



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Mitigación del estrés por déficit hídrico en maíz forrajero mediante el uso de PGPB**

**Mayling Gisette Serrato Gutiérrez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología  
Bogotá, Colombia

2023



# Mitigación del estrés por déficit hídrico en maíz forrajero mediante el uso de PGPB

**Mayling Gisette Serrato Gutiérrez**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Ciencias Microbiología**

Director:

PhD. Daniel Uribe Vélez

Codirector:

PhD. Germán Andrés Estrada

Línea de Investigación:

Microbiología Agrícola

Grupo de Investigación:

Microbiología Agrícola

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología IBUN

Bogotá, Colombia

2023



*A mis padres y querido Carlos.*

*“El coraje no siempre ruge.  
A veces es un susurro que al final del día dice:  
mañana lo volveré a  
intentar”.*  
*Mary Anne Radmacher*

## Agradecimientos

A mi madre y a Carlos por su enorme apoyo incondicional, paciencia y por sus palabras de aliento y comprensión durante este tiempo. Muchas gracias, la vida es más bella sabiendo que están ahí.

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) y la Universidad Nacional de Colombia (UNAL), por financiar este proyecto a través de la convocatoria Conjunta de Proyectos de Investigación, Desarrollo e Innovación (I+D+i) del Sector Agropecuario.

A la Universidad Nacional y el Instituto de Biotecnología (IBUN) por la formación académica y las facilidades brindadas para la realización de este trabajo. Un agradecimiento especial a las personas que hacen parte del IBUN, por su gran disposición y voluntad para ayudar. A don Julio, Andrés y Jorge, muchas gracias, ustedes son una pieza clave en el desarrollo de tantos proyectos y sueños.

A los Centros de Investigación de AGROSAVIA, Tibaitatá y Motilonia, por abrirme las puertas para aprender, formarme en investigación y permitirme llevar a cabo los experimentos. Muchas gracias a todas las personas de AGROSAVIA que me ayudaron, brindaron sus conocimientos y tuvieron paciencia con mi proceso de aprendizaje, en especial al PhD. Germán Estrada y los investigadores Andrés Moreno y Luis F. Gómez.

Al profesor Daniel Uribe, por acogerme, dirigir mi trabajo de investigación y formarme académicamente. Admiración total por su dedicación y amor a la academia. Gracias.

A mis compañeros del grupo de Microbiología Agrícola, por su enorme apoyo, por las risas y las lágrimas. Muchas gracias, este trabajo lleva también el esfuerzo de ustedes.

## Resumen

### Mitigación del estrés por déficit hídrico en maíz forrajero mediante el uso de PGPB

La escasez mundial de agua disponible para el riego representa una de las principales amenazas para la agricultura y la seguridad alimentaria. Se espera que la situación se agrave por períodos de sequía más recurrentes debido al cambio climático. Fortalecer la tolerancia de los cultivos a condiciones deficientes de agua y mejorar su eficiencia en el uso del recurso hídrico se convierte en uno de los mayores desafíos actuales. Las PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) se presentan como una alternativa viable para reducir los efectos deletéreos de la sequía. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial de diez cepas de PGPB de los géneros *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. y *Lysinibacillus* sp. pertenecientes a las colecciones del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN) y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), en la mitigación del déficit hídrico en plantas de maíz. Para ello, se realizaron ensayos en invernadero (Bogotá) y casa de malla (Cesar) utilizando inóculos individuales. Las plantas se cultivaron en condiciones de riego durante 20 días y luego se sometieron a 11 días de déficit hídrico. Después del período de estrés, se determinaron cambios en la biomasa seca (aérea y radical), contenido relativo hídrico (RWC), contenido de pigmentos fotosintéticos, acumulación de osmolitos y actividad enzimática antioxidante (GR y APX). La inoculación de las cepas XT14, MT1C8, PSL63 y MGC9 demostró atenuar los efectos perjudiciales de la sequía en el crecimiento del maíz, aumentando la biomasa seca aérea entre un 22% y 51% frente al control de estrés. Otras cepas como PSL80 y XT17 mejoraron el estado hídrico de la planta, manteniendo el RWC entre un 94% y 98%. Esto se logró principalmente mediante la modulación específica de cada cepa en la acumulación de osmolitos, la actividad antioxidante y el contenido de clorofila en las hojas. Posteriormente, las cepas PSL80, PSL63, XT14 y XT17 fueron seleccionadas para estudios adicionales a nivel de laboratorio, donde se determinaron características de promoción del crecimiento y tolerancia al estrés osmótico. Se observó que las cepas eran tolerantes al estrés osmótico inducido por la presencia de Polietilenglicol (PEG) 6000 en el medio de crecimiento y poseían múltiples rasgos de promoción, como la capacidad para sintetizar compuestos de tipo indol y exopolisacáridos (EPS), solubilizar y mineralizar fósforo, y establecerse en las raíces incluso en condiciones de estrés. Estos atributos podrían guardar relación con los beneficios observados en las plantas, al aumentar la biodisponibilidad de nutrientes, mantener la humedad en la rizósfera y estimular hormonalmente el crecimiento. Se concluyó que las cepas de *Pseudomonas* PSL80 y PSL63, y de *Bacillus* XT14, poseen potencial para mitigar el estrés por déficit hídrico en las plantas de maíz.

**Palabras clave:** Sequía, polietilenglicol, ajuste osmótico, Zea mays, antioxidantes, Caribe seco.

## Abstract

### Mitigating Water Deficit Stress in Forage Maize through the Use of PGPB

Global water scarcity for irrigation represents one of the main threats to agriculture and food security. It is expected to worsen due to more frequent drought periods resulting from climate change. Strengthening crop tolerance to water-deficient conditions and improving water use efficiency have become some of the greatest challenges today. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) emerge as a viable alternative to reduce the deleterious effects of drought. This study aimed to evaluate the potential of ten PGPB strains from the genera *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., and *Lysinibacillus* sp., collected from Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN) and Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), in mitigating water deficit in maize plants. Greenhouse (Bogotá) and mesh house (Cesar) assays were conducted using individual inocula. The plants were subjected to 20 days of watering and then exposed to 11 days of water deficit. After the stress period, changes in dry biomass (aboveground and root), relative water content (RWC), photosynthetic pigment content, osmolyte accumulation, and antioxidant enzyme activity (GR and APX) were determined. The inoculation of XT14, MT1C8, PSL63, and MGC9 strains demonstrated attenuation of detrimental effects of drought on maize growth, increasing stem dry biomass by 22% to 51% compared to the stressed control. Other strains like PSL80 and XT17 improved the plant's water status, maintaining RWC between 94% and 98%. This was achieved mainly through specific modulation by each strain in osmolyte accumulation, antioxidant activity, and chlorophyll content in the leaves. Subsequently, strains PSL80, PSL63, XT14, and XT17 were selected for additional laboratory-level studies, where growth promotion characteristics and tolerance to osmotic stress were determined. These strains were found to be osmotolerant induced by Polyethylene glycol (PEG) 6000 in the growth medium and had multiple promotion traits, such as the ability to synthesize indole-type compounds and exopolysaccharides (EPS), solubilize and mineralize phosphorus, establish themselves in the roots even under stressful conditions. These attributes may be related to the observed benefits in plants by increasing nutrient availability, maintaining moisture in the rhizosphere, and hormonally stimulating growth. It was concluded that the *Pseudomonas* PSL80 and PSL63 strains, and the *Bacillus* XT14 strain, have the potential to mitigate water deficit stress in maize plants.

**Keywords:** Drought, Polyethylene glycol, Osmotic Adjustment, *Zea mays*, Antioxidants, Dry Caribbean.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen.....</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de símbolos y abreviaturas.....</b>	<b>XIV</b>
<b>1. Marco Conceptual .....</b>	<b>21</b>
1.1 El maíz .....	21
1.2 La sequía: definiciones .....	23
1.3 El estrés por sequía en las plantas .....	24
1.3.1 Respuestas de las plantas al estrés por sequía .....	27
1.4 Las PGPB y su papel en cultivos tolerantes a la sequía .....	31
1.4.1 PGPB: las bacterias aliadas de las plantas.....	31
1.4.2 Efecto de las PGPB en la protección de las plantas frente al déficit hídrico.....	32
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>39</b>
2.1 Objetivo General .....	39
2.2 Objetivos Específicos.....	39
<b>3. Metodología.....</b>	<b>40</b>
3.1 Metodología Objetivo 1 .....	41
3.1.1 Construcción del modelo metodológico de evaluación de estrés por déficit hídrico en maíz.....	41
3.1.2 Material biológico .....	42
3.1.3 Preparación de inóculos bacterianos .....	44
3.1.4 Efecto de la inoculación de plantas de maíz con PGPB en la mitigación del estrés por sequía: un ensayo de invernadero .....	45
3.1.5 Análisis estadístico de datos .....	49
3.2 Metodología Objetivo 2 .....	50
3.2.1 Experimento bajo condiciones de casa de malla .....	50
3.2.2 Análisis estadístico de datos .....	51
3.3 Metodología Objetivo 3 .....	52
3.3.1 Caracterización <i>in vitro</i> de los aislamientos.....	52
3.3.2 Ensayo de germinación bajo déficit hídrico .....	56

3.3.3	Evaluación de colonización y permanencia de los aislamientos en las plantas bajo condiciones de déficit hídrico .....	56
3.3.4	Análisis estadístico de datos .....	58
<b>4.</b>	<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>59</b>
4.1	Objetivo 1.....	59
4.1.1	El modelo de estrés por sequía en maíz forrajero .....	59
4.1.2	Efecto de la inoculación de PGPB en la mitigación del estrés por sequía en maíz en condiciones de invernadero.....	60
4.2	Objetivo 2.....	78
4.2.1	Efecto de la inoculación de PGPB en la mitigación del estrés por sequía en maíz: Un ensayo en el Caribe seco.....	78
4.3	Objetivo 3.....	86
4.3.1	Generalidades y características asociadas a la promoción del crecimiento.....	86
4.3.2	Tolerancia al estrés osmótico .....	90
4.3.3	Efecto de las PGPR sobre la germinación en condiciones de déficit hídrico .....	96
4.3.4	Colonización y permanencia de las PGPR en las raíces del maíz en sequía simulada .	98
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>105</b>
5.1	Conclusiones .....	105
5.2	Recomendaciones.....	106
<b>6.</b>	<b>Material suplementario .....</b>	<b>108</b>
	Anexo 1. Composición del abono orgánico ABONAZA .....	109
	Anexo 2. Prueba preliminar de germinación del maíz ICA V109 bajo estrés osmótico inducido por PEG.....	110
	Anexo 3. Resultados de la variable longitud aérea de la planta en los ensayos de invernadero .....	111
	Anexo 4. Resultados de solubilización de fosfato tricálcico en placas NBRIP .....	113
	Anexo 5. Resultados de parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos determinados en el ensayo de casa de malla .....	114
	Anexo 6. Análisis de Componentes Principales (PCA) de parámetros de respuesta monitoreados en el maíz ICA V109 inoculado con PGPB (casa de malla) .....	115
<b>7.</b>	<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>117</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1-1.</b> Producción mundial de algunos cereales en el período 2012 - 2021 expresada en millones de toneladas .....	22
<b>Figura 1-2.</b> Representación del movimiento del agua a través del continuo suelo-planta-atmósfera, impulsado por el gradiente de potencial hídrico ( $\Psi$ ) desde el suelo hasta las hojas bajo las condiciones óptimas de riego y de déficit hídrico .....	25
<b>Figura 1-3.</b> Efectos y respuestas asociados al estrés por sequía en las plantas .....	31
<b>Figura 1-4.</b> Mecanismos de las PGPB implicados en la inducción de resistencia al estrés por déficit hídrico en plantas.....	34
<b>Figura 3-1.</b> Diagrama de flujo metodológico para el desarrollo del proyecto de investigación.....	40
<b>Figura 3-2.</b> Esquema metodológico de los ensayos en planta bajo condiciones de invernadero ...	46
<b>Figura 3-3.</b> Montaje experimental usado en la evaluación de la actividad de Solubilización y Mineralización de fósforo de las cepas bacterianas en medio NBRIP. ....	53
<b>Figura 3-4.</b> Metodología para la evaluación de colonización y permanencia de las PGPB en las raíces de la planta en condiciones simuladas (PEG 6000) de estrés por déficit hídrico. ....	58
<b>Figura 4-1.</b> Parámetros cuantificados en el ajuste del modelo de estrés por sequía en maíz forrajero. (A) Biomasa seca aérea (g) de las plantas en condición óptima y de estrés. (B) Contenido de humedad (%) del suelo en las materas sin riego respecto a la condición irrigada.....	60
<b>Figura 4-2.</b> Mapa de calor de correlación entre parámetros de respuesta para los controles irrigados y de sequía en los ensayos de invernadero. ....	66
<b>Figura 4-3.</b> Respuesta morfo-fisiológica en plantas de maíz al estrés por sequía y la inoculación de PGPB a nivel de la biomasa seca aérea (A y B), biomasa seca radical (C y D) y el RWC (E y F) después de 11 días de déficit hídrico. ....	68
<b>Figura 4-4.</b> Cambios en la concentración de prolina (A y B) y azúcares totales solubles (Azúc. Tot. Sol.) (C y D) en plantas de maíz en condiciones de sequía durante 11 días. ....	70
<b>Figura 4-5.</b> Efecto en la actividad enzimática de GR (A y B) y APX (C y D) en plantas de maíz inoculadas con PGPB tras 11 días de estrés hídrico.....	72
<b>Figura 4-6.</b> Mapa de calor construido a partir de las variaciones generadas en los parámetros bioquímicos, fisiológicos y morfológicos de cada cepa y sus respectivos controles en los grupos 1 y 2.....	75
<b>Figura 4-7.</b> Cambios en la biomasa seca aérea (A), biomasa seca de las raíces (B) en plantas de maíz de 31 días PS y en la Conductancia estomática ( $g_s$ ) (C) determinada en el día 29 PS, asociados a la	

inoculación de las PGPB en condiciones de déficit hídrico, en un ensayo conducido en casa de malla en el Cesar.....	80
<b>Figura 4-8.</b> Cambios en las concentraciones de los solutos compatibles prolina (A) y azúcares totales solubles (B) en plantas de maíz tratadas con inóculos de PGPB, después de 11 días de estrés por déficit hídrico a nivel de casa de malla. ....	81
<b>Figura 4-9.</b> A) PCA de atributos fisiológicos y bioquímicos estudiados en las plantas de maíz sin inoculación bajo estrés por sequía. El PCA explica el 72,4 % de la varianza observada y las elipses indican el intervalo de confianza del 95% para cada tratamiento. B) Mapa de calor de correlación entre atributos fisiológicos y bioquímicos de las plantas control en el ensayo de casa de malla...	83
<b>Figura 4-10.</b> Fotografía de A) Prueba de compatibilidad entre <i>Pseudomonas</i> sp. PSL80 y las cepas de <i>Bacillus</i> spp. XT14 y XT17, donde se puede observar la carencia de halos de inhibición y la superposición de los crecimientos PSL80-XT14. B) Prueba de mineralización de ácido fítico en medio sólido NBRIP, las colonias con los halos de mayor tamaño corresponden a las cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. (control positivo PSL95, PSL80 y PSL63). ....	87
<b>Figura 4-11.</b> Efecto del estrés osmótico inducido por diferentes concentraciones de PEG 6000 (0, 10, 20 y 30% p/v) sobre la población bacteriana de PSL80, PSL63, XT14 y XT17, tras 24 h de crecimiento .....	91
<b>Figura 4-12.</b> Producción de compuestos indólicos (A) y de exopolisacáridos (B) de las PGPB en condiciones de crecimiento óptimas y bajo estrés hídrico simulado por PEG 6000 al 20% p/v .....	94
<b>Figura 4-13.</b> Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de la inoculación de PGPB sobre la germinación (%) del maíz ICA V109 en presencia de PEG 6000 al 10% p/v.....	97
<b>Figura 4-14.</b> Efecto de la inoculación de PSL80, PSL63, XT14 y XT17 en plantas de maíz tras 11 días de déficit hídrico inducido mediante la adición de PEG 6000 al 20% (p/v) sobre la longitud (A) y biomasa seca (C) aérea y de raíz, en un sistema gnotobiótico.....	98
<b>Figura 4-15.</b> Plántulas de maíz después de 11 días de estrés de sequía simulada en un sistema gnotobiótico de crecimiento.....	99

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1-1.</b> Efectos de la sequía en cultivos de cereales.....	26
<b>Tabla 1-2.</b> Alivio del estrés por déficit hídrico en maíz ( <i>Zea mays</i> L.) inducido por la aplicación de PGPB y sus mecanismos de acción en la planta.....	36
<b>Tabla 3-1.</b> Información de las cepas utilizadas en este estudio .....	43
<b>Tabla 4-1.</b> Respuesta de plantas de maíz ICA V109 sin inocular después de 11 días de sequía, a nivel de invernadero.....	62
<b>Tabla 4-2.</b> Comportamiento de la concentración de clorofila (a y b), clorofila total y carotenoides en plantas de maíz inoculadas tras ser sometidas a estrés por déficit hídrico. ....	71
<b>Tabla 4-3.</b> Impacto de la inoculación bacteriana sobre la respuesta de estrés al déficit hídrico en maíz ICA V109. Se destacan los principales cambios evidenciados para cada cepa respecto a las plantas control de estrés.....	76
<b>Tabla 4-4.</b> Efecto de la inoculación de las PGPB sobre parámetros de crecimiento, fisiológicos y bioquímicos en plantas de maíz, sometidas a estrés por déficit hídrico en un ensayo de casa de malla.....	79
<b>Tabla 4-5.</b> Rasgos de promoción de crecimiento vegetal de las cepas bacterianas evaluados <i>in vitro</i> . ....	87
<b>Tabla 4-6.</b> Recuento de células de las cepas PSL80, PSL63, XT14 y XT17 presentes la rizósfera del maíz. Los recuentos celulares se determinaron en plántulas de maíz después de 11 días de estrés osmótico inducido por PEG al 20%. ....	100
<b>Tabla 4-7.</b> Beneficios de la inoculación de las PGPB en el maíz ante el déficit hídrico y sus posibles métodos de acción .....	103

## Lista de símbolos y abreviaturas

$\Psi$	Potencial hídrico
$\alpha$	alfa
ABA	Ácido abscísico
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
Al	Aluminio
APX	Ascorbato Peroxidasa
AsA	Ácido ascórbico
ASC	Ascorbato
Azúc	Azúcares totales solubles
BA	Biomasa seca aérea
BR	Biomasa seca radical
°C	Grados centígrados
$\text{Ca}^{2+}$	Calcio citosólico
$\text{CaCl}_2$	Cloruro de calcio
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tricálcico
CAT	Catalasa
Car	Carotenoides
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
CC	Capacidad de Campo
CE	Conductividad Eléctrica
Chl	Clorofila
C.I.	Centro de Investigación
CICE	Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva
CK	Citoquininas
$\text{Cl}^-$	Anión Cloruro
cm	Centímetro
CMIB	Colección de Microorganismos con Interés Biofertilizante
$\text{cmol}(+)/\text{Kg}$	Centimoles por kilogramo
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
DE	Desviación estándar
D-glu	D-glucosa
DHA	Deshidroascorbato
DHAR	Deshidroascorbato reductasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
ds/m	Decisiemens por metro
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPS	Exopolisacáridos
FBN	Fijación biológica de nitrógeno

---

Fe	Hierro
g	Gramo
$g_s$	Conductancia estomática
$\times g$	Gravedades
GA	Giberelinas
GB	Glicinabetaína
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación S-transferasa
GSSG	Disulfuro de glutación (glutación oxidado)
h	Horas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil) etanosulfónico
HR	Humedad relativa
HCN	Cianuro de hidrógeno
HSP	Proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins)
IAA	Ácido indol-3-acético o ácido indolacético
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
IEM	Índice de Eficiencia de Solubilización
IES	Índice de Eficiencia de Mineralización
JA	Ácido Jasmónico
K <sup>+</sup>	Catión Potasio
KCl	Cloruro de potasio
Kg	Kilogramo
LB	Luria Bertani
LEA	Proteínas de embriogénesis tardía abundante (Late Embryogenesis Abundant)
LHC	Complejos recolectores de luz
M	Millones
M	Molar
MAD	Malondialdehído
MDHA	Monodeshidroascorbato
MDHAR	Monodeshidroascorbato reductasa
MES	Medio de Esporulación
MES	Ácido 2-etanosulfónico
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mmol	Milimoles
MPa	Mega pascales (1 MPa = 10 <sup>6</sup> Pascales = 9,8 atmósferas)
MO	Materia orgánica
Mt	Millones de toneladas
N	Norte (North)
NaCl	Cloruro de sodio
NADP <sup>+</sup>	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato oxidada
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato reducida
NBRIP	Medio de fosfatos del National Botanical Research Institute

nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
$\text{O}_2^-$	Súper óxido
$\cdot\text{OH}$	Hidroxilo
P	Fósforo
$\text{P}_i$	Fósforo inorgánico
$\text{P}_o$	Fósforo orgánico
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
PGPB	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Bacteria)
PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)
PF	Peso fresco
Pro	Prolina
PS	Post-siembra o Peso seco (depende del contexto)
PT	Peso turgente
$\rho$	Rho
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)
rpm	Revoluciones por minuto
RWC	Contenido Hídrico Relativo (Relative Water Content)
S	Azufre
SA	Ácido salicílico
SOD	Superóxido dismutasa
SRI	Inducción de Resistencia Sistémica
STI	Inducción de Tolerancia Sistémica
t	tonelada
TSA	Agar soya tripticasa
$\mu$	Microlitro
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
V	Variedad
VOCs	Compuestos Orgánicos Volátiles (Volatile Organic Compounds)
W	Oeste (West)
16S rRNA	ARN ribosomal 16S

## Introducción

La sequía es la causa principal de los daños y pérdidas de los cultivos a nivel mundial (FAO, 2017). El déficit de lluvias por períodos prolongados o recurrentes, incide en la escasez de agua para consumo humano, el detrimento de la fertilidad del suelo, el declive del rendimiento de los cultivos, la pérdida del sector pecuario y en una serie de limitaciones económicas y sociales (FAO, 2017), que hacen de este fenómeno una amenaza para los cultivos, la actividad pecuaria y la seguridad alimentaria por igual (Gupta et al., 2020). Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura -FAO (2017), las pérdidas globales en la producción agrícola debidas a la sequía entre 2005 - 2015 se estimaron sobre los ~30 mil millones de dólares en los países en desarrollo y tan sólo en EEUU, ha causado la pérdida del 67% de los cultivos durante los últimos 30 años (Comas et al., 2013).

El panorama global no promete ser alentador en los próximos años, se espera que la severidad y frecuencia de los episodios de sequía incrementen como consecuencia del cambio climático, y afecten colateralmente el crecimiento de las plantas en más del 50% de las tierras cultivables (Moreno-Galván, Romero-Perdomo et al., 2020; Naveed et al., 2014; Vinocur & Altman, 2005). Lo anterior, sumado al aumento de la población humana, que podría llegar a ~10 mil millones en 2050 (UN, 2019), se traduce en una demanda mayor de alimentos, superficie cultivable y agua.

Se prevé que la producción de cultivos clave, como el maíz, el trigo y la cebada, se desplace hacia zonas marginales que padecen principalmente escasez de agua (Edmeades, 2008). Además, se estima que la pérdida anual de tierras cultivables se duplicará para fines de siglo (Naveed et al., 2014), mientras que el suministro de agua disponible para la agricultura disminuirá en un 50% (Gupta et al., 2020). Esta situación podría agravarse aún más en las regiones tropicales y subtropicales, donde la sequía es frecuente debido a los patrones de lluvia irregulares y la baja capacidad de retención de agua en los suelos (Musimwa et al., 2023; Prasanna et al., 2021). En Colombia, los biomas altamente vulnerables, como el Caribe Seco colombiano, podrían verse especialmente afectados.

El Caribe Seco colombiano, se concibe como la zona donde predominan los bosques secos y matorrales desérticos, comprendida entre los departamentos de Atlántico, Bolívar, Cesar, La Guajira y Magdalena (Rozo-Leguizamón et al., 2018). Se caracteriza por presentar períodos intermitentes de lluvia y sequía, deficiencia en la humedad del suelo disponible para las plantas entre 90 a 180 días por año y un ambiente semiárido con tendencia a la desertificación (Moreno-Galván, Cortés-Patiño, et al., 2020). Se espera que el cambio climático recrudezca los efectos de la sequía en este bioma, particularmente, en el departamento del Cesar, para el cual existe una

amenaza alta sobre la disponibilidad del recurso hídrico a futuro (PIDARET, 2019), debido a cambios previstos en el incremento de temperatura de 1,2 °C y reducción del 40% en las precipitaciones entre el 2011 y 2040 (MinAmbiente, 2015).

El escenario anterior, trae repercusiones directas sobre la actividad agropecuaria, uno de los principales renglones económicos del departamento, en especial, para la siembra de cultivos de ciclo corto y las pasturas que sirven de alimento a bovinos (Moreno-Galván, Cortés-Patiño, et al., 2020). El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos de ciclo corto de mayor relevancia en el Cesar, tan solo para el 2021 se sembraron 45.971 hectáreas y se produjeron más de 114.600 toneladas, equivalentes al 56% del total de la producción anual de cereales del departamento (Agronet-Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2023). No obstante, su área y rendimiento ha disminuido desde el 2013 debido, entre otros factores, a la sequía (MinAmbiente, 2015; PIDARET, 2019).

El maíz es el principal cultivo de cereal a nivel mundial (Edmeades, 2008), con un rendimiento y producción mayor que el del arroz o el trigo (FAO, 2023a), es el tercer cultivo alimentario más importante en términos de fuentes de energía y proteína en la nutrición humana (Aslam et al., 2015), y en Colombia, es el segundo cereal con mayor superficie de siembra después del arroz (FAO, 2023a; Govaerts et al., 2019). Todas las partes del maíz (tallos, hojas, panojas y mazorcas) son aprovechables para diversos usos, ya sea en la alimentación humana, la elaboración de piensos y ensilajes para animales o la producción de biocombustibles.

El maíz es uno de los cereales más eficientes en el uso del agua, ya que por ejemplo, requiere 146 kg de agua menos para producir un kilogramo de materia seca en contraste con cultivos similares como el trigo (Aslam et al., 2015). Sin embargo, el maíz se ve notablemente afectado por el déficit hídrico en todo su ciclo de vida, siendo particularmente sensible en algunos estadios de desarrollo. De hecho, la insuficiencia de agua durante las etapas iniciales de desarrollo, o la polinización y llenado del grano (Aslam et al., 2015; Wahid et al., 2007), impacta posteriormente el rendimiento del cultivo, al disminuir el peso de los granos y la biomasa de la planta hasta un 87% (Kamara et al., 2003).

Bajo este contexto, la construcción de alternativas que contribuyan al desarrollo de cultivos que utilicen el agua de manera más eficiente y en especial, que presenten mayor tolerancia a la sequía es apremiante (Edmeades, 2008; Gupta et al., 2020). Actualmente, para dar respuesta a esta problemática se está trabajando en estrategias biotecnológicas tales como la edición genética de plantas (Lu et al., 2013; Xiao et al., 2009) y el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB (por sus siglas en inglés).

Pese a que, la ingeniería genética ha permitido desarrollar plantas transgénicas con niveles mejorados de tolerancia a estreses abióticos y rendimientos superiores que sus contrapartes silvestres (p. ej. en X. Zhao et al. (2020) y Shi et al. (2017)), la transformación genética es un proceso prolongado y complejo; requiere ardua investigación para desentrañar los mecanismos genéticos involucrados en la percepción del estrés, la transducción de señales y la expresión de genes y

metabolitos específicos (Vinocur & Altman, 2005) y cuyos beneficios no son fácilmente transferibles entre especies vegetales (Ngumbi & Kloepper, 2016). A lo anterior, se suma el hecho de que las plantas modificadas no son bien aceptadas en algunas regiones del mundo (Wahid et al., 2007) o se excluyen del mercado de producción orgánica, limitando su uso masivamente.

Debido a lo anterior, las bacterias que interactúan con las plantas y que ejercen efectos beneficiosos en ellas, conocidas como PGPB (Khabbaz et al., 2019), han ganado recientemente especial atención, como una herramienta prometedora para contrarrestar los efectos del cambio climático en los cultivos de manera sostenible (Tiwari et al., 2018; Ngumbi & Kloepper, 2016; Mayak et al., 2004). Una de las grandes ventajas de utilizar las PGPB para ayudar a las plantas a tolerar los períodos de sequía frente a otras estrategias, radica en su capacidad para conferir también tolerancia a otros estreses abióticos (p.ej. salinidad y altas temperaturas) y bióticos en un número importante de hospederos (Danish et al., 2020; Ngumbi & Kloepper, 2016; Gururani et al., 2013). Por ejemplo, estudios han mostrado que la inoculación de cepas de *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Azospirillum* spp., *Acinetobacter* spp., *Azotobacter* spp. y *Achromobacter* spp. mejoran el crecimiento y desarrollo de plantas de papa (Gururani et al., 2013), gramíneas verdes (Saravanakumar et al., 2011), trigo (Creus et al., 2004), menta (Asghari et al., 2020), tomate y pimentones (Mayak et al., 2004) bajo estrés por déficit hídrico y que a la vez, algunas PGPB pueden actuar frente a fitopatógenos (Pedraza-Herrera et al., 2021; Sandhya et al., 2017).

En Colombia, la investigación en PGPB se ha enfocado mayormente en su potencial como biofertilizantes y biocontroladores, y en menor medida, en la mitigación del estrés abiótico (Zambrano-Moreno et al., 2016). La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) y la Universidad Nacional (UNAL), han llevado a cabo trabajos en conjunto, para evaluar la capacidad de las PGPB en la reducción de los efectos de estrés por sequía en cultivos de zonas áridas y semiáridas del país. Uno de ellos, se realizó utilizando inóculos puros de cepas de *Bacillus* provenientes de suelo rizosférico del Caribe Seco colombiano en plantas de maíz, sembradas en materas con suelo estéril (Moreno-Galván, Romero-Perdomo, et al., 2020). En otro, se utilizaron inóculos mixtos de *Bacillus* spp. tolerantes al estrés hídrico y plantas de pasto guinea, en condiciones semicontroladas en invernadero (Moreno-Galván, Cortés-Patiño, et al., 2020), y en un tercer trabajo, se usaron cultivos puros y co-inoculaciones de *Herbaspirillum*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* en plantas de riagrás perenne, en ensayos *in vitro* e invernadero (Cortés-Patiño et al., 2021). En todos los casos, bajo las condiciones específicas de estrés hídrico de cada estudio, se reportó la modulación de la respuesta antioxidante y osmótica de las plantas debida a las PGPB, lográndose incrementos importantes de biomasa. En este sentido, se planteó como hipótesis de investigación que “cepas bacterianas con rasgos asociados a la promoción del crecimiento vegetal resguardadas en los bancos de cepas de ambas instituciones (UNAL y AGROSAVIA), pueden también brindar protección frente a los efectos ocasionados por la sequía en el cultivo de maíz”.

Este trabajo de investigación, tuvo como objetivo general evaluar el potencial de PGPB pertenecientes a las colecciones del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN) y AGROSAVIA, en la mitigación de los efectos ocasionados por la sequía agronómica en el maíz, en el

departamento del Cesar. Para ello, se evaluó el efecto protector de diez cepas bacterianas sobre plantas de maíz en condiciones de déficit hídrico, en ensayos de invernadero en Bogotá D.C. y casa de malla, en el Cesar. Finalmente, algunas de ellas se seleccionaron para pruebas adicionales en laboratorio, donde se determinaron características de promoción del crecimiento y tolerancia al estrés osmótico.

La presente tesis de maestría se desarrolló y ejecutó en el marco del proyecto “Mitigación del déficit hídrico en la producción de maíz forrajero en el Caribe seco mediante el uso de Bioestimulantes”, financiado por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) y la Universidad Nacional de Colombia.

