gowtham *et al.*, 2020). Estos resultados se pueden atribuir a la conservación de la hidratación foliar mediante la modulación del comportamiento de estomas, la disminución de la transpiración, la reducción de la conductancia estomática y de la tasa fotosintética (Bandurska, 2022).

X. CONCLUSIONES

Las cepas bacterianas aisladas de muestras de suelo de la región agrícola centro-sur del estado de Chihuahua fueron identificadas dentro del género *Bacillus*, predominando la especie *B. cereus*, seguida de *B. thuringiensis*, además *B. subtilis* y *B. wiedmannii*.

Las cepas de *Bacillus* spp. Bc16-4, Bc16-5, Bs22-3, Bc25-4, Bc25-7, Bc30-1 y Bc30-2 favorecieron la germinación y la promoción de crecimiento del chiltepín bajo condiciones *in vitro* e invernadero.

Las cepas de *Bacillus* Bc25-3, Bc25-4, Bt25-6, Bc25-7 y Bc30-2 aumentaron la resistencia al estrés por sequía en plántulas de chiltepín bajo condiciones *in vitro* e invernadero.

La cepa de *B. cereus* Bc25-7 destacó al incrementar la mayoría de los parámetros vegetativos y la tolerancia a estrés hídrico en chiltepín, en condiciones *in vitro* y en invernadero.

Las cepas de *Bacillus* Bt25-6 y Bc30-2 mostraron una tolerancia alta al estrés hídrico *in vitro* con relación a otras cepas reportadas.

El chile chiltepín nativo de Chínipas, mostró mayor tolerancia al estrés hídrico *in vitro* con relación a otros reportes de variedades de chile cultivadas.



10. 1 Perspectivas y sugerencias

Realizar una comparación de los mecanismos de promoción de crecimiento de las cepas en condiciones de sequía y en condiciones normales.

Evaluar el efecto de la combinación de cepas que presentan mayor actividad PGPR y bioprotección contra el estrés hídrico.

Determinar el efecto de las cepas de *Bacillus* spp. en condiciones de invernadero en etapas fenológicas más avanzadas, considerando especialmente parámetros de productividad y rendimiento.

Evaluar mecanismos de defensa a estrés hídrico como actividad antioxidante, peroxidación lipídica, contenido total de azúcares solubles, contenido de proteínas protectoras, actividad hormonal y expresión molecular.

Evaluar el potencial agrotecnológico de las cepas de *Bacillus* spp. en condiciones de campo.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, A., & Ibrahim, S. (2007, October 9-11). *Genotypic and differential responses of growth and yield of some maize (Zea mays L.) genotypes to drought stress*. In Conference on International Agricultural Research for Development. Tropentag, Witzenhouse, Germany. Disponible en: https://www.tropentag.de/2007/abstracts/links/Abdelmula_sTrfBukv.pdf
- Abdelwahed, S., Trabelsi, E., Saadouli, I., Kouidhi, S., Masmoudi, A., Cherif, A., Mnif, W., & Mosbah, A. (2022). A new pioneer colorimetric micro-plate method for the estimation of ammonia production by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Main Group Chemistry*, 21(1), 55–68. DOI: 10.3233/MGC-210077
- Abdul Baki, A., & Anderson, J. (1973). Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Science*, 13, 630–633. DOI: 10.2135/cropsci1973.0011183X001300060013x
- Abril, J., Roncallo, B., & Bonilla, R. (2017). Effect of inoculation with bacteria of the genus *Bacillus* on the growth of *Megathyrus maximus* Jacq, in conditions of water stress. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 37(1), 25–37. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2314-369X2017000100003
- Acevedo, P., Cruz, J., & Taboada, O. (2020). Commercial organic fertilizers, local manures and chemical fertilization in the production of poblano pepper seedlings. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 43(1), 35–44. DOI:10.35196/rfm.2020.1.35
- Adeoti, O., Agoro, A., Adedokun, E., Komolafe, K., & Adesina, D. (2021). Bioinformatics utilization of 16S rRNA sequences of PGPR bacterial isolates from farmland. *Open Journal of Case Reports*, 2(3), 1-5. Disponible en: https://www.arraypublishers.com/images/photo/606324b9cdc_b9.pdf
- Agami, R., Madani, R., Abd El-Mola, I., & Taha, R. (2016). Exogenous application with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) or proline induces stress tolerance in basil plants (*Ocimum basilicum* L.) exposed to water stress. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, 2(5), 77–92. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/308984083_Exogenous_application_with_plant_growth_promoting_rhizobacteria_PGPR_or_proline_induces_stress_tolerance_in_basil_plants_Ocimum_basilicum_L_exposed_to_water_stress
- Aguilar Meléndez, A., Vásquez Dávila, M., Manzanero Medina, G., & Katz, E. (2021). Chile (*Capsicum* spp.) as food-medicine continuum in multiethnic Mexico. *Foods*, 10(10), 2502. DOI: 10.3390/FOODS10102502
- Ahemad, M., & Khan, M. (2012). Productivity of greengram in tebuconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth-promoting *Bradyrhizobium* sp. MRM6 strain. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(1), 245–254. DOI: 10.1007/s11738-011-0823-8
- Ahluwalia, O., Singh, P., & Bhatia, R. (2021). A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resources, Environment and Sustainability*, 5: 100032. DOI: 10.1016/j.resenv.2021.100032
- Ahmad, M., Hussain, A., Dar, A., Luqman, M., Ditta, A., Iqbal, Z., Ahmad, H., Nazli, F., Soufan, W., Almutairi, K., & Sabagh, A. El. (2023). Combating iron and zinc malnutrition through mineral biofortification in maize through plant growth promoting *Bacillus* and *Paenibacillus* species. *Frontiers in Plant Science*, 13: 1094551. DOI: 10.3389/fpls.2022.1094551
- Alcalá Rico, J., López Benítez, A., Vázquez Badillo, M., Sánchez Aspeytia, D., Rodríguez Herrera, S., Pérez Rodríguez, M., & Ramírez Godina, F. (2019). Seed physiological potential of *Capsicum*



annuum var. *glabriusculum* genotypes and their answers to pre-germination treatments. *Agronomy*, 9: 325. DOI: 10.3390/agronomy9060325

Ali, M., Ahmed, I., Tariq, H., Abbas, S., Zia, M., Mumtaz, A., & Sharif, M. (2023). Growth improvement of wheat (*Triticum aestivum*) and zinc biofortification using potent zinc-solubilizing bacteria. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1140454 DOI: 10.3389/fpls.2023.1140454

Amna, Ud Din, B., Sarfraz, S., Xia, Y., Kamran, M., Javed, M., Sultan, T., Hussain Munis, M., & Chaudhary, H. (2019). Mechanistic elucidation of germination potential and growth of wheat inoculated with exopolysaccharide and ACC- deaminase producing *Bacillus* strains under induced salinity stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183: 109466. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109466

Andy, A., Rajput, V., Burachevskaya, M., & Gour, V. (2023). Exploring the identity and properties of two Bacilli strains and their potential to alleviate drought and heavy metal stress. *Horticulturae*, 9(46). DOI: 10.3390/horticulturae9010046

Antil, S., Kumar, R., Pathak, D., Kumar, A., Panwar, A., & Kumari, A. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria-*Bacillus cereus* KMT-5 and *B. megaterium* KMT-8 effectively suppressed Meloidogyne javanica infection. *Applied Soil Ecology*, 174: 104419. DOI: 10.1016/j.apsoil.2022.104419

Araiza Lizarde, N., Araiza Lizarde, E., & Martínez Martínez, J. (2011). Evaluation of germination and seedling Growth of Chiltepín (*Capsicum annum* L. variedad *glabriusculum*) greenhouse. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 8(2), 170–175. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77621587016>

Arun, D., Sabarinathan, K., Gomathy, M., Kannan, R., & Balachandar, D. (2020). Mitigation of drought stress in rice crop with plant growth-promoting abiotic stress-tolerant rice phyllosphere bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 60(9), 768–786. DOI: 10.1002/jobm.202000011

Ashry, N., Alaidaroos, B., Mohamed, S., Badr, O., El-Saadony, M., & Esmael, A. (2022). Utilization of drought-tolerant bacterial strains isolated from harsh soils as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Utilization of drought-tolerant bacterial strains. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1760–1769. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.10.054

Astorga, K., Meneses, K., Zúñiga, C., Brenes, J., & Rivera, W. (2014). Evaluation of antagonism of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* against three garlic pathogens. *Tecnología en Marcha*, 27(2), 82–91. Disponible en: <https://hdl.handle.net/2238/4285>

Ault, T. (2020). On the essentials of drought in a changing climate. *Science*, 368(6488), 256–260. DOI: 10.1126/science.aaz5492

Aziz, A., Umar, M., Mansha, M., Khan, M., Javed, M., Gao, H., Farhan, S., Iqbal, I., & Abdullah, S. (2018). Assessment of drought conditions using HJ-1A/1B data: A case study of Potohar region, Pakistan. *Geomatics, Natural Hazards and Risk*, 9(1), 1019–1036. DOI: 10.1080/19475705.2018.1499558

Bandurska, H. (2022). Drought stress responses: coping strategy and resistance. *Plants*, 11(7), 922. DOI: 10.3390/plants11070922

Bardakci, F., & Skibinski, F. (1994). Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 73, 117–123. DOI: 10.1038/hdy.1994.110

Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., Lopez Ferber, M., Graillet, B., Siegwart, M., & Nicot, P. (2015). Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Frontiers in Plant Science*, 6: 566. DOI: 10.3389/fpls.2015.00566



- Basu, A., Prasad, P., Das, S., Kalam, S., Sayyed, R., Reddy, M., & Enshasy, H. (2021). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: Recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, 13: 1140. DOI: 10.3390/su13031140
- Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress. *F1000 Research*, 5, 1554. DOI: 10.12688/f1000research.7678.1
- Bates, L. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205–207. DOI: 10.1007/BF00018060
- Batool, M., El-Badri, A., Wang, Z., Mohamed, I., Yang, H., Ai, X., Salah, A., Hassan, M., Sami, R., Kuai, J., Wang, B., & Zhou, G. (2022). Rapeseed morpho-physio-biochemical responses to drought stress induced by PEG-6000. *Agronomy*, 12(3): 579. DOI: 10.3390/agronomy12030579
- Benaissa, A., & Djebbar, R. (2022, May 06-08). *Aridity, Stress and Plant*. In 3rd Conference: International Modern Scientific Research Congress. Istanbul, Turkey. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/361944200_ARIDITY_STRESS_AND_PLANT
- Bewley, J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9(7), 1055–1056. DOI: 10.1105/tpc.9.7.1055
- Bhagat, N., Raghav, M., Dubey, S., & Bedi, N. (2021). Bacterial exopolysaccharides: Insight into their role in plant abiotic stress tolerance. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 31(8), 1045–1059. DOI: 10.4014/jmb.2105.05009
- Bhatt, K., & Maheshwari, D. (2020). Zinc solubilizing bacteria (*Bacillus megaterium*) with multifarious plant growth promoting activities alleviates growth in *Capsicum annum* L. *Biotech*, 10: 36. DOI: 10.1007/s13205-019-2033-9
- Bhattacharyya, C., Banerjee, S., Acharya, U., Mitra, A., Mallick, I., Haldar, A., Haldar, S., Ghosh, A., & Ghosh, A. (2020). Evaluation of plant growth promotion properties and induction of antioxidative defense mechanism by tea rhizobacteria of Darjeeling, India. *Scientific Reports*, 10: 15536. DOI: 10.1038/s41598-020-72439-z
- Blake, C., Christensen, M., & Kovacs, A. (2021). Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 34(1), 15–25. DOI: 10.1094/MPMI-08-20-0225-CR
- Boesenberg Smith, K., Pessaraki, M., & Wolk, D. (2012). Assessment of DNA yield and purity: An overlooked detail of PCR troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter*, 34(1), 1–6. DOI: 10.1016/j.clinmicnews.2011.12.002
- Bolaños, A., Toribio, J., Rodríguez, M., Hernández, G., Toledo, E., Alemón, F., & Romero, Y. (2021). *Bacillus licheniformis* M2-7 improves growth, development and yield of *Capsicum annum* L. *Agrociencia*, 55(3), 227–242. DOI: 10.47163/agrociencia.v55i3.2415
- Borjas Ventura, R., Andía Alarcón, E., Alarcón Águila, G., Estelita Castro, S., & Julca Otiniano, A. (2018). Growth and quality of coffee cultivars seedling (*Coffea arabica*) grafted onto *Coffea canephora* facing nematodes in greenhouse. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 6(2), 28–41. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2308-3859201800020002&lng=es&nrm=iss
- Bruno, B., Karthik, C., Ma, Y., Kadirvelu, K., Freitas, H., & Rajkumar, M. (2020). Amelioration of chromium and heat stresses in sorghum bicolor by Cr⁶⁺ reducing-thermotolerant plant growth promoting bacteria. *Chemosphere*, 244: 125521. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125521



Buchailot, M., Cairns, J., Hamadziripi, E., Wilson, K., Hughes, D., Chelal, J., McCloskey, P., Kehs, A., Clinton, N., Araus, J., & Kefauver, S. (2022). Regional monitoring of fall armyworm (FAW) using early warning systems. *Remote Sensing*, 14:5003. DOI: 10.3390/rs14195003

Bunu, S., Otele, D., Alade, T., & Dodoru, R. (2020). Determination of serum DNA purity among patients undergoing antiretroviral therapy using NanoDrop-1000 spectrophotometer and polymerase chain reaction. *Biomedical and Biotechnology Research Journal*, 4(3), 214–219. DOI: 10.4103/bbrj.bbrj_68_20

Camacho Rodríguez, M., Almaraz Suárez, J., Vázquez Vázquez, C., Angulo Castro, A., Ríos Vega, M., & González Mancilla, A. (2022). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth and yield of jalapeño pepper. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 28, 185–196. DOI: 10.29312/remexca.v13i28.3273

Candeias, L., Macfarlane, D., Mcwhinnie, S., Maidwell, N., Roeschlaub, C., Sammes, P., & Whittlesey, R. (1998). The catalysed NADH reduction of resazurin to resorufin. *Royal Chemical Society Journal. Perkin Transactions 1*, 2, 2333–2334. DOI: 10.1039/A806431H

Cano Vázquez, A., López Peralta, M., Zavaleta Mancera, H., Cruz Huerta, N., Ramírez Ramírez, I., Gardea Béjar, A., & González Hernández, V. (2015). Variation in degrees of seed dormancy among collections of chile piquin (*Capsicum annuum* var. *Glabriusculum*). *Botanical Sciences*, 93(1), 175–184. DOI: 10.17129/botsci.138

Cappucino, J., & Sherman, N. (1992). *Microbiology: A Laboratory Manual* (3rd Edition). Benjamin/Cumming Pub. Co.

Castañeda, N., Khoury, C., Achicanoy, H., Bernau, V., Dempewolf, H., Eastwood, R., Guarino, L., Harker, R., Jarvis, A., Maxted, N., Müller, J., Ramirez, J., Sosa, C., Struik, P., Vincent, H., & Toll, J. (2016). Global conservation priorities for crop wild relatives. *Nature Plants*, 2: 16022. DOI: 10.1038/NPLANTS.2016.22

Castillo Aguilar, C., Córdova Gaspar, A., Carillo Castañeda, G., Ortíz García, C., Coh Méndez, D., & Chiquini Medina, R. (2021). Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the growth of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agro Productividad*, 14(11), 35. DOI: 10.32854/agro p.v14i11.1690

Caughey Espinoza, D., Buitimea Cantúa, G., Buitimea Cantúa, N., Ayala Astorga, G., & Ochoa Meza, A. (2020). Physicochemical properties and yield of chiltepin fruits (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) cultivated under different growth conditions. *Idesia*, 38(3), 77–86. DOI: 10.4067/S0718-34292020000300077

Cerano, P., Villanueva, D., Fulé, P., Arreola, A., Sánchez, C., & Valdez, C. (2009). Reconstrucción de 350 años de precipitación para el suroeste de Chihuahua, México. *Madera y Bosques*, 15(2), 27–44. DOI:10.21829/myb.2009.1521189

Chandra, P., Wunnava, A., Verma, P., Chandra, A., & Sharma, R. (2021). Strategies to mitigate the adverse effect of drought stress on crop plants—influences of soil bacteria: A review. *Pedosphere*, 31(3), 496–509. DOI: 10.1016/S1002-0160(20)60092-3

Checinska, A., Paszczyński, A., & Burbank, M. (2015). *Bacillus* and other spore-forming genera: Variations in responses and mechanisms for survival. *In Annual Review of Food Science and Technology* 6, 351–369. DOI: 10.1146/annurev-food-030713-092332

Chen, M., Wei, X., Zhang, J., Zhou, H., Chen, N., Wang, J., Feng, Y., Yu, S., Zhang, J., Wu, S., Ye, Q., Pang, R., Ding, Y., & Wu, Q. (2022). Differentiation of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*



Using Genome-Guided MALDI-TOF MS Based on Variations in Ribosomal Proteins. *Microorganisms*, 10(5), 918. DOI: 10.3390/microorganisms 10050918

Chowdhury, S., Majumdar, S., & Mandal, V. (2020). Application of *Bacillus* sp. LBF-01 in *Capsicum annum* plant reduces the fungicide use against *Fusarium oxysporum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, 101714. DOI: 10.1016/j.bcab.20 20.101714

Cochard, B., Giroud, B., Crovadore, J., Chablais, R., Arminjon, L., & Lefort, F. (2022). Endophytic PGPR from Tomato Roots: Isolation, *In Vitro* Characterization and *In Vivo* Evaluation of Treated Tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Microorganisms*, 10(4), 765. DOI: 10.3390/MICROORGANISMS10040765

Corral Lugo, A., Morales García, Y., Pazos Rojas, L., Ramírez Valverde, A., Martínez Contreras, D., & Muñoz Rojas, J. (2012). Quantification of cultivable bacteria by the “Massive Stamping Drop Plate” method. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 147–156. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752012000200016

Corrales Ramírez, L., Sánchez Leal, L., Arévalo Galvez, Z., & Moreno Burbano, V. (2014). *Bacillus*: a genus of bacteria that exhibits important phosphate solubilizing abilities. *NOVA*, 12(21), 165–178. DOI:10.22490/24629448.1041

Cosío, J. (16 de julio de 2022). *Producción de chiltepín, una alternativa de desarrollo para comunidades rurales*. CONACYT PRENSA. Disponible en: <https://centrosconacyt.mx/objeto/produccion-chiltepin/>