# 1. Marco Conceptual

## 1.1 El maíz

- **Generalidades**

El maíz (*Zea mays* L.), es una planta monocotiledónea de crecimiento anual, perteneciente a la familia de las poáceas o gramíneas y a la tribu *Maydeae* (ITIS, 2023). La planta de maíz presenta un solo tallo predominante, con abundantes hojas dísticas alargadas y un sistema radical fibroso. Es monóica, donde la inflorescencia masculina (panícula o espiga) se ubica en la terminación superior del tallo y la inflorescencia femenina, se desarrolla en la axila de las hojas formando las mazorcas (elote o choclo).

El maíz posee metabolismo fotosintético tipo C4, por lo que puede generar más materia seca por unidad de agua transpirada que las plantas con vía fotosintética convencional (C3) (Mejía, 2003; Paliwal et al., 2001). Si bien es un cereal eficiente en el uso del agua, pues cada milímetro de lámina de agua que ha absorbido durante su ciclo de vida es responsable por la producción de 10 – 16 kg de grano (Aslam et al., 2015), es altamente sensible a la deficiencia de agua. Se estima que en los últimos 30 años, se han generado pérdidas del ~39% en el rendimiento del cultivo a nivel mundial debido a la sequía (Daryanto et al., 2016; Aslam et al., 2015).

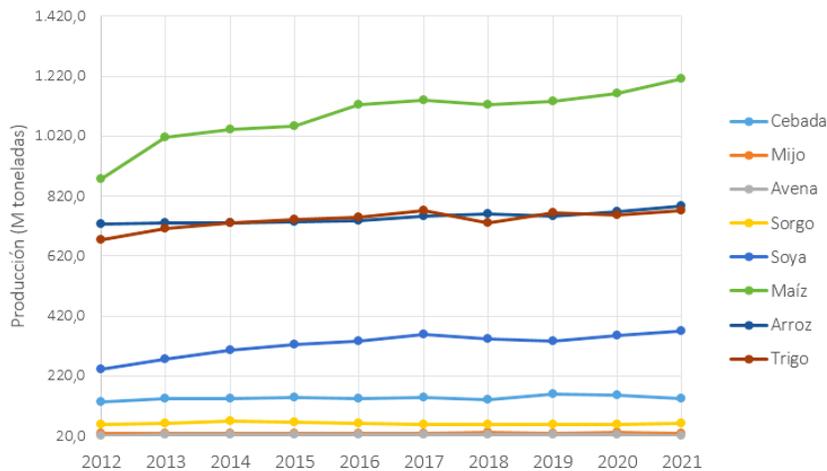
- **Importancia Económica y Social del maíz**

El maíz es el principal cultivo de cereal en el mundo, tan sólo en el 2021 se produjeron ~1.210 Mt de maíz frente a ~770 Mt de trigo y ~787 Mt de arroz, donde más del 61% de la producción total provino de EE.UU (31,7% ), China (22,5%) y Brasil (7,3%) (FAO, 2023a). Gracias a la facilidad de adaptación del maíz a diferentes condiciones ambientales (plasticidad), es cultivado en un extenso número de países a lo largo y ancho del planeta, permitiendo que actualmente se destinen más de 205 millones de hectáreas para su siembra (FAO, 2023a). Adicionalmente, el maíz se destaca por ser un cultivo de ciclo corto con alto rendimiento (Mejía, 2003). En el 2021, se registró un valor promedio mundial de 5,88 t/ha, superando a otros cereales de similar importancia económica y nutricional (por ej., trigo 3,49 t/ha y arroz 4,76 t/ha) (FAO, 2023a). Debido a esto, es una de las especies cultivadas de cereal más productivas que hay y de mayor interés para los agricultores que trabajan en áreas con escasez de suelo y alta presión demográfica (Shiferaw et al., 2011).

El aumento significativo en la producción mundial de maíz en la última década (ver Figura 1-1), se debe en gran medida a una creciente demanda motivada por sus múltiples usos en el sector industrial y energético (Tanumihardjo et al., 2020). Este cereal, es empleado no solo de forma directa para el consumo humano y animal (en grano o forraje), sino también como materia prima para la fabricación de piensos, almidón, jarabes, aceites y otros productos industriales, e incluso se utiliza en la producción de biocombustibles, como el etanol (Anjum et al., 2016; Aslam et al., 2015).

De estos usos, se estima que aproximadamente el 61% de la producción mundial se destina a la alimentación animal, el 17% a la fabricación de biocombustibles y el 13% al consumo humano (Grote et al., 2021).

Además de lo anterior, es importante destacar que el maíz desempeña un papel fundamental en la dieta básica de las personas, especialmente en países de Latinoamérica y África. Según informes de la FAO (2023b) y Shiferaw et al. (2011), más del 30% del aporte calórico de cereales diario proviene de alimentos elaborados a base de maíz en estas regiones. El maíz es considerado un cereal clave en la alimentación humana y una fuente crucial de seguridad alimentaria para millones de personas en países en desarrollo. Por lo tanto, se están invirtiendo esfuerzos significativos para mantener y mejorar los rendimientos del cultivo y su calidad nutricional (Grote et al., 2021; Tanumihardjo et al., 2020).



**Figura 1-1.** Producción mundial de algunos cereales en el período 2012 - 2021 expresada en millones de toneladas. Fuente: Elaboración propia con base en los datos de producción de FAOSTAT (FAO, 2023a)

#### • El maíz en Colombia

En Colombia, existen 23 razas de maíz, es el tercer cultivo con mayor área de siembra después del café y arroz (Govaerts et al., 2019) y su producción se centra en las regiones Orinoquía, Caribe y Andina, siendo los principales productores los departamentos de Meta, Tolima y Córdoba (DANE, 2019; FENALCE, 2023a). Para el 2022, se produjeron en el país más de 1,9 millones de toneladas que representaron cerca del 92% de la producción nacional de cereales (excluyendo el arroz) (FENALCE, 2023a).

Sí bien el maíz es un cereal importante en la economía agrícola y un ingrediente fundamental de la dieta de los colombianos, donde una persona consume en promedio 38,7 kg de maíz al año (FAO, 2023b), la cantidad producida en el país no es suficiente para cubrir la demanda interna. Por tanto,

el 74% del maíz consumido en Colombia se importa de EEUU, Brasil y Argentina (FENALCE, 2023b), convirtiendo al país en el décimo importador a nivel mundial y el segundo en Latinoamérica después de México (FAO, 2023a). Del maíz importado, el 94% es de tipo amarillo, que se utiliza principalmente para elaborar concentrados de animales domésticos y abastecer al sector pecuario, mientras que el 6% restante, corresponde al maíz blanco que se destina al consumo humano (FENALCE, 2023b). La situación anterior entre la demanda y oferta interna, se debe en gran parte, a la falta de tecnificación del cultivo, reducción de áreas de siembra, disminución de la rentabilidad para los agricultores o caída en los rendimientos por factores ambientales como la sequía (FENALCE, 2021, 2011; Govaerts et al., 2019).

Para hacer frente al declive de la autosuficiencia de maíz y fortalecer su producción en el país, se han desarrollado programas destinados a promover la tecnificación del cultivo, especialmente en el caso del maíz amarillo, y se han impulsado investigaciones en colaboración con organizaciones como CIMMYT, AGROSAVIA y FENALCE para desarrollar nuevos híbridos y variedades que ofrezcan mayores rendimientos (FENALCE, 2011). A pesar de estos esfuerzos, aún cerca del 21% de la producción nacional del maíz proviene de métodos de cultivo tradicionales, en su mayoría en condiciones de secano, siendo altamente vulnerable a factores climáticos y escasez de agua. Estos cultivos abarcan el 44,6% del total del área maicera del país y se encuentran principalmente en el Caribe colombiano, en los departamentos de Bolívar, Sucre y Cesar (DANE, 2019; FENALCE, 2023a), por lo que es crucial mejorar la producción de este cereal en dicha región.

## 1.2 La sequía: definiciones

En un sentido amplio, la sequía es una condición que resulta de la escasez de las precipitaciones y se caracteriza por la insuficiencia de recursos hídricos para satisfacer las demandas de plantas, animales y poblaciones humanas, sus estilos de vida y el uso de la tierra (Drobot et al., 2022). Se han propuesto diferentes definiciones de sequía de acuerdo con el ámbito de estudio (Wilhite et al., 1985; Yevjevich, 1967; Palmer, 1965), pero en términos generales, se pueden clasificar en cuatro categorías (Ngumbi & Kloepper, 2016; Mishra & Singh, 2010; Wilhite et al., 1985):

1. **Sequía meteorológica:** Definida como la falta o disminución considerable de precipitaciones durante un período prolongado.
2. **Sequía hidrológica:** Hace referencia a la disminución apreciable de recursos hídricos superficiales y subterráneos en comparación con las condiciones promedio de un área y tiempo dado, siendo inadecuados para los usos de un sistema de planeación y manejo de los recursos hídricos.
3. **Sequía agrícola o agronómica:** Se presenta cuando la humedad del suelo es insuficiente para satisfacer las necesidades óptimas de crecimiento y desarrollo de los cultivos, perjudicando la producción agrícola.

4. **Sequía socioeconómica:** Se produce por la falla o carencia en los sistemas de abastecimiento de agua para suplir la demanda humana y de uno o más sectores económicos.

Estas definiciones se encuentran estrechamente relacionadas entre sí y puede ser difícil establecer límites claros entre ellas. Por ejemplo, una sequía meteorológica puede conducir inicialmente a una sequía de tipo agrícola, y si la falta de precipitaciones se prolonga, puede desencadenar una sequía hidrológica y, por último, la socioeconómica (Drobot et al., 2022). Sin embargo, para fines de este trabajo, el uso del término “sequía” hará referencia a la definición de sequía meteorológica o agrícola, dependiendo del contexto.

### 1.3 El estrés por sequía en las plantas

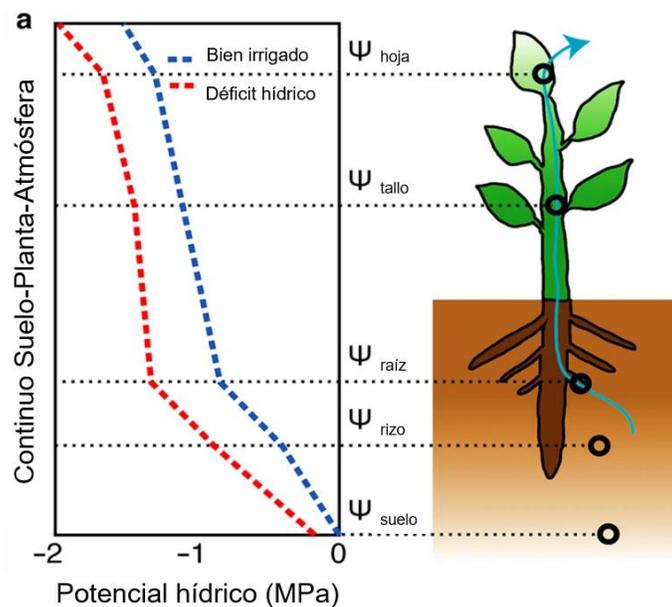
El estrés se puede definir en un sentido amplio como cualquier cambio anormal en los procesos fisiológicos, dada una combinación de factores medio ambientales y biológicos que ejercen una influencia desventajosa en el crecimiento o desarrollo de la planta (Zeiger & Taiz, 2007; Lichtenthaler, 1996). Por ejemplo, la infección de un microorganismo fúngico desencadena estrés biótico, el exceso de sales en el suelo genera estrés salino y osmótico, y la reducción de agua disponible en el suelo puede provocar el estrés por sequía en la vegetación. De hecho, entre los diferentes estreses abióticos, el de sequía es uno de los más nocivos y dinámicos, capaz de entorpecer el crecimiento y desarrollo de las plantas y limitar la productividad de los cultivos, más que cualquier otro factor ecológico (Anjum, Ashraf, Tanveer, et al., 2017). En EEUU, por ejemplo, el estrés por sequía ha causado la pérdida de cultivos en un 67% durante los últimos 50 años (Comas et al., 2013). La severidad de los efectos de la sequía depende de la especie y etapa de desarrollo de la planta, así como de la duración e intensidad del estrés (Zarei, 2022; Anjum, Ashraf, Zohaib, et al., 2017).

El agua se mueve a través de un flujo continuo suelo-planta-atmósfera gracias a la diferencia de potencial hídrico que existe entre ellos, desde un potencial más positivo (mayor cantidad de agua) hacia uno más negativo (menor cantidad de agua) (Scharwies & Dinneny, 2019; Zeiger & Taiz, 2007). Las plantas pueden modular, hasta cierto punto, el transporte de agua desde el suelo hacia la atmósfera, al disminuir el potencial hídrico de sus hojas (Figura 1-2). Así, el agua se mueve a través del suelo, es absorbida por la planta por las raíces, transportada a la parte aérea por un mecanismo impulsado por la transpiración, evaporada en las cavidades sub-estomatales y transpirada de regreso a la atmósfera (Scharwies & Dinneny, 2019).

Concretamente, las plantas experimentan estrés por sequía cuando la cantidad de agua absorbida desde el suelo no es suficiente para compensar la cantidad de agua perdida por transpiración, lo que conlleva a un desbalance o déficit hídrico que altera negativamente sus funciones fisiológicas y metabólicas (Nieves-Cordones et al., 2019; Scharwies & Dinneny, 2019). Por tanto, el estrés por sequía o por déficit hídrico, puede ser el resultado de una combinación de varios factores ambientales que secan el suelo alrededor de las raíces o dificultan la absorción de agua por parte

de las plantas, como lo son las bajas precipitaciones, el suministro insuficiente de agua por riego, la capacidad pobre del suelo para retener agua, las temperaturas elevadas y la baja humedad atmosférica (Anjum et al., 2016; Keskin et al., 2010; Moreno, 2009).

El estrés por sequía es multidimensional y complejo, sus efectos se pueden encontrar en todo nivel del organismo, así como variar considerablemente entre especies vegetales y etapas de crecimiento (Vurukonda et al., 2016; Farooq et al., 2009). De forma general, puede afectar la germinación por la reducción de la humedad del suelo, y retrasar o disminuir la emergencia y el establecimiento de las plántulas (Yan, 2015). Así mismo, el estrés por déficit hídrico deteriora la división y elongación celular al disminuir la presión de turgencia, altera la expansión de hojas, la altura y diámetro de tallos, la estructura del sistema radical y disminuye la producción de biomasa, lo que provoca sustanciales pérdidas en el rendimiento de los cultivos (Farooq et al., 2009).



**Figura 1-2.** Representación del movimiento del agua a través del continuo suelo-planta-atmósfera, impulsado por el gradiente de potencial hídrico ( $\Psi$ ) desde el suelo hasta las hojas bajo las condiciones óptimas de riego y de déficit hídrico. Nótese que el  $\Psi$  se hace más negativo a medida que se avanza a través de la planta hacia las hojas. Fuente: Adaptado de Scharwies y Dinneny (2019)

También, a nivel fisiológico, compromete la función estomática, el intercambio gaseoso, la actividad fotosintética, el contenido relativo de agua (RWC por su sigla en inglés) de las hojas, el potencial hídrico, la regulación de la temperatura de las hojas y la absorción y translocación de nutrientes. Mientras que, a nivel bioquímico, se reduce la síntesis de clorofila, se altera el equilibrio osmótico y hormonal de la planta, conduce a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno o ROS (por su sigla en inglés de Reactive Oxygen Species) y al estrés oxidativo (Ilyas et al., 2021; Hussain et al., 2018; Lopes et al., 2011). A nivel molecular, el estrés por sequía provoca fluctuaciones en la expresión génica, regulando negativamente factores de transcripción relacionados con los procesos de crecimiento primario, y positivamente, genes vinculados con la

señalización y protección ante el estrés, como es el caso de la expresión de genes codificantes de proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (Late Embryogenesis Abundant Proteins o LEA), proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins o HSP) y de señalización de calcio (Ilyas et al., 2021; Hussain et al., 2018; Ullah et al., 2017).

Los efectos del déficit hídrico pueden evidenciarse claramente en los cereales de consumo básico, para los que se ha llegado a reportar síntomas de daño cuando su RWC cae por debajo del 90% durante períodos prolongados (Zia et al., 2016; Hossain et al., 2015; de Carvalho et al., 2011). En el caso del maíz, a pesar de ser un cereal eficiente en el uso del agua, por ejemplo, requiere 368 kg de agua para producir 1 kg de materia seca, mientras el trigo demanda 514 kg H<sub>2</sub>O para la misma cantidad (Aslam et al., 2015), es altamente sensible a la escasez de agua. El estrés por sequía afecta al maíz en todo su ciclo de vida, desde la germinación hasta la madurez de la cosecha, pero muy especialmente durante las fases de crecimiento vegetativo (etapas V1 a V5) y reproductivo (etapas de polinización y llenado del grano) (Aslam et al., 2015). Cuando el déficit hídrico ocurre durante las primeras etapas de desarrollo, baja la densidad de siembra en el cultivo, reduce la tasa de crecimiento, prolonga la etapa de crecimiento vegetativo, y en condiciones extremas de estrés, puede desencadenar en el fracaso total del establecimiento de las plántulas (Zaman-Allah et al., 2016; Aslam et al., 2015). Por su parte, durante la fase reproductiva, los efectos negativos del estrés pueden manifestarse en la reducción de la duración de la fase reproductiva, propiciando una menor área de las hojas y tamaño de la planta, el aborto de granos de las mazorcas, la esterilidad del polen, la distorsión del tubo polínico y la disminución del número de mazorcas por planta Anjum, Ashraf, Zohaib, et al., 2017; Aslam et al., 2015; Farooq et al., 2009). En la Tabla 1-1, se presentan efectos ocasionados por el estrés por sequía en algunos de los cereales de importancia mundial.

**Tabla 1-1.** Efectos de la sequía en cultivos de cereales. Fuente: Adaptada de Anjum et al. (2017)

<b>Cultivo</b>	<b>Efectos del estrés por sequía</b>	<b>Referencia</b>
Arroz	Aumento en el enrollamiento de las hojas, afectación severa de biomasa y raíces, disminución del crecimiento de elongación y expansión, número de macollos y de rasgos fisiológicos (p. ej. fotosíntesis, transpiración, índice de área foliar y eficiencia en el uso del agua).	(Pandey & Shukla, 2015)
Trigo	Reducción de la fertilidad (al aumentar la esterilidad del polen), el número de macollos y granos por espiga. Disminución del rendimiento.	(Barnabás et al., 2008)
	Disminución de fotosíntesis, conductancia estomática, CRA, peso del grano y rendimiento.	(Wasaya et al., 2021)

Continuación Tabla 1-1. Efectos de la sequía en cultivos de cereales. Fuente: Adaptada de Anjum et al. (2017)

Cultivo	Efectos del estrés por sequía	Referencia
Soya	Reducción en el número de macollos por planta, número de espigas y granos por planta, menor peso individual del grano, que conlleva a la reducción en el rendimiento y disminución de la germinación de semillas y el vigor de las plántulas.	(Samarah & Alqudah, 2009; Samarah, 2005)
Maíz	Disminución de la altura de la planta, diámetro del tallo, área de la hoja, número de hojas por planta, tamaño de las mazorcas y peso fresco y seco de los brotes. Reducción de acumulación de biomasa en la etapa de polinización, llenado de grano y madurez fisiológica en 37%, 34% y 21%, respectivamente.	(Kamara et al., 2003)
	Reducción en el tamaño, peso fresco y peso seco de brotes y raíces. Disminución de contenido de clorofila (Chl) a, b, total y RWC. Caída en la tasa de fotosíntesis neta, tasa de transpiración y conductancia estomática. Incremento de concentración de ABA. Causa cambios en la estructura de cloroplastos y tilacoides.	(Li et al., 2018)

### 1.3.1 Respuestas de las plantas al estrés por sequía

Las plantas al ser organismos sésiles, han desarrollado complejos mecanismos para percibir, responder y sobrevivir a entornos con deficiencia de agua, dicha capacidad se conoce como *Resistencia a la Sequía* (Gupta et al., 2020; Ngumbi & Kloepper, 2016). La resistencia a la sequía se manifiesta a través de numerosas adaptaciones que se clasifican principalmente en tres tipos o estrategias (Gupta et al., 2020; De Micco & Aronne, 2012; Farooq et al., 2009): (1) *Escape de la sequía*, ocurre cuando la planta completa su ciclo de vida y entra en latencia antes del inicio de la sequía. En este caso, las plantas no experimentan déficit hídrico porque son capaces de modular su fenología vegetativa y reproductiva según las estaciones más húmedas (De Micco & Aronne, 2012); (2) *Evitación o aplazamiento de la sequía*, es la habilidad de la planta para sostener su potencial hídrico tan alto como es posible y prevenir el daño tisular; (3) *Tolerancia a la sequía*, se produce cuando la planta, aún con reducido contenido interno de agua, es capaz de mantener su crecimiento y actividades metabólicas bajo el estrés. Algunos autores (Ilyas et al., 2021; Fang & Xiong, 2015), añaden un cuarto tipo de resistencia a la clasificación, llamado *recuperación*. Este se define como la capacidad de la planta para reiniciar el crecimiento después de la exposición al

estrés por sequía extrema (deseccación) y se puede evidenciar en las excepcionales y comúnmente llamadas plantas de la resurrección (Zia et al., 2016).

Durante el déficit hídrico, mecanismos de evitación y tolerancia pueden tener lugar en el mismo organismo y en algunos casos, es difícil diferenciar o clasificar sin ambigüedad una respuesta biológica en sólo uno de ellos, por ejemplo, con las respuestas moleculares (Osmolovskaya et al., 2018). No obstante, se reconocen como respuestas típicas de evitación aquellas que se relacionan con reducir la pérdida y mejorar la eficiencia de absorción y uso del agua, tales como el cierre estomático, la reducción del área foliar, la alteración de la arquitectura de las raíces y la acumulación de agua en el parénquima. Mientras que, las respuestas asociadas a la tolerancia están principalmente encaminadas en mantener el potencial hídrico, proteger estructuras y macromoléculas, y enfrentar el estrés oxidativo principalmente, a través del ajuste osmótico y la activación del sistema antioxidante (Osmolovskaya et al., 2018; Farooq et al., 2009). Por otro lado, estas estrategias también pueden relacionarse con niveles o etapas de respuesta al estrés por déficit hídrico (Osmolovskaya et al., 2018), donde ante un estrés leve se desarrollan mayormente respuestas de evitación, mientras que, frente a uno moderado a severo, las de tolerancia (Laxa et al., 2019).

Se ha mencionado que las plantas perciben los cambios de disponibilidad de agua en el suelo a través de sus raíces, así como las variaciones de la humedad atmosférica por medio del potencial hídrico foliar. Estos cambios o señales hidráulicas, son transformados en señales químicas, por ejemplo, en ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), etileno, giberelinas (GA), auxinas, ácido salicílico (SA), calcio citosólico ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y citoquininas (CK), que viajan por toda la planta hasta llegar a los receptores objetivo y desencadenan cascadas de respuestas destinadas a amortiguar el déficit hídrico (Ilyas et al., 2021; Takahashi et al., 2020; McAdam & Brodribb, 2016).

La hormona vegetal del ABA es clave en este proceso de señalización. Estudios han sugerido que, ante la detección del estímulo de déficit hídrico, se incrementa rápidamente la síntesis del ABA en las raíces y hojas de la planta (McAdam & Brodribb, 2016; Lambers 2008). Seguidamente, el ABA es transportado a través del sistema vascular hacia las células guarda (u oclusivas) que conforman el poro de los estomas (Takahashi et al., 2020). Allí, su acumulación conduce al incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del ingreso y liberación del calcio almacenado intracelularmente. Este proceso, genera la alcalinización del citosol y activa los canales de salida de iones ( $\text{Cl}^-$ , malato<sup>2-</sup> y  $\text{K}^+$ ), conduciendo a la despolarización de la membrana plasmática y el escape del agua (Taiz & Zeiger, 2003). La salida del agua de las células guarda, ocasiona que pierdan su turgencia y se genere el cierre estomático (McAdam & Brodribb, 2016; Scharwies & Dinneny, 2019).

El cierre estomático es considerado la estrategia inicial de evitación para reducir la pérdida de agua por transpiración durante el estrés hídrico (Osmolovskaya et al., 2018). Posteriormente, otras estrategias de evitación tienen lugar, como lo son el desarrollo de raíces más profundas y densas para aumentar la eficiencia de absorción de agua y nutrientes, la disminución del número y tamaño de estomas, el engrosamiento de la cutícula y el aumento de los pelos y tricomas en las hojas. Dichas medidas ayudan a la planta a mantener su potencial hídrico durante el estrés, pero

requieren un alto gasto energético que va en detrimento del crecimiento aéreo. Además, debido al cierre estomático, la captación de CO<sub>2</sub> disminuye y se afecta la tasa fotosintética, por lo que estas medidas no pueden ser sostenidas a largo plazo (Farooq et al., 2009; Ilyas et al., 2021). Por tanto, las plantas han desarrollado otros mecanismos tendientes a mejorar su tolerancia al déficit hídrico, como lo son el sistema de defensa antioxidante y el ajuste osmótico.

Durante el déficit hídrico, la producción de ROS se incrementa en los compartimientos celulares, especialmente en cloroplastos, peroxisomas, mitocondrias y el apoplasto, debido a la activación o reducción incompleta del oxígeno molecular en procesos como la respiración y la fotosíntesis. Las ROS, que incluyen el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>), oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), radical superóxido (O<sup>2-</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), son moléculas altamente reactivas, subproductos naturales de la interacción metabólica con el oxígeno, que cumplen funciones en la homeostasis y la señalización celular (Hasanuzzaman et al., 2020; You & Chan, 2015; Cruz de Carvalho, 2008). En condiciones normales, las ROS se generan y eliminan en un delicado equilibrio, sin embargo, en situaciones de estrés, este balance se rompe y se propicia su acumulación dando lugar al estrés oxidativo (Hasanuzzaman et al., 2020; Khoshru et al., 2020).

Por ejemplo, en los principales centros de generación de ROS dentro de las células vegetales, los cloroplastos, el estrés provocado por el déficit hídrico interrumpe la cadena de transporte de electrones fotosintética en la membrana tilacoidal (al afectar la fotólisis del agua), impidiendo que el exceso de energía absorbida por las clorofilas del fotosistema II (PSII, en inglés), sea disipada mediante el apagado fotoquímico. Este exceso de energía conlleva a la formación de clorofila excitada en estado triplete (3Chl\*), la cual transfiere rápidamente la energía al oxígeno molecular generando el <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Por otro lado, en el fotosistema I (PSI), debido a la disminución de la concentración de CO<sub>2</sub> cloroplástico y la renovación de NADP<sup>+</sup> como consecuencia del cierre de estomas, se produce el O<sup>2-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la reacción de Mehler y la acción de la enzima superóxido dismutasa. Posteriormente, la interacción de estas ROS con componentes del PSI e iones metálicos presentes en el estroma, como el Fe<sup>2+</sup> (reacción de Fenton), da lugar a la formación de OH<sup>•</sup> (Hasanuzzaman et al., 2020; Noctor et al., 2016; Cruz de Carvalho, 2008).

En las plantas, el estrés oxidativo tiene efectos negativos en la fotosíntesis (daña la maquinaria fotosintética), así como en la estabilidad de las membranas (oxida los lípidos y afecta la permeabilidad), induce daños irreversibles en las biomoléculas (rompe y genera mutaciones en los ácidos nucleicos y desnaturaliza proteínas) y finalmente, conduce a la muerte celular (Cruz de Carvalho, 2008; Moreno-Galván, Romero-Perdomo et al., 2020).

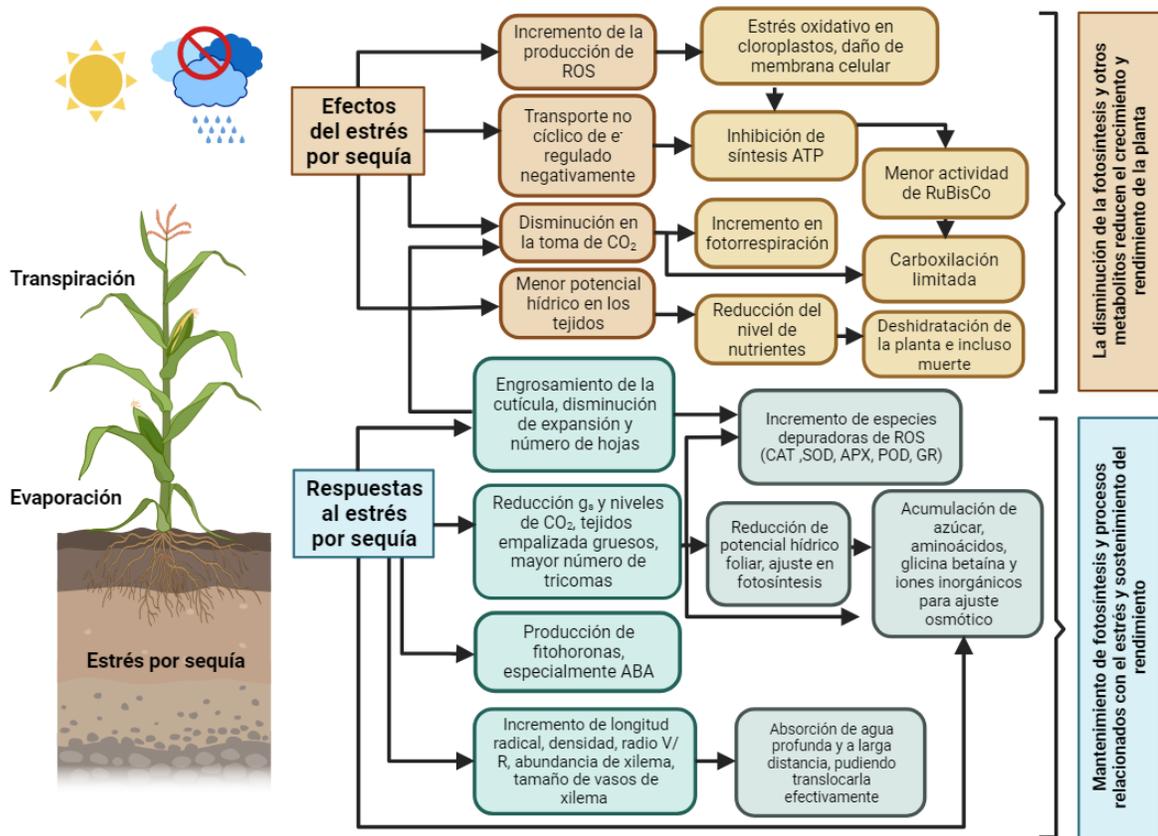
Para contrarrestar los efectos deletéreos de las ROS, las plantas poseen dos mecanismos de respuesta antioxidante: el sistema enzimático y el sistema no enzimático. Al primer sistema, pertenecen las enzimas que capturan y transforman especies de ROS en unas menos reactivas (p. ej. superóxido dismutasa - *SOD*, catalasa - *CAT*, ascorbato peroxidasa - *APX*, glutatión peroxidasa - *GPX* y guayacol Peroxidasa - *GPOD*), y aquellas que actúan como enzimas restauradoras de moléculas implicadas en la respuesta antioxidante (p. ej. monodehidroascorbato reductasa - *MDHAR*, dehidroascorbato reductasa - *DHAR* y glutatión reductasa - *GR*) (Melgarejo et al., 2010).

Al segundo mecanismo, corresponden las moléculas de bajo peso molecular de naturaleza liposoluble o hidrosoluble, que actúan a través de reacciones redox para mantener la homeostasis de las ROS en la célula (Loscos-Aranda, 2007; Smirnov, 2005). Entre los antioxidantes no enzimáticos más importantes en las plantas se destacan el ácido ascórbico (AsA), glutatión (GSH), carotenoides (Car),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), flavonoides y antocianinas (Fang & Xiong, 2015).

El ajuste osmótico, es otro de los mecanismos fundamentales responsables de la tolerancia a la sequía. Se ha documentado que este proceso protege la estructura celular y la fotosíntesis, retrasa la senescencia y muerte de las hojas y mejora el crecimiento de las raíces bajo deshidratación (Fang & Xiong, 2015). El ajuste osmótico implica la acumulación de compuestos orgánicos e inorgánicos en el citosol, altamente solubles, de bajo peso molecular y que no interfieren con las funciones metabólicas celulares, conocidos como solutos compatibles, así como también el incremento de iones (p. ej.  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Mg^{2+}$ ) en la vacuola (Moreno, 2009). Este fenómeno, tiene la finalidad de disminuir el potencial osmótico (hacerlo más negativo), para provocar la atracción de agua hacia el interior de la célula y mantener su turgencia (Farooq et al., 2009).