Costa, P., Gomes, A., Braz, M., Pereira, C., & Almeida, A. (2021). Application of the resazurin cell viability assay to monitor *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* inactivation mediated by phages. *Antibiotics*, 10: 974. DOI: 10.3390/antibiotics 10080974

Covadonga, V. A., & de Silóniz, S. S. (2010). Técnicas básicas de Microbiología Observación de bacterias. *Reduca Serie Microbiología*, 3(5), 15-38. Disponible en: <http://revistareduca.es/index.php/biologia/issue/view/64/showToc>

De Moraes, C., Costa, B., Sampaio, M., Kashiwaqui, M., Caetano, J., Guimarães, V., de Herrera, J., Coutinho, P., Tsutsumi, C., Cruz, M., Alves, T., Oliveira, S., Ristau, A. and Braz, H. (2018). Production of lettuce seedlings with association of Diazotrophic bacteria and humic acids. *American Journal of Plant Sciences*, 9, 946-957. DOI: 10.4236/ajps.2018.95072

De Vries, F., Griffiths, R., Knight, C., Nicolitch, O., & Williams, A. (2020). Harnessing rhizosphere microbiomes for drought-resilient crop production. *Science*, 368(6488), 270–274. DOI: 10.1126/science.aaz5192

Del Toro Guerrero, F., & Kretschmar, T. (2020). Precipitation-temperature variability and drought episodes in northwest Baja California, México. *Journal of Hydrology: Regional Studies*, 27: 100653. DOI: 10.1016/j.ejrh.2019.100653

Deligoz, A., & Gur, M. (2015). Morphological, physiological and biochemical responses to drought stress of Stone pine (*Pinus pinea* L.) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37: 243. DOI: 10.1007/s11738-015-1998-1

Diabankana, R., Afordoanyi, D., Safin, R., Nizamov, R., Karimova, L., & Validov, S. (2021). Antifungal properties, abiotic stress resistance, and biocontrol ability of *Bacillus mojavensis* PS17. *Current Microbiology*, 78(8), 3124–3132. DOI: 10.1007/s00284-021-02578-7

Ding, J., Johnson, E., & Martin, Y. (2020). Optimization of leaf morphology in relation to leaf water status: A theory. *Ecology and Evolution*, 10(3), 1510–1525. DOI: 10.1002/ece3.6004



Ditta, A., Ullah, N., Imtiaz, M., Li, X., Jan, A., Mehmood, S., Rizwan, M., & Rizwan, M. (2022). Zn biofortification in crops through Zn-solubilizing plant growth-promoting rhizobacteria. Qaisar Mahmood (Ed.). *Sustainable Plant Nutrition in a Changing World*. (115–133). DOI: 10.1007/978-3-030-91499-8_7

Dutta, S., Layek, J., Akoijam, R., Boopathi, T., Vanlalhmangaiha, Saha, S., Singh, S., Lungmuana, & Prakash, N. (2019). Seaweed extract as natural priming agent for augmenting seed quality traits and yield in *Capsicum frutescens* L. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3803–3813. DOI: 10.1007/s10811-019-01871-0

Ehling Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* Species with pathogenic potential. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 10-1128. DOI: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0032-2018

Elgazzar, R. (2017). *Screening of siderophore producers from soil*. Undergraduate Honors Theses. Paper 379. East Tennessee State University. Disponible en: <https://dc.etsu.edu/honors/379>

Emmerich, W., & Hardegree, S. (1990). Polyethylene Glycol Solution Contact Effects on Seed Germination. *Agronomy Journal*, 82, 1103–1107. DOI: 10.2134/agronj1990.00021962008200060015x

Escalante Sandoval, C., & Nuñez, P. (2017). Meteorological drought features in northern and northwestern parts of Mexico under different climate change scenarios. *Journal of Arid Land*, 9(1), 65–75. DOI: 10.1007/s40333-016-0022-y

Eshaghi, E., Nosrati, R., Owlia, P., Malboobi, M., Ghaseminejad, P., & Ganjali, M. (2019). Zinc solubilization characteristics of efficient siderophore-producing soil bacteria. *Iranian Journal of Microbiology*, 11(5), 419–430. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Etesami, H., & Maheshwari, D. (2018). Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 225–246. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.013

Fang, Y., & Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72, 673–689. DOI: 10.1007/s00018-014-1767-0

Felegari, S., Sharifi, A., Moravej, K., Golchin, A., & Tariq, A. (2022). Investigation of the relationship between NDVI index, soil moisture, and precipitation data using satellite images. Pavan, A., Pandey, S., & Singh, V. (Eds.). *Sustainable Agriculture Systems and Technologies*. (314–325). DOI: 10.1002/9781119808565.ch15

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2021). The impact of disasters and crises on agriculture and food security. Disponible en: <https://www.fao.org/3/cb3673en/cb3673en.pdf>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT statistical database. (2021). Cultivos y productos de ganadería. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#data>

Furlan, A., Bianucci, E., Giordano, W., Castro, S., & Becker, D. (2020). Proline metabolic dynamics and implications in drought tolerance of peanut plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 151, 566–578. DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.04.010

Gangotri, S., Peerjade, D., Awati, M., & Satish, D. (2022). Evaluation of Chilli (*Capsicum annuum* L.) Genotypes for Drought Tolerance Using Polyethylene Glycol (PEG) 6000. *Journal of Experimental Agriculture International*, 44(11), 47–55, DOI: 10.9734/jeai/2022/v44i112052



- García, J., Ruiz, M., Preciado, P., Nieto, A., Murillo, B., Ruiz, F., Valdez, R., & Rueda, E. (2018). Growth and oil yield parameters of the *Capsicum annuum* var *aviculare* associated to the beneficial bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* and *Azospirillum halopraeferens* under field conditions. *Biotechnia*, 20(2), 59-64. Disponible en: <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/2835>
- García, P., Camarero, J., Fule, P., Martínez Sifuentes, R., Villanueva Díaz, J., Estrada Ávalos, J., Trucíos Caciano, R., Carlón Allende, T., & Castruita Esparza, U. (2022). Two Centuries of Drought History in the Center of Chihuahua, Mexico. *Forests*, 13(6), 921. DOI: 10.3390/F13060921
- Garrity, G., De Vos, P., Jones, D., Kreig, N., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, K., & Whitman, W. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 3. The Firmicutes. DOI: 10.1007/978-0-387-68489-5.
- Gashash, E., Osman, N., Alsahli, A., Hewait, H., Ashmawi, A., Alshallash, K., El-Taher, A., Azab, E., Abd El-Raouf, H., & Ibrahim, M. (2022). Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and cyanobacteria on botanical characteristics of tomato (*Solanum lycopersicon* L.) plants. *Plants*, 11, 2732. DOI: 10.3390/plants11202732
- Ghazy, N., & Sahar E. (2021). Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. *Archives of Microbiology*, 203, 1195–1209. DOI: 10.1007/s00203-020-02113-5
- Gohil, R., Raval, V., Panchal, R., & Rajput, K. (2022). Plant growth-promoting activity of *Bacillus* sp. PG-8 isolated from fermented Panchagavya and its effect on the growth of *Arachis hypogea*. *Frontiers in Agronomy*, 4, 805454. DOI: 10.3389/fagro.2022.805454
- Goswami, S., Dubey, A., Singh, N., & Maurya, B. (2019). Role of phosphorus solubilizing microorganisms and dissolution of insoluble phosphorus in soil. *International Journal of Chemical Studies*, 7(3), 3905–3913. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/336220599>
- Gou, J., Suo, S., Shao, K., Zhao, Q., Yao, D., Li, H., Zhang, J., & Rensing, C. (2020). Biofertilizers with beneficial rhizobacteria improved plant growth and yield in chili (*Capsicum annuum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36: 86. DOI: 10.1007/s11274-020-02863-w
- Gowtham, G., Brijesh, S., Murali, M., Shilpa, N., Prasad, M., Aiyaz, M., Amruthesh, K., & Niranjana, S. (2020). Induction of drought tolerance in tomato upon the application of ACC deaminase producing plant growth promoting rhizobacterium *Bacillus subtilis* Rhizo SF 48. *Microbiological Research*, 234, 126422. DOI: 10.1016/J.MICRES.2020.126422
- Green, M., & Sambrook, J. (2018). Isolation and quantification of DNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 6, 403–414. DOI: 10.1101/pdb.top093336
- Green, M., & Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 6–15. DOI: 10.1101/pdb.top100388
- Grover, M., Bodhankar, S., Sharma, A., Sharma, P., Singh, J., & Nain, L. (2021). PGPR mediated alterations in root traits: way toward sustainable crop production. *Frontiers in Sustainable Food System*, 4: 618230. DOI: 10.3389/fsufs.2020.618230.
- Gupta, A., Rico Medina, A., & Caño Delgado, A. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368(6488), 266–269. DOI: 10.1126/science.aaz7614
- Gupta, S., Kaushal, R., Sood, G., Bhardwaj, S., & Chauhan, A. (2021). Indigenous plant growth promoting rhizobacteria and chemical fertilizers: impact on soil health and productivity of *Capsicum* (*Capsicum Annuum* L.) in north western Himalayan region. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 52(9), 948–963. DOI: 10.1080/00103624.2021.1872595



- Hahm, M., Son, J., Hwang, Y., Kwon, D., & Ghim, S. (2017). Alleviation of salt stress in pepper (*Capsicum annum* L.) plants by plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(10), 1790–1797. DOI: 10.4014/jmb.1609.09042
- Hao, X., Cho, C., Racz, G., & Chang, C. (2002). Chemical retardation of phosphate diffusion in an acid soil as affected by liming. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 64, 213–224. DOI: 10.1023/A:1021470824083
- Hasan, A., Widodo, Hamzah Mutaquin, K., Taufik, M., & Hidayat, S. (2021). Metode single image-NDVI untuk deteksi dini gejala mosaik pada *Capsicum annum*. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 17(1), 9–18. DOI: 10.14692/jfi.17.1.9-18
- Hasuty, A., Choliq, A., & Hidayat, I. (2018). Production of Indole Acetic Acid (IAA) by *Serratia marcescens* subsp. *marcescens* and *Rhodococcus aff. qingshengii*. *International Journal of Agricultural Technology*, 14(3), 299–312. Disponible en: [http://www.ijat-aatsea.com/pdf/v14_n3_2018_%20May/3_IJAT_14\(3\)_2018_Hastuty,%20A..pdf](http://www.ijat-aatsea.com/pdf/v14_n3_2018_%20May/3_IJAT_14(3)_2018_Hastuty,%20A..pdf)
- Hatfield, J., & Dold, C. (2019). Water-use efficiency: Advances and challenges in a changing climate. *In Frontiers in Plant Science*, 10: 103. DOI: 10.3389/fpls.2019.00103
- Hayano, C., Gámez, N., & Medina, L. (2016). Wild Pepper *Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*: Taxonomy, plant morphology, distribution, genetic diversity, genome sequencing, and phytochemical compounds. *Crop Science*, 56(1), 1–11. DOI: 10.2135/CROPSCI2014.11.0789
- Hernández, J., Tamez, P., Gómez, R., Delgado, M., Robles, L., González, A., & Infante, R. (2023). Pepper growth promotion and biocontrol against *Xanthomonas euvesicatoria* by *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* formulations. *PeerJ*, 11: e14633. DOI: 10.7717/peerj.14633
- Hernández Pérez, T., Gómez García, M., Valverde, M., & Paredes López, O. (2020). *Capsicum annum* (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(6), 2972–2993. DOI: 10.1111/1541-4337.12634
- Huang Lin, E., Sánchez León, E., Amils, R., & Abrusci, C. (2022). Potential applications of an exopolysaccharide produced by *Bacillus xiamenensis* RT6 isolated from an acidic environment. *Polymers*, 14(18), 3918. DOI: 10.3390/polym14183918
- Huerta, E., Vidal, O., Jarquin, A., Geissen, V., & Gomez, R. (2010). Effect of vermicompost on the growth and production of amashito pepper, interactions with earthworms and rhizobacteria. *Compost Science and Utilization*, 18(4), 282–288. DOI: 10.1080/1065657X.2010.10736967
- Hussain, S., Hussain, S., Qadir, T., Khaliq, A., Ashraf, U., Parveen, A., Saqib, M., & Rafiq, M. (2019). Plant science today drought stress in plants: An overview on implications, tolerance mechanisms and agronomic mitigation strategies. *Plant Science Today*, 6(4), 389–402. DOI: 10.14719/pst.2019.6
- Ihuoma, S., & Madramootoo, C. (2019). Crop reflectance indices for mapping water stress in greenhouse grown bell pepper. *Agricultural Water Management*, 219, 49–58. DOI: 10.1016/j.agwat.2019.04.001
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2019) (07 de julio de 2022). Report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. Disponible en: <https://www.ipcc.ch/srccl/download/>
- Jayapala, N., Mallikarjunaiah, N., Puttaswamy, H., Gavirangappa, H., & Ramachandrappa, N. (2019). Rhizobacteria *Bacillus* spp. induce resistance against anthracnose disease in chili (*Capsicum*



annuum L.) through activating host defense response. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29: 45. DOI: 10.1186/s41938-019-0148-2

Jiménez, A., Orozco, J., Gutiérrez, A., Vargas, G., Sánchez, E., Muñoz, E., & Esqueda, M. (2022). Functional plasticity of *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* through multiple traits. *AoB PLANTS*, 14(3): plac017. DOI: 10.1093/aobpla/plac017

Jo, H., Tagele, S., Pham, H., Kim, M., Choi, S., Kim, M., Park, Y., Ibal, J., Park, G., & Shin, J. (2020). Response of soil bacterial community and pepper plant growth to application of *Bacillus thuringiensis* KNU-07. *Agronomy*, 10(4), 551. DOI: 10.3390/agronomy10040 551

Kalam, S., Basu, A., & Podile, A. (2020). Functional and molecular characterization of plant growth promoting *Bacillus* isolates from tomato rhizosphere. *Heliyon*, 6(8), e04734. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04734

Kaniz, F., Zheng, W., Bais, H., & Jin, Y. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria mediate soil hydro-physical properties: An investigation with *Bacillus subtilis* and its mutants. *Vadose Zone Journal*, 22(5), e20274. DOI: 10.1002/vzj2.20274

Karimzad, L., Khakvar, R., Younessi-Hamzekhanlu, M., Norouzi, M., Amani, M., & Sabourmoghaddam, N. (2023). Drought tolerance induction in wheat by inoculation of seeds with a novel growth-promoting bacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47, 102594. DOI: 10.1016/j.bcab.2022.102594

Kashyap, B.K., Solanki, M.K., Pandey, A.K., Prabha, S., Kumar, P., Kumari, B. (2019). *Bacillus* as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Promising Green Agriculture Technology. In: Ansari, R., Mahmood, I. (eds) *Plant Health Under Biotic Stress*. (219-236). Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-13-6040-4_11

Kaushal, M., & Wani, S. (2016). Plant-growth-promoting rhizobacteria: Drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. *Annals of Microbiology*, 66, 35–42. DOI: 10.1007/s13213-015-1112-3

Kaya, A., & Banu Doganlar, Z. (2019). Melatonin improves the multiple stress tolerance in pepper (*Capsicum annuum*). *Scientia Horticulturae*, 256, 108509. DOI: 10.1016/j.scienta.2019.05.036

Kazerooni, E., Maharachchikumbura, S., Adhikari, A., Al-Sadi, A., Kang, S., Kim, L., & Lee, I. (2021). Rhizospheric *Bacillus amyloliquefaciens* protects *Capsicum annuum* cv. *Geumsugangsan* from multiple abiotic stresses via multifarious plant growth-promoting attributes. *Frontiers in Plant Science*, 12, 669693. DOI: 10.3389/fpls.2021.669693

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(1), 239–247. DOI: 10.1080/17429145.2018.1471527

Kim, S., Yoo, S., Weon, H., Song, J., & Sang, M. (2022). *Bacillus butanolivorans* KJ40 contributes alleviation of drought stress in pepper plants by modulating antioxidant and polyphenolic compounds. *Scientia Horticulturae*, 301(2), 111111. DOI: 10.1016/j.scienta.2022.111111

Kolacinska, K., & Koncki, R. (2014). A novel optoelectronic detector and improved flow analysis procedure for ammonia determination with nessler's reagent. *Analytical Sciences*, 30(10), 1019–1022. DOI: 10.2116/analsci.30.1019

Kovács, Á. T. (2019). Trends in Microbiology: *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 27(8), 724–725. DOI: 10.1016/j.tim.2019.03.008