Los solutos compatibles, siendo los más importantes la prolina, glicina betaína (GB), aminoácidos libres, polioles y azúcares solubles (Bouremani et al., 2023), también cumplen funciones de osmoprotección. Por un lado, ayudan con la estabilización espacial de enzimas y la integridad de las membranas, y por otro, contribuyen con la defensa antioxidante, ya sea sirviendo como barrera protectora entre las ROS y biomoléculas esenciales, o neutralizándolas directamente (Anjum et al., 2016; Fang & Xiong, 2015). Entre los solutos compatibles, se destaca la prolina gracias a sus múltiples funciones (osmoprotector, osmoregulador y detoxificante) bajo diferentes estreses abióticos como sequía, salinidad y temperaturas extremas, y por ser el aminoácido libre de mayor y más rápida acumulación en las plantas estresadas (Aslam et al., 2015; Bates et al., 1973). En la Figura 1-3 se resumen los efectos y respuestas de resistencia a la sequía mencionados anteriormente y se presentan algunas de sus relaciones.

En general, la escasez de agua puede ser devastadora para las plantas. A pesar de las considerables respuestas naturales desplegadas por las plantas ante el estrés por déficit hídrico, no siempre son suficientes para asegurar su supervivencia en períodos secos, lo que provoca pérdidas sustanciales en la agricultura y afecta la seguridad alimentaria. Para abordar este problema, se han desarrollado alternativas innovadoras como el uso de bioestimulantes microbianos a base de PGPB y hongos micorrízicos. En los últimos años, esta estrategia ha ganado especial interés por su capacidad para mejorar la tolerancia de los cultivos a condiciones de escasez de agua y ser ambientalmente sostenible (Lephatsi et al., 2022).



**Figura 1-3.** Efectos y respuestas asociados al estrés por sequía en las plantas. Fuente: Adaptada y traducida de Bouremani et al. (2023). POD: Peroxidasa; RuBisCo: Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa; V/R: Vástago/Raíz; e: electrones

## 1.4 Las PGPB y su papel en cultivos tolerantes a la sequía

### 1.4.1 PGPB: las bacterias aliadas de las plantas

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) son microorganismos capaces de asociarse con un sinnúmero de especies de plantas y son reconocidas por su capacidad para ejercer efectos beneficiosos sobre ellas. Las PGPB incluyen bacterias presentes en la rizósfera, la filósfera, los tejidos internos de las plantas e inclusive, a aquellas aisladas de diferentes ecosistemas naturales, como el marino (Khabbaz et al., 2019; Goswami et al., 2013). Entre las PGPB, el grupo más ampliamente estudiado es el de las bacterias asociadas a la raíz, mejor conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (por sus siglas en inglés) (Kloepper et al., 1980). Las PGPR se caracterizan por su capacidad para colonizar las raíces y producir una gama amplia de enzimas y metabolitos, que mejoran el rendimiento y la tolerancia de las plantas al estrés

biótico y abiótico (Ngumbi & Kloepper, 2016). Las PGPB pertenecen a diversos géneros bacterianos, entre los mejor estudiados se encuentran *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* y *Streptomyces* (Fadiji et al., 2022; Asghari et al., 2020).

En las plantas, las PGPB actúan a través de mecanismos directos e indirectos que pueden promover el crecimiento y desarrollo, mejorar la captación de nutrientes, modular la respuesta fisiológica ante el estrés y disminuir o prevenir las enfermedades. La promoción directa, implica mecanismos que facilitan la adquisición de nutrientes del medio o interfieren positivamente en el crecimiento de las plantas mediante la señalización hormonal (Glick, 2020; Kour, Rana, Yadav, et al., 2020; Ngumbi & Kloepper, 2016). Algunos de los mecanismos directos conocidos que utilizan las PGPB, incluyen la producción de fitohormonas (como auxinas, citoquinas y giberelinas), que estimulan el desarrollo de raíces y brotes, la fijación de nitrógeno atmosférico a formas asimilables por la planta y la solubilización y mineralización de fósforo por medio de ácidos orgánicos y enzimas hidrolíticas (Basu et al., 2021; Niu et al., 2018; Marasco et al., 2013). También, se ha demostrado la actuación de las PGPB en la reducción de los niveles de señalización de estrés mediada por etileno en las plantas (Mayak et al., 2004). Algunas PGPB pueden escindir el precursor inmediato del etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), en amonio y  $\alpha$ -cetobutirato por medio de la actividad de la enzima ACC-desaminasa. De esta forma, se limita la síntesis de etileno y se alivia el estrés, reduciendo el efecto adverso sobre el crecimiento en las plantas (Penrose & Glick, 2003).

Por su parte, la promoción indirecta ocurre cuando las PGPB disminuyen o previenen la acción de un patógeno vegetal (Glick, 2014). Esto lo pueden lograr a través de la producción de compuestos antagónicos (p. ej. antibióticos, compuestos orgánicos volátiles - VOCs, enzimas líticas y cianuro de hidrógeno - HCN), la competencia por nicho y nutrientes (como el secuestro de hierro por medio de sideróforos) y la inducción de resistencia sistémica (SRI) en las plantas contra un amplio espectro de patógenos foliares y radicales (activando las vías de señalización del jasmonato y etileno) (Dasgupta et al., 2023; Basu et al., 2021).

#### **1.4.2 Efecto de las PGPB en la protección de las plantas frente al déficit hídrico**

Durante la sequía, las propiedades biológicas y fisicoquímicas del suelo se alteran drásticamente, creando un ambiente inadecuado para todos los organismos que lo habitan (Zarei, 2022). Las PGPB que viven en el suelo, también pueden experimentar estrés debido a la disminución del potencial hídrico. En ellas, la pérdida de humedad del suelo se manifiesta a través del estrés osmótico y la competencia por recursos. A nivel celular, las PGPB deben ajustar su potencial hídrico respecto al del entorno para evitar deshidratarse y morir. Además, enfrentan estrés oxidativo debido a la sobreproducción de ROS, las cuales inducen cambios conformacionales de proteínas, alteraciones en el ADN, daños en la membrana celular e interferencia en la cadena de transporte de electrones (Ngumbi & Kloepper, 2016).

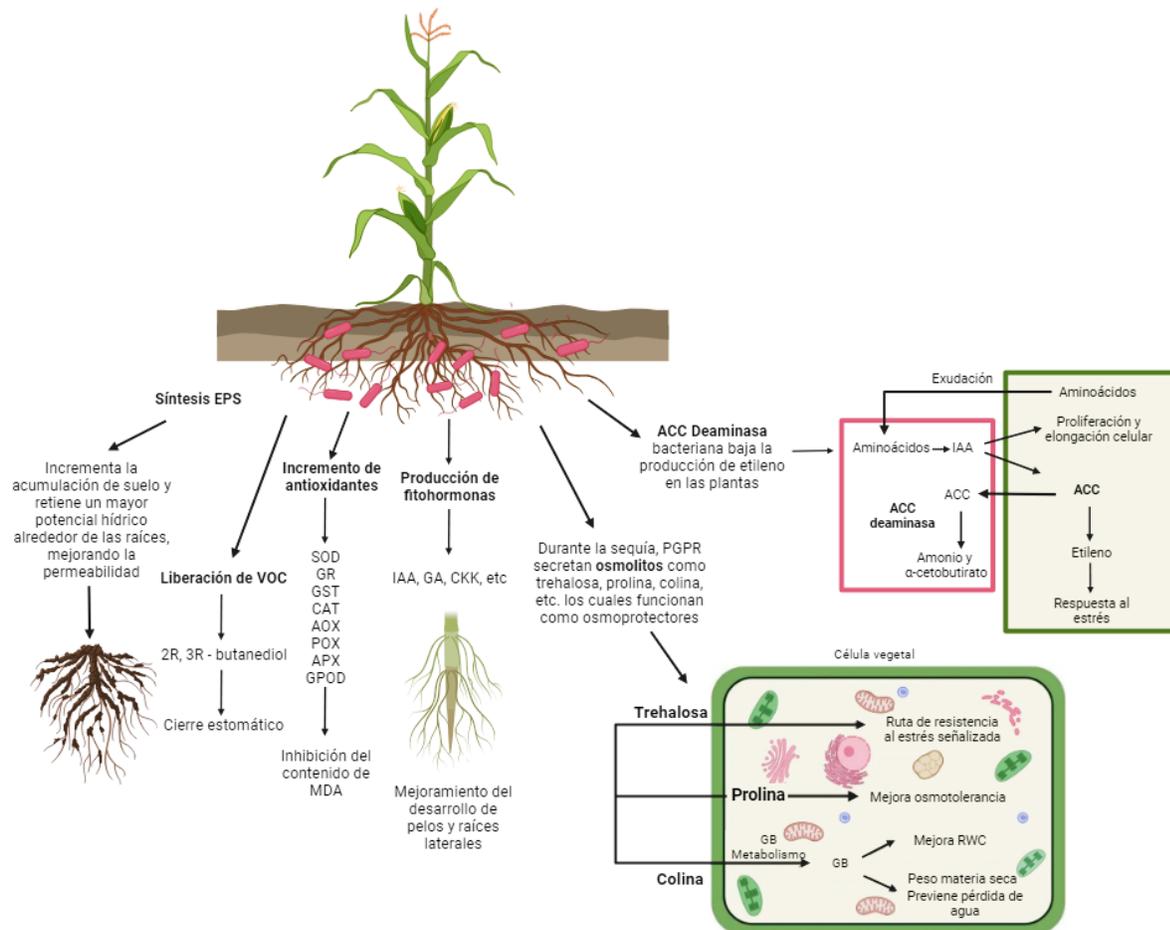
Para sobrevivir a los efectos del déficit hídrico, proteger sus estructuras y evitar la lisis, las bacterias emplean varios mecanismos fisiológicos entre los que destacan la acumulación de solutos compatibles, que incluyen aminoácidos (p.ej. glutamato, glutamina, alanina y prolina), aminos cuaternarios (p.ej. glicina betaína) y gránulos de azúcares (p.ej. sacarosa, trehalosa y poliglucosanos) (Sandhya et al., 2017), así como también la producción de sustancias poliméricas extracelulares o exopolisacáridos (EPS), la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP) y la producción de esporas (Akhtar et al., 2020; Ngumbi & Kloepper, 2016). Inclusive, algunas bacterias pueden aumentar considerablemente el número de sus ribosomas para responder rápidamente a la necesidad de sintetizar proteínas durante el estrés (Ngumbi & Kloepper, 2016).

Por lo tanto, en el proceso de selección de potenciales PGPB, cobra relevancia considerar su capacidad para adaptarse a condiciones ambientales similares a las que se pretenden utilizar (Marulanda et al., 2009). En este sentido, las bacterias nativas de ambientes áridos o semiáridos están ganando especial atención en la investigación en sequía (p.ej. en los trabajos realizados por Hagaggi y Abdul-Raouf (2022), Ansari et al. (2021), Karimzadeh et al. (2021), Niu et al. (2018), García et al. (2017) y Selvakumar et al. (2017)). Esto se debe a que podrían presentar un desempeño superior como promotoras de crecimiento y ser capaces de inducir tolerancia al déficit hídrico en las plantas, en contraste con aquellas bacterias que son introducidas a un ambiente nuevo que resulta desafiante. Es decir, las bacterias adaptadas podrían presentar mayor capacidad para sobrevivir y colonizar las raíces, así como de interactuar de manera efectiva con las plantas en entornos con baja disponibilidad de agua.

Numerosos estudios han demostrado que los mecanismos característicos de las PGPB pueden operar aún bajo las condiciones altamente estresantes del déficit hídrico, brindando protección y reforzando las respuestas de defensa de las plantas contra la sequía (ver Figura 1-4). Por ejemplo, en un estudio realizado por Sandhya et al. (2009), utilizando la cepa de *Pseudomonas putida* GAP-P45 se observó un aumento en la supervivencia, la biomasa y la cantidad de suelo adherido a la raíz de plántulas de girasol sometidas a estrés hídrico mediante el cese de irrigación. Los autores mencionan que la capacidad de la cepa para colonizar las raíces y producir EPS dio paso a la formación de biopelícula sobre las raíces, la cual contribuyó a mejorar la estructura del suelo circundante y el estado hídrico de las plantas.

En otra investigación, Saikia et al. (2018) utilizaron un consorcio de tres especies bacterianas pertenecientes a los géneros de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Ochrobactrum* para mitigar el estrés por falta de agua en leguminosas (*Pisum sativum* L. y *Vigna mungo* L.). El consorcio logró reducir la acumulación de ACC y la expresión del gen de la enzima ACC-oxidasa (que cataliza la biosíntesis de etileno), mejorando el crecimiento de las plantas sometidas al estrés. También, Tiwari et al. (2016), encontraron que la cepa de *Pseudomonas putida* RA mejoró la germinación, el crecimiento de las plantas, el estado hídrico (RWC), la integridad de la membrana celular, la acumulación de osmoprotectores (específicamente azúcares totales y prolina), la capacidad de eliminación de ROS y moduló al alza la expresión de genes sensibles al estrés, en dos cultivares de garbanzo sometidos a déficit hídrico.

En el caso específico del maíz, Naveed et al. (2014) llevaron a cabo un experimento en invernadero para evaluar la efectividad de las cepas endófitas *Burkholderia phytofirmans* y *Enterobacter* sp., en la mejora de parámetros morfofisiológicos de dos cultivares en condiciones de estrés por sequía. Los resultados revelaron que la bacterización minimizó los efectos debidos al estrés al aumentar significativamente la biomasa aérea y radical, el área foliar, el contenido de clorofila (Chl) y el RWC en las hojas. En la Tabla 1-2 se presentan estudios adicionales realizados con el modelo del maíz, mencionando los efectos benéficos de las PGPB y los mecanismos de acción asociados.



**Figura 1-4.** Mecanismos de las PGPB implicados en la inducción de resistencia al estrés por déficit hídrico en plantas. Exopolisacáridos (EPS), compuestos orgánicos volátiles (VOC), glutatión S-transferasa (GST), oxidasa alternativa (AOX), peroxidasa (POX), ácido indolacético (IAA), giberelina (GA), citoquinina (CKK). Fuente: Adaptado y traducido de Sati et al. (2022)

En síntesis, las PGPB han emergido como una alternativa promisoriosa para mitigar los efectos de la sequía y mejorar el rendimiento de los cultivos, a la vez que proporcionan beneficios adicionales en términos de protección contra fitopatógenos y aumento de la fertilidad del suelo. En consecuencia, existe un creciente interés en el desarrollo de biofertilizantes y bioestimulantes basados en PGPB para mejorar la tolerancia de los cultivos al estrés abiótico. Además, estos

enfoques pueden ser más económicos, con impactos ambientales nulos, de fácil adopción por parte de los agricultores y consumidores, y adaptables a una gama amplia de especies de plantas, en comparación con otras alternativas actuales como la modificación genética, la hibridación tradicional y los fertilizantes de síntesis química.

**Tabla 1-2.** Alivio del estrés por déficit hídrico en maíz (*Zea mays* L.) inducido por la aplicación de PGPB y sus mecanismos de acción asociados en la planta

PGPB	Mecanismos de acción asociados	Impactos relacionados	Referencia
<i>Bacillus</i> spp. y <i>Paenibacillus</i> <i>favisporus</i>	- EPS - IAA (ácido indolacético) - Solubilización de fosfato	-Aumento de biomasa seca total, RWC, potencial hídrico, relación suelo rizósferico/tejido raíz. -Aumento de prolina, azúcares, aminoácidos libres. -Disminución de fuga de electrolitos, actividad enzimática (APX, CAT, Glutación peroxidasa GPX).	Vardharajula et al. (2011)
<i>Proteus penneri</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Alcaligenes faecalis</i>	- EPS - Solubilización de fosfato	-Aumento de biomasa, longitud de parte aérea y raíz, área de las hojas, RWC, proteínas y azúcares. -Disminución de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y peroxidasa) y prolina.	Naseem y Bano (2014)
<i>Azospirillum</i> sp.	- Solubilización de fosfato - Producción de sideróforos - Fijación de N - IAA	-Incremento de la altura, biomasa aérea y radical, RWC y prolina.	García et al. (2017)
<i>Azotobacter</i> spp.	- Solubilización de fosfato y potasio - Producción de sideróforos	-Incremento de biomasa seca, altura, contenido de clorofila, concentración de nutrientes (N, P y Fe).	Shirinbayan et al. (2019)
<i>Achromobacter</i> <i>xylooxidans</i> y <i>Enterobacter cloacae</i>	- ACC desaminasa - IAA	-Aumento de altura, peso seco de brotes, producción de grano, tasa fotosintética, tasa de transpiración, clorofila a, b, y total, y conductancia estomática.	Danish et al. (2020)

Continuación Tabla 1-2. Alivio del estrés por déficit hídrico en maíz (*Zea mays* L.) inducido por la aplicación de PGPB y sus mecanismos de acción asociados en la planta

PGPB	Mecanismos de acción asociados	Impactos en la planta relacionados	Referencia
<i>Staphylococcus edaphicus</i> , <i>Bacillus</i> spp. y <i>Streptomyces</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IAA</li> <li>- Solubilización de fosfato</li> <li>- EPS y producción de biopelícula</li> <li>- Fijación de N</li> <li>- ACC desaminasa</li> </ul>	-Incremento de área total de la hoja y biomasa seca radical.	Vieira et al. (2020)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solubilización de fosfatos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Mejora concentración de clorofilas (a, b y total), actividades fotosintéticas.</li> <li>-Aumento de prolina, azúcares solubles totales y actividad antioxidante (CAT, Peroxidasa).</li> </ul>	Zarei et al. (2020)
<i>Bacillus</i> spp., <i>Enterobacter</i> sp. y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ACC desaminasa</li> <li>- EPS</li> <li>- Producción de sideróforos</li> <li>- Solubilización de fosfatos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Aumento de RWC, concentración de pigmentos (clorofilas y carotenoides) y actividad fotosintética.</li> <li>-Aumento de actividad enzimática (SOD, GPX, CAT).</li> </ul>	Saleem et al. (2021)
<i>Bacillus</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IAA</li> <li>- Fijación de nitrógeno</li> <li>- Solubilización de fosfato.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Aumento de parámetros de crecimiento (biomasa y altura), pigmentos fotosintéticos.</li> <li>-Disminución de malondialdehído (MDA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y actividad enzimática antioxidante (SOD, APX, GPX, CAT).</li> </ul>	Azeem et al. (2022)
<i>Sphingobacterium changzhouense</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Producción de fitohormonas: IAA y Giberelina (GA)</li> <li>- EPS</li> <li>- Solubilización de fosfato</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Aumento de longitud de la parte aérea y raíces, tasa fotosintética, conductancia estomática y eficiencia del uso del agua.</li> <li>-Incremento de la actividad antioxidante total, clorofila total, prolina, carbohidratos, proteínas, compuestos fenólicos y flavonoides.</li> </ul>	Hagaggi y Abdul-Raouf (2022)



## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

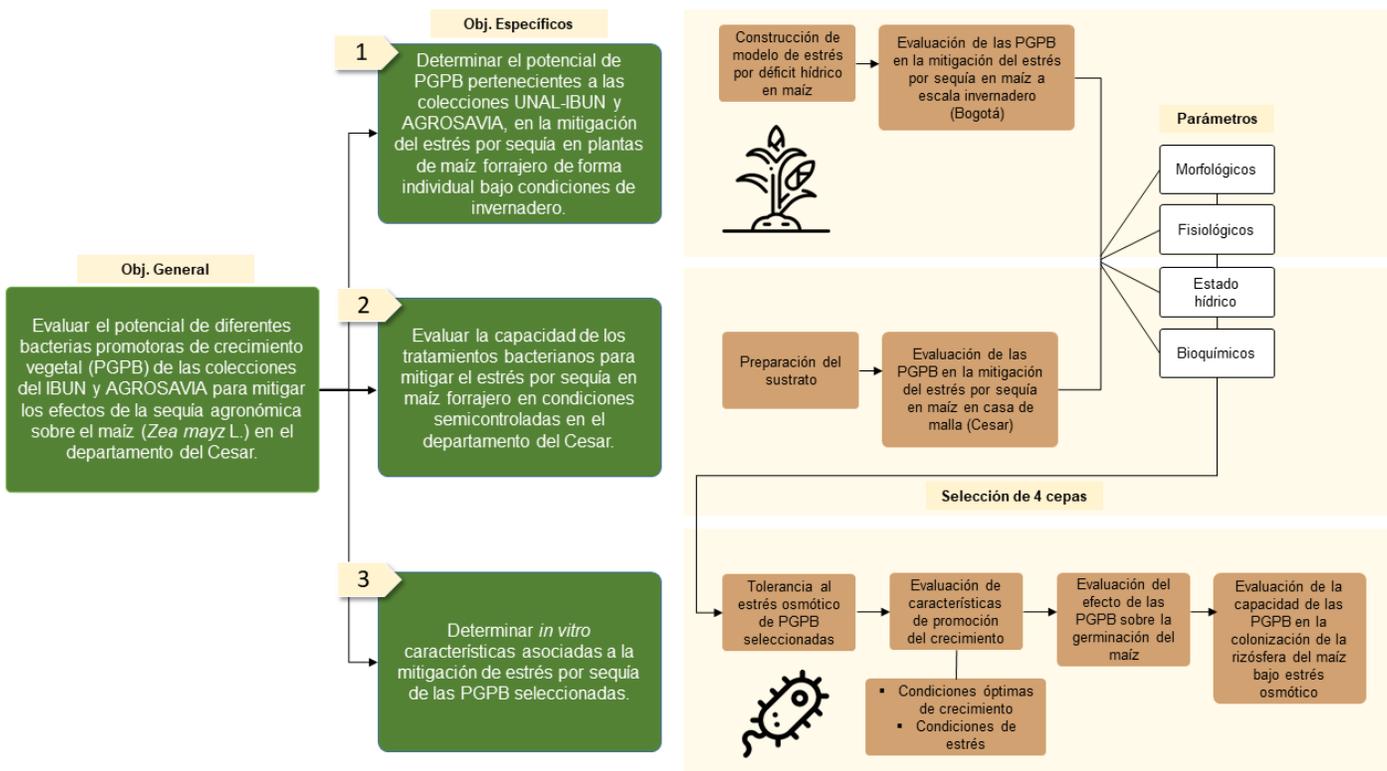
Evaluar el potencial de diferentes bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) de las colecciones del IBUN y AGROSAVIA para mitigar los efectos de la sequía agronómica sobre el maíz (*Zea mays* L.) en el departamento del Cesar.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el potencial de PGPB pertenecientes a las colecciones UNAL-IBUN y AGROSAVIA, en la mitigación del estrés por sequía en plantas de maíz forrajero de forma individual bajo condiciones de invernadero.
2. Evaluar la capacidad de los tratamientos bacterianos para mitigar el estrés por sequía en maíz forrajero en condiciones semicontroladas en el departamento del Cesar.
3. Determinar *in vitro* características asociadas a la mitigación de estrés por sequía de las PGPB seleccionadas.

### 3. Metodología

Para dar alcance a los objetivos anteriormente mencionados, el trabajo investigativo se desarrolló en tres secciones o fases; inicialmente, se evaluó el efecto de las cepas de interés sobre la mitigación del estrés por sequía en plantas de maíz en un invernadero de la UNAL en Bogotá. Posteriormente, se evaluaron nuevamente las cepas en un ensayo *in vivo* en el caribe colombiano, siguiendo el diseño experimental probado previamente con algunas modificaciones, llevándolo a cabo en una estructura que permitió controlar el riego y exponer a las plantas a las condiciones ambientales reales de la zona de estudio (casa de malla). Finalmente, se seleccionaron cuatro de las cepas evaluadas y se procedió con su caracterización *in vitro*. En la Figura 3-1, se resumen las actividades principales de cada fase y el flujo de trabajo seguido en este proyecto de investigación.



**Figura 3-1.** Diagrama de flujo metodológico para el desarrollo del proyecto de investigación. Los recuadros en verde indican los objetivos del trabajo; los recuadros en color beige representan fases o secciones, los recuadros pequeños en café, las actividades principales de cada fase y los recuadros en blanco, los tipos de parámetros en los que se evaluó la respuesta al estrés por déficit hídrico en las plantas de maíz, para los ensayos de invernadero y casa de malla. Fuente: Elaboración propia

### 3.1 Metodología Objetivo 1

**Objetivo No. 1:** Determinar el potencial de PGPB pertenecientes a las colecciones UNAL-IBUN y AGROSAVIA, en la mitigación del estrés por sequía en plantas de maíz forrajero de forma individual bajo condiciones de invernadero.

Este objetivo se llevó a cabo, en un principio, definiendo el modelo experimental apropiado para evaluar los efectos del estrés por déficit hídrico en el maíz y, posteriormente, evaluando el efecto de las cepas bacterianas en la mitigación del estrés.

#### 3.1.1 Construcción del modelo metodológico de evaluación de estrés por déficit hídrico en maíz

Con la construcción del modelo experimental se buscó definir la línea base de las variables de control de los ensayos en invernadero, la duración del período de déficit hídrico y cambios morfológicos asociados al estrés en la variedad de maíz forrajero ICA V109. Para ello, se llenaron materas plásticas de 22 cm de diámetro con 2,0 kg de suelo no estéril proveniente del Centro de Investigación (C.I.) Tibaitatá de AGROSAVIA, ubicado en el municipio de Mosquera, Cundinamarca, Colombia (4°41'42.9"N - 74°12'19.6"W). El suelo fue clasificado como Andisol (Typic Hapludands), presentó pH de 5,64, conductividad eléctrica (CE) 1,68 dS/m, contenido de materia orgánica (MO) 10,26 %, fósforo disponible (P) 36,51 mg/Kg, azufre disponible (S) 36,01 mg/Kg, boro disponible (B) 0,24 mg/Kg, calcio disponible (Ca) 2,69 cmol(+)/Kg, potasio disponible (K) 2,61 cmol(+)/Kg y capacidad de intercambio catiónico efectiva (CICE) 10,72 cmol(+)/Kg. El suelo se cribó con tamiz de 5mm previo a su uso y se determinó el contenido de agua a capacidad de campo (CC) por el método gravimétrico acorde con la Ecuación 1 (Cassel & Nielsen, 1986). Seguidamente, se sembraron dos semillas germinadas de maíz en cada matera y se definieron dos tratamientos, uno con riego durante todo el experimento (control) y otro, sometido a déficit hídrico. Ambos tratamientos contaron con 20 réplicas.

Las materas se ubicaron en el invernadero de Microbiología Agrícola del Instituto de Biotecnología (IBUN) de la Universidad Nacional, sede Bogotá. Se fijaron las condiciones día/noche de temperatura, Humedad Relativa (HR) y fotoperíodo en el invernadero de 29/20 °C, 40/70 % y 12/12 h respectivamente, teniendo como base los datos proporcionados por la estación meteorológica del C.I. Motilonia de AGROSAVIA, ubicado en el municipio de Agustín Codazzi (Valledupar, Cesar). El contenido de agua en las materas se controló monitoreando su peso cada 48 h, determinando el peso perdido por evapotranspiración y adicionando la cantidad de agua necesaria para mantener el suelo a aproximadamente el 80 % de su CC (Anjum et al., 2016) (ver Ecuaciones 2 y 3).

$$CC_{100\%} = \frac{Psat(g) - Psec(g)}{Psec(g)} \quad (1)$$

$$CC_{80\%} = CC_{100\%} * 0,8 \quad (2)$$

$$\text{Peso materia a } CC_{80\%} = (CC_{80\%} * Psec(g)) + Psec(g) \quad (3)$$

Donde:

CC<sub>100%</sub>, Contenido de agua a capacidad de campo del suelo (g/g);

CC<sub>80%</sub>, Contenido de agua al 80 % de capacidad de campo del suelo;

Psat, peso del suelo en saturación (g);

Psec, peso seco del suelo (g);

Peso materia a CC<sub>80%</sub>, peso de la materia con CC al 80 % (g)

Transcurridos 10 días posteriores a la siembra (PS), se dejó una sola planta por materia y se continuó con el riego hasta los 20 PS. Desde el día 21 PS, se suspendió el riego al tratamiento correspondiente para inducir un estrés por sequía progresivo. Se tomaron cinco réplicas de ambos tratamientos (con riego y sin riego) y muestras de 25 g del suelo cercano a las raíces de las plantas en cada una de ellas, para estimar el peso seco de la parte aérea y la pérdida de humedad del suelo en los días 5, 8, 11 y 15 del estrés. La biomasa seca aérea se determinó secando las muestras en horno a 65 °C hasta peso constante (se logró aproximadamente a las 72 h). Con la información resultante (ver sección resultados y discusión 4.1.1.), se determinó que 11 días de estrés de déficit hídrico eran suficientes para observar cambios significativos en el crecimiento aéreo de la planta.

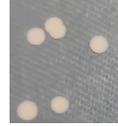
### 3.1.2 Material biológico

Se utilizaron semillas certificadas de maíz amarillo ICA V109 (Semicol, Bogotá-Colombia), una variedad para producción de forraje (principalmente) y de consumo humano, adaptada a clima cálido y de uso común en el Caribe colombiano (Suárez et al., 2022). Por otra parte, se usaron diez cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Bacillus* (7 cepas), *Pseudomonas* (2 cepas) y *Lysinibacillus* (1 cepa), provenientes del suelo rizosférico de cultivos de papa, maíz y pasto de diferentes zonas del país (ver Tabla 3-1).

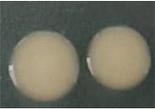
Las cepas XT13, XT14, XT17, XT38 y XT110 son bacterias aisladas de suelos semiáridos con potencial para mejorar la sequía en maíz y pasto guinea (Moreno-Galván, Cortés-Patiño, et al., 2020; Moreno-Galván, Romero-Perdomo, et al., 2020) y fueron proporcionadas por la Colección de Microorganismos con Interés Biofertilizante – CMIB del Banco de Germoplasma de AGROSAVIA. Las cepas IBUN PSL80 y PSL63, han mostrado efectos beneficiosos sobre el crecimiento en papa (Ordoñez et al. 2016), y las cepas IBUN 2755, MGC9 y MT1C8, han promovido el crecimiento (Gomez-Ramirez & Uribe-Velez, 2021; Cruz et al., 2017) y brindado protección contra fitopatógenos en arroz (Perea-Molina et al., 2022; Pedraza-Herrera et al., 2021;). Estas cepas fueron

suministradas por el Banco de Genes y Cepas de Microorganismos del IBUN. Las cepas pertenecientes a este último banco, serán nombradas de ahora en adelante solamente por su código sin la palabra “IBUN” (p.ej. IBUN MGC9, pasaría a MGC9).