- Kumar, A., Dewangan, S., Lawate, P., Bahadur, I., & Prajapati, S. (2019). Zinc-Solubilizing bacteria: A boon for sustainable agriculture. Sayyed, R., *et al.* (eds.) *Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable stress management, microorganisms for sustainability*. (139–155) Springer. DOI: 10.1007/978-981-13-6536-2_8
- Kumar, A., Sridar, R., & Uthandi, S. (2017). Mitigation of drought in rice by a phyllosphere bacterium *Bacillus altitudinis* FD48. *African Journal of Microbiology Research*, 11(45), 1614–1625. DOI: 10.5897/AJMR2017.8610
- Kumar J., & Saraf, M. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of Agricultural Research and Development*, 5(2), 108–119. DOI: 10.13140/RG.2.1.5171.2164
- Kumar, M., Mishra, S., Dixit, V., Kumar, M., Agarwal, L., Chauhan, P., & Nautiyal, C. (2016). Synergistic effect of *Pseudomonas putida* and *Bacillus amyloliquefaciens* ameliorates drought stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signaling & Behavior*, 11(1), e1071004. DOI: 10.1080/15592324.2015.1071004
- Lastochkina, O., Yakupova, A., Avtushenko, I., Lastochkin, A., & Yuldashev, R. (2023). Effect of seed priming with endophytic *Bacillus subtilis* on some physio-biochemical parameters of two wheat varieties exposed to drought after selective herbicide application. *Plants*, 12(8), 1724. DOI: 10.3390/plants12081724
- Lestari, P., Syukur, M., & Trikoesoemaningtyas, W. (2023). Genetic variability and path analysis of chili (*Capsicum annum* L.) associated characters under drought stress from vegetative to generative phases. *Biodiversitas*, 24(4), 2315–2323. DOI: 10.13057/biodiv/d240445
- Lim, J., & Kim, S. (2013). Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper. *The Plant Pathology Journal*, 29(2), 201. DOI: 10.5423/PPJ.SI.02.2013.0021
- Linares, J., Cuellar, G., Rivera, B., Gutiérrez, N., Pérez, S., & Nevárez, G. (2020). Selection of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables based on their antimicrobial and enzymatic activities. *Foods*, 9, 1399. DOI: 10.3390/foods9101399
- Llanes, O., Gaxiola, A., Estrella, R., Norzagaray, M., Troyo, E., Pérez, E., Ruiz, R., & Pellegrini, M. (2018). Variability and factors of influence of extreme wet and dry events in Northern Mexico. *Atmosphere*, 9, 122. DOI: 10.3390/atmos9040122
- López, A., Alvarado, M., Díaz, L., & Rocha, A. (2020). Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento en la concentración de algunas fitohormonas y germinación de las semillas del chile piquín *Capsicum annum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill. *Polibotánica*, 50. 83-95. DOI: 10.18387/polibotanica.50.6
- Lozo, J., Danojević, D., Jovanović, Ž., Nenadović, Ž., Fira, D., Stanković, S., & Radović, S. (2022). Genotype-Dependent Antioxidative Response of Four Sweet Pepper Cultivars to Water Deficiency as Affected by Drought-Tolerant *Bacillus safensis* SS-2.7 and *Bacillus thuringiensis* SS-29.2 Strains. *Horticulturae*, 8(3), 236 DOI: 10.3390/horticulturae8030236
- Mancera, P. (01 de abril de 2020). *Cuantificación de ácidos nucleicos mediante diferentes técnicas*. Disponible en: <https://vhir.vallhebron.com/sites/default/files/2022-06/UAT-quantificacio-fluorometri-ca-acids-nucleics.pdf>
- Mares, M., & Valiente, J. (2019). Horticultural aspects for the cultivated production of piquin peppers (*Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*)-A review. *In HortScience*, 5(1), 70–75. DOI: 10.21273/HO RTSCI13451-18



- Martignago, D., Rico, A., Blasco, D., Fontanet, J., & Caño, A. (2020). Drought resistance by engineering plant tissue-specific responses. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1676. DOI: 10.3389/fpls.2019.01676
- Martínez, E., Lagunes, L., Castelán, M., Lara, F., & Trejo, C. (2020). Leaf gas exchange and growth of *Capsicum annuum* var. *Glabriusculum* under conditions of flooding and water deficit. *Photosynthetica*, *58*(3), 873–880. DOI: 10.32615/ps.2020.032
- Mathivanan, S., Chidambaram, A., Amala Robert, G., & Kalaikanghan, R. (2017). Impact of PGPR inoculation on photosynthetic pigment and protein contents in *Arachis hypogaea* L. *Journal of Scientific Agriculture*, *1*, 29–36. DOI: 10.25081/jsa.2017.v1i0.24
- Medrano, H., Na Bota, J., Cifre, J., Flexas, J., Ribas Carbó, M., & Gulías, J. (2007). Eficiencia en el uso del agua pro las plantas. *Investigaciones Geográficas*, *43*, 63–84. DOI:10.14198/INGEO2007.43.04
- Michel, B., & Kaufmann, M. (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, *51*, 914–916. DOI: 10.1104/pp.51.5.914.
- Miljaković, D., Marinković, J., & Balešević Tubić, S. (2020). The Significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, *8*(7), 1037. DOI: 10.3390/MICROORGANISMS8071037
- Mimmo, T., Del Buono, D., Terzano, R., Tomasi, N., Vigani, G., Crecchio, C., Pinton, R., Zocchi, G., & Cesco, S. (2014). Rhizospheric organic compounds in the soil-microorganism-plant system: Their role in iron availability. *European Journal of Soil Science*, *65*(5), 629–642. DOI: 10.1111/ejss.12158
- Moghannem, S., Farag, M., Shehab, A., & Azab, M. (2018). Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*(3), 452–462. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.05.012
- Mohamed, E., Farag, A., & Youssef, S. (2018). Phosphate Solubilization by *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* Isolated from Tomato Plant Rhizosphere. *Journal of Environmental Protection*, *9*(3), 266–277. DOI: 10.4236/jep.2018.93018
- Moreno, A., Romero, F., Estrada, G., Meneses, C., & Bonilla, R. (2020). Dry-caribbean *Bacillus* spp. strains ameliorate drought stress in maize by a strain-specific antioxidant response modulation. *Microorganisms*, *8*(6), 823. DOI: 10.3390/MICROORGANISMS8060823
- Mormak, D., & Casida, L. (1985). Study of *Bacillus subtilis* endospores in soil by use of a modified endospore stain. *Applied and Environmental Microbiology*, *49*(6), 1356–1360. DOI: 10.1128/aem.49.6.1356-1360.1985
- 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*(2), 590–596. DOI: 10.22161/ijeab/2.2.5
- Munitz, S., Schwartz, A., & Netzer, Y. (2019). Water consumption, crop coefficient and leaf area relations of a *Vitis vinifera* cv. “Cabernet Sauvignon” vineyard. *Agricultural Water Management*, *219*, 86–94. DOI: 10.1016/j.agwat.2019.03.051
- Murali, M., Singh, S., Gowtham, H., Shilpa, N., Prasad, M., Aiyaz, M., & Amruthesh, K. (2021). Induction of drought tolerance in *Pennisetum glaucum* by ACC deaminase producing PGPR- *Bacillus amyloliquefaciens* through antioxidant defense system. *Microbiological Research*, *253*, 126891. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126891



- Murillo, B., Rueda, E., Troyo, E., Córdoba, M., Hernández, L., & Nieto, A. (2015). Baseline study of morphometric traits of wild *Capsicum annuum* growing near two biosphere reserves in the Peninsula of Baja California for future conservation management. *BMC Plant Biology*, 15, 118. DOI: 10.1186/s12870-015-0505-6
- Napitupulu, T. P., Kanti, A., & Sudiana, I. M. (2019). Evaluation of the Environmental Factors Modulating Indole-3-acetic Acid (IAA) Production by *Trichoderma harzianum* InaCC F88. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 308, 012060. DOI: 10.1088/17551315/308/1/012060
- Naseer, I., Maqshoof, A., Hussain, A., & Jamil, M. (2020). Potential of zinc solubilizing *Bacillus* strains to improve rice growth under axenic conditions. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 57(4), 1057–1071. DOI: 10.21162/PAKJAS/20.9988
- Nithyapriya, S., Lalitha, S., Sayyed, R., Reddy, M., Dailin, D., El Enshasy, H., Luh Suriani, N., & Herlambang, S. (2021). Production, purification, and characterization of bacillibactin siderophore of *Bacillus subtilis* and its application for improvement in plant growth and oil content in sesame. *Sustainability*, 13, 5394. DOI: 10.3390/su1310 5394
- Nwosu, I., Abu, G., & Agwa, K. (2019). Isolation, screening and characterization of exopolysaccharide producing bacteria. *Microbiology Research Journal International*, 29(5), 52376. DOI: 10.9734/mrji/2019/v29i530174
- Oana, A., Constantinescu, F., & Petruta, C. (2015). Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(5), 10737-10750. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/287534082>
- Oluwatosin, A., Toba, T., Titilayo, O., Jude, A., Oluwapelumi, O., Ifeoluwa, O., Joseph, O., Kwenda, S., Khumalo, Z., Ismail, A., Julius, O., & Olubukola, O. (2022). The growth enhancement potentials of indigenous plant growth promoting rhizobacteria on sweet pepper (*Capsicum annuum*) through seed bacterization. *International Journal of Innovative Research & Growth*, 1(2), 96–104. Disponible en: <https://ijsrisjournal.com/index.php/ojsfiles/article/view/58>
- Ortega, D., Bartolón, J., & Bahena, H. (2018). Drought vulnerability indices in Mexico. *Water*, 10(11), 1671. DOI: 10.3390/w10111671
- Osmolovskaya, N., Shumilina, J., Kim, A., Didio, A., Grishina, T., Bilova, T., Keltsieva, O., Zhukov, V., Tikhonovich, I., Tarakhovskaya, E., Frolov, A., & Wessjohann, L. A. (2018). Methodology of drought stress research: Experimental setup and physiological characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 4089. DOI: 10.3390/ijms19124089
- Osuna, J., Hernández, S., Osuna, T., Pacheco, A., Parra, S., Romero, C., & Retes, J. (2023). Variations in salinity tolerance in wild pepper (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) populations. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 83(4), 432–443. DOI: 10.4067/S0718-58392023000400432
- Ozturk, M., Turkyilmaz, B., García, P., Khursheed, A., Gul, A., & Hasanuzzaman, M. (2021). Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1321–1335. DOI: 10.1111/ppl.13297
- Patrignani, A., & Ochsner, T. (2015). Canopeo: A powerful new tool for measuring fractional green canopy cover. *Agronomy Journal*, 107(6), 2312–2320. DOI: 10.2134/agron j15.0150
- Paul, A., & Dubey, R. (2015). Characterization of protein involved in nitrogen fixation and estimation of co-factor. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, 5(4), 582-597. Disponible en: <http://bipublication.com/files/IJABR-V5I4-2014-4.pdf>



- Paul, G., Mahmud, S., Dutta, A., Sarkar, S., Laboni, A., Hossain, M., Nagata, A., Karmaker, P., Razu, M., Kazi, T., Uddin, M., Zaman, S., Islam, M., Khan, M., & Saleh, M. (2022). Volatile compounds of *Bacillus pseudomycooides* induce growth and drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Scientific Reports*, 12(1), 19137. DOI: 10.1038/s41598-022-22354-2
- Pérez, A., Eguiarte, L., Mercer, K., Martínez, N., McHale, L., van der Knaap, E., & Jardón, L. (2022). Genetic diversity, gene flow, and differentiation among wild, semiwild, and landrace chile pepper (*Capsicum annuum*) populations in Oaxaca, Mexico. *American Journal of Botany*, 109(7), 1157–1176. DOI: 10.1002/ajb2.16019
- Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of phosphates in soil in relation with vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17, 362–370. DOI:
- Poobalan, V., Praneetha, S., Arumugam, T., Jeyakumar, P., & Kumaravadeivel, N. (2020). Screening of *Capsicum annuum* and its related species for drought tolerance. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(1), 2139–2146. Disponible en: <https://www.phytojournal.com/archives/2020/vol9issue1/PartAJ/9-1-436-264.pdf>
- Quintero, M., Guillen Castillo, O., Delgado Sánchez, P., Sánchez, J., Guzmán Carrasco, A., & Guzmán Palomino, J. (2018). Improving dormancy and germination of Piquín chili pepper (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) by priming techniques. Preprints.org. DOI: 10.20 944/preprints201802.0160.v1
- Rashid, U., Yasmin, H., Hassan, M., Naz, R., Nosheen, A., Sajjad, M., Ilyas, N., Keyani, R., Jabeen, Z., Mumtaz, S., Alyemeni, M., & Ahmad, P. (2021). Drought-tolerant *Bacillus megaterium* isolated from semi-arid conditions induces systemic tolerance of wheat under drought conditions. *Plant Cell Reports*, 41(3), 549–569. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02640-x>
- Rebetzke, G., Botwright, T., Moore, C., Richards, R., & Condon, A. (2004). Genotypic variation in specific leaf area for genetic improvement of early vigour in wheat. *Field Crops Research*, 88(2–3), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.01.007>
- Reed, R., Bradford, K., & Khanday, I. (2022). Seed germination and vigor: ensuring crop sustainability in a changing climate. *Heredity*, 128(6), 450–459. DOI: 10.1038/s41437-022-00497-2
- Ricardez, L., Lagunes, L., Hernández, E., Palma, D., & Conde, F. (2021). Water restriction during the vegetative and reproductive stages of *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, and its effect on growth, secondary metabolites and fruit yield. *Scientia Horticulturae*, 285, 110129. DOI: 10.1016/J.SCIENTA.2021.110129
- Riordan, E., & Nabhan, G. (2019). *Trans situ* conservation of crop wild relatives. *Crop Science*, 59(6), 2387–2403. DOI: 10.2135/cropsci2019.06.0356
- Romero, C., Hernández, S., Pacheco, A., Retes, J., Osuna, T., & Valdéz, Á. (2023). Phenotype differentiation of *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* of three regions in Mexico and its relation to climate. *Botanical Sciences*, 101(3), 744–760. DOI: 10.17129/botsoci.3289
- Rosenswig, R. (2010). The beginnings of mesoamerican civilization: inter-regional interaction and the olmec (Cambridge University Press, Ed.).
- Rout, G., & Sahoo, S. (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. *Agricultural Science*, 3, 1–24. DOI: 10.7831/ras.3.1
- Saad, M., & Abo-Koura, H. (2018). Improvement of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) growth and yield under drought stress by inoculation with *Bacillus cereus* and foliar application of potassium silicate. *Environment, Biodiversity and Soil Security*, 2, 1–8. DOI: 10.21608/jenvbs.2019.6790.1045



Sáenz Reyes, T., Muñoz Flores, H., Pérez, C., Rueda Sánchez, A., & Hernández Ramos, J. (2014). Plant quality of three pine species of “Morelia” nursery at Michoacán state. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5(26), 98–111. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63439016008>

Sahitya, U., Krishna, M., & Suneetha, P. (2019). Integrated approaches to study the drought tolerance mechanism in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(3), 637–647. DOI: 10.1007/s12298-019-00655-7

Salazar, A., Sandoval, A., & Armendáriz, J. (2013). *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGraw-Hill Interamericana.

Sanchez, M., Mora, M., Wong, A., De La Portilla, N., Sanchez, L., Lugo, J., Vaca, R., Del Aguila, P., & Yañez, G. (2023). Effect of pH and carbon source on phosphate solubilization by bacterial strains in pikovskaya medium. *Microorganisms*, 11, 49. DOI: 10.3390/microorganisms11010049

Sansinenea, E. (2019). *Bacillus* spp.: As plant growth-promoting bacteria. Singh, H. *et al.* (eds.), Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms. 225–237. *Springer*. DOI: 10.1007/978-981-13-5862-3_11

Sati, S., & Prabha, P. (2019). Evaluation of phosphate solubilization by root endophytic aquatic Hyphomycete *Tetracladium setigerum*. *Symbiosis*, 77(2), 141–145. DOI: 10.1007/s13199-018-0575-y

Schaad, N., Jones, J., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* (Third Edition). American Phytopathological Society. DOI: 10.1023/A:1013748332579

Schwyn, B., & Neilands, J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160, 47–56. DOI:10.1016/0003-2697(87)90612-9

Seleiman, M., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Haleem Abdul-Wajid, H., & Leonardo Battaglia, M. (2021). Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, 10, 259. DOI: 10.3390/plants

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (5 de agosto de 2023). Anuario estadístico de la producción agrícola. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

Servicio Meteorológico Nacional – Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (5 de agosto de 2023). Monitor de Sequía en México (MSM). Disponible en: <https://smn.conagua.gob.mx/es/climatologia/monitor-de-sequia/monitor-de-sequia-en-mexico>

Sharma, P., K. C. Kumawat, K. C. K., Kaur, S., & Kaur, N. (2014). Assessment of Zinc solubilization by endophytic bacteria in legume rhizosphere. *Indian Journal of Applied Research*, 4(6), 439–441. DOI: 10.15373/2249555X/June2014/137

Sheteiwy, M., Abd Elgawad, H., Xiong, Y., Macovei, A., Brestic, M., Skalicky, M., Shaghaleh, H., Alhaj Hamoud, Y., & El-Sawah, A. (2021). Inoculation with *Bacillus amyloliquefaciens* and mycorrhiza confers tolerance to drought stress and improve seed yield and quality of soybean plant. *Physiologia Plantarum*, 172(4), 2153–2169. DOI: 10.1111/PPL.13454

Sikha, S., Sunil, P., Arti, J., & Sujata, B. (2013). Impact of water-deficit and salinity stress on seed germination and seedling growth of *Capsicum annuum* “Solan Bharpur.” *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(8), 9–15. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/283355272_Impact_of_Water_deficit_and_Salinity_stress_on_Seed_Germination_and_Seedling_Growth_of_Capsicum_annuum_'Solan_Bharpur'



- Solano, N., Valencia, J., Vergara, S., Millán, J., Torres, I., & Guevara, R. (2022). Comparative analysis of the NDVI and NGBVI as indicators of the protective effect of beneficial bacteria in conditions of biotic stress. *Plants*, 11(7), 932. DOI: 10.3390/plants11070932
- Sosa, M., Ruiz, E., Tun, J., Pinzón, L., & Reyes, A. (2019). Germinación, crecimiento y producción de glucanasas en *Capsicum chinense* Jacq. inoculadas con *Bacillus* spp. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6(16), 137–143. DOI: 10.19136/era.a6n16.1801
- Takahashi, F., Kuromori, T., Urano, K., Yamaguchi, K., & Shinozaki, K. (2020). Drought stress responses and resistance in plants: From cellular responses to long-distance intercellular communication. *Frontiers in Plant Science*, 11, 556972. DOI: 10.3389/fpls.2020.556972
- Tejera Hernández, B., Rojas Badía, M., & Heydrich Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 42(3). 131-138. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181222321004>
- Tian, T., Sun, B., Shi, H., Gao, T., He, Y., Li, Y., Liu, Y., Li, X., Zhang, L., Li, S., Wang, Q., & Chai, Y. (2021). Sucrose triggers a novel signaling cascade promoting *Bacillus subtilis* rhizosphere colonization. *The ISME Journal*, 15(9), 2723–2737. DOI: 10.1038/s41396-021-00966-2
- Timmusk, S., Abd El-Daim, I. A., Copolovici, L., Tanilas, T., Kännaste, A., Behers, L., Nevo, E., Seisenbaeva, G., Stenström, E., & Niinemets, Ü. (2014). Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: Enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PLoS ONE*, 9(5), e96086. DOI: 10.1371/journal.pone.0096086
- Ullah, A., Nisar, M., Ali, H., Hazrat, A., Hayat, K., Keerio, A., Ihsan, M., Laiq, M., Ullah, S., Fahad, S., Khan, A., Khan, A., Akbar, A., & Yang, X. (2019). Drought tolerance improvement in plants: an endophytic bacterial approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(8), 7385–7397. DOI: 10.1007/s00253-019-10045-4
- Vargas, T., & Kuno, A. (2014). Morfología Bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 49(2), 2594–2598. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/372321101/Morfologia-Bacteriana-pdf>
- Vázquez, A., Góngora, O., Olivas, I., Muñoz, O., Osuna, P., Rodrigo, J., De la Rosa, L., & Álvarez, E. (2020). Phytochemical profile and antioxidant activity of chiltepin chili (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*), Sonora, Mexico. *Journal of Food Bioactives*, 11, 57-65. DOI: 10.31665/jfb.2020.11237
- Verslues, P., Ober, E., & Sharp, R. (1998). Root growth and oxygen relations at low water potentials. Impact of oxygen availability in polyethylene glycol solutions. *Plant Physiology*, 116, 1403–1412. DOI: 10.1104/pp.116.4.1403
- Vicente, S., Quiring, S., Peña, M., Yuan, S., & Domínguez Castro, F. (2019). A review of environmental droughts: Increased risk under global warming? *Earth-Science Reviews*, 201(42), 102953. DOI:10.1016/j.earscirev.2019.102953
- Vieira, C., Abreu, C., Aparecida, E., De Paula, U., Gomes, C., Moreira, L., Marta, M., & Morais De Sousa. (2020). Genome-guided insights of tropical *Bacillus* strains efficient in maize growth promotion. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(9), fiae157. DOI: 10.1093/femsec/fiae157
- Vinale, F., & Sivasithamparam, K. (2020). Beneficial effects of *Trichoderma* secondary metabolites on crops. In *Phytotherapy Research*, 34(11) 2835–2842. John Wiley and Sons Ltd. DOI: 10.1002/ptr.6728