**Tabla 3-1.** Información de las cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Género	Origen del aislamiento	Morfología colonia	No. Accesoión (16s rRNA)
IBUN MGC9	<i>Lysinibacillus</i>	Rizósfera del maíz ( <i>Zea mays</i> ) – Antioquia, Colombia		Sin registro
IBUN MT1C8	<i>Bacillus</i>	Rizósfera del maíz ( <i>Zea mays</i> ) – Antioquia, Colombia		Sin registro
IBUN 2755	<i>Bacillus</i>	Rizósfera de papa criolla ( <i>Solanum tuberosum</i> Grupo Phureja) – Cundinamarca, Colombia		Sin registro
IBUN PSL63	<i>Pseudomonas</i>	Rizósfera de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> cv. Parda pastusa) – Antioquia, Colombia		Sin registro
IBUN PSL80	<i>Pseudomonas</i>	Rizósfera de papa criolla ( <i>Solanum phureja</i> ) – Antioquia, Colombia		Sin registro
XT13	<i>Bacillus</i>	Rizósfera de pasto guinea ( <i>Megathyrsus maximus</i> ) – Cesar, Colombia		MH014814 (GenBank)
XT14	<i>Bacillus</i>	Rizósfera de pasto guinea ( <i>Megathyrsus maximus</i> ) – Cesar, Colombia		MH014816 (GenBank)

Continuación Tabla 3-1. Información de las cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Género	Origen del aislamiento	Morfología colonia	No. Accesoión (16s rRNA)
XT17	<i>Bacillus</i>	Rizósfera de pasto guinea ( <i>Megathyrsus maximus</i> ) – Cesar, Colombia		MH014818 (GenBank)
XT38	<i>Bacillus</i>	Rizósfera de pasto guinea ( <i>Megathyrsus maximus</i> ) – Cesar, Colombia		MH014817 (GenBank)
XT110	<i>Bacillus</i>	Rizósfera de pasto guinea ( <i>Megathyrsus maximus</i> ) – Cesar, Colombia		MH014815 (GenBank)

### 3.1.3 Preparación de inóculos bacterianos

Inicialmente, las cepas almacenadas en viales criogénicos a -20 y -80 °C, se activaron en agar Luria Bertani (LB) (composición por litro: triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, cloruro de sodio 10 g, y agar microbiológico 15 g) (cepas PSL63, PSL80, MT1C8, MGC9 y 2755), o agar tripticasa soya (TSA) (cepas XT13, XT14, XT17, XT38 y XT110) y se incubaron durante 24 a 48 h a 30 °C. En el caso de las *Pseudomonas* spp., se tomó una colonia de cada cultivo puro de 48 h, se sembró en tubos tipo Falcon® de 50 mL con 5 mL de caldo LB y se incubó a 30 °C *overnight* con agitación orbital (150 rpm). Posteriormente, la biomasa bacteriana se recuperó centrifugando a 7830 × g durante 5min, lavando y resuspendiendo el pellet en solución salina (0,85 % p/v NaCl). La suspensión celular pura se ajustó a una densidad óptica (OD) de 0,2 ± 0,05 a 600nm, equivalente a 1,0x10<sup>8</sup> UFC/mL, concentración determinada mediante la técnica de diluciones seriadas y recuento de microgotas en placas de LB según Hoben y Somasegaran (1982).

En el caso de las cepas de *Bacillus* spp. y *Lysinibacillus* sp., los inóculos utilizados en este estudio se prepararon de dos formas para obtener suspensiones de células vegetativas o esporas. Las células vegetativas se obtuvieron a partir de una colonia de cada cultivo puro de 24 h y se procedió con la preparación del inóculo de forma similar que con las *Pseudomonas*. Para las esporas, una colonia de un cultivo puro de 24 h se mezcló con 1 mL de solución salina (SS) en un tubo de microcentrífuga, y seguidamente, 100 µL de la mezcla fueron sembrados masivamente con hisopo en una caja Petri® con Medio Sólido de Esporulación (MES) (en g/L: 0,1 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,028 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6,8 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,12 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,014 ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,02 MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 7,0 Triptona, 3,0 D-Glucosa y 10, 0 Bacto-agar) (Cruz et al., 2017). Después de 10 días de incubación a 30 °C, la biomasa bacteriana se

recuperó de la caja, se lavó dos veces y resuspendió con 20 mL de NaCl (0,85 % p/v). La suspensión de esporas se calentó a 80°C por 10min en baño serológico para eliminar las células vegetativas remanentes. Las esporas puras concentradas ( $1,0 \times 10^8$  –  $1,0 \times 10^9$  UFC/mL) se conservaron en refrigeración a 4°C en frascos ámbar y sirvieron de stock para la preparación de las suspensiones empleadas como inóculo. Las suspensiones de células vegetativas de *Bacillus* y *Lysinibacillus* se utilizaron en los ensayos *in vitro*, mientras que las esporas, se usaron en los ensayos en materia.

Las suspensiones bacterianas de todas las cepas evaluadas, fueron ajustadas con SS (NaCl 0,85 % p/v) a una concentración de  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL y verificada su pureza previamente a su uso. Ensayos preliminares al interior del grupo de investigación, permitieron verificar que una concentración mayor a  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL con algunas de las cepas, conducía al daño o degradación del embrión de las semillas de maíz (datos no presentados). Por lo tanto, se decidió trabajar con la concentración anteriormente mencionada.

#### **3.1.4 Efecto de la inoculación de plantas de maíz con PGPB en la mitigación del estrés por sequía: un ensayo de invernadero**

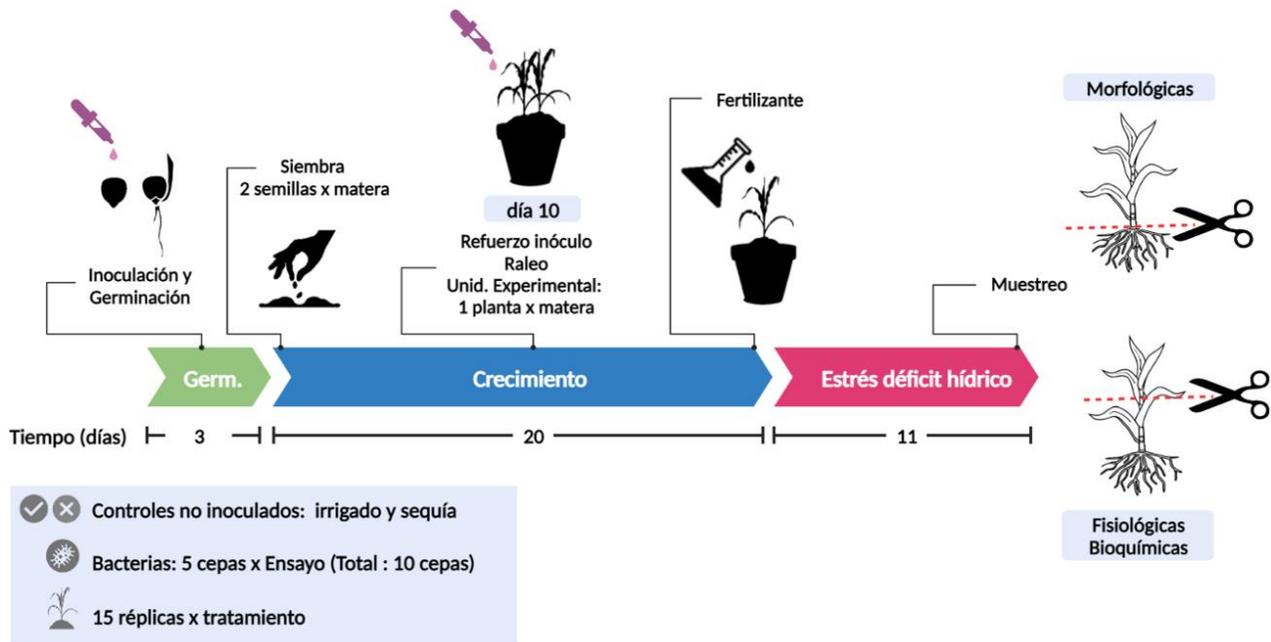
Un experimento en invernadero fue llevado a cabo para determinar el efecto de la inoculación de las cepas, en la mitigación del estrés por déficit hídrico en plantas de maíz forrajero. Inicialmente, las semillas de maíz ICA V109 se desinfectaron superficialmente mediante inmersión en hipoclorito de sodio 5 % (v/v) durante 3 min, seguido de un lavado con agua estéril e inmersión en etanol 70 % (v/v) por 2 min. Posteriormente, se lavaron vigorosamente dos veces con agua estéril para remover el etanol y restos de fungicida adheridos a la superficie (Moreno-Galván, Cortés-Patiño, et al., 2020). Una vez desinfectadas las semillas, se inocularon sumergiéndolas en cada una de las suspensiones bacterianas ajustadas ( $1,0 \times 10^7$  UFC/mL) a razón de 1 mL por semilla (Shirinbayan et al., 2019), durante 30 min con agitación orbital constante a 150 rpm y 30 °C. Se utilizaron semillas embebidas en solución salina estéril (NaCl 0,85 % p/v) como control no inoculado. Una vez inoculadas, se dejaron secar bajo flujo laminar por 20 min y se colocaron sobre placas con agar agua (7,5 g/L agar bacteriológico). Las placas se incubaron a 25 °C en oscuridad durante tres días para permitir su germinación.

Las materas se llenaron con 2,0 kg de suelo no estéril por tratamiento. Se definieron diez tratamientos bacterianos que debieron evaluarse en dos grupos independientes dado el tamaño del invernadero. En el *primer grupo*, se evaluaron los tratamientos de las cepas XT14, 2755, MT1C8, PSL80 y PSL63 y en el *segundo grupo*, MGC9, XT17, XT13, XT38 y XT110. Se contó con dos controles no inoculados en cada ensayo, uno con riego constante y otro, sometido a déficit hídrico. Se sembraron dos semillas germinadas por materia. Después de 10 días PS, se dejó una sola plántula por materia y se aplicó un refuerzo de 5 mL de suspensión celular correspondiente con concentración igual a  $1 \times 10^7$  UFC/mL en la zona de las raíces y el tallo. El suelo utilizado, las

condiciones ambientales del invernadero y la forma de riego, se ajustaron conforme a lo descrito anteriormente en el modelo de estrés por sequía detallado en la sección 3.1.1 de este documento.

Las plantas fueron regadas durante 20 días a fin de favorecer su crecimiento y desarrollo. Antes de la fase del estrés, en el último día de riego, se adicionaron 100 mL de una solución de Hoagland al 50 % (Hoagland & Arnon, 1950) para suplir posibles deficiencias nutricionales. El estrés por sequía fue inducido al suspender el riego y permitir la deshidratación libre del suelo durante 11 días.

Después del período de estrés, las plantas fueron cosechadas para determinar el efecto de cada tratamiento a nivel de variables morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Adicionalmente, se tomaron muestras de suelo cercano a las raíces de los tratamientos control para monitorear el contenido de agua al finalizar el ensayo. En la Figura 3-2 se esquematiza la metodología seguida en los ensayos de invernadero.



**Figura 3-2.** Esquema metodológico de los ensayos en planta bajo condiciones de invernadero. Fuente: Elaboración propia

#### • Parámetros morfológicos

Se midió la altura de todas las plantas de cada tratamiento desde la base del tallo (superficie del suelo) hasta el ápice de la hoja más larga. Seguidamente, se procedió a extraer la planta y dividirla en tallo y raíz para determinar la biomasa seca secando las muestras en horno a 65 °C durante 72 h.

- **Parámetros fisiológicos**

**Contenido Relativo de Agua (RWC):** El contenido relativo de agua (RWC, en inglés) se determinó siguiendo la metodología propuesta por Sade et al. (2015) para cereales, con modificaciones menores. Brevemente, se cortó un fragmento de 10 cm medido en dirección del ápice hacia el tallo, de una hoja completamente desarrollada de cada planta. El fragmento se depositó rápidamente en una bolsa con cierre hermético y se procedió a determinar su peso fresco (PF). Seguidamente, la hoja se ajustó en posición vertical dentro de la bolsa y se adicionó 2 mL de CaCl<sub>2</sub> a 5 mM, asegurando que sólo el área del corte estuviera en contacto con la solución. Las muestras se dejaron en oscuridad por 8 h. Posteriormente, los fragmentos se extrajeron de la bolsa, se secaron suavemente con una toalla de papel para retirar el exceso de solución y se pesaron para determinar su peso en turgencia (PT). Luego, se llevaron al horno a 60 °C hasta peso constante y se registró su peso seco (PS). El contenido relativo hídrico se calculó siguiendo la Ecuación 4.

$$\text{RWC (\%)} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PT} - \text{PS}} \times 100 \quad (4)$$

- **Parámetros bioquímicos**

Para los análisis bioquímicos, se cortó el tercio superior de las plantas, se congeló con nitrógeno líquido y se trituró con un mortero frío hasta pulverizarlo. Las muestras se almacenaron a -80 °C en tubos de microcentrífuga para su posterior análisis. A partir de cada muestra se midió el contenido de prolina libre, azúcares totales solubles, pigmentos fotosintéticos (Chl a, b y carotenoides) y la actividad enzimática antioxidante de APX y GR, como se detalla a continuación:

**Estimación de Prolina libre:** La prolina libre se determinó siguiendo el método propuesto por Bates et al. (1973) con las modificaciones sugeridas por Abrahám et al. (2010). Inicialmente, se tomaron 100 mg de muestra procesada de cada réplica, se depositaron en tubos de microcentrífuga y se agregaron 500 µL de ácido sulfosalicílico 3 % (p/v), luego, se llevaron a agitación horizontal a 200 rpm durante 1 h para facilitar la homogeneización. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 18.620 × g por 5 min para obtener un extracto libre de material vegetal. De este sobrenadante, se tomaron 100 µL y se depositaron en un tubo nuevo de reacción de 2 mL, al cual se adicionaron 100 µL de ácido sulfosalicílico 3% (p/v), 200 µL de ácido acético glacial y 200 µL de ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina disuelta en 30 mL de ácido acético glacial y mezclada con 20 mL de ácido ortofosfórico 6M). Las muestras se mezclaron mediante vórtex y se llevaron a baño serológico durante 1 h a una temperatura aproximada de 100 °C. La reacción se detuvo en cama de hielo, se adicionó 1 mL de tolueno y se agitó vigorosamente por 20 s. La fase acuosa formada se analizó a 520 nm en un lector de microplacas de 96 pozos, empleando como blanco tolueno. Las absorbancias obtenidas fueron interpoladas en una curva elaborada a partir de L-prolina grado analítico y los resultados se expresaron en µg de prolina/g de tejido fresco.

**Estimación de Azúcares Totales Solubles:** Los azúcares totales solubles se midieron de acuerdo con Dubois et al. (1956) con leves modificaciones. Se tomaron 100 mg de material vegetal triturado de cada muestra y se colocaron en un tubo de 15 mL. Seguidamente, se adicionaron 5 mL de agua ultrapura y se llevaron a un agitador horizontal durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a  $4.227 \times g$  durante 15 min a 12 °C, para obtener un extracto libre de material vegetal. Se tomaron 30  $\mu$ L de cada extracto y se mezclaron con 180  $\mu$ L de agua ultrapura, 200  $\mu$ L de fenol al 80 % (p/v) recién preparado y 1 mL de ácido sulfúrico al 98% v/v en tubos de microcentrífuga de 2,0 mL. Se mezcló mediante vórtex por 1 min y las muestras se dejaron en reposo en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 490 nm y se comparó con una curva de calibración con D-glucosa como patrón. Los resultados se expresaron en mg D-glucosa /g de tejido fresco.

**Estimación de pigmentos fotosintéticos:** Los pigmentos fotosintéticos se determinaron siguiendo la metodología propuesta por Hiscox e Israelstam (1979) con modificaciones menores. Se tomaron 20 mg de tejido vegetal fresco macerado con nitrógeno líquido y se depositaron en un tubo de microcentrífuga de 2 mL. Se adicionó 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevó a baño serológico a 65 °C durante 1 h. Pasado este tiempo, se recuperó el sobrenadante y se colectó en un tubo nuevo. Se adicionó nuevamente 1 mL de DMSO a la muestra y se dejó por una hora más en el baño serológico para terminar de extraer los pigmentos y lograr que el tejido vegetal perdiera su coloración verde. Finalmente, los sobrenadantes se juntaron en el mismo tubo y se leyó su absorbancia a 665, 649 y 480 nm. Las lecturas obtenidas fueron reemplazadas en las ecuaciones propuestas por Wellburn (1994), para obtener las concentraciones de clorofila a (Chla), clorofila b (Chlb) y carotenoides (CAR). Los resultados se expresaron en  $\mu$ g/g de tejido fresco.

**Estimación de actividad enzimática:** La determinación de la actividad enzimática antioxidante de ascorbato peroxidasa (APX) (EC 1.11.1.11) y glutatión reductasa (GR) (EC 1.20.4.2.) se realizó con base en los métodos propuestos por Nakano y Asada (1981) y Smith et al. (1988) respectivamente, aplicando las modificaciones para la cuantificación en microplaca propuestas por Murshed et al. (2008). Para ello, se tomaron 250 mg de tejido vegetal fresco macerado con nitrógeno líquido, se colocaron en un tubo de 2,0 mL y se homogenizaron en un agitador vórtex con buffer MES/KOH (pH 6,0), conteniendo 40 mM de KCl, 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 1 mM de L-ácido ascórbico (AsA). Seguidamente, se centrifugó a  $14.000 \times g$  por 10 min a 4°C para obtener el extracto enzimático. A partir de este extracto, se determinó la actividad enzimática de APX y GR. Todos los pasos se realizaron a una temperatura de 4°C.

La actividad de la APX se midió dispensando 185  $\mu$ L de buffer de fosfato 50 mM (pH 7.0) con AsA 0,25 mM en pozos de microplaca y adicionando 10  $\mu$ L de extracto enzimático de cada muestra. Seguidamente, la microplaca se cargó en un equipo lector de microplacas (Synergy HTX, BioTek), se agregaron 5  $\mu$ L de 200 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (concentración final 5mM) a cada pozo con una pipeta multicanal y se agitó 5 s linealmente por programación del equipo. Se midió el decrecimiento de la

absorbancia a 290 nm durante 3 min. La actividad específica se calculó utilizando el coeficiente de extinción de 2,8/mM·cm (Nakano & Asada, 1981).

Para la enzima GR, se dispensaron 185  $\mu$ L de buffer HEPES 50 mM (pH 8,0) con 0,5 mM de EDTA y 0,25 mM de Nicotiamida-Adenina Dinucleotido Fosfato (NADPH) en pozos de microplaca y se adicionó 10  $\mu$ L de muestra por pozo. La reacción se inició agregando 5  $\mu$ L de 20 mM de glutatión oxidado (GSSG) (0,5 mM) a cada pozo y se siguió el decrecimiento de NADPH por oxidación a 340 nm por 3 min. La actividad específica se calculó con el coeficiente de extinción 6,2/mM·cm. Los resultados de las actividades enzimáticas se expresaron en términos de nmol/min·g de peso fresco.

### 3.1.5 Análisis estadístico de datos

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado (DCA) en los ensayos de invernadero. Una planta por materia fue considerada como la unidad experimental o réplica y cada tratamiento contó con 15 réplicas. Respecto a las variables monitoreadas, la altura fue determinada en todas las réplicas de cada tratamiento, mientras que para la biomasa seca (raíz y parte aérea) se cosecharon al azar 10 plantas por tratamiento, y para las variables de RWC y bioquímicas, se utilizaron las 5 plantas restantes.

Todos los valores presentados corresponden a las medias de los datos y sus desviaciones estándar (DE). Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), garantizando los supuestos de normalidad y homocedasticidad a través de las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Duncan. Para los datos que no presentaron un comportamiento paramétrico, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con ajuste de Bonferroni del paquete Agricolae del software estadístico R. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de  $p \leq 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software R versión 4.0.5.

Adicionalmente, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ ) debido a que los datos de algunas de las variables no presentaban una distribución normal y se estimó su significancia a un valor de  $p \leq 0,05$ . Este análisis se realizó en busca de correlaciones entre los parámetros evaluados en las plantas sin inoculación empleando el mismo software mencionado.

## 3.2 Metodología Objetivo 2

**Objetivo No. 2:** Evaluar la capacidad de los tratamientos bacterianos para mitigar el estrés por sequía en maíz forrajero en condiciones semicontroladas en el departamento del Cesar.

### 3.2.1 Experimento bajo condiciones de casa de malla

Con el propósito de evaluar el desempeño de las cepas en la mitigación del estrés por sequía en el maíz, en condiciones ambientales cercanas a las encontradas en los agroecosistemas del Cesar, se llevó a cabo un ensayo en casa de malla. Esta estructura, con techo translúcido y recubierta por malla metálica, funcionó como un sistema abierto para las variables de temperatura, radiación solar y humedad relativa, pero permitió controlar el riego de las plantas.

El experimento se realizó en el C.I. Motilonia de AGROSAVIA ubicado en Agustín Codazzi, Cesar (10° 0' 10.920" N - 73° 14' 46.027" W), bajo un diseño experimental en bloques completamente aleatorizados, temperatura promedio de 28,6 °C y humedad relativa de 76,6%. El ensayo contó con 10 tratamientos, correspondientes a las 10 cepas en estudio (ver Tabla 3-1), y dos controles sin inocular (uno de ellos irrigado durante todo el experimento y otro sometido a estrés hídrico). Se utilizaron 12 materas con 5 kg de sustrato por tratamiento. El sustrato consistió en una mezcla de 75% p/p de aluivión y 25% p/p de materia orgánica (abono ABONAZA, composición en Tabla suplementaria 6-1). El sustrato se preparó en las proporciones mencionadas, para mejorar el aporte nutricional de las plantas y la retención de humedad, además de ser esta una práctica común local para la producción de plantas en vivero. El sustrato presentó un pH de 7,7, CE de 4,4 dS/m, MO 3,12 %, fósforo disponible 63,4 mg/Kg, azufre disponible 273,7 mg/Kg, CICE 27,2 cmol(+)/Kg y boro disponible 3,68 mg/Kg.

Las semillas de ICA V109 se desinfectaron e inocularon como se indicó previamente y se sembraron tres de ellas por matera. Tras 10 días PS, se dejó en las materas una sola planta y se reinoculó una suspensión bacteriana ajustada ( $1,0 \times 10^7$  UFC/mL), en el caso de los tratamientos, y de solución salina, en el de los controles. Durante 20 días PS se permitió el establecimiento de las plantas bajo condiciones óptimas de riego y a partir del día 21 PS se dio inicio a la fase de estrés, deteniendo el riego por 11 días. Al finalizar el período de estrés, se determinaron las variables de respuesta en las plantas a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico como se mencionó en la sección 3.1.4 (experimento invernadero). En el caso de la variable altura, se midió en el día 20 y 31 PS en todas las plantas de cada tratamiento.

Adicionalmente, se seleccionaron al azar 5 plantas de cada tratamiento y se monitoreó la conductancia estomática ( $g_s$ ) empleando un porómetro de mano (SC-1 Leaf Porometer). Las mediciones se realizaron en la hoja nueva que se encontraba completamente extendida,

desarrollada y sin señales de lesión o enfermedad, durante la fase de estrés en los días 21, 26, 27 y 29 PS desde las 7:30 am.

### 3.2.2 Análisis estadístico de datos

El experimento en casa de malla se aplicó un diseño de bloques aleatorizados. Todos los valores presentados corresponden a las medias de los datos y sus DE. Una planta por materia fue considerada como réplica y cada tratamiento contó con 12 réplicas. Respecto a las variables monitoreadas, la altura fue determinada en todas las réplicas de cada tratamiento, mientras que para la biomasa seca (raíz y parte aérea) se cosecharon al azar 7 plantas por tratamiento y para las variables fisiológicas y bioquímicas, se utilizaron 5 plantas. La comparación de varianzas entre tratamientos se realizó inicialmente mediante un análisis de varianzas (ANOVA) de dos vías o bifactorial, para evaluar la significancia de la interacción bloque-tratamiento. En caso de que el bloque no presentara efecto sobre la respuesta de las variables, se realizó el ANOVA tradicional garantizando los supuestos de normalidad y homocedasticidad a través de las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Duncan. Para los datos que no presentaron un comportamiento paramétrico, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con ajuste de Bonferroni del paquete Agricolae del software estadístico R. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de  $p \leq 0,05$  y los análisis estadísticos se realizaron empleando el software R versión 4.0.5.

Adicionalmente, se realizaron Análisis de Componentes Principales (PCA) para evaluar la interacción multifactorial en los tratamientos bacterianos y se calculó el coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ ) a un valor de  $p \leq 0,05$  con el software R versión 4.0.5. Este último análisis, se realizó para cuantificar la correlación existente entre las variables de respuesta fisiológicas y bioquímicas medidas en las plantas sin inoculación.

### 3.3 Metodología Objetivo 3

**Objetivo No. 3:** Determinar *in vitro* características asociadas a la mitigación de estrés por sequía de las PGPB seleccionadas.

#### 3.3.1 Caracterización *in vitro* de los aislamientos

De los aislamientos evaluados en los ensayos de invernadero y casa de malla, se seleccionaron cuatro de ellos (PSL80, PSL63, XT14 y XT17) (ver sección 4.2.1) para determinar su tolerancia al déficit hídrico y características de promoción de crecimiento vegetal como se indica a continuación.

- **Tolerancia al déficit hídrico de las cepas seleccionadas**

Se evaluó la tolerancia de las cepas al déficit hídrico a través de su capacidad para crecer en condiciones de estrés osmótico inducidas mediante la aplicación de Polietilenglicol 6000 (PEG 6000) a diferentes concentraciones (Ilyas et al., 2020; Sandhya et al., 2009). Brevemente, se utilizó caldo LB en tubos tipo Falcon® de 50 mL suplementado con PEG 6000 a 0, 10, 20 y 30% (p/v), correspondientes a los potenciales hídricos de 0, -0,13, -0,45 y -0,95 MPa, respectivamente (Michel & Kaufmann, 1973), y se inoculó el 1% del volumen con una suspensión pura de células vegetativas de 24 h de crecimiento ajustada a una OD<sub>600</sub> de 0,2 (1,0x10<sup>7</sup> UFC/mL), para una concentración inicial en cada tubo de 1,0x10<sup>5</sup> UFC/mL aproximadamente. Cada cepa contó con tres réplicas por concentración de PEG para un total de 12 tubos, las cuales se incubaron a 30°C con agitación orbital constante a 150 rpm durante 24 h. Posteriormente, se determinó el crecimiento celular en UFC por mL mediante el método de diluciones seriadas (Niu et al., 2018). Se realizaron tres ensayos independientes en el tiempo.

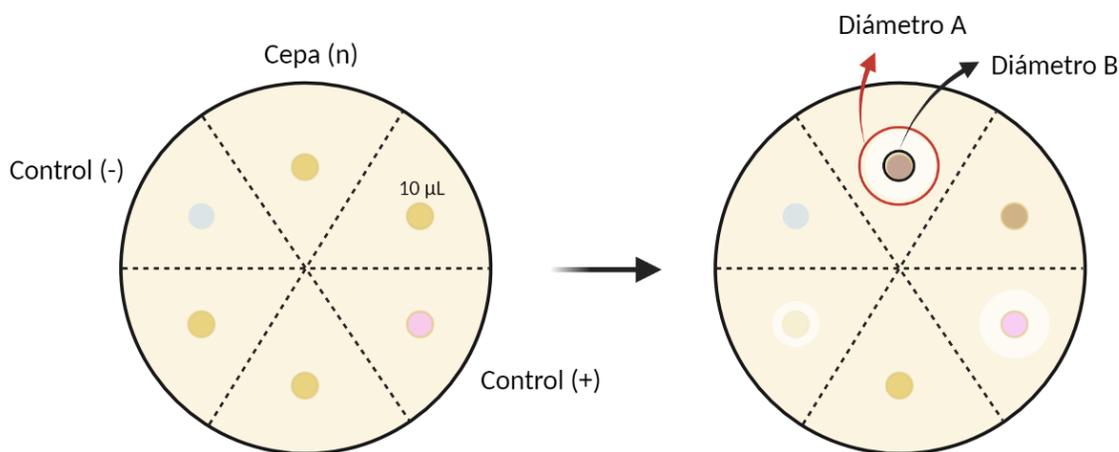
- **Medición cualitativa de solubilización y mineralización de fósforo**

La capacidad de las cepas para solubilizar fosfato se probó en medio sólido NBRIP (Nautiyal, 1999) para dos fuentes de fósforo inorgánico: fosfato de aluminio 0,3% (Gomez-Ramirez & Uribe-Velez, 2021) y fosfato tricálcico 0,5% (p/v) (Nautiyal, 1999), suplementado con azul de bromotimol (0,025 g/L). El pH del medio se ajustó a 7,0 ± 0,2 antes de esterilizar en autoclave (Nautiyal, 1999). Las placas con NBRIP se inocularon con una gota de 10 µL de la suspensión bacteriana de 24 h ajustada (1,0x10<sup>7</sup> UFC/mL) de cada cepa (ver Figura 3-3), y se incubaron durante 5 días a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se comprobó la capacidad de solubilización del fosfato mediante la presencia de un halo transparente alrededor de las colonias bacterianas (García et al., 2017). A

partir de la relación del diámetro del halo (A) y de la colonia bacteriana (B) (Ecuación 5), se estableció el Índice de Eficiencia de Solubilización ( $IE_s$ ) de la cepa como lo define Kumar y Narula (1999).

$$IE_{S,M} = \frac{A}{B} \quad (5)$$

Por otra parte, la capacidad de las cepas para mineralizar fósforo orgánico se evaluó en medio sólido NBRIP suplementado con ácido fítico (CAS 14306-25-3, Sigma-Aldrich) como fuente de fósforo, añadido al 1% (p/v) (Gomez-Ramirez & Uribe-Velez, 2021). El medio se inoculó como se mencionó anteriormente y se incubó durante 72 h a 30°C. La formación de un halo transparente alrededor de las colonias al finalizar el período de incubación, se consideró como un indicador positivo de la actividad y se procedió a calcular el Índice de Eficiencia de Mineralización de fósforo ( $IE_M$ ) con la Ecuación 5 (Gomez-Ramirez & Uribe-Velez, 2021). En todos los ensayos se utilizó la cepa *P. fluorescens* IBUN PFL095 como control positivo (Ordoñez et al., 2016) y como control negativo, solución salina al 0,85 % (p/v). La totalidad del material utilizado en los ensayos se lavó con detergente neutro libre de fosfatos antes de su uso (EXTRAN®, Merk). Cada cepa evaluada contó con 15 réplicas, y los ensayos con las fuentes de fósforo inorgánico y orgánico, se evaluaron dos veces en el tiempo.



**Figura 3-3.** Montaje experimental usado en la evaluación de la actividad de Solubilización y Mineralización de fósforo de las cepas bacterianas en medio NBRIP. Los círculos pequeños de color café, rosa y azul representan gotas de 10 µL. Cada gota fue ubicada aleatoriamente dentro de la placa. Fuente: Elaboración propia.

#### • Cuantificación de la solubilización de fósforo en medio líquido

La capacidad de solubilizar fosfato se evaluó cuantitativamente a partir de fosfato tricálcico ( $Ca_3(PO_4)_2$ ) 0,5% (p/v) y fosfato de aluminio ( $AlPO_4$ ) 0,3% (p/v), usando medio líquido NBRIP

(Nautiyal, 1999), con las modificaciones sugeridas por Gomez-Ramirez y Uribe-Velez (2021). Brevemente, se prepararon tubos tipo Falcon® de 50 mL con 15 mL de medio NBRIP y la fuente de fósforo correspondiente (pH 7,0), y se inoculó el 1% del volumen de cada tubo con una suspensión fresca de células vegetativas a la concentración aproximada de  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL. Cada cepa contó con tres réplicas. Se utilizó como control positivo la cepa *Pseudomonas* sp. PSL095 (Lara-Bosso, 2007) y como control negativo, el medio líquido NBRIP con la fuente de fósforo sin inocular. Los recipientes se llevaron a incubar a 30 °C durante 7 días con agitación constante (150 rpm), ubicándolos en posición horizontal dentro del equipo para mejorar la homogeneización del medio. Posteriormente, se centrifugó cada tubo a  $2710 \times g$  durante 30 min para obtener un sobrenadante libre de partículas y células. La cuantificación de fósforo soluble se realizó mediante el método del vanadato y heptamolibdato amónico con el kit SpectroQuant Phosphate Test® (Merck), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron en un lector de microplaca a una longitud de onda de 405 nm (Multiskan FC®, Thermo Scientific). Todo el material utilizado en los ensayos se lavó con detergente neutro libre de fosfatos antes de su uso (EXTRAN®, Merk). Las absorbancias se compararon con una curva estándar de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y los resultados se expresaron en mg  $\text{PO}_4\text{-P/mL}$ . El ensayo se realizó por duplicado.

#### • **Producción de compuestos indólicos**

La capacidad para producir compuestos indólicos se estimó mediante la técnica colorimétrica basada en el reactivo de Salkowsky (12 g/L  $\text{FeCl}_3$  en 7,9 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) acorde con Glickmann y Dessaux (1995), con modificaciones menores. Brevemente, frascos ámbar con 10 mL de caldo LB y 0,3 mM de L-triptófano se inocularon con 100  $\mu\text{L}$  de suspensión fresca de cada cepa (concentración  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL). Los frascos se incubaron por 72 h en oscuridad a 30 °C en agitación orbital constante (150 rpm). Cada tratamiento contó con tres réplicas y se utilizó como control positivo la cepa *Azospirillum brasilense* C43SN7 (Leal-Medina, 2018) y como control negativo, solución salina. Al cabo de este tiempo, las muestras se centrifugaron para eliminar la biomasa y se tomaron 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante. En tubos de microcentrífuga, el reactivo de Salkowsky se mezcló en una proporción 1:1 con el sobrenadante de cada muestra y se dejó reaccionar en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas (Multiskan FC®, Thermo Scientific). La determinación de la producción de los compuestos de tipo indol, se determinó con base en una curva estándar construida con IAA como patrón y se expresó en  $\mu\text{g IAA/mL}$ . La producción de compuestos indólicos también se evaluó bajo la condición de mayor estrés osmótico tolerado por las cepas. Para ello, se adicionó al medio líquido LB el 20% (p/v) de PEG 6000 y se procedió como se mencionó anteriormente. Los ensayos se llevaron a cabo dos veces en el tiempo.