- Wang, D., Jiang, C., Zhang, L., Chen, L., Zhang, X., & Guo, J. (2019). Biofilms positively contribute to *Bacillus amyloliquefaciens* 54-induced drought tolerance in tomato plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6271; DOI: 10.3390/ijms20246271
- Wang, Q., Moreno, Á., Muñoz, J., Campos, M., & Camps, G. (2023). Estimation of vegetation traits with kernel NDVI. *Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 195, 408–417. DOI: 10.1016/j.isprsjprs.2022.12.019
- Wang, W., Wu, Z., He, Y., Huang, Y., Li, X., & Ye, B. (2018). Plant growth promotion and alleviation of salinity stress in *Capsicum annuum* L. by *Bacillus* isolated from saline soil in Xinjiang. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 520–529. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.070
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)811 92-2
- Yadav, V., Bhagat, N., & Sharma, S. (2022). Modulation in plant growth and drought tolerance of wheat crop upon inoculation of drought-tolerant- *Bacillus* species isolated from hot arid soil of India. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16(1), 246–262. DOI: 10.22207/JPAM.16.1.14
- Yang, C., Zhang, X., Zou, C., Cheng, Y., Zheng, P., & Li, G. (2007). Effects of PEG-6000 simulated drought stress on germination and seedling growth of different *Brassica napus* varieties. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 29(4), 425–430. Disponible en: <http://www.jouoilcrops.cn/EN/abstract/abstract80.shtml>
- Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, 7(3), 50. DOI: 10.3390/horticulturae7030050
- Yasin, N., Akram, W., Khan, W., Ahmad, S., Ahmad, A., & Ali, A. (2018). Halotolerant plant-growth promoting rhizobacteria modulate gene expression and osmolyte production to improve salinity tolerance and growth in *Capsicum annum* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(23), 23236–23250. DOI: 10.1007/s11356-018-2381-8
- Yildirim, K., Orel, D., Okyay, H., Gursan, M., & Demir, I. (2021). Quality of immature and mature pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds in relation to bio-priming with endophytic *pseudomonas* and *Bacillus* spp. *Horticulturae*, 7(4), 75. DOI: 10.3390/horticulturae7040075
- Zafar Ul-Hye, M., Danish, S., Abbas, M., Ahmad, M., & Munir, T. (2019). ACC deaminase producing PGPR *Bacillus amyloliquefaciens* and *Agrobacterium fabrum* along with biochar improve wheat productivity under drought stress. *Agronomy*, 9(7), 343. DOI: 10.3390/agronomy9070343
- Zamljen, T., Zupanc, V., & Slatnar, A. (2020). Influence of irrigation on yield and primary and secondary metabolites in two chilies species, *Capsicum annuum* L. and *Capsicum chinense* Jacq. *Agricultural Water Management*, 234, 106104. DOI: 10.1016/J.AG WAT.2020.106104
- Zhang, L., Wu, H. C., & Chan, S. C. (2015, Julio). Large-scale dynamic gene regulatory networks analysis for time course DNA microarray data from *C. elegans*, preliminary results and findings. In *2015 IEEE International Conference on Digital Signal Processing (DSP)* (552-556). IEEE. DOI: 10.1109/ICDSP.2015.7251934
- Zhang, X., Lu, G., Long, W., Zou, X., Li, F., & Nishio, T. (2014). Recent progress in drought and salt tolerance studies in *Brassica crops*. *Breeding Science*, 64(1), 60. DOI: 10.1270/JSBBS.64.60
- Zhao, T., & Dai, A. (2015). The magnitude and causes of global drought changes in the twenty-first century under a low–moderate emissions scenario. *Journal of Climate*, 28(11), 4490–4512. DOI: 10.1175/JCLI-D-14-00363.1



Zhou, C., Ma, Z., Zhu, L., Xiao, X., Xie, Y., Zhu, J., & Wang, J. (2016). Rhizobacterial strain *Bacillus megaterium* BOFC15 induces cellular polyamine changes that improve plant growth and drought resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 976. DOI: 10.3390/ijms17060976

Zia, R., Nawaz, M., Siddique, M., Hakim, S., & Imran, A. (2021). Plant survival under drought stress: Implications, adaptive responses, and integrated rhizosphere management strategy for stress mitigation. *Microbiological Research*, 242, 126626. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126626

Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., & De Bertoldi, M. (1981). Evaluating toxicity in immature compost. *Biocycle*, 22, 54–57.

XII. APÉNDICES

Apéndice I. Índices de vigor, fitotoxicidad y esbeltez de plántulas de chiltepín tratadas con *Bacillus* spp. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	Índice de vigor	Índice de germinación	Índice de esbeltez
C _N	647.1 ± 102.8 b	98.94 ± 7.28 b	1.506 ± 0.44 b
C _{H₂O}	843.8 ± 164.6 b	149.76 ± 43.56 a	1.919 ± 0.40 a
BsQ	779.5 ± 162.1 b	105.59 ± 28.15 b	1.767 ± 0.35 a
BtBII	864.5 ± 117.9 b	186.63 ± 20.80 a	1.381 ± 0.23 c
Bc16-4	807.6 ± 239.9 b	132.68 ± 31.17 b	1.392 ± 0.38 c
Bc16-5	877.1 ± 173.2 b	217.62 ± 40.51 a	1.535 ± 0.31 b
Bw19-1	579.8 ± 109.4 b	62.64 ± 14.42 c	1.205 ± 0.28 c
Bt22-1	818.2 ± 209.2 b	149.17 ± 93.96 b	1.516 ± 0.39 b
Bs22-3	1068.3 ± 138.6 a	236.34 ± 22.83 a	1.745 ± 0.32 a
Bc25-3	732.2 ± 109.1 b	110.89 ± 15.84 b	1.553 ± 0.35 b
Bc25-4	961.4 ± 64.0 a	199.48 ± 32.26 a	1.505 ± 0.37 b
Bt25-6	678.0 ± 112.1 b	92.08 ± 21.23 b	1.605 ± 0.52 b
Bc25-7	1100.0 ± 189.8 a	180.54 ± 54.57 a	1.805 ± 0.36 a
Bc30-1	884.4 ± 267.0 b	133.78 ± 36.55 b	1.608 ± 0.48 b
Bc30-2	1145.4 ± 157.5 a	167.51 ± 35.77 a	2.019 ± 0.41 a

Apéndice II. Anatomía de raíces secundarias en plántulas de chiltepín tratadas con *Bacillus* spp. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	Espesor de raíz (mm)	Espesor de tejido conectivo (mm)
C _n	0.263 ± 0.11 b	0.138 ± 0.06 a
C _{H₂O}	0.205 ± 0.03 a	0.097 ± 0.02 a
BsQ	0.285 ± 0.05 b	0.139 ± 0.04 a
BtBII	0.243 ± 0.04 a	0.132 ± 0.01 a
Bc16-4	0.245 ± 0.04 a	0.119 ± 0.04 a
Bc16-5	0.245 ± 0.06 a	0.123 ± 0.02 a
Bw19-1	0.080 ± 0.14 e	0.044 ± 0.08 d
Bt22-1	0.265 ± 0.04 b	0.131 ± 0.03 a
Bs22-3	0.242 ± 0.04 a	0.127 ± 0.03 a
Bc25-3	0.119 ± 0.14 d	0.067 ± 0.08 c
Bc25-4	0.287 ± 0.07 b	0.151 ± 0.05 a
Bt25-6	0.179 ± 0.14 c	0.099 ± 0.08 b
Bc25-7	0.224 ± 0.14 c	0.125 ± 0.08 b
Bc30-1	0.236 ± 0.05 a	0.116 ± 0.03 a
Bc30-2	0.286 ± 0.06 b	0.147 ± 0.05 a