- **Producción de exopolisacáridos (EPS)**

La producción de EPS por los aislamientos seleccionados se evaluó empleando el método descrito por Cortés-Patiño et al. (2021) con leves modificaciones. Para ello, se sirvieron 10 mL de caldo LB en matraces de vidrio, se inocularon con 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión fresca de  $1 \times 10^7$  UFC/mL de cada cepa y se incubaron a 30 °C durante 24 h con agitación orbital constante (150 rpm). Cada cepa contó con tres replicas y se empleó medio estéril con solución salina como control negativo. Después de la incubación, los cultivos se trasvasaron a tubos tipo Falcon® de 50 mL, se adicionó 0,4 mL de EDTA 0,26 M y 0,2 mL de NaCl 5M a cada tubo, se mezcló mediante vórtex y se centrifugaron a 5220 x *g* durante 10 min. En tubos nuevos de iguales características, se vertieron los sobrenadantes obtenidos y se mezclaron con 10 mL de etanol absoluto frío (-80°C), se agitaron vigorosamente y se dejaron en refrigeración (4 °C) durante 24 h para permitir la precipitación de los EPS. Posteriormente, los EPS se cosecharon mediante centrifugación a 7690 x *g* por 10 min y se resuspendieron en 10 mL de agua ultrapura. Los EPS se determinaron mediante la cuantificación de los carbohidratos totales solubles presentes en ellos utilizando el método propuesto por Dubois et al. (1951), con las modificaciones sugeridas por Moreno-Galván, Cortés-Patiño et al. (2020). Para esto, se dispensaron 290  $\mu\text{L}$  de cada muestra de EPS en un tubo tipo Falcon® de 15 mL y se adicionaron 290  $\mu\text{L}$  de Fenol al 5% (p/p) y 1410  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98% (v/v). Rápidamente, se homogeneizó mediante vórtex por 30 s y se permitió reaccionar la mezcla en oscuridad durante 30 min. Se determinó la absorbancia de las muestras a 490 nm y se comparó con una curva estándar de D-glucosa. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g/mL}$ . Así mismo, se evaluó la producción de EPS bajo estrés osmótico en caldo LB, adicionando al medio líquido el 20% (p/v) de PEG 6000 y se procedió siguiendo la metodología descrita anteriormente.

- **Compatibilidad entre las cepas en medio sólido**

La compatibilidad entre las cuatro cepas seleccionadas se probó mediante enfrentamiento directo en agar LB. El enfrentamiento se realizó trazando una línea vertical cerca al borde de la placa de agar con un asa inoculada y superponiendo dos trazados perpendicularmente en los extremos de la línea. Cada línea o trazado correspondió a una cepa y se realizó a partir de una colonia de 24 h de crecimiento en placa. Se realizaron duplicados de cada enfrentamiento y se incubaron durante 72 h, haciendo observaciones diarias con el estereoscopio. Las cepas se catalogaron como compatibles, si al cabo del período de incubación las colonias crecían mezcladas o establecían contacto, o incompatibles si se repelían creando halos de inhibición.

### 3.3.2 Ensayo de germinación bajo déficit hídrico

Se llevó a cabo un ensayo *in vitro* con el propósito de determinar el efecto de las PGPB seleccionadas sobre la germinación de semillas de maíz en condiciones de estrés osmótico inducido por PEG. Inicialmente, semillas desinfectadas superficialmente como se indicó en la sección 3.1.4, se inocularon sumergiéndolas en la suspensión celular de cada cepa ( $1,0 \times 10^7$  UFC/mL) a razón de 1 mL por semilla (Shirinbayan et al., 2019), durante 30 min con agitación orbital constante (150 rpm). Se utilizaron semillas embebidas en solución salina estéril (NaCl 0,85 % p/v) para los controles no inoculados. Una vez inoculadas las semillas, se descartó la suspensión celular y se secaron bajo flujo laminar por 20 min. Posteriormente, se colocaron cinco semillas por caja Petri® sobre papel filtro Whatman No. 1 (Tiwari et al., 2016) y se adicionaron 3 mL de una solución de PEG 6000 al 10% (p/v) en cada una para simular el déficit hídrico. El ensayo contó con dos controles sin inocular, uno sin estrés y otro sometido a estrés osmótico. Para el control sin estrés, se utilizó agua destilada estéril en lugar de la solución con PEG. Las cajas Petri se taparon y se sellaron con papel *parafilm* para evitar la pérdida de humedad por evaporación. Las semillas se incubaron en oscuridad a 25 °C durante 3 días, al final de los cuales se determinó el porcentaje de germinación para los cuatro tratamientos bacterianos y los dos controles. Las semillas se consideraron germinadas al observar la presencia de radícula de mínimo 5mm de longitud (Tiwari et al., 2016).

La concentración del estresor fue determinada a partir de ensayos previos en los que se evaluaron concentraciones de PEG 6000 en el rango de 0 al 30% (p/v) y su efecto en la germinación de la variedad de maíz ICA V109, evidenciando que concentraciones de 20% (p/v) disminuían notoriamente la germinación (hasta porcentajes de germinación del 4% al 6%) y a 30% (p/v), la inhibían completamente (Tabla suplementaria 6-2).

Las semillas control sometidas al estrés osmótico que no germinaron, se humedecieron con agua ultrapura en cajas Petri® y se incubaron por 3 días más para verificar que el efecto observado en la germinación era debido al estrés inducido por PEG y no a otras causas, como pérdida de viabilidad. Cada tratamiento contó con 10 réplicas de 5 semillas por caja para un total de 50 semillas y el ensayo se repitió tres veces en el tiempo.

### 3.3.3 Evaluación de colonización y permanencia de los aislamientos en las plantas bajo condiciones de déficit hídrico

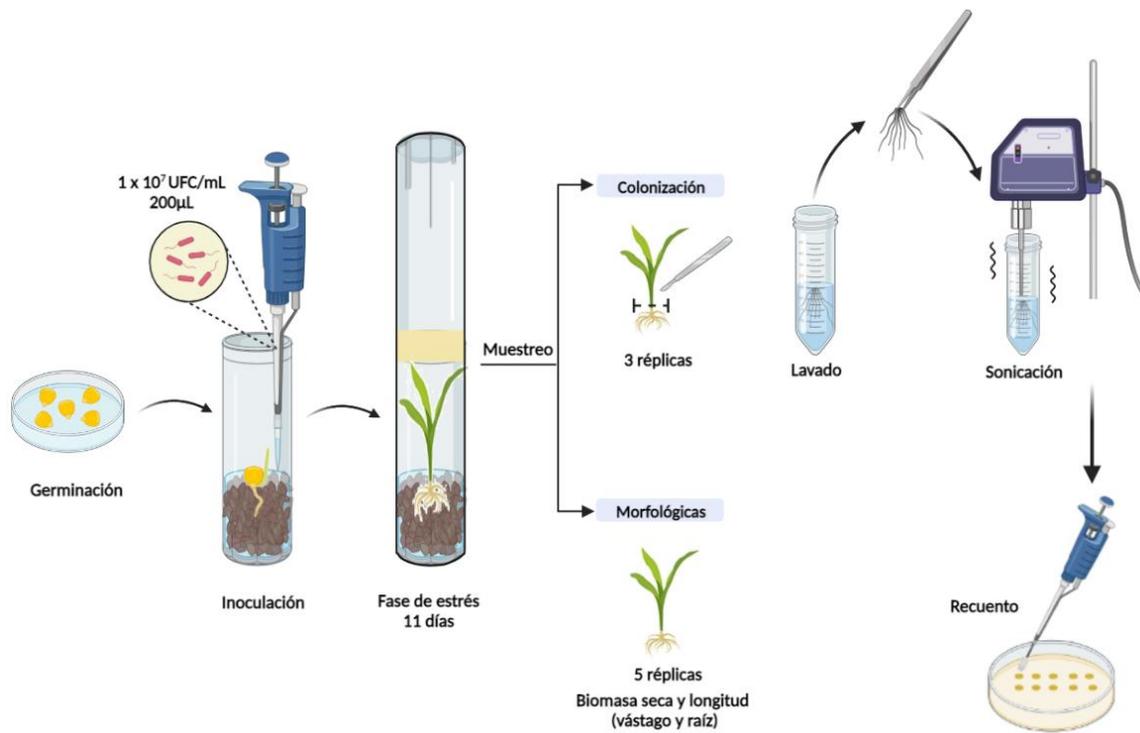
Una de las características principales de las PGPB, es su habilidad para colonizar la rizósfera y la superficie de las raíces de las plantas, condición que permite la interacción beneficiosa planta-microorganismo (Amaya-Gómez et al., 2020; Lugtenberg & Kamilova, 2009). Con el propósito de evaluar la capacidad de las cepas seleccionadas para colonizar las raíces de las plantas y

permanecer en ellas bajo condiciones de estrés hídrico, se realizó un experimento en cámara de crecimiento utilizando frascos de vidrio con plántulas de maíz en un ambiente estéril.

En consecuencia, se germinaron semillas desinfectadas superficialmente sobre agar agua durante tres días en oscuridad a 25 °C como se mencionó anteriormente en la sección 3.1.4. Seguidamente, se seleccionaron semillas germinadas con similar longitud de raíz primaria y desarrollo, y se introdujeron en frascos de vidrio de 15 cm de longitud y 4 cm de diámetro. Cada frasco, contenía 80 g gravilla estéril y 20 mL de una solución Hoagland al 50% (v/v) suplementada con PEG 6000 al 20% (p/v), para proporcionar nutrientes a las plantas y simular el estrés por déficit hídrico (Nayyar & Gupta, 2006). Se contó con cuatro tratamientos correspondientes a las cepas PSL80, PSL63, XT14 y XT17 y dos controles sin inocular, uno de ellos con la solución del estresor (PEG), y el control en condiciones óptimas, sólo con solución de Hoagland al 50% (v/v). Adicionalmente, en ensayos anteriores se probó la sensibilidad de las bacterias a varios antibióticos, encontrándose que las cuatro cepas eran capaces de crecer en medio LB suplementado con 10 µg/mL ampicilina sin que se afectara su población (datos no mostrados).

Los frascos se inocularon con 200 µL de una suspensión celular ajustada a  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL de la cepa correspondiente, directamente en el medio de soporte a distancia de la semilla. Cada tratamiento contó con 8 réplicas. Los frascos fueron sellados con otro frasco de vidrio de iguales características a modo de tapa y llevados a la cámara de crecimiento Sanyo® donde se ubicaron aleatoriamente. Las plantas crecieron en la cámara con la programación del equipo: fotoperíodo luz/oscuridad de 12 h/12 h, temperatura promedio día/noche de 30 °C/28 °C y humedad relativa del 60%. Las plantas fueron sometidas a las condiciones de estrés hídrico durante 11 días, tras los cuales se buscó recuperar las células presentes en las raíces. Transcurrido el período de estrés, cinco plantas por tratamiento fueron seleccionadas para determinar la longitud y biomasa seca del tallo y raíces, y tres plantas, para cuantificar las UFC en la rizósfera.

La altura y biomasa seca se determinaron de igual forma que en los ensayos de invernadero (sección 3.1.4). Para recuperar las células bacterianas presentes en las raíces, las plantas se retiraron de los frascos en condiciones estériles y con escalpelo, se separaron las raíces de la parte aérea. A continuación, las raíces se sumergieron brevemente en un tubo con agua destilada estéril, para remover las células bacterianas que no se encontraran firmemente adheridas a ellas. Después, las raíces se colocaron en un tubo nuevo tipo Falcon® con 20 mL de agua destilada estéril y se sonicaron con un disruptor ultrasónico (Sonics Vibra Cell VC-130®). El equipo se ajustó a una amplitud de onda del 30% y se aplicaron 10 pulsos de 1 s con una pausa de 1 s entre sí (Allard-Massicotte et al., 2016). Las células presentes en la fase líquida al final del proceso, se determinaron por conteo de diluciones seriadas en placas de LB con ampicilina (10 µg/mL) desde  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ . Los resultados se expresaron en UFC/g de raíz seca. El ensayo se repitió dos veces en el tiempo. En la Figura 3-4 se resume la metodología aplicada.



**Figura 3-4.** Metodología para la evaluación de colonización y permanencia de las PGPB en las raíces de la planta en condiciones simuladas (PEG 6000) de estrés por déficit hídrico. Fuente: Elaboración propia.

### 3.3.4 Análisis estadístico de datos

Los valores presentados corresponden a las medias de los datos y sus DE. Todos los ensayos *in vitro* contaron con una distribución completamente aleatorizada al interior de los equipos y se realizaron, dos o más repeticiones en el tiempo. Los datos determinados en el ensayo de colonización, fueron transformados logarítmicamente ( $\text{Log}_{10}$ ) previo a su análisis estadístico. La comparación de varianzas se realizó mediante ANOVA de una vía, garantizando los supuestos de normalidad y homocedasticidad a través de las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. La comparación de medias se realizó a través de la prueba de rango múltiple de Duncan en la mayoría de los casos, a menos que se indique algo diferente. Para los datos que no presentaron un comportamiento paramétrico, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con ajuste de Bonferroni del paquete Agricolae del software estadístico R. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de  $p \leq 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software R versión 4.0.5

## 4. Resultados y Discusión

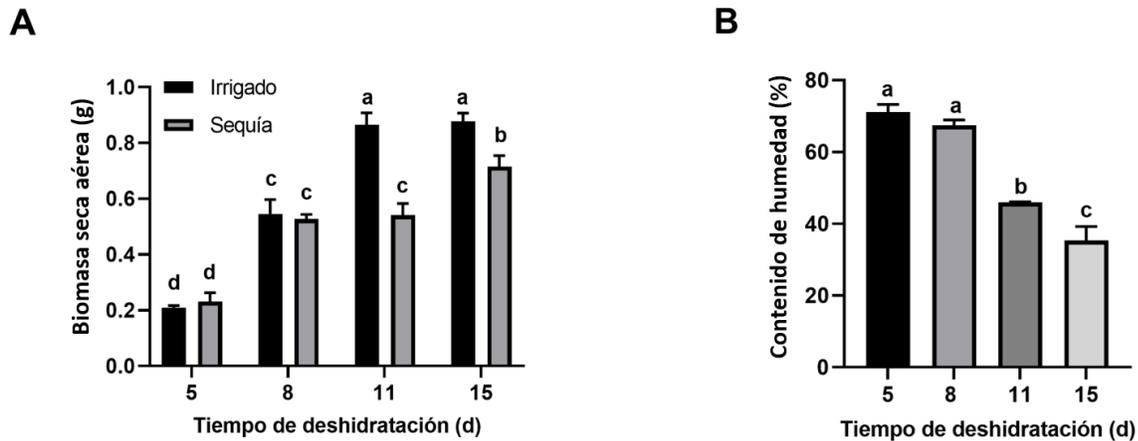
### 4.1 Objetivo 1

#### 4.1.1 El modelo de estrés por sequía en maíz forrajero

Un modelo para la evaluación del estrés por sequía o déficit hídrico para ensayos en materas fue diseñado. En dicho modelo, se monitorearon los cambios de biomasa seca aérea de plantas de maíz ICA V109 y del contenido de humedad del suelo de las materas, durante una condición de estrés por deshidratación libre. La sequía impuesta a través del cese del riego durante 15 días, condujo a cambios visibles en las plantas como la pérdida de turgencia y aparición de hojas enrolladas y secas. También, al finalizar el experimento (35 días PS), algunas de ellas sólo alcanzaron a desarrollar tres hojas a diferencia de las plantas irrigadas que contaban en promedio con cuatro y cinco hojas (datos no mostrados), por lo que se infiere que el estrés afectó negativamente el desarrollo de las plantas. Respecto a la biomasa, se observó una caída significativa ( $p < 0,05$ ) en la ganancia de peso seco aéreo a partir del onceavo día del estrés, donde se alcanzaron reducciones del 37% y 19% respecto al control irrigado en los días 11 y 15, respectivamente (Figura 4-1, A). Esto guardó relación con la pérdida de humedad del suelo, en el cual hubo una reducción considerable ( $p < 0,05$ ) del contenido inicial de agua, llegando a valores cercanos del 46% y 35% de la capacidad de campo en los dos últimos días de la fase de estrés (Figura 4-1, B).

Los cambios observados en las plantas durante el ensayo, son manifestaciones típicas del estrés por déficit hídrico. La deshidratación, conlleva a la pérdida de presión de turgencia y posterior disminución en la división, diferenciación y elongación celular (Farooq et al., 2009). Igualmente, ante la sequía, las plantas pueden priorizar el suministro de agua hacia ciertos órganos removilizando el agua desde las hojas viejas hacia las más jóvenes (Ge et al., 2012). Estos cambios, conducen al marchitamiento, la senescencia temprana de las hojas, y limitan la acumulación de biomasa y el desarrollo aéreo de las plantas (Aslam et al., 2015; Ge et al., 2012). Por otro lado, el enrollamiento de las hojas, es un mecanismo de adaptación de la planta que le permite disminuir la pérdida de agua por transpiración (De Micco & Aronne, 2012) y evitar el calentamiento excesivo de las hojas al disminuir el área foliar que intercepta la energía luminosa (Lopes et al., 2011; Zeiger & Taiz, 2007). Estas señales de estrés hídrico, han sido anteriormente descritas en el maíz en las etapas de establecimiento y desarrollo vegetativo en diferentes modelos donde fue inducido el estrés por sequía (Xin et al., 2018; Aslam et al., 2015; Avramova et al., 2015, 2016).

Dado que los cambios a nivel de biomasa aérea y humedad del suelo tienen relevancia estadística a partir del día 11 de la fase de estrés (Figura 4-1), se consideró apropiado establecer este período de tiempo y condiciones ambientales de control para evaluar el efecto de la sequía en los ensayos siguientes.



**Figura 4-1.** Parámetros cuantificados en el ajuste del modelo de estrés por sequía en maíz forrajero. (A) Biomasa seca aérea (g) de las plantas en condición óptima y de estrés. (B) Contenido de humedad (%) del suelo en las materas sin riego respecto a la condición irrigada. Los valores presentados, corresponden a la media de 5 réplicas  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos con prueba de comparación múltiple de Duncan ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2 Efecto de la inoculación de PGPB en la mitigación del estrés por sequía en maíz en condiciones de invernadero

Con el objeto de conocer el potencial protector de diez cepas bacterianas nativas de suelos colombianos, sobre la respuesta al estrés por sequía de una variedad de maíz cultivada en el Cesar, se realizaron dos ensayos a nivel de invernadero en plantas inoculadas induciendo la condición de estrés hídrico determinado en el modelo de estrés por sequía descrito en la sección anterior.

Como se mencionó en la sección 3.1.4, un primer ensayo incluyó el grupo 1 de las cepas MT1C8, XT14, 2755, PSL80 y PSL63, mientras que, en el segundo se evaluaron las cepas del grupo 2, MGC9, XT13, XT17, XT38 y XT110. Cada grupo contó con sus correspondientes controles sin inoculación de irrigación y sequía.

Los resultados y su análisis se presentarán en dos secciones. En la primera sección, se buscará caracterizar la respuesta de la planta de maíz ICA V109 (sin inocular) al estrés hídrico impuesto y en la segunda sección, evaluar el efecto de las cepas bacterianas sobre dicha respuesta.

- **Respuesta del maíz ICA V109 al estrés por déficit hídrico**

El estrés por sequía es un fenómeno complejo que afecta a las plantas en todos los niveles y cuyo impacto está condicionado por la severidad y duración del estrés, así como por la sensibilidad de la planta y la fase de desarrollo en la que se encuentra (Zarei, 2022; Anjum, Ashraf, Zohaib, et al.,

2017). En este estudio, el déficit hídrico condujo a cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos notables en el maíz; en las plantas no inoculadas (controles de sequía grupo 1 y 2), el crecimiento aéreo se vio afectado negativamente al igual que el contenido relativo hídrico de las hojas (RWC), generándose una acumulación menor de biomasa seca aérea y RWC hasta del 23,8% y 4,6% respectivamente, en comparación con las plantas del grupo control irrigado (Tabla 4-1). Por otra parte, el estrés hídrico estimuló considerablemente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento del sistema radical hasta un 75,9% respecto al control irrigado. En cuanto a la longitud de la parte aérea, el estrés no afectó significativamente su elongación (grupo 1,  $p = 0,12$  y grupo 2,  $p = 0,72$ ).

A nivel bioquímico, el déficit hídrico conllevó a la acumulación de prolina y azúcares solubles en los tejidos foliares de las plantas de maíz (Tabla 4-1), lográndose incrementos significativos ( $p < 0,05$ ) hasta de un 48,0% y 74,0% respectivamente, frente a plantas en condiciones de riego normal. De igual manera, incrementó la concentración de los carotenoides (Car) en un rango de 18,4% a 22,0% ( $p < 0,05$ ) y llegó a duplicar la actividad de la enzima Glutación Reductasa (GR). A nivel de clorofilas, un aumento leve de clorofila b (Chlb) fue evidenciado. No se observaron cambios relevantes (grupo 1,  $p = 0,13$  y grupo 2,  $p = 0,89$ ) a nivel de la actividad enzimática de APX (Ascorbato Peroxidasa).

El déficit hídrico disminuye la humedad del tejido foliar, por lo que el RWC se considera una variable fisiológica esencial para monitorear el estado hídrico de la planta y permite establecer una relación con la severidad de la sequía (Aslam et al., 2015; Anjum et al., 2011). Los resultados en ambos grupos mostraron una disminución del RWC inferior al 5% con respecto a las plantas irrigadas, que de acuerdo con Hsiao (1973), el estrés experimentado por las plantas podría catalogarse como leve (pérdida máxima del 10% frente al control), mientras que otros autores, por ejemplo Laxa et al. (2019), consideran el mismo nivel de estrés (leve) a partir de una disminución del 20%. Si bien el RWC parece indicar un estrés leve o incluso, carencia de este, cambios significativos ( $p < 0,05$ ) fueron observados en varios de los parámetros de respuesta al estrés evaluados en la planta (Tabla 4-1).

Una posible causa de esta ambigüedad, la expone Hsiao (1973), quien destacó que el RWC tiende a perder sensibilidad al describir el grado de deshidratación del tejido foliar cuando no se trata de déficits severos. Esta limitación se atribuye al hecho de que, en tejidos casi saturados, incluso cambios leves en el contenido de agua pueden afectar notablemente el potencial hídrico ( $\Psi$ ) de la planta, mientras que dichos cambios se traducen en sólo variaciones de unos pocos puntos porcentuales en el RWC. Adicionalmente, Aroca (2012) señala que la elección de la metodología para medir el RWC puede llevar a sobreestimar la pérdida de turgencia en las hojas, como ocurre en el caso de los métodos de flotación e inmersión de las muestras. Por ende, los valores de RWC descritos en varios estudios de sequía podrían indicar niveles de estrés más severos que los percibidos verdaderamente por las plantas. Dada la utilización de un método distinto para estimar el RWC en el presente trabajo, existe la posibilidad de que, en investigaciones con condiciones de estrés similares se reporten pérdidas de RWC superiores a las aquí observadas.

**Tabla 4-1.** Respuesta de plantas de maíz ICA V109 sin inocular después de 11 días de sequía, a nivel de invernadero.

Tratamientos	Long.10 (cm)	Long.31 (cm)	BA (g)	BR (g)	RWC (%)	Pro (µg/g PF)	Azúc. (mg D-Glu/g PF)	Chla (µg/g PF)	Chlb (µg/g PF)	Car (µg/g PF)	APX (nmol/ min·g PF)	GR (nmol/ min·g PF)
<i>Grupo 1</i>												
Irrigado	30,30 ± 5,0	45,30 ± 6,5	0,34 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,0 <sup>b</sup>	98,60 ± 1,2 <sup>a</sup>	66,36 ± 9,2 <sup>b</sup>	23,89 ± 2,1 <sup>b</sup>	295,94 ± 22,1	416,40 ± 26,6	121,40 ± 11,0 <sub>b</sub>	3,69 ± 1,0	0,36 ± 0,1 <sup>b</sup>
Sequía	31,70 ± 5,4	49,50 ± 7,4	0,29 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,1 <sup>a</sup>	94,10 ± 2,4 <sup>b</sup>	98,45 ± 7,9 <sup>a</sup>	30,56 ± 1,2 <sup>a</sup>	257,56 ± 35,6	447,60 ± 22,3	143,70 ± 1,3 <sup>a</sup>	4,79 ± 0,0	0,75 ± 0,3 <sup>a</sup>
<i>Grupo 2</i>												
Irrigado	19,70 ± 2,0	43,00 ± 4,8	0,43 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,1 <sup>b</sup>	95,65 ± 0,6 <sup>a</sup>	104,35 ± 4,7 <sup>b</sup>	8,67 ± 2,9 <sub>b</sub>	784,66 ± 137,5 <sub>b</sub>	280,70 ± 36,8	140,97 ± 25,5 <sup>b</sup>	10,79 ± 3,6	0,93 ± 0,3 <sup>b</sup>
Sequía	17,90 ± 2,2	43,70 ± 5,5	0,33 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,1 <sup>a</sup>	91,91 ± 3,4 <sup>b</sup>	141,19 ± 35,9 <sup>a</sup>	15,08 ± 1,8 <sup>a</sup>	973,62 ± 122,8 <sub>a</sub>	333,80 ± 40,1	172,00 ± 14,7 <sup>a</sup>	9,99 ± 3,5	1,51 ± 0,3 <sup>a</sup>

Los datos corresponden a la media de un n de 15 (longitudes), 10 (biomasas) o 5 (RWC y bioquímicas) ± DE. En las columnas, letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes a  $p < 0,05$ . Long.10: Longitud aérea a los 10 días PS; Long.31: Longitud aérea a los 31 días PS; BA: Biomasa seca aérea; BR: Biomasa seca raíces; RWC: Contenido Relativo hídrico; Pro: Prolina; Azúc: Azúcares Totales Solubles; Chla: Clorofila a; Chlb: Clorofila b; Car: Carotenoides; APX: Actividad enzimática de Ascorbato Peroxidasa; GR: Actividad enzimática de Glutación Reductasa; PF: Peso Fresco; D-Glu: D-glucosa.

En este sentido, con el propósito de evitar este tipo de inconsistencias, se sugiere que en futuras investigaciones se incluya la medición de variables adicionales que proporcionen información complementaria sobre el estado hídrico y el nivel de estrés experimentado por las plantas, tales como el potencial hídrico foliar y la biomasa fresca del tallo.

Por otra parte, al evaluar el contenido de agua del suelo en las materas de las plantas control al final del período de deshidratación (día 11), se evidenció que descendió aproximadamente hasta un valor promedio del  $44 \pm 3\%$  de la capacidad de campo (CC). Este valor de humedad del suelo se podría relacionar con un nivel moderado de estrés por sequía, al ser cercano al rango de 45% al 50% de CC propuesto en trabajos anteriores (Fang et al., 2017; Ma et al., 2014; Sánchez-Rodríguez et al., 2010). En consecuencia, el alto RWC sostenido por las plantas de maíz en este estudio (pérdidas  $\sim 5\%$  respecto al control) a pesar de encontrarse bajo disponibilidad limitada de humedad del suelo tras 11 días sin riego (44% de la CC), podría indicar que la variedad de maíz utilizada posee mecanismos intrínsecos de regulación o compensación del estado hídrico, que le confieren un grado de resistencia al estrés por sequía. Situación similar observaron Kränzlein et al. (2021), donde dos híbridos de maíz (L2 y KW) con diferentes mecanismos de resistencia a la sequía, después de 16 días de estrés y con una CC final alrededor del 50%, lograron mantener las pérdidas del RWC tan sólo entre el 6,8 y 9,7% respecto a las plantas control irrigadas.

Estudios en otras especies vegetales también han reportado resultados afines. Por ejemplo, Hossain et al. (2015) llevaron a cabo una evaluación en dos genotipos de plantas de soya, observando que el descenso del RWC y del potencial hídrico de las hojas fue marcadamente más lento en el genotipo tolerante a la sequía que en el susceptible, durante 7 días sin riego. De igual forma, Ogbaga et al. (2014) informaron que el cultivar de sorgo Samsorg 17, caracterizado por su tolerancia a la sequía, mantuvo varios de los parámetros fisiológicos monitoreados, incluido el RWC, sin cambios significativos hasta 10 días en condiciones drásticas de estrés (20% - 30% de CC). Así mismo, MacAlister et al. (2020), encontraron que la capacidad de un tipo de arbusto (*Aspalathus linearis*) para mantener el RWC sin cambios relevantes bajo sequía (30% de CC) durante 5 días, estaba vinculada con su tolerancia al déficit hídrico.

La disminución de acumulación de biomasa aérea en las plantas tras un período de déficit hídrico es un cambio esperado como consecuencia de múltiples factores que tienen lugar durante el estrés, entre ellos, la caída del potencial hídrico y la presión de turgencia de las células, así como del cierre estomático que limita la adsorción  $\text{CO}_2$  y la producción de asimilados (Farooq et al., 2009; Hsiao & Xu, 2000). Este efecto en la biomasa, se ha observado en estudios anteriores en diferentes especies de plantas, como por ejemplo, maíz (Moreno-Galván, Romero-Perdomo, et al., 2020; Shirinbayan et al., 2019), sorgo (Carlson et al., 2020), tomate (Riva et al., 2021), pasto (Cortés-Patiño et al., 2021), arveja (Saikia et al., 2018) y arroz (Singh et al., 2020). Aunado a lo anterior, muchas especies de plantas, incluido el maíz, responden al déficit de agua redirigiendo los asimilados de los órganos aéreos hacia la raíz para favorecer su crecimiento bajo el suelo (Hsiao & Xu, 2000; Maazou et al., 2016).

El crecimiento radical es una estrategia típica de evitación del estrés hídrico, que hace parte de los mecanismos de resistencia a la sequía pero que puede afectar la acumulación de materia seca aérea (Hsiao & Xu, 2000). Este fenómeno, fue posible evidenciarlo en la variedad de maíz estudiada, en la cual se incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) la biomasa seca radical bajo estrés hídrico, mientras se restringió la ganancia de biomasa aérea. El robustecimiento del sistema radical permite a las plantas incrementar su habilidad para hacer frente al estrés por sequía (Sah et al., 2020), puesto que raíces más profundas, densas y numerosas facilitan el acceso a diferentes perfiles del suelo en busca de agua y nutrientes (Comas et al., 2013; Farooq et al., 2009; Ilyas et al., 2021). Razón por la cual, algunos autores consideran el crecimiento de las raíces un atributo morfológico prometedor para la selección y mejoramiento de cultivos adaptados a la sequía (Yan Fang et al., 2017; Lopes et al., 2011).

Cuando la humedad del suelo disminuye por la sequía, las plantas deben reducir aún más su potencial hídrico para continuar absorbiendo agua. Para ello, se valen del mecanismo más eficiente en la reducción del potencial hídrico, conocido como ajuste osmótico (Farooq et al., 2009; Taiz & Zeiger, 2003). En las plantas de maíz, la prolina y los azúcares (especialmente, glucosa, sacarosa, fructosa y trehalosa) son dos de los principales tipos de solutos compatibles u osmolitos que participan en el ajuste osmótico (Aslam et al., 2015; Velázquez-Márquez et al., 2015). En el presente estudio, en las plantas estresadas se observó un incremento significativo de la concentración de prolina y azúcares solubles a nivel foliar en comparación con las plantas irrigadas (Tabla 4-1). Estos resultados coinciden con los hallazgos de Sun et al. (2016) en plantas de maíz, sometidas a ciclos de sequía de siete días de duración en condiciones de invernadero, así como lo informado por Kour, Rana, Sheikh, et al. (2020) en plantas de trigo bajo dos niveles deficientes de agua, al 70% y 50% de la capacidad de campo. Esta respuesta, ha sido considerada una estrategia adaptativa que confiere tolerancia a la sequía debido a su papel crucial en el mantenimiento de la turgencia de las células vegetales, lo cual contribuye al crecimiento y la supervivencia de las plantas (Ilyas et al., 2021; Takahashi et al., 2020). En consecuencia, la acumulación aumentada de prolina y azúcares observada en este trabajo, es probablemente una de las razones por las cuales la elongación del tallo de las plantas de maíz no se vio afectada y las raíces pudieron continuar creciendo a través del suelo seco (Mejri et al., 2016; Fang & Xiong, 2015).

Durante la sequía, la abundancia de especies reactivas de oxígeno (ROS) tiende a aumentar en los tejidos de las plantas, al igual que los componentes del sistema antioxidante (Lopes et al., 2011). En este estudio, se midió la actividad de dos enzimas pertenecientes al ciclo ascorbato-glutatión (AsA-GSH) con importancia en el restablecimiento de la homeostasis redox celular y la reducción del daño oxidativo, las enzimas APX (Ascorbato Peroxidasa) y GR (Glutatión Reductasa) (Noctor & Foyer, 1998). De ellas, se encontró que la enzima GR responde al estado hídrico de la planta, viéndose aumentada su actividad en las plantas sometidas al déficit hídrico (Tabla 4-1). Esta enzima, permite reestablecer las reservas de glutatión (GSH), un metabolito esencial con múltiples roles en el metabolismo primario, la señalización celular y en especial, en la defensa del estrés oxidativo en las plantas, al reciclar la molécula de glutatión oxidado (GSSG) acopladamente a NADPH (Noctor et al., 2012). De esta forma, la enzima GR ayuda a sostener el funcionamiento de

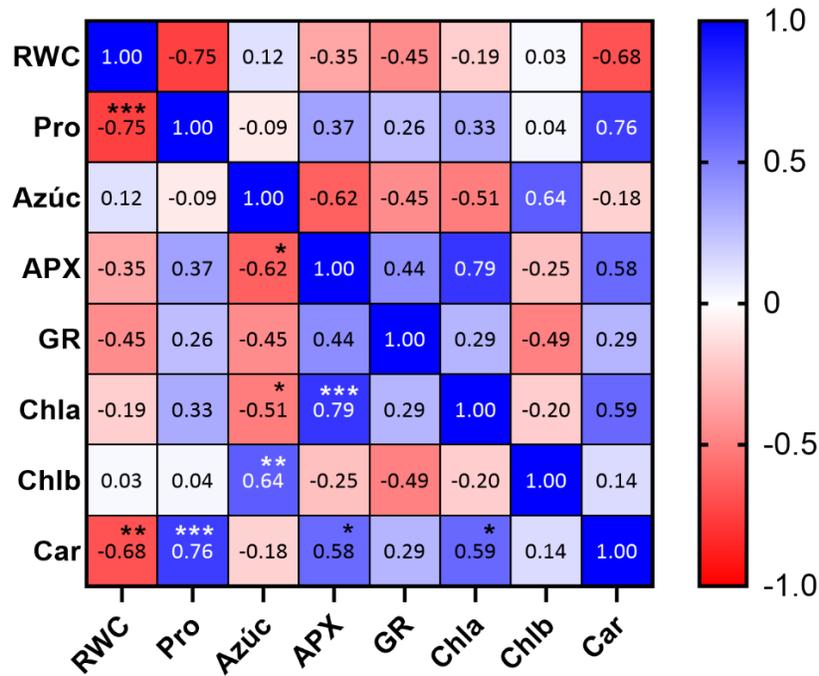
enzimas detoxificantes e implicadas en rutas de detoxificación dependientes de GSH (p.ej. Glutación Peroxidasa –*GPX*, dehidroascorbato reductasa –*DHAR* y Glutación S-transferasa –*GST*), así como los niveles de GSH, que por sí mismo actúa como una molécula depuradora de ROS (Gill et al., 2013; Hasanuzzaman et al., 2020).

A nivel de pigmentos fotosintéticos, no se observó un patrón claro en los cambios de las concentraciones de clorofilas en ambos ensayos, pero sí se hallaron diferencias en los carotenoides (Tabla 4-1). Las clorofilas a y b presentaron concentraciones promedio similares en las plantas irrigadas y estresadas sin llegar a diferenciarse estadísticamente (excepto en Grupo 2 Chla, Tabla 4-1). Estos hallazgos sugieren que el estrés por sequía leve puede no afectar de manera significativa el aparato fotosintético (Batoool et al., 2020). Por otro lado, la capacidad de algunas plantas de mantener sus niveles de clorofila durante períodos de restricción de agua, podría reflejar la preservación de la actividad fotosintética y la habilidad de captar la luz (Rolando et al., 2015), lo cual ha sido asociado con la tolerancia al estrés en cereales como el sorgo (Borrell et al., 2000) y maíz (Avramova et al., 2015). En el caso de los carotenoides, estos pigmentos accesorios constituyen otra clase importante de moléculas antioxidantes y fotoprotectoras, conocidas por su papel en la eliminación de radicales libres nocivos y la disipación del exceso de energía en forma de calor (Sharma et al., 2012), que ayudan en la protección de proteínas constitutivas de los complejos cosechadores o recolectores de luz (LHC, por sus siglas en inglés) y la estabilidad de la membrana de los tilacoides (Hasanuzzaman et al., 2020).

Adicionalmente, para comprender la relación entre las variables empleadas en la evaluación de la respuesta al estrés por sequía en maíz, se realizó un análisis de correlación mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ ) utilizando el Software R (Figura 4-2). Los resultados mostraron una correlación negativa significativa entre el parámetro de RWC y el contenido de prolina ( $\rho = -0,75, p < 0,001$ ) y carotenoides ( $\rho = -0,68, p < 0,01$ ), así como una correlación negativa leve con la actividad enzimática de GR ( $\rho = -0,45$ ) y APX ( $\rho = -0,35$ ). Estos hallazgos ponen en evidencia que en el maíz ICA V109, entre los osmolitos evaluados, la prolina desempeña un papel fundamental en el ajuste osmótico del tejido foliar y su incremento en la planta está ligado a la deshidratación, resultado en concordancia con lo reportado por Nio et al. (2011) en trigo, Ogbaga et al. (2014) en sorgo y Vardharajula et al. (2011) en maíz. También, se observa que el estrés hídrico desencadena la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática, principalmente a través de GR y los carotenoides, respectivamente, siendo más fuerte la respuesta a nivel de pigmentos accesorios en este punto de la fase de estrés.

Asimismo, se presentó una correlación directa entre la enzima APX, la clorofila a ( $\rho = 0,79, p < 0,001$ ) y los carotenoides ( $\rho = 0,58, p < 0,05$ ). Lo anterior, podría sugerir que el aumento de la actividad de APX y los niveles de carotenoides favorecen la presencia del pigmento fotosintético en las hojas. APX, es una enzima abundante en varios compartimientos celulares, tales como los cloroplastos, y cuya función es transformar el  $H_2O_2$  en agua utilizando ascorbato (ASC) (Caverzan et al., 2012). Mientras que los carotenoides, son pigmentos constitutivos de los complejos recolectores de luz (LHC) presentes en la membrana de los tilacoides, que también actúan eliminando ROS (principalmente, el oxígeno singlete  $^1O_2$ ) y disipando la energía de la clorofila triplete en los LHC

(Hasanuzzaman et al., 2020; Smirnov, 2005). La ubicación de los carotenoides y de la APX en los tilacoides, les permite neutralizar las ROS resultantes del desbalance entre la captación de luz y la cadena de transferencia de electrones del fotosistema en el sitio donde se producen. Dado que el estrés por déficit hídrico incrementa la generación de ROS en los cloroplastos (Miller et al., 2010), tiene sentido que estas dos variables estén correlacionadas positivamente ( $\rho = 0,58$ ,  $p < 0,05$ ), lo que podría señalar el papel de APX y los carotenoides en la protección de la integridad de los componentes de los fotosistemas (p.ej. Chla) y, en consecuencia, de la fotosíntesis.



**Figura 4-2.** Mapa de calor de correlación entre parámetros de respuesta para los controles irrigados y de sequía en los ensayos de invernadero. La matriz se construyó a partir del cálculo del coeficiente de correlación de Spearman. El esquema de color muestra en azul la correlación máxima positiva (+1) y en rojo, el valor máximo negativo (-1). Los (\*) indican correlaciones significativas: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . Contenido Relativo Hídrico (RWC), Prolina (PRO), Azúcares Totales Solubles (Azúc), Clorofila a (Chla), Clorofila b (Chlb), Carotenoides (Car), Ascorbato Peroxidasa (APX) y Glutatión Reductasa (GR).

Por otra parte, se encontró una relación negativa entre los azúcares solubles y la actividad enzimática (GR y APX), siendo significativa con la APX ( $\rho = -0,62$ ,  $p < 0,01$ ) (Figura 4-2). Lo anterior, podría explicarse mediante las siguientes hipótesis: 1) La relación inversa entre los azúcares y las enzimas sugiere que la acumulación de carbohidratos puede ocurrir cuando la actividad enzimática antioxidante mediada por APX y GR disminuye o se agota. Esto implica que, frente al estrés oxidativo causado por el déficit hídrico, la línea de defensa inmediata es enzimática (Farooq et al., 2009) y que posteriormente, se activa la acumulación de azúcares, un proceso que necesita mayor tiempo para actuar, como lo menciona Velázquez-Márquez et al. (2015), quienes registraron el aumento de azúcares solubles después de 24 h del inicio del estrés hídrico en plantas de maíz. Ante

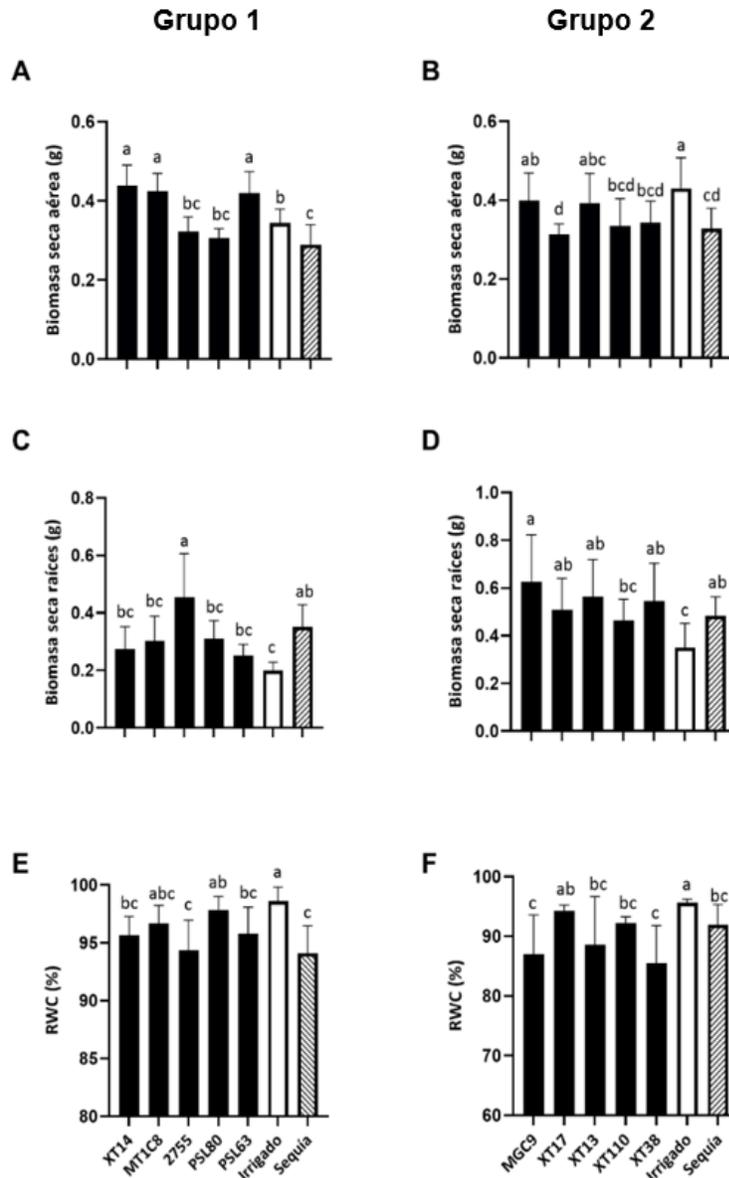
la sobreproducción de ROS debido al estrés abiótico, es posible que sean neutralizadas rápidamente mediante antioxidantes enzimáticos ya presentes en la célula, y que, las reservas energéticas de la planta sean utilizadas controladamente para garantizar la supervivencia mientras se reestablecen las condiciones favorables, en lugar de emplearse en el ajuste osmótico, función que, en este caso, podría estar siendo cubierta inicialmente por la prolina, tal como lo menciona Tiwari et al. (2017) al hallar picos de prolina a las 3 h en plantas de arroz en sequía. 2) Por otro lado, podría indicar que los azúcares solubles presentes en la planta también actúan en la protección y eliminación de ROS durante el estrés, aminorando así el daño celular y la acumulación de radicales libres (Ogbaga et al., 2014), por lo que, al disminuir el daño oxidativo se atenuaría la respuesta enzimática antioxidante.

En resumen, el déficit hídrico incrementó la respuesta antioxidante del maíz, medida en actividad enzimática de GR y concentración de carotenoides, así como la acumulación de solutos compatibles (prolina y azúcares solubles) y la formación de raíces, mientras que afectó el crecimiento aéreo (biomasa seca aérea), respecto a las plantas irrigadas. Este patrón de respuestas coincide con lo evidenciado por Anjum et al. (2017), quienes, al comparar tres híbridos de maíz con diferentes niveles de sensibilidad al estrés por sequía, el híbrido más tolerante presentó una fuerte respuesta en los mecanismos antioxidantes y de acumulación de osmolitos, con una disminución atenuada de la biomasa (-13,45% biomasa seca total). Del mismo modo, Silva et al. (2016) encontraron en plantas jóvenes de palma de aceite, que la activación simultánea de estrategias antioxidantes de eliminación de ROS y disipación excesiva de energía (carotenoides), estaban relacionadas con la tolerancia a la sequía. En este sentido, los cambios morfológicos y bioquímicos observados en la variedad de maíz (ICA V109) bajo las condiciones del estudio, se asocian con estrategias de evitación (crecimiento de las raíces y sostenimiento del estado hídrico del tejido) y tolerancia (ajuste osmótico y actividad antioxidante) a condiciones deficientes de riego, siendo de especial relevancia el aumento de prolina y carotenoides, lo que sugiere algún grado de adaptación a la sequía.

Adicionalmente, se resalta que las discrepancias observadas en la magnitud de la respuesta al déficit hídrico entre los controles de ambos grupos, pueden deberse principalmente al efecto de las variaciones ambientales del invernadero. Aunque los experimentos se llevaron a cabo en el mismo lugar y se conservó la configuración de los parámetros de humedad relativa, temperatura y fotoperíodo, las condiciones ambientales externas pudieron influir en la respuesta de las plantas. Por ejemplo, las paredes y techo de cristal del invernadero permitían el paso de luz del sol hacia las plantas, que, aunada a la luz proporcionada por las lámparas artificiales, fluctuaba la cantidad de luz recibida por las plantas cada día. De igual forma, durante los ensayos, en Bogotá se presentaron días con temperaturas ambientales nocturnas por debajo de los 6°C (Secretaría Distrital de Ambiente, 2021a, 2021b), lo que probablemente afectó la regulación de esta variable al interior del invernadero.

• **Efecto de la inoculación de las cepas bacterianas sobre la respuesta del maíz al estrés por sequía**

En condiciones de déficit hídrico, los tratamientos bacterianos XT14, MT1C8, PSL63 y MGC9 mejoraron la acumulación de biomasa seca aérea de las plantas hasta en un 51,3% (Figura 4-3) en comparación con el control estresado. Incluso, los tratamientos XT14, MT1C8 y PSL63 incrementaron la biomasa seca aérea significativamente ( $p < 0,05$ ) en contraste con el control irrigado en un 27,4%, 23,4% y 22,0%, respectivamente.

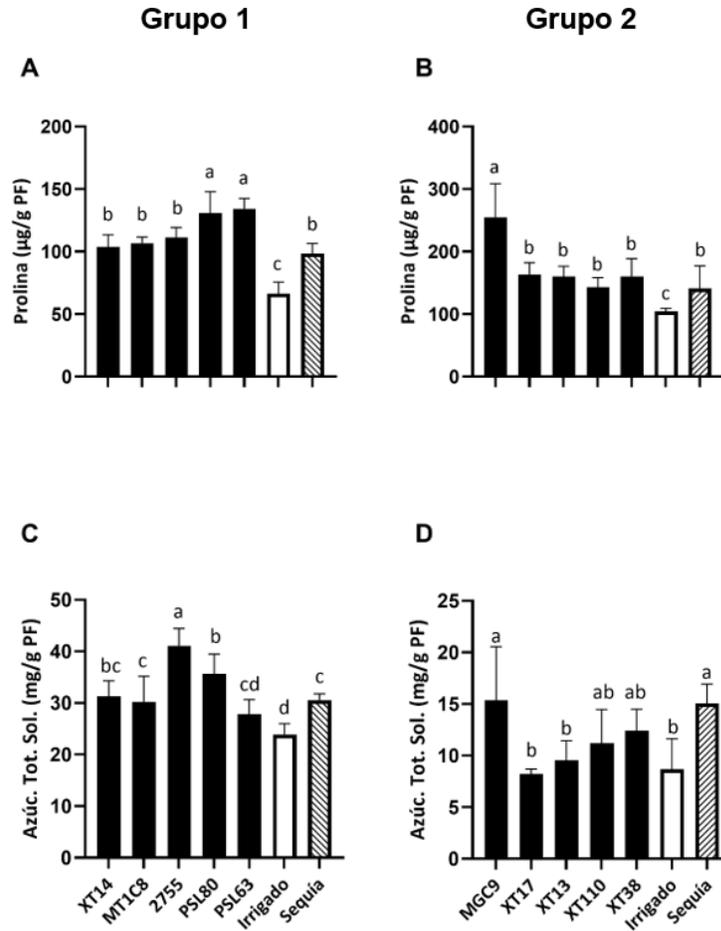


**Figura 4-3.** Respuesta morfo-fisiológica en plantas de maíz al estrés por sequía y la inoculación de PGPB a nivel de la biomasa seca aérea (A y B), biomasa seca radical (C y D) y el RWC (E y F) después de 11 días de déficit hídrico. Las barras representan la media de 10 (A, B, C y D) o 5 (E y F) réplicas ± DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a  $p \leq 0,05$  con prueba de Duncan (A, B, C, D y E) y prueba de Kruskal-Wallis (F). RWC: Contenido relativo hídrico.

Interesantemente, no se observó un efecto sobre la elongación de la parte aérea de las plantas a los 10 días PS con ninguna de las cepas (Tabla suplementaria 6-3), es decir, no se presentó promoción del crecimiento longitudinal en los primeros días de la fase de irrigación del experimento. Sin embargo, al final de la fase de estrés (31 días PS), las plantas tratadas con MGC9, eran en promedio más altas que las plantas de los demás tratamientos, incluyendo los controles no inoculados, aunque dichas diferencias (6,6% más frente al control de sequía) no tuvieron significancia estadística ( $p = 0,32$ ) (ver Tabla suplementaria 6-4).

Por otro lado, se presentó un incremento en la biomasa seca radical de todos los tratamientos sometidos al estrés hídrico respecto al control irrigado (Figura 4-3, C-D). Si bien la inoculación bacteriana no alteró significativamente este parámetro frente al control estresado, se destaca el efecto de las cepas 2755 y MGC9 en la estimulación del aumento de la biomasa radical en 29,6% y 21,8%, respectivamente. Asimismo, el estrés disminuyó el contenido relativo de agua (RWC) en el control no inoculado, donde la pérdida respecto al control irrigado estuvo entre el 3,9% y 4,6 % (Figura 4-3, E-F). Sin embargo, en las plantas tratadas con las cepas PSL80 y XT17 (Figura 4-3, E-F) dicha disminución de RWC fue tan solo de 0,8% ( $p < 0,05$ ) y 1,4%, respectivamente, evidenciando una mejora en la hidratación de las hojas del maíz, incluso siendo similar estadísticamente al control irrigado.

Otros aspectos en la planta que se afectaron considerablemente por el déficit hídrico, fueron los contenidos de prolina y azúcares totales solubles (Figura 4-4). Como se mencionó anteriormente, se presentó una sobreproducción significativa ( $p < 0,05$ ) de estos solutos compatibles en las plantas control sometidas al estrés respecto aquellas en condiciones de riego. Referente a los tratamientos inoculados, en el caso de la prolina, las cepas PSL80, PSL63 y MGC9 indujeron incrementos entre 1,3 y 1,8 veces ( $p < 0,05$ ) frente al control de estrés sin inocular (Figura 4-4, A-B). Mientras que, en los azúcares totales solubles, la respuesta fue planta-bacterio específica; por ejemplo, las cepas 2755 y PSL80 (Figura 4-4, C-D), exacerbaron la acumulación de carbohidratos en el tejido vegetal foliar incluso por encima del control estresado en un 34% y 17% ( $p < 0,05$ ) respectivamente, en contraste, esta concentración fue atenuada al mismo nivel del control irrigado con el uso de las cepas XT17 y XT13.



**Figura 4-4.** Cambios en la concentración de prolina (A y B) y azúcares totales solubles (Azúc. Tot. Sol.) (C y D) en plantas de maíz en condiciones de sequía durante 11 días. Las barras representan la media de 5 réplicas  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a  $p \leq 0,05$  con prueba de Duncan (A, C y D) y Kruskal-Wallis (B). PF: Peso Fresco.

A nivel de pigmentos, MT1C8, 2755, PSL63 y PSL80 mejoraron notoriamente ( $p < 0,05$ ) el contenido de clorofila total frente a las plantas control entre un 35,0% a 63,0% (Tabla 4-2). La mayoría de las cepas bacterianas aumentaron el contenido de Chl<sub>a</sub> foliar en condiciones de estrés, destacándose el efecto de los tratamientos 2755 y XT17, al lograr incrementos hasta del 87,0% ( $p < 0,05$ ) respecto a las plantas irrigadas (Tabla 4-2). En el caso de las plantas sin inocular, en ambos ensayos se presentaron diferencias de importancia estadística en los carotenoides, donde se obtuvieron incrementos de este pigmento entre el 18,4% y 22,0% en los controles de sequía (Tabla 4-2). Por su parte, los tratamientos no afectaron significativamente el comportamiento del contenido de carotenoides en condiciones de estrés, a excepción de XT14 y PSL80, que mantuvieron los niveles del pigmento similar al de las plantas control con riego (Tabla 4-2).

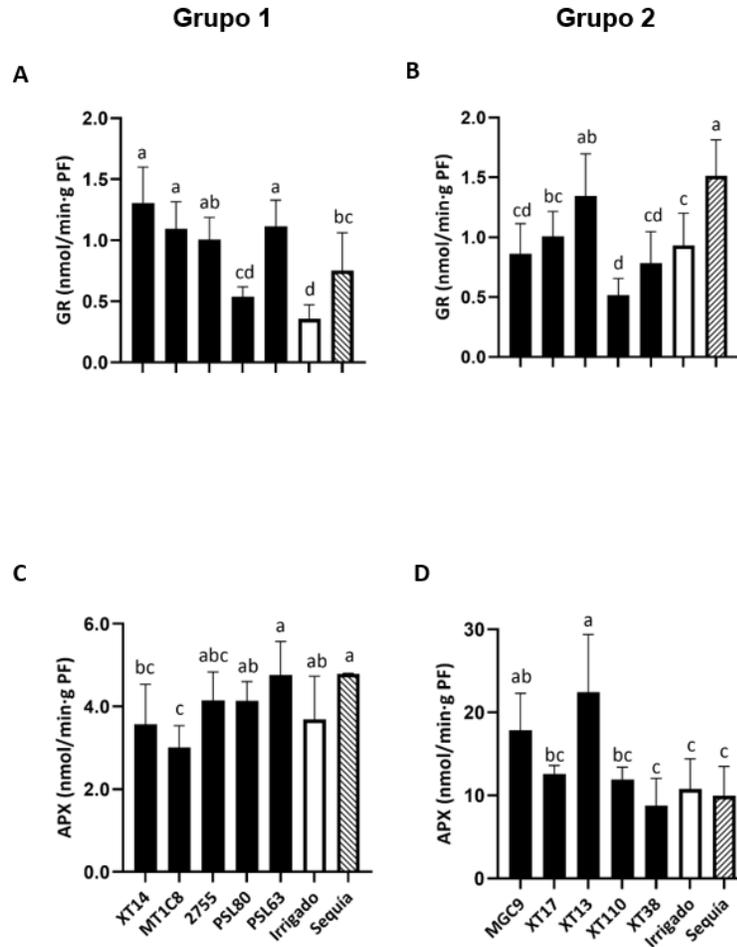
**Tabla 4-2.** Comportamiento de la concentración de clorofila (a y b), clorofila total y carotenoides en plantas de maíz inoculadas tras ser sometidas a estrés por déficit hídrico.

Tratamiento	Clorofila a ( $\mu\text{g/g PF}$ )	Clorofila b ( $\mu\text{g/g PF}$ )	Clorofila Total (a+b) ( $\mu\text{g/g PF}$ )	Carotenoides ( $\mu\text{g/g PF}$ )
<b>Grupo 1</b>	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Control Irrigado	295,9 $\pm$ 22,1 d	416,4 $\pm$ 26,7 bc	683,1 $\pm$ 62,9 c	121,4 $\pm$ 11,0 b
Control Sequía	257,6 $\pm$ 35,6 d	447,6 $\pm$ 22,3 b	667,9 $\pm$ 85,6 c	143,7 $\pm$ 1,4 a
XT14	415,8 $\pm$ 44,5 c	407,7 $\pm$ 36,2 bc	789,8 $\pm$ 99,8 bc	113,1 $\pm$ 10,8 b
MT1C8	525,4 $\pm$ 39,1 a	413,4 $\pm$ 35,3 bc	892,7 $\pm$ 74,7 b	139,6 $\pm$ 8,1 a
2755	553,5 $\pm$ 45,5 a	582,4 $\pm$ 73,7 a	1087,9 $\pm$ 206,0 a	144,5 $\pm$ 8,5 a
PSL80	455,8 $\pm$ 39,7 bc	377,6 $\pm$ 37,4 c	899,6 $\pm$ 106,7 b	119,6 $\pm$ 2,3 b
PSL63	494,4 $\pm$ 51,1 ab	412,0 $\pm$ 24,3 bc	900,3 $\pm$ 39,3 b	142,7 $\pm$ 11,3 a
<b>Grupo 2</b>	$p < 0,05$	$p < 0,05$		$p < 0,05$
Control Irrigado	784,7 $\pm$ 137,5 c	280,7 $\pm$ 36,8 b	1156,5 $\pm$ 267,9	148,6 $\pm$ 25,5 c
Control Sequía	973,6 $\pm$ 122,8 ab	333,8 $\pm$ 40,1 ab	1307,4 $\pm$ 162,8	172,0 $\pm$ 14,7 ab
MGC9	858,9 $\pm$ 107,4 bc	290,0 $\pm$ 33,3 b	1165,3 $\pm$ 156,0	167,5 $\pm$ 17,8 ab
XT17	1097,5 $\pm$ 179,4 a	351,3 $\pm$ 49,5 a	1448,8 $\pm$ 226,3	192,2 $\pm$ 19,5 a
XT13	932,5 $\pm$ 73,0 abc	328,7 $\pm$ 28,9 ab	1261,2 $\pm$ 88,4	184,9 $\pm$ 11,1 a
XT110	868,4 $\pm$ 88,5 bc	281,4 $\pm$ 26,6 b	1149,7 $\pm$ 113,8	156,4 $\pm$ 11,8 bc
XT38	1001,8 $\pm$ 142,4 ab	330,6 $\pm$ 45,4 ab	1332,3 $\pm$ 185,2	177,3 $\pm$ 23,6 ab

Los datos corresponden a la media de 5 réplicas  $\pm$  DE. En las columnas, letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes a  $p < 0,05$ .

Respecto a la actividad enzimática, en el caso de GR, las plantas sin inocular sometidas al estrés por sequía incrementaron considerablemente ( $p < 0,05$ ) la actividad de esta enzima en relación a las plantas irrigadas (Figura 4.5 A-B), mientras que la respuesta de las plantas inoculadas fluctuó con cada aislamiento. En el caso de las cepas XT14, MT1C8 y PSL63 se incrementó la actividad hasta un 73,7% sobre el control estresado, mientras que, en otros tratamientos, la actividad de GR fue similar (PSL80, MGC9 y XT38) o significativamente menor (XT110,  $p < 0,05$ ) a la evidenciada en las plantas en condiciones de riego. En cuanto a la enzima APX, si bien no hubo diferencias estadísticas entre la actividad enzimática de los controles (Figura 4-5 C-D), se observó que en las plantas inoculadas la actividad de APX fue modulada; en los tratamientos XT13 y MGC9 se incrementó

notoriamente entre 1,8 y 2,0 veces frente al control de sequía, mientras que en MT1C8, la actividad enzimática descendió un 18,0% frente al control sin estrés.



**Figura 4-5.** Efecto en la actividad enzimática de GR (A y B) y APX (C y D) en plantas de maíz inoculadas con PGPB tras 11 días de estrés hídrico. Las barras representan la media de 5 réplicas  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos a  $p \leq 0,05$  con prueba de Duncan (A, B y D) y Kruskal-Wallis (C). PF: Peso Fresco.

Actualmente, la escasez mundial de agua disponible para el riego es una de las principales amenazas para la agricultura y la seguridad alimentaria (Saikia et al., 2018; Kaushal & Wani, 2016b; Mancosu et al., 2015). La deficiencia de agua limita el crecimiento y productividad de los cultivos, por lo que fortalecer la tolerancia de las plantas a condiciones deficientes de agua sin penalizar el rendimiento, ha sido un gran desafío en los programas de mejoramiento (Takahashi et al., 2020). Las PGPB han demostrado ser una alternativa viable para reducir los efectos deletéreos de la sequía en las plantas de maíz (Azeem et al., 2022; Danish et al., 2020; Zarei et al., 2020; Saikia et al., 2018; Naveed et al., 2014).

En este trabajo, se encontró que las cepas de *Bacillus* spp. XT14 y MT1C8 y *Pseudomonas* sp. PSL63 mejoraron la ganancia de biomasa aérea en condiciones de estrés, incluso superando a las plantas control irrigadas (22,0% a 27,4%), sin afectar significativamente la respuesta natural del maíz sobre el crecimiento de las raíces. Posiblemente, la influencia de estas cepas en el aumento de la actividad enzimática de GR y la concentración de la Chla, el principal pigmento involucrado en la fotosíntesis que puede aumentar la tasa de fotosíntesis neta (Vishnupradeep et al., 2022), benefició la acumulación de biomasa. Estos resultados se relacionan con los reportados por Shirinbayan et al. (2019) en plantas de maíz, donde la inoculación de cepas PGPB de *Azotobacter* spp. mejoró la acumulación de biomasa seca y el contenido de clorofila, en condiciones similares de estrés hídrico. GR es una enzima esencial en el sistema antioxidante enzimático de las plantas involucrada en la reposición del glutatión (GSH), una molécula multifuncional reductora de ROS, y que además ayuda a sostener indirectamente las reservas de ácido ascórbico (Hasanuzzaman et al., 2020; Moreno-Galván, Cortés-Patiño, et al., 2020; Noctor et al., 2012). Por ello, el incremento de su actividad tras la inoculación de PGPB en plantas en condiciones ambientales estresantes, como la deficiencia de agua, se ha relacionado con una mejoría en la tolerancia al estrés, tal como lo refiere Singh et al., (2020) en su estudio de plantas de arroz tratadas con una cepa de *P. fluorescens*.