Apéndice III. Número de hojas y área foliar de plántulas de chiltepín tratadas con *Bacillus* spp. al día 42 DDT. Los datos están representados por la media de 6 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	Número de hojas	Área foliar (cm ²)
C-	41.3 ± 4.84 a	65.5 ± 10.75 a
BsQ	47.0 ± 7.56 a	76.4 ± 10.89 a
BtBII	45.5 ± 6.38 a	75.8 ± 18.71 a
Bs22-3	45.8 ± 10.98 a	93.2 ± 19.91 a
Bc25-4	40.0 ± 10.51 a	75.3 ± 19.29 a
Bc25-7	49.0 ± 9.57 a	84.5 ± 8.27 a
Bc30-2	50.7 ± 8.69 a	72.9 ± 7.54 a

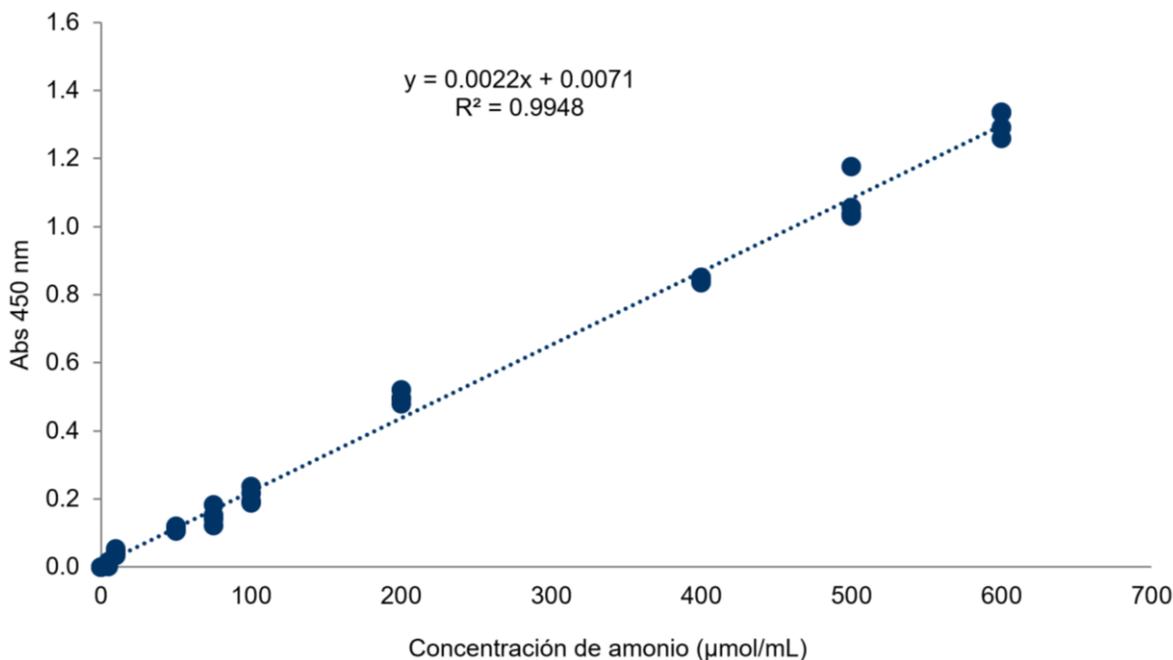
Apéndice IV. Pigmentos fotosintéticos de plántulas de chiltepín tratadas con *Bacillus* spp. al día 42 DDT. Los datos están representados por la media de 6 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	Pigmentos fotosintéticos (mg / g de peso fresco)		
	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides
C -	0.761 ± 0.144 b	0.286 ± 0.172 b	0.308 ± 0.076 b
BsQ	0.798 ± 0.080 b	0.177 ± 0.049 b	0.277 ± 0.038 b
BtBII	1.083 ± 0.032 a	0.238 ± 0.042 b	0.357 ± 0.028 a
Bc22-3	1.032 ± 0.098 a	0.425 ± 0.117 a	0.350 ± 0.012 a
Bc25-4	0.984 ± 0.173 a	0.317 ± 0.082 b	0.375 ± 0.072 a
Bc25-7	1.020 ± 0.124 a	0.284 ± 0.080 b	0.332 ± 0.036 a
Bc30-2	0.913 ± 0.165 a	0.250 ± 0.056 b	0.309 ± 0.063 b

Apéndice V. Diferencias en el índice de solubilización de fósforo de *Bacillus* spp. en medio Pikovskaya a las 24, 48 y 72 h de incubación. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	24 h	48 h	72 h
BsQ	2.651 ± 0.293 a	2.779 ± 0.162 a	3.013 ± 0.285 a
BtBII	2.676 ± 0.071 a	2.816 ± 0.084 a	3.013 ± 0.265 a
Bc16-4	2.608 ± 0.202 a	2.780 ± 0.173 a	3.256 ± 0.315 a
Bc16-5	2.766 ± 0.204 a	2.916 ± 0.327 a	3.032 ± 0.327 a
Bw19-1	2.676 ± 0.220 a	2.991 ± 0.310 a	3.168 ± 0.270 a
Bt22-1	2.766 ± 0.234 a	2.891 ± 0.184 a	3.043 ± 0.241 a
Bs22-3	2.476 ± 0.123 a	2.701 ± 0.339 a	3.197 ± 0.167 a
Bc25-3	2.638 ± 0.601 a	2.855 ± 0.501 a	2.936 ± 0.172 a
Bc25-4	2.761 ± 0.162 a	3.103 ± 0.169 a	3.121 ± 0.437 a
Bt25-6	2.407 ± 0.366 a	2.703 ± 0.242 a	3.013 ± 0.243 a
Bc25-7	2.845 ± 0.228 a	2.852 ± 0.381 a	3.405 ± 0.270 a
Bc30-1	2.834 ± 0.122 a	2.876 ± 0.244 a	3.035 ± 0.338 a
Bc30-2	2.894 ± 0.242 a	2.678 ± 0.268 a	2.946 ± 0.521 a

Apéndice VI. Curva de calibración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para la cuantificación de amonio. El gráfico indica la tendencia lineal a distintas concentraciones (0 - 600 mg/L). La gráfica representa los datos de 4 repeticiones.



Apéndice VII. Diferencias significativas en producción de amonio (5 días de incubación e índice de producción de sideróforos (72 h de incubación) de cepas *Bacillus* spp. Los datos están representados por la media de 4 repeticiones. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	Producción de NH_4 (µmol/mL)	Índice de producción de sideróforos
BsQ	0.41 ± 0.03 e	2.59 ± 0.06 a
BtBII	3.51 ± 0.16 d	2.93 ± 0.07 a
Bc16-4	3.05 ± 0.18 b	2.42 ± 0.06 b
Bc16-5	3.50 ± 0.24 c	2.41 ± 0.11 b
Bw19-1	3.29 ± 0.26 b	2.39 ± 0.06 b
Bt22-1	0.44 ± 0.08 b	2.47 ± 0.06 b
Bs22-3	1.60 ± 0.08 e	2.53 ± 0.12 b
Bc25-3	3.58 ± 0.12 b	2.48 ± 0.07 b
Bc25-4	2.99 ± 0.11 c	2.28 ± 0.04 b
Bt25-6	5.32 ± 0.42 a	2.44 ± 0.08 b
Bc25-7	3.29 ± 0.11 b	2.72 ± 0.07 a
Bc30-1	3.33 ± 0.20 b	2.92 ± 0.10 a
Bc30-2	2.86 ± 0.15 c	2.42 ± 0.05 b

Apéndice VIII. Diferencias significativas en la producción de exopolisacáridos, índice y eficiencia de solubilización de zinc de cepas *Bacillus* spp. Los datos están representados por la media de 4 (producción de exopolisacáridos) y 5 repeticiones (solubilización de zinc). Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Scott Knott ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	Solubilización de Zinc		Exopolisacáridos (g/L)
	SI	SE (%)	
BsQ	2.88 ± 0.07 a	187.68 ± 15.03 a	2.36 ± 0.16 a
BtBII	2.84 ± 0.10 a	184.20 ± 23.10 a	0.42 ± 0.08 c
Bc16-4	2.81 ± 0.03 a	180.57 ± 06.44 a	0.38 ± 0.04 c
Bc16-5	2.72 ± 0.04 a	171.61 ± 08.00 a	0.20 ± 0.04 c
Bw19-1	2.72 ± 0.06 a	171.65 ± 13.03 a	0.74 ± 0.03 b
Bt22-1	3.04 ± 0.10 a	204.30 ± 22.90 a	0.50 ± 0.03 c
Bs22-3	1.00 ± 0.00 a	0.00 ± 00.00 a	2.53 ± 0.22 a
Bc25-3	3.07 ± 0.17 a	207.30 ± 37.50 a	0.50 ± 0.07 c
Bc25-4	2.59 ± 0.15 a	159.10 ± 33.20 a	0.61 ± 0.05 b
Bt25-6	2.68 ± 0.09 a	167.57 ± 20.73 a	0.47 ± 0.06 c
Bc25-7	2.79 ± 0.10 a	178.60 ± 23.40 a	0.69 ± 0.03 b
Bc30-1	2.64 ± 0.11 a	164.30 ± 25.20 a	0.58 ± 0.03 b
Bc30-2	2.93 ± 0.15 a	192.60 ± 33.30 a	0.82 ± 0.02 b

Apéndice IX. Curva de calibración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para la cuantificación de amonio. El gráfico indica la tendencia lineal a distintas concentraciones (0 - 600 mg/L). La gráfica representa los datos de 4 repeticiones.