Un comportamiento interesante se presentó en las plantas inoculadas con *Lysinibacillus* sp. MGC9. Si bien, la deshidratación en las plantas se acentuó (-4,7% en RWC) y se estimuló el crecimiento radical (+29,0%) respecto al control sometido a estrés, también se mejoró la ganancia de biomasa aérea (+21,8%). Es posible que la cepa haya contribuido a la mitigación del daño en el crecimiento, al mejorar la acumulación de prolina (+80,5%) y la actividad de APX (+78,9%), los cuales son mecanismos que favorecen la protección de macromoléculas esenciales y la reducción del estrés oxidativo en condiciones de déficit hídrico (Fang & Xiong, 2015; Farooq et al., 2009). Estos resultados coinciden con los presentados por Wang et al. (2012), quienes empleando un inóculo mixto de *B. cereus* AR156, *B. subtilis* SM21 y *Serratia* sp. XY21, lograron mejorar la tolerancia de plantas de pepino a la sequía, al aumentar la concentración de prolina en las hojas, la expresión génica de APX citosólica y de otras enzimas antioxidantes. Similarmente, Imran et al. (2023), evidenciaron que la aplicación de *Lysinibacillus fusiformis* PLT16 benefició el crecimiento longitudinal del tallo y raíces, y el aumento de peso seco en plantas de soya, a través de la promoción de la defensa antioxidante enzimática y del incremento de prolina.

Por otra parte, se observó que, a pesar de la disminución de biomasa aérea en las plantas ocasionada por el estrés, la inoculación de la cepa *Pseudomonas* sp. PSL80 incrementó en el contenido de azúcares totales solubles (+16,8%) y de prolina (+33,1%) frente al control estresado. Se presume, que el ajuste osmótico mediado por los osmolitos contribuyó al sostenimiento del estado hídrico durante el período de estrés (RWC del 97,9%) en las plantas tratadas con esta cepa. Adicionalmente, la inoculación atenuó la respuesta de crecimiento de las raíces y del sistema de defensa antioxidante (APX, GR y carotenoides), e intensificó la síntesis de clorofila (Chla) en la planta. Probablemente, estos cambios estuvieron vinculados con la mitigación del daño oxidativo gracias a la presencia de los solutos compatibles (Ali & Khan, 2021). Los hallazgos mencionados, están en sintonía con los resultados reportados por Ghosh et al. en 2017 y 2018 en plantas de

*Arabidopsis thaliana* inoculadas con *P. putida* GAP-P45 bajo condiciones de deshidratación. Las plantas presentaron aumento del contenido de prolina, disminución de los niveles de ROS y de la actividad antioxidante enzimática (entre ellas, APX y GR), así como incremento del contenido de agua y clorofila, y reducción de la longitud de la raíz primaria. Los autores pudieron confirmar a nivel molecular, que el fenómeno observado, se debió a la modulación positiva de la cepa sobre los genes implicados en la síntesis de prolina y al refuerzo en la actividad enzimática metabólica del aminoácido, permitiendo aliviar de esta forma el efecto del estrés hídrico en las plantas.

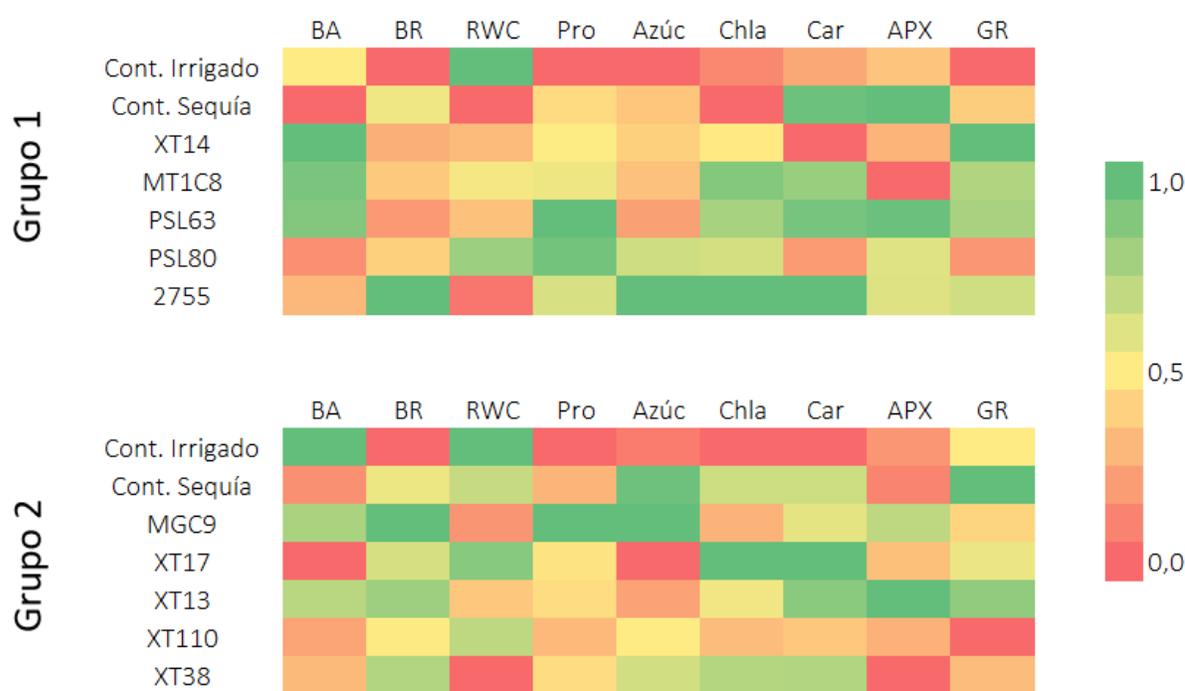
La cepa *Bacillus* sp. 2755, promovió la acumulación de biomasa de las raíces (+29,6%) y la síntesis de clorofila total (+62,9%) en las plantas en comparación con el control de sequía. Además, intervino en el ajuste osmótico y la protección antioxidante, evidenciado por el incremento de los azúcares solubles (+34,4%) y la actividad enzimática de GR (+33,6%), respectivamente. Estos mecanismos de resistencia a la sequía son similares a los observados en las plantas sin inocular bajo estrés, como se discutió previamente en la sección sobre la “respuesta del maíz ICA V109 al estrés por déficit hídrico”. Por tanto, el tratamiento con la cepa 2755 parece haber fortalecido la respuesta natural del maíz al estrés hídrico en varios parámetros, pero, a pesar de los beneficios mencionados, no se lograron mejoras significativas en la biomasa aérea ni en el nivel de hidratación de las plantas.

Respecto a las plantas inoculadas con *Bacillus* sp. XT17, se observó una mejoría leve en el contenido relativo hídrico (+3,4%) y el contenido de pigmentos (+10,8% Chl total y +11,7% carotenoides) en relación al control de estrés, pero se redujo la respuesta de osmoregulación mediada por azúcares solubles (-45,5%) y de renovación del glutatión a través de GR (-33,0%). Por su parte, la inoculación de la cepa de *Bacillus* spp. XT13, favoreció el incremento de biomasa aérea en aproximadamente un 20,0% en contraste con las plantas sin inocular en déficit hídrico. Sin embargo, no se observó un mecanismo claro por el cual se podría estar logrando este resultado, e inclusive, algunos de los parámetros determinados se vieron afectados negativamente (p. ej. RWC y azúcares solubles). En el caso de los tratamientos XT38 y XT110, no se presentaron mejoras en el desempeño de las plantas en la mayoría de las respuestas bioquímicas y morfológicas evaluadas bajo las condiciones de estudio.

Es interesante destacar que los resultados obtenidos para las cepas XT17, XT13, XT38 y XT110 difieren de los hallazgos reportados por Moreno-Galván et al. en un estudio previo del 2020. En dicho estudio, se probó el potencial de estas bacterias en la mitigación del estrés en una variedad de maíz diferente (V-508), donde la acumulación de prolina y el crecimiento de las raíces mediada por las cepas mencionadas, desempeñaron un papel crucial en la tolerancia al estrés. Este hecho pone en evidencia, que la interacción entre una planta y un microorganismo es un proceso complejo que depende de múltiples factores, a tal grado que, aún entre plantas de la misma especie, el genotipo puede influir en el establecimiento de una interacción positiva (Glick, 2012). Por lo tanto, se resalta la importancia de realizar evaluaciones *in vivo* con las plantas objetivo para determinar el potencial de una cepa.

De forma general, los resultados anteriores indican que la inoculación de gran parte de las PGPB evaluadas, provocó la modulación de mecanismos relacionados con la respuesta al estrés por déficit hídrico a nivel de enzimas, pigmentos y/o osmolitos en el contexto del estudio, y que la fluctuación en la intensidad de la respuesta es producto de la interacción específica planta-microorganismo. Con algunas cepas, esta interacción potenció la capacidad intrínseca de la planta para hacer frente al estrés, reflejándose en un estado hídrico mejorado y ganancia de biomasa. Tales beneficios fueron observados aún en condiciones no estériles del suelo, sugiriendo el efecto diferenciador de la aplicación bacteriana independientemente de la comunidad microbiana nativa del suelo y la respuesta natural al estrés por sequía en las plantas de maíz.

En la Tabla 4-3, se resumen los resultados más relevantes evidenciados en la respuesta del maíz al estrés hídrico tras la inoculación de cada cepa bacteriana, y en la Figura 4-6, se presenta de forma esquemática en un mapa de calor, las variaciones observadas en todas las variables bioquímicas y morfofisiológicas determinadas respecto a las plantas control de cada ensayo.



**Figura 4-6.** Mapa de calor construido a partir de las variaciones generadas en los parámetros bioquímicos, fisiológicos y morfológicos de cada cepa y sus respectivos controles en los grupos 1 y 2. Los datos fueron previamente normalizados en la escala de 0,0 a 1,0 en cada columna. El color verde (1,0) indica el tratamiento con el mayor incremento en la variable (columna) y el rojo, el tratamiento con el menor valor (0,0).

**Tabla 4-3.** Impacto de la inoculación bacteriana sobre la respuesta de estrés al déficit hídrico en maíz ICA V109. Se destacan los principales cambios evidenciados para cada cepa respecto a las plantas control de estrés.

<b>Tratamiento bacteriano</b>	<b>Impacto asociado al tratamiento</b>	<b>Respuesta del maíz sin inocular</b>
XT14	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incremento de biomasa seca aérea, actividad GR y Chla.</li> <li>- Disminución de actividad APX y carotenoides.</li> </ul>	
MT1C8	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incremento de biomasa seca aérea, actividad GR y Chla.</li> <li>- Disminución de actividad APX.</li> </ul>	
PSL63	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incremento de biomasa seca aérea, actividad GR, prolina y Chla.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución de la biomasa seca aérea.</li> <li>- Disminución de RWC.</li> <li>- Incremento de biomasa seca radical.</li> </ul>
MGC9	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incremento de biomasa seca aérea, prolina y actividad APX.</li> <li>- Disminución de actividad GR.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incremento de prolina y azúcares totales solubles.</li> <li>- Incremento de actividad GR.</li> </ul>
PSL80	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incremento de RWC, azúcares totales solubles, prolina y Chla.</li> <li>- Disminución carotenoides.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incremento concentración de carotenoides.</li> </ul>
2755	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incremento de azúcares totales solubles y Chl total (a+b).</li> <li>- Disminución de actividad APX.</li> </ul>	

**Continuación Tabla 4-3.** Impacto de la inoculación bacteriana sobre la respuesta de estrés al déficit hídrico en maíz ICA V109. Se destacan los principales cambios evidenciados para cada cepa respecto a las plantas control de estrés.

Tratamiento bacteriano	Impacto asociado al tratamiento	Respuesta del maíz sin inocular
XT17	- Disminución de azúcares totales solubles y actividad GR.	- Disminución de la biomasa seca aérea. - Disminución de RWC.
XT13	- Incremento de actividad APX. - Disminución de azúcares totales solubles.	- Incremento de biomasa seca radical. - Incremento de prolina y azúcares totales solubles.
XT38	- Disminución de actividad GR.	- Incremento de actividad GR.
XT110	- Disminución de actividad GR.	- Incremento concentración de carotenoides.

## 4.2 Objetivo 2

### 4.2.1 Efecto de la inoculación de PGPB en la mitigación del estrés por sequía en maíz: Un ensayo en el Caribe seco

Con el propósito de evaluar el desempeño de las diez cepas en un entorno que se aproximara a las condiciones ambientales en las que potencialmente podrían ser utilizadas, se llevó a cabo un experimento en una estructura tipo casa de malla en el Caribe seco colombiano, específicamente en el departamento del Cesar, en el C.I. Motilonia de AGROSAVIA. Durante el experimento, se utilizaron plantas de maíz inoculadas, sembradas en materas con sustrato de aluvión y materia orgánica. El estrés hídrico fue inducido mediante la suspensión del riego a partir del día 20 PS, manteniendo esta condición durante 11 días.

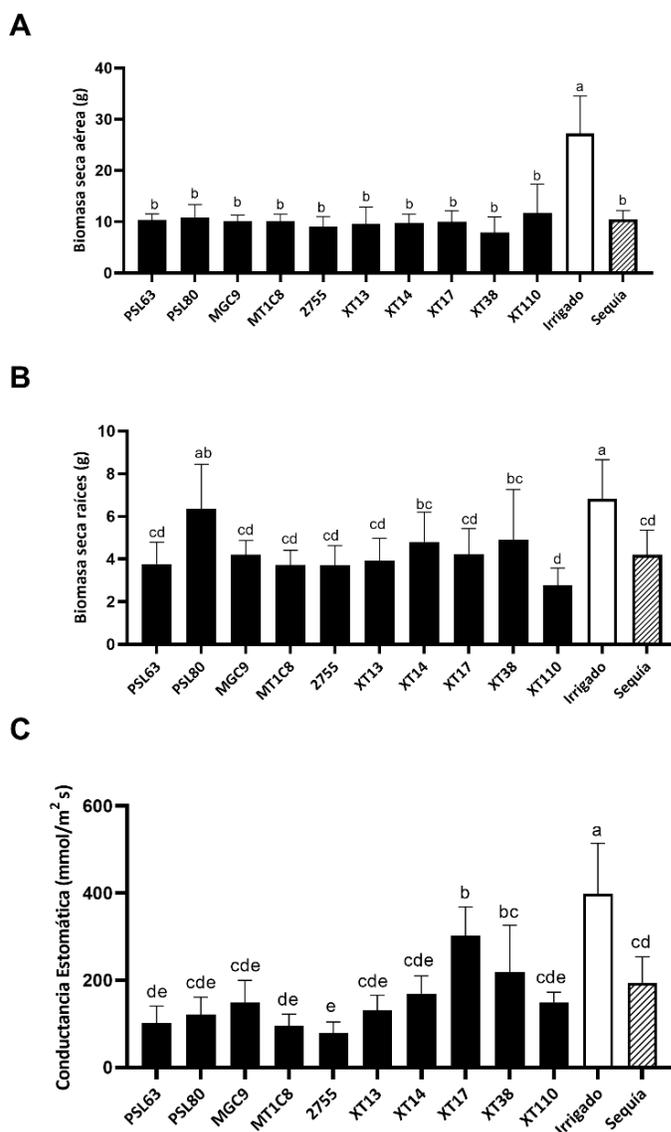
La deshidratación provocada por el estrés hídrico tuvo un efecto desventajoso evidente en las plantas de maíz del grupo control de sequía, ocasionando alteraciones importantes en los parámetros morfológicos y fisiológicos monitoreados. En lo que respecta a la parte aérea, se observó una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) de 18,5 cm (13,9%) en la altura promedio (Tabla 4-4) y una disminución del 61,4% ( $p < 0,05$ ) en la acumulación de biomasa de las plantas en comparación con el grupo del control irrigado (Figura 4-7, A). Asimismo, el RWC experimentó una caída del 34,1% ( $p < 0,05$ ) (Tabla 4-4), mientras que en la conductancia estomática ( $g_s$ ), determinada en el día 9 de la fase de déficit hídrico (29 días PS), se redujo un 51,3% ( $p < 0,05$ ) en comparación con las plantas bajo riego (Figura 4-7, C). En cuanto a las raíces, a diferencia de lo observado en condiciones de invernadero en la sección anterior, se registró una reducción del 38,5% ( $p < 0,05$ ) en la biomasa seca radical en comparación con las plantas que recibían riego regular (Figura 4-7, B).

Por otra parte, al evaluar el efecto de la aplicación de las cepas en la respuesta al estrés hídrico en los parámetros morfo-fisiológicos, se observó que las cepas XT14, XT38 y PSL80 favorecieron el incremento del peso seco radical de las plantas en un 14,3, 16,7 y 51,4% ( $p < 0,05$ ) respectivamente, frente al control sin inocular bajo estrés (Figura 4-7, B). En el caso de la  $g_s$ , medida a los 29 días PS, se observó de forma general una tendencia hacia la baja en la respuesta de las plantas inoculadas, especialmente en la cepa 2755 (-59,6%,  $p < 0,05$ ), mientras que el tratamiento XT17 se diferenció por incrementar considerablemente ( $p < 0,05$ ) la  $g_s$  de las plantas en un 55,5% en comparación con el control de estrés (Figura 4-7, C). En cuanto al parámetro de longitud aérea, no se presentaron diferencias entre el control de estrés y los tratamientos al finalizar el período de deshidratación (31 días PS) (Tabla 4-4). De igual forma, el peso seco aéreo (Figura 4-7, A) y el RWC foliar no se vieron alterados estadísticamente por la inoculación bacteriana (Tabla 4-4).

**Tabla 4-4.** Efecto de la inoculación de las PGPB sobre parámetros de crecimiento, fisiológicos y bioquímicos en plantas de maíz, sometidas a estrés por déficit hídrico en un ensayo de casa de malla

Tratamiento	Long. 31 (cm)	RWC (%)	$g_s$ 27 (mmol/m <sup>2</sup> s)	APX (nmol/ min·g PF)	GR (nmol/ min·g PF)
Control Irrigado	133,2±14,2 a	72,4±6,3 a	442,1±34,3 a	8,4±6,6	1,0±0,4 a
Control Sequía	114,7±10,9 b	47,7±9,2 b	336,9±51,2 b	7,4±5,5	0,6±0,4 ab
PSL63	108,1±13,1 b	43,9±9,4 b	351,7±53,6 b	5,4±3,6	0,4±0,2 bcd
PSL80	106,1±7,8 b	39,2±11,8 b	330,2±61,2 b	7,0±2,4	0,4±0,1 bcd
MGC9	109,9±8,8 b	44,4±6,2 b	275,6±40,0 bc	4,7±3,0	0,5±0,2 bcd
MT1C8	107,6±11,4 b	47,0±7,4 b	292,5±79,1 bc	5,7±0,7	0,3±0,2 cd
2755	110,7±8,9 b	45,5±9,3 b	239,4±72,0 c	14,7±6,9	0,3±0,1 d
XT13	108,6±18,0 b	42,6±4,8 b	283,0±48,3 bc	8,3±4,5	0,3±0,2 cd
XT14	112,4±8,7 b	45,2±5,0 b	299,9±68,8 bc	8,9±7,7	0,6±0,3 abc
XT17	108,4±13,6 b	49,6±11,9 b	326,2±37,4 b	5,2±4,0	0,3±0,2 cd
XT38	107,1±12,0 b	47,9±5,7 b	355,8±31,6 b	5,8±4,6	0,4±0,2 bc
XT110	106,7±16,7 b	44,7±9,5 b	311,6±89,5 bc	8,1±2,2	0,6±0,3 bcd
<i>P</i> valor	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$		$p < 0,001$

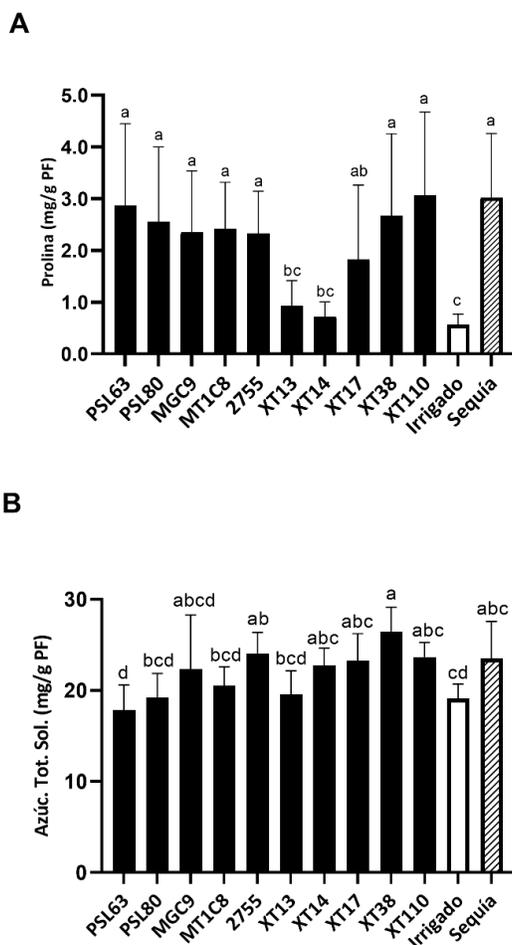
Los datos corresponden al promedio de 12 (Long. 31) o cinco (RWC,  $g_s$  27, APX y GR) réplicas por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por parámetro evaluado con prueba de comparación múltiple de Duncan. Long. 31: Longitud de la parte aérea de la planta a los 31 días PS; RWC: Contenido Relativo Hídrico;  $g_s$  27: Conductancia estomática medida en el día 27 PS; APX: Actividad enzimática de Ascorbato Peroxidasa; GR: Actividad enzimática de Glutación Reductasa



**Figura 4-7.** Cambios en la biomasa seca aérea (A), biomasa seca de las raíces (B) en plantas de maíz de 31 días PS y en la Conductancia estomática ( $g_s$ ) (C) determinada en el día 29 PS, asociados a la inoculación de las PGPB en condiciones de déficit hídrico, en un ensayo conducido en casa de malla en el Cesar. Las barras corresponden al promedio de 7 (A y B) o 5 (C) unidades experimentales  $\pm$  DE. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos con prueba de comparación múltiple de Duncan (B y C) y Kruskal-Wallis (A) a  $p < 0,05$ .

A nivel bioquímico, en las plantas no inoculadas en condición de estrés hídrico se presentaron incrementos de clorofila a y b (entre 23,9 a 26,8%) y carotenoides (29,1%) frente al grupo control irrigado, pero sin llegar a ser estadísticamente relevantes (Tabla suplementaria 6-5). En relación a los osmolitos, se registró un incremento significativo de 5,3 veces ( $p < 0,05$ ) en la acumulación de prolina y del 23,0% en la concentración foliar de azúcares solubles, en comparación con el control irrigado (Figura 4-8). Interesantemente, las actividades de las enzimas APX y GR de las plantas sin inocular en condiciones de riego, fueron superiores a las encontradas en el grupo control de sequía

en un 11,7 y 64,1% respectivamente, aunque estas variaciones no tuvieron importancia estadística (Tabla 4-4).



**Figura 4-8.** Cambios en las concentraciones de los solutos compatibles prolina (A) y azúcares totales solubles (B) en plantas de maíz tratadas con inóculos de PGPB, después de 11 días de estrés por déficit hídrico a nivel de casa de malla. Las barras corresponden a la media de 5 réplicas  $\pm$  DE por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas a  $p < 0,05$  mediante la prueba de Duncan (B) y Kruskal-Wallis (A). PF: Peso Fresco.

En relación a las plantas tratadas con los aislamientos bacterianos, la mayoría de ellas presentaron disminución en la respuesta de acumulación de solutos compatibles en comparación con el control de estrés. En el caso de la prolina, las plantas inoculadas con las cepas XT13 y XT14 experimentaron una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) del 69,3% y 76,2% respectivamente, en la concentración del osmolito en las hojas (Figura 4-8, A), llegando a niveles comparables estadísticamente a los hallados en las plantas irrigadas. Asimismo, en los azúcares, se observó una disminución importante del 24,0% ( $p < 0,05$ ) en las plantas tratadas con la cepa PSL63 (Figura 4-8, B).

Con respecto a los parámetros enzimáticos (GR y APX), se presentaron disminuciones considerables ( $p < 0,05$ ) en el rango del 42,6% al 55,6% en la actividad de GR en las plantas inoculadas con las

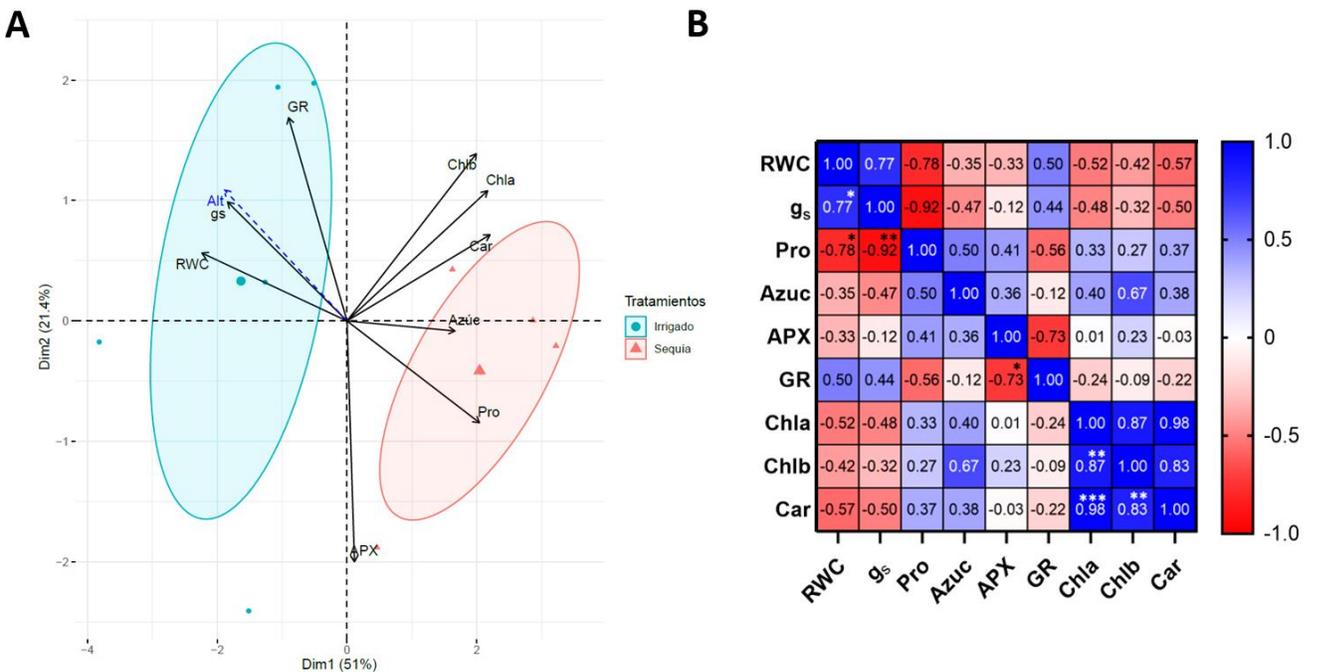
cepas MT1C8, 2755, XT13 y XT17 en contraste con el control de estrés (Tabla 4-4). Por otro lado, en la actividad antioxidante de APX, no se lograron establecer diferencias estadísticas entre los controles y tratamientos bacterianos (Tabla 4-4), aunque se destacó la cepa 2755 por su modulación hacia el alza en esta variable. En el caso de los pigmentos fotosintéticos y accesorios (Chla, Chlb y Car), tampoco se detectaron diferencias estadísticas mediante el análisis de varianza (ANOVA) (Tabla suplementaria 6-5).

En resumen, el déficit hídrico provocó un aumento en la respuesta de osmoregulación del maíz en términos de prolina, mientras que afectó drásticamente el crecimiento aéreo y la formación de raíces, así como el contenido de agua en las hojas (medido en RWC) y la actividad de los estomas ( $g_s$ ) de la planta. En los resultados bioquímicos (exceptuando la prolina), no fue posible identificar un patrón claro en el comportamiento de las plantas estresadas en comparación con el grupo control de riego. En algunos parámetros evaluados, como la actividad de GR y APX, los valores medidos fueron más altos en las plantas irrigadas que en las sometidas a estrés y las pruebas estadísticas no mostraron diferencias significativas entre los controles. Adicionalmente, algunas características que se habían observado en el ensayo de invernadero, tales como el crecimiento de las raíces y el sostenimiento del crecimiento longitudinal aéreo bajo estrés hídrico, tuvieron resultados opuestos en el experimento de casa de malla, donde hubo menor biomasa seca acumulada en las raíces (entre -56,9% y -71,0%) y disminución de la altura (entre -13,9% y -20,3%) en las plantas estresadas (control y tratamientos) que en aquellas irrigadas. Por tanto, con el propósito de identificar posibles interacciones entre los parámetros medidos y los 12 tratamientos (10 tratamientos bacterianos y 2 controles), se optó por realizar un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) para cada grupo de variables: morfológicos y fisiológicos-bioquímicos.

Los PCA explicaron el 55,3% de la varianza en los atributos fisiológicos y bioquímicos (ver Figura suplementaria 6-2), y el 85,7% en los morfológicos (ver Figura suplementaria 6-3). Respecto a los tratamientos bacterianos, no se observaron diferencias entre ellos. Los grupos formados por las elipses de cada tratamiento estuvieron superpuestos con el control de estrés, por lo que se infiere que la respuesta de las plantas no se vio influenciada de forma importante por la inoculación de las cepas. Los PCA permitieron deducir que, en las condiciones de este ensayo y en el momento de la medición, el factor diferencial entre los tratamientos lo ejerció la sequía, no la inoculación. Por ello, se realizó un nuevo PCA (Figura 4-9, A), incluyendo solamente los controles de sequía y riego, el cual explicó el 72,4% de la varianza.

En este PCA (Figura 4-9, A), se crearon dos grupos claramente independientes. Los datos del tratamiento irrigado se agruparon alrededor de los vectores (flechas negras) de altura de la planta, RWC,  $g_s$  y GR, mientras que los datos correspondientes al grupo de sequía, lo hicieron alrededor de los vectores de prolina, azúcares totales solubles y carotenoides (Figura 4-9, A). En consecuencia, estos parámetros son los que mayor peso tuvieron sobre la varianza de los datos y los que mejor describieron el comportamiento de las plantas control irrigadas y estresadas, en las condiciones de estudio de casa de malla.

Por otro lado, la posición de los vectores respecto a los dos componentes del PCA, permitió distinguir que existían correlaciones negativas (p. ej. RWC y prolina) y positivas (p.ej. RWC y  $g_s$ ) entre ellos. Al estimar el coeficiente de correlación de Spearman (Figura 4-9, B), se encontró que existe una relación inversa significativa entre la concentración de prolina, el contenido de agua de los tejidos (RWC) ( $\rho = -0,78$ ,  $p = 0,017$ ) y la  $g_s$  ( $\rho = -0,92$ ,  $p = 0,001$ ), y una correlación directa fuerte entre el RWC y  $g_s$  ( $\rho = 0,77$ ,  $p = 0,012$ ), coincidiendo con lo mencionado en estudios previos (Chaves et al., 2009; Ghannoum, 2009). El análisis anterior, indica que la prolina en la planta responde al nivel de deshidratación, incrementándose su concentración a medida que el déficit hídrico crece (disminuye el RWC), y que la apertura de los estomas está positivamente relacionada con el contenido de agua en las hojas, lo que significa que  $g_s$  aumenta o disminuye según se presente un mayor o menor RWC. En este sentido, el contenido de prolina podría destacarse como un indicador robusto del grado de estrés por sequía experimentado por la planta, y tanto RWC como  $g_s$  se presentan como indicadores sensibles del estado hídrico en la variedad de maíz ICA V109.



**Figura 4-9.** A) PCA de atributos fisiológicos y bioquímicos estudiados en las plantas de maíz sin inoculación bajo estrés por sequía. El PCA explica el 72,4 % de la varianza observada y las elipses indican el intervalo de confianza del 95% para cada tratamiento. B) Mapa de calor de correlación entre atributos fisiológicos y bioquímicos de las plantas control en el ensayo de casa de malla. La matriz se construyó a partir del cálculo del coeficiente de correlación de Spearman. El esquema de color muestra en azul la correlación máxima positiva (+1) y en rojo, el valor máximo negativo (-1). Los (\*) indican correlaciones significativas: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . Conductancia estomática ( $g_s$ ); Altura de la planta (Alt); Contenido Relativo Hídrico (RWC); Prolina (Pro); Azúcares Totales Solubles (Azuc); Clorofila a (Chla); Clorofila b (Chlb); Carotenoides (Car); Ascorbato Peroxidasa (APX) y Glutatión Reductasa (GR).

En este contexto, al examinar los valores de RWC medidos en las plantas sometidas a déficit hídrico, estos pueden catalogarse como típicos de plantas en condiciones de estrés hídrico moderado a severo (Laxa et al., 2019; Hsiao, 1973). En el caso de las plantas control, los niveles de RWC (promedio de 72,4%) indican que también experimentaron un grado de estrés leve por déficit hídrico de acuerdo con los rangos propuestos por Laxa et al. (2019) y Ghannoum (2009). Esta situación explicaría comportamientos observados en las plantas irrigadas, como aumento de actividad antioxidante enzimática (GR) y un contenido de azúcares solubles similar al de los tratamientos estresados, siendo un patrón de respuesta semejante al que se halló en las plantas bajo estrés en los ensayos de invernadero (sección 4.1.2).

A partir de este experimento, se puede concluir que es necesario diseñar un modelo metodológico previamente adaptado a las condiciones del sitio, ya que la metodología de evaluación de estrés propuesta, con la estimación de 11 días de deshidratación libre en invernadero, resultó excesiva para las condiciones de casa de malla (sección 4.1.1). La estructura al carecer de paredes, no se consideró la mayor pérdida de agua por evapotranspiración que habría ni las elevadas temperaturas ambientales a las que se podían enfrentar las plantas. Un indicio de lo anterior, se evidencia en la  $g_s$ , cuando desde el séptimo día del estrés (día 27 PS) las plantas ya experimentaban una reducción importante del 23,8% ( $p < 0,05$ ) en la  $g_s$  respecto al control irrigado (Tabla 4-4). Teniendo en cuenta que el cierre estomático es considerado una de las respuestas más tempranas a la deficiencia de agua (Flexas & Medrano, 2002), quizás alrededor de este punto habría sido un momento más adecuado para finalizar el experimento. Estas consideraciones deberán tenerse en cuenta en futuras investigaciones.

En relación con el efecto mínimo observado en la modulación de la respuesta de las plantas al estrés generado por las cepas, se ha mencionado que las sequías severas suelen afectar la asimilación de carbono en las plantas y limitar su transferencia hacia la rizósfera (Karlowsky et al., 2018). Al reducirse los depósitos de carbono en la rizósfera, se debilitan las interacciones planta-microorganismos, debido a que la microbiota del suelo depende en gran medida de los exudados radicales (Glick, 2020; Karlowsky et al., 2018). Así mismo, la pérdida de humedad del suelo dificulta la difusión de los exudados en las inmediaciones de las raíces, así como la movilidad de los microorganismos hacia ellos, por lo que puede verse afectada la colonización de las PGPB (Nunan et al., 2017). Aunado a lo anterior, en los suelos más secos, las bacterias también experimentan estrés osmótico, el cual puede llegar a ser letal y termina por reducir la biomasa bacteriana (Vieira et al., 2023). Considerando el grado de estrés por déficit hídrico alcanzado en este experimento (moderado-severo), es razonable que el potencial de las PGPB en la mitigación se haya visto afectado negativamente.

Además de lo expuesto anteriormente, existe la posibilidad de que el cambio de sustrato (de suelo a mezcla de aluvión y materia orgánica), haya ejercido un impacto desfavorable en la interacción de las PGPB y las plantas. Por un lado, es probable que la composición y las características fisicoquímicas de este nuevo sustrato, hayan restringido la actividad de las bacterias. Por otro, la comunidad de microorganismos presente en la mezcla pudo haber limitado el establecimiento de las cepas en las raíces de las plantas, y, por ende, su efectividad en la mitigación del estrés.

En virtud de los resultados obtenidos (secciones 4.1 y 4.2), para los experimentos siguientes, se optó por seleccionar cuatro de las diez cepas evaluadas: dos de ellas pertenecientes al cepario del IBUN (PSL63 y PSL80) y otras dos (XT14 y XT17), provenientes del cepario de AGROSAVIA. Estas cepas fueron elegidas principalmente debido a los efectos positivos que se evidenciaron en las plantas en los ensayos de invernadero, como lo son el incremento de la biomasa aérea (XT14 y PSL63) en condición de estrés hídrico, considerando la relevancia de este parámetro en la producción de forraje; el ajuste osmótico y la mejora del estado hídrico (PSL80 y XT17) de las plantas, así como su desempeño en la mitigación del estrés por sequía en estudios similares realizados por el grupo de investigación de Sistemas Agropecuarios Sostenibles de AGROSAVIA (XT14 y XT7).

La razón detrás de esta selección no sólo radica en considerar las variables de importancia agronómica que pueden ayudar a reducir las pérdidas en campo, sino también, en tener en cuenta los rasgos de evitación-tolerancia manifestados por las plantas tras la inoculación, que podrían brindarles una ventaja competitiva frente a otras plantas de maíz cuando las condiciones secas se prolonguen.

### 4.3 Objetivo 3

Los cuatro aislados bacterianos seleccionados, PSL80, PSL63, XT14 y XT17, fueron analizados para explorar su capacidad de tolerar el estrés osmótico y algunas de sus características de promoción del crecimiento que podrían proporcionar ventajas a las plantas bajo condiciones de estrés hídrico.

#### 4.3.1 Generalidades y características asociadas a la promoción del crecimiento

Las *Pseudomonas* spp., son bacterias Gram negativas, en forma de bastón, que se encuentran naturalmente en el suelo y la rizósfera de diversas plantas (Karimzadeh et al., 2021). Debido a su capacidad de colonizar rápidamente y de manera eficiente las raíces, así como a su versatilidad metabólica capaz de aprovechar una amplia gama de compuestos orgánicos simples y complejos (Scarpellini et al., 2004), las *Pseudomonas* spp. pueden establecerse fácilmente en las raíces y adaptarse a ambientes estresantes aportando beneficios a las plantas (Karimzadeh et al., 2021; Vaishnav & Choudhary, 2019). Por otro lado, los *Bacillus* spp., son bacterias Gram positivas, conocidas por su destacable versatilidad en la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, de promoción del crecimiento e inducción de la defensa en las plantas (Akhtar et al., 2020). Así mismo, los *Bacillus* spp. poseen la capacidad de formar endosporas que les permiten resistir a condiciones ambientales hostiles, como el calor y la desecación. Estas características han hecho de los *Bacillus* spp., bacterias ideales para aplicaciones agrícolas y el desarrollo de bioproductos comerciales (Chen et al., 2007).

Las cepas PSL80 y PSL63 pertenecen a la especie de *Pseudomonas fluorescens* de acuerdo con Ordoñez et al. (2016), para las cuales se ha reportado la capacidad de producir sideróforos, adherirse a superficies inertes, moverse a través del swimming y swarming, y otros rasgos asociados a la promoción del crecimiento y el biocontrol, en estudios realizados en papa principalmente (Laverde-Robayo, 2016; Ordoñez et al., 2016; Lara-Bosso, 2007). Por su parte, las cepas XT14 y XT17 se identificaron como *Bacillus aryabhatai* y *Bacillus amyloliquefaciens*, respectivamente (Moreno-Galván, Romero-Perdomo, et al., 2020), y se ha mencionado que poseen la capacidad para producir sideróforos y mitigar el estrés por sequía en pastos forrajeros y maíz modulando la respuesta de las plantas al estrés (Cortés-Patiño et al., 2021; Mendoza-Labrador et al., 2021; Moreno-Galván, Cortés-Patiño, et al., 2020; Moreno-Galván, Romero-Perdomo, et al., 2020).

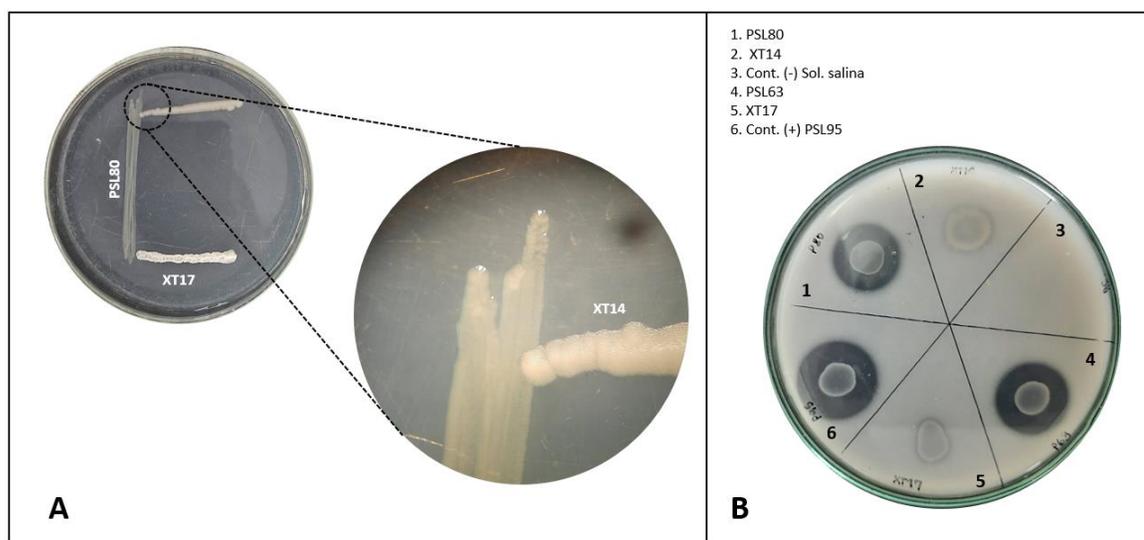
En las pruebas realizadas *in vitro*, se evidenció que las cepas son compatibles entre sí, pudiendo crecer contiguamente en medio sólido sin inhibirse (Figura 4-10, A). También, se verificó su capacidad para solubilizar fosfato en medio líquido a partir de fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), destacándose las cepas de PSL80, XT14 y PSL63 (Tabla 4-5). Además, se observó que las cepas evaluadas pueden mineralizar ácido fítico, en especial, PSL63 y PSL80 (Figura 4-10, B), las cuales

presentaron los halos de solubilización de mayor tamaño, con los índices de eficiencia de mineralización (IEM) significativamente más altos frente a las demás (Tabla 4-5). Igualmente, se detectó la producción de compuestos indólicos en las cuatro cepas a partir de L-triptófano en el rango de 0,5 a 2,5  $\mu\text{g}$  IAA/mL, así como de exopolisacáridos, siendo XT14 la cepa más productora de carbohidratos solubles (Tabla 4-5). En la prueba de solubilización a partir de fosfato de aluminio ( $\text{AlPO}_4$ ) en medio sólido, no se observó la formación de zonas claras alrededor de las colonias de las cepas evaluadas, ni se detectó fósforo libre en la prueba cuantitativa (medio líquido NBRIP) para este compuesto.

**Tabla 4-5.** Rasgos de promoción de crecimiento vegetal de las cepas bacterianas evaluados *in vitro*.

Cepa bacteriana	IES $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2^*$	IEM Ácido Fítico*	Solub. de P (mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ )	Comp. Ind. ( $\mu\text{g}$ IAA/mL)	EPS ( $\mu\text{g}$ D-Glu/mL)
PSL95	$1,4 \pm 0,1^a$	$2,0 \pm 0,2^a$	$181,4 \pm 18,2^a$	ND	ND
C43SN7	ND	ND	ND	$25,6 \pm 3,9^a$	ND
PSL80	$1,4 \pm 0,1^a$	$1,8 \pm 0,2^b$	$162,0 \pm 23,2^{ab}$	$0,5 \pm 0,2^d$	$34,8 \pm 0,8^{ab}$
PSL63	$1,4 \pm 0,1^a$	$2,0 \pm 0,2^a$	$143,0 \pm 1,6^b$	$2,5 \pm 0,3^b$	$25,7 \pm 8,4^b$
XT14	$0,0 \pm 0,0^c$	$1,1 \pm 0,0^c$	$158,7 \pm 2,5^{ab}$	$1,5 \pm 0,3^c$	$42,4 \pm 8,2^a$
XT17	$1,2 \pm 0,1^b$	$1,2 \pm 0,1^c$	$57,8 \pm 9,4^c$	$2,5 \pm 0,2^b$	$34,3 \pm 4,5^{ab}$

Los datos corresponden a la media de 3 réplicas  $\pm$  DE. En las columnas, letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes a  $p < 0,05$ . IES: Índice de Eficiencia de Solubilización en medio sólido; IEM: índice de Eficiencia de Mineralización en medio sólido; Solub. de P: Solubilización de fósforo a partir de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; Comp. Ind.: Producción de compuestos indólicos; EPS: Producción de exopolisacáridos; ND: No determinado. La cepa PSL95 corresponde al control positivo de las pruebas de IES, IEM y Solubilización de P, mientras que la cepa C43SN7, al control positivo de la prueba de IAA. \*Los datos corresponden a la media de 15 réplicas  $\pm$  DE.



**Figura 4-10.** Fotografía de A) Prueba de compatibilidad entre *Pseudomonas* sp. PSL80 y las cepas de *Bacillus* spp. XT14 y XT17, donde se puede observar la carencia de halos de inhibición y la superposición de los crecimientos PSL80-XT14. B) Prueba de mineralización de ácido fítico en medio sólido NBRIP, las colonias con los halos de mayor tamaño corresponden a las cepas de *Pseudomonas* spp. (control positivo PSL95, PSL80 y PSL63).

El fósforo (P) constituye uno de los principales nutrientes necesarios para el óptimo desarrollo y funcionamiento metabólico de las plantas (Bouremani et al., 2023), pero a su vez, es el elemento menos disponible en el suelo (Kour, Rana, Yadav, et al., 2020). El fósforo crea complejos con el aluminio (Al), hierro (Fe) y calcio (Ca) presentes en el suelo, o bien, se encuentra en forma de fósforo orgánico, mayormente como ácido fítico (mioinositol 1,2,3,4,5,6- hexakisfosfato, IP6). Todos estos compuestos, son fuentes insolubles de P no asimilables por las plantas (Gomez-Ramirez & Uribe-Velez, 2021; Shulse et al., 2019). En condiciones de sequía, la deficiencia de fósforo en plantas tiende a intensificarse debido a la pérdida de agua del suelo que dificulta la solubilización y absorción del fósforo (Bouremani et al., 2023; Karimzadeh et al., 2021). Por esta razón, la presencia de bacterias en la rizósfera capaces de solubilizar el P a partir de formas de fósforo inorgánico ( $P_i$ ) u orgánico ( $P_o$ ) del suelo y hacerlo disponible para las plantas, juega un papel esencial.

Las bacterias incrementan el contenido de fósforo biodisponible a través de mecanismos como la expresión de fosfatasas y fitasas, que permiten liberar fosfatos desde el  $P_o$  (mineralización), y la exudación de agentes quelantes, ácidos orgánicos y protones, que ayudan a acidificar el entorno y movilizar el fósforo atrapado en fuentes minerales del suelo (solubilización) (Ghosh et al., 2023; Shulse et al., 2019; Yarzabal, 2010). Este hecho de acidificación, se observó en las pruebas de agar NBRIP suplementado con fosfato tricálcico y el indicador de pH (azul de bromotimol). Desde las 24 h de inoculación, se presentó el cambio de color del medio de verde a amarillo como consecuencia de la caída del pH, siendo más notorio alrededor de las colonias de las cepas PSL63 y PSL80 (Figura suplementaria 6-1). Es probable que la acidificación del medio haya sido producto del principal mecanismo de solubilización del fosfato, la producción de ácidos orgánicos (Saeid et al., 2018). Algunos de los ácidos orgánicos más frecuentemente reportados que podrían estar implicados en la solubilización son el ácido glucónico y 2-cetoglucónico en el caso de las Gram negativas (Estrada et al., 2013; Patiño-Torres & Sanclemente, 2014), y el ácido glucónico, láctico, acético, succínico y propiónico, en las especies de *Bacillus* (Saeid et al., 2018).

En este estudio, todas las cepas pudieron solubilizar y mineralizar fósforo a partir del fosfato tricálcico y ácido fítico, respectivamente (Tabla 4-5). Interesantemente, en el caso de la cepa XT14, en contraste con la prueba en placas de NBRIP donde no se observó la formación de halos de solubilización (IES) en las colonias, la evaluación de su actividad en medio líquido fue positiva, encontrándose una concentración de fósforo soluble de 158,7 mg  $PO_4$ -P/L en el sobrenadante (Tabla 4-5). Esta diferencia en los resultados de desempeño de las PGPB en las pruebas de solubilización en medios sólidos y líquidos, se ha observado en otras oportunidades (por ej., Amaya-Gómez et al. (2020), Pereira & Castro, (2014) y Nautiyal (1999)), razón por la cual es aconsejable evaluar varios métodos e incluir, de ser posible, más de una fuente de fósforo inorgánico (Bashan et al., 2012).

Teniendo en cuenta este último razonamiento, también se realizaron pruebas de solubilización con  $AlPO_4$ , una de las formas de fósforo más comunes en los suelos tropicales (Yarzabal, 2010). Sin embargo, en ninguno de los métodos utilizados para su evaluación se obtuvieron resultados

positivos, por lo que se deduce que las cepas no poseen la capacidad de solubilizar esta fuente de fósforo. También, existe la posibilidad de que la concentración empleada de fosfato de aluminio (0,3 % p/v) haya causado toxicidad a las bacterias, al liberarse los iones de  $Al^{3+}$  del compuesto tras la acidificación del medio (Piña & Cervantes, 1996). En este sentido, aunque la solubilización con fosfato tricálcico *in vitro* es la técnica más usada para aislar y seleccionar bacterias solubilizadoras (Bashan et al., 2012), resultaría conveniente realizar pruebas adicionales con fuentes diferentes de  $P_i$  para despejar cualquier duda sobre el potencial de las cepas en este aspecto.

La producción de fitohormonas, es considerado uno de los mecanismos más importantes a través de los cuales las PGPB promueven el crecimiento (Bouremani et al., 2023). El ácido indolacético (IAA), es un compuesto indólico y por mucho, la fitohormona tipo auxina más activa fisiológicamente en las plantas y ampliamente estudiada (Glick, 2020; Vurukonda et al., 2016). En las pruebas *in vitro*, se encontró que las cuatro cepas (PSL80, PSL63, XT14 y XT17) eran capaces de producir compuestos indólicos tipo IAA, especialmente XT17 y PSL63 con 2,5  $\mu g$  IAA/mL. Los compuestos tipo IAA de origen bacteriano, pueden propiciar en la planta el crecimiento de las raíces y órganos superficiales, la diferenciación de los tejidos vasculares, el desarrollo de raíces laterales y adventicias, así como incrementar la cantidad de exudados radicales, los que a su vez apoyan la actividad microbiana en la rizósfera y los procesos de colonización (Glick, 2020).

En condiciones de déficit hídrico, se ha reportado que plantas inoculadas con PGPB productoras de IAA han incrementado su resistencia al estrés (p. ej. Shirinbayan et al. (2019), Armada et al. (2014) y Arzanesh et al. (2011)), presentando efectos beneficiosos en el aumento de biomasa aérea, cambios en la arquitectura de las raíces y mejoras en el contenido de agua y nutrientes. Tales beneficios se han logrado incluso con concentraciones bajas de auxinas, como las halladas en el presente estudio. Por ejemplo, Marulanda et al. (2009) informaron sobre plantas de trébol inoculadas con cepas de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus megaterium* productoras de IAA en el rango de 0,3 a 3,0  $\mu g$  IAA/mL, que mostraron mayor tolerancia a la sequía que aquellas sin inocular. Al respecto, también algunos autores mencionan que concentraciones elevadas de auxinas tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de las raíces (Dimkpa et al., 2009), y que los niveles adecuados a aplicar dependerán de la sensibilidad de los tejidos de cada planta a la fitohormona (Glick, 2020). Por ende, las cepas de estudio podrían llegar a estimular el crecimiento de las plantas debido a su producción de compuestos indólicos tipo IAA.

Los exopolisacáridos (EPS), son polímeros solubles de alto peso molecular secretados al ambiente por los microorganismos, que están compuestos principalmente por polisacáridos y proteínas, y en menor medida, por ácido urónico, lípidos y otras sustancias (Glick, 2020; Ilyas et al., 2020). Los EPS bacterianos pueden ser de tipo limo o capsular y actúan como barrera protectora de las células frente a condiciones ambientales adversas (Naseem & Bano, 2014). Su producción y composición específica, es decir, el tipo de azúcares, proteínas y lípidos que los conforman, están influenciados por la fase de crecimiento y la especie bacteriana, así como por la composición del medio de cultivo (proporción C/N) y las condiciones ambientales del entorno de la célula (Morcillo & Manzanera, 2021; Kaushal & Wani, 2016b). A su vez, son los principales componentes de la matriz extracelular

que dan forma a la biopelícula (Naseem et al., 2018; Naseem & Bano, 2014). La formación de biopelícula es considerado un mecanismo clave en la colonización exitosa de las raíces empleado por las PGPR, que les permite adherirse firmemente y establecer una relación simbiótica con la planta (Knights et al., 2021; Zhang et al., 2019).

En condiciones limitadas de agua, la liberación de EPS por las bacterias presentes en la rizósfera ha demostrado ofrecer protección de la desecación a las plantas. Los EPS favorecen la formación de biopelículas con alto contenido de agua (~97%) alrededor de las raíces (rizovainas), que retardan la deshidratación y las consecuencias deletéreas del estrés en la planta (Morcillo & Manzanera, 2021; Naseem et al., 2018). Además, los EPS mejoran la capacidad de retención de agua y la estructura del suelo gracias a las fuerzas intermoleculares de atracción, como puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, y mecanismos de adsorción de aniones entre los EPS y las partículas del suelo (Morcillo & Manzanera, 2021; Bashan et al., 2004). Así mismo, facilitan la difusión de agua y nutrientes esenciales hacia la planta (Ghosh et al., 2019; Kour et al., 2019) y pueden funcionar como potentes eliminadores de ROS (Singh et al., 2021).

En este trabajo se evidenció que todas las cepas bacterianas secretan sustancias poliméricas extracelulares, siendo posible detectar concentraciones de EPS en el rango de 25,7 (PSL63) a 42,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (XT14) en medio líquido LB tras 24 h de incubación. Al respecto, se ha reportado que las plantas tratadas con bacterias de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. productoras de EPS presentan una mayor resistencia al estrés hídrico (p. ej. Naseem et al. (2021), Niu et al. (2018), Vurukonda et al. (2016), Zhang et al. (2015), Naseem & Bano (2014) y Vardharajula et al. (2011)). Esto se debe al aumento en la humedad y cantidad de suelo adherido a las raíces, así como a cambios en la porosidad y formación de agregados estables del suelo. Dichos efectos mejoran el flujo de agua hacia las raíces, afectan positivamente el estado hídrico de la planta, permiten el enraizamiento y promueven su crecimiento en condiciones de escasez de agua. En este sentido, la característica de producción de EPS determinada en las cepas es un rasgo de promoción del crecimiento bastante favorable que podría contribuir en el alivio del estrés por sequía en las plantas de maíz.

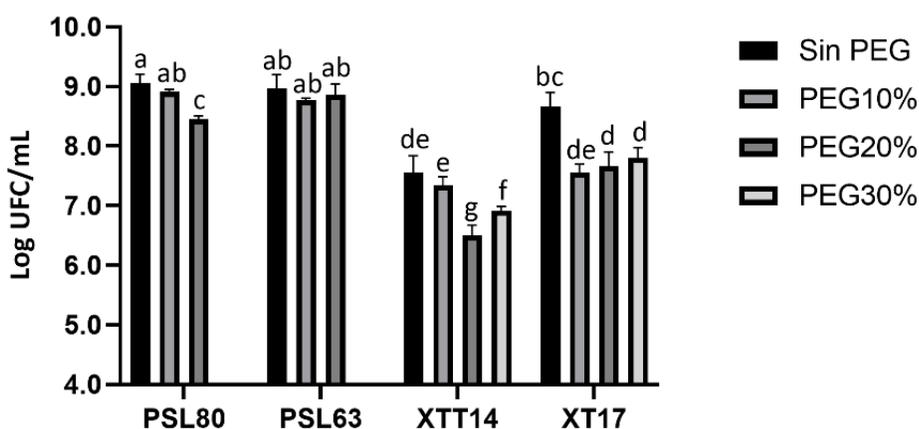
#### **4.3.2 Tolerancia al estrés osmótico**

La población bacteriana de cada cepa fue monitoreada tras 24 h de someterse a estrés osmótico utilizando caldo LB con Polietilenglicol (PEG) 6000. El PEG, es un polímero inerte que permite bajar el potencial hídrico del medio y ha sido utilizado comúnmente para simular las condiciones de estrés por sequía o déficit hídrico (Embiale et al., 2016; Smith et al., 1985). Esto se debe, a que el oxígeno presente en los grupos funcionales de éter en la estructura del PEG forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, disminuyendo así el agua libre disponible en el medio y dificultando su ingreso hacia el interior de las células (Ghosh et al., 2019; Almansouri et al., 2001; Michel & Kaufmann, 1973). Concentraciones de PEG 6000 de 0, 10%, 20% y 30% (p/v) fueron usadas

para someter a las bacterias a potenciales hídricos teóricos de 0, -0,13, -0,45 y -0,95 MPa respectivamente de acuerdo con los cálculos propuestos por Michel & Kaufman (1973).

Las cuatro cepas presentaron mayor crecimiento en los tratamientos control (Sin PEG) que en las condiciones de estrés (Figura 4-11). Las cepas PSL80 y PSL63 alcanzaron una población de  $1,2 \times 10^9$  y  $1,0 \times 10^9$  UFC/mL respectivamente en el medio de cultivo sin el estresor, mientras que XT17 y XT14 presentaron poblaciones de menor concentración con  $5,0 \times 10^8$  y  $4,2 \times 10^7$  UFC/mL, respectivamente. Se encontró que el estrés osmótico de -0,13 MPa generado por la adición de PEG al 10% al medio líquido, no afectó de forma importante el crecimiento de las cepas PSL63, PSL80 y XT14 (Figura 4-11). En el caso de XT17, este mismo nivel de estrés generó una reducción del 12,8% de la población ( $p < 0,05$ ) expresada en términos del Log (UFC/mL) en contraste con el control. Sin embargo, al exponer a XT17 a grados más altos de estrés osmótico (PEG al 20% y 30%), el impacto en el crecimiento no fue proporcional al nivel de estrés, sino que se mantuvo similar al presentado con PEG al 10%, con reducciones en la población entre 9,9% y 11,6%.

En la concentración de PEG al 20%, es decir, a un potencial hídrico de -0,45 MPa, se presentaron reducciones del 6,6% ( $p < 0,05$ ) en la población de PSL80 y del 14,0% ( $p < 0,05$ ) en la de XT14, en comparación con los controles (Figura 4-11). Interesantemente, no fue posible detectar células viables de las cepas PSL63 y PSL80 mediante el método de recuento en placa en la condición de PEG al 30% (-0,95 MPa). Este resultado fue consistente en las repeticiones del ensayo en el tiempo.



**Figura 4-11.** Efecto del estrés osmótico inducido por diferentes concentraciones de PEG 6000 (0, 10, 20 y 30% p/v) sobre la población bacteriana de PSL80, PSL63, XT14 y XT17, tras 24 h de crecimiento. Los datos corresponden a la media de 3 réplicas  $\pm$  DE. Letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes a  $p < 0,05$  con la prueba de rango múltiple de Duncan.

Es necesario que cualquier PGPB que presente potencial en la mitigación del estrés por sequía, sea capaz de sobrevivir y crecer bajo condiciones de estrés osmótico (Ghosh et al., 2019). De esta

manera, es más probable que pueda adaptarse a un ambiente deficiente de agua en la rizósfera y brinde protección a la planta a través de sus atributos de promoción del crecimiento.

En este estudio, todas las cepas pudieron crecer hasta un nivel de estrés osmótico teórico de -0,45 MPa, siendo la cepa *Pseudomonas fluorescens* PSL63 la que mayor tolerancia presentó, ya que sostuvo su población sin cambios relevantes bajo condiciones de estrés (Figura 4-11). No obstante, en el nivel más alto de estrés evaluado (PEG 30%, -0,95 MPa), sólo las cepas de *Bacillus* spp. (XT14 y XT17) fueron capaces de crecer. Estas observaciones son consistentes con estudios anteriores realizados por otros investigadores, quienes también han informado un mejor rendimiento de algunas cepas de *Bacillus* en términos de resistencia y crecimiento bajo estrés osmótico (Ghosh et al., 2019; Praveen Kumar et al., 2014; Saleem et al., 2021).

Una de las probables razones por las cuales las bacterias del género *Bacillus* han presentado mayor tolerancia al estrés por sequía y otros tipos de estreses abióticos, es su capacidad de formar endosporas (Praveen Kumar et al., 2014). Las endosporas, son estructuras complejas, excepcionalmente resistentes a estreses ambientales, ricas en ácido dipicolínico y calcio, que les permiten a las células permanecer en estado de dormancia durante largos períodos hasta que las condiciones del entorno son favorables (Willey et al., 2008). También, se ha encontrado que gracias a la presencia de una gruesa pared de peptidoglicano en la estructura celular, las bacterias Gram positivas, como los *Bacillus*, pueden ser más resistentes a las presiones osmóticas que las bacterias Gram negativas (Glick, 2020; Naylor & Coleman-Derr, 2018). Además, es importante resaltar, que las cepas de *Bacillus* spp. XT14 y XT17 fueron aisladas de la rizósfera de pastos de suelos semiáridos del Cesar, por lo que es probable que cuenten con mecanismos metabólicos de adaptación a condiciones de déficit hídrico.

Por otro lado, también se han reportado estudios sobre cepas de *Pseudomonas* capaces de tolerar altos grados de estrés osmótico. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Sandhya y Ali (2015) se menciona que la cepa *P. putida* GAP—P45 pudo crecer a un potencial hídrico de -0,73 MPa, debido a su remarcable capacidad de producción de EPS. En general, aunque las cepas de *Pseudomonas* spp. PSL63 y PSL80 no lograron sobrevivir a un estrés osmótico teórico mayor de -0,45 MPa, este resultado es superior al reportado por Ali et al. (2014) para 32 cepas de *Pseudomonas fluorescens* mitigadoras del estrés por sequía, donde el nivel máximo tolerado fue de -0,3 MPa, o equiparable al presentado por Ilyas et al. (2020), en el cual sólo dos de las 24 cepas evaluadas, pertenecientes a las especies de *B. subtilis* y *A. brasilense*, lograron crecer en caldo nutritivo suplementado con PEG 6000 al 20 y 25 % p/v.

En cuanto al estrés osmótico y su relación con el grado de estrés hídrico experimentado por las plantas, en la revisión de Osmolovskaya et al. (2018) y las investigaciones realizadas por Liu et al. (2010) y Nayyar y Gupta (2006), se menciona que valores de potencial hídrico del sustrato en el rango de -0,4 y -1,0 MPa, se asocian con niveles de estrés hídricos en las plantas de leves a moderados. En este contexto, se podría suponer que la adición de PEG 6000 al medio en proporciones del 20% (-0,45 MPa) y 30% (-0,95 MPa) p/v empleadas en el presente trabajo,

simularían condiciones de déficit hídrico semejantes. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las presiones osmóticas de este estudio no fueron medidas con algún equipo en particular, por lo que podrían ser aún mayores considerando la composición y viscosidad del caldo de cultivo (LB). Al respecto, Saleem et al. (2021) mencionan que concentraciones de PEG al 10%, 20% y 30 % p/v en caldo tripticasa soya (TSB) determinadas mediante osmómetro, corresponden a -0,60 MPa, -1,46 MPa y -2,10 MPa respectivamente, mientras que Bhatt et al. (2015) señalan en su estudio, que el caldo LB con 25% p/v de PEG 8000 posee un potencial hídrico de -1,9 MPa. Lo anterior sugiere, que la capacidad real de las cepas para tolerar el estrés osmótico podría ser mucho mayor de lo esperado, especialmente, en el caso de las cepas XT14 y XT17.

Con base en lo expuesto, la condición máxima de estrés osmótico tolerada por las cuatro cepas (PEG al 20% p/v), fue seleccionada para realizar estudios adicionales relacionados con rasgos de promoción de las PGBP bajo condiciones simuladas de estrés por déficit hídrico.

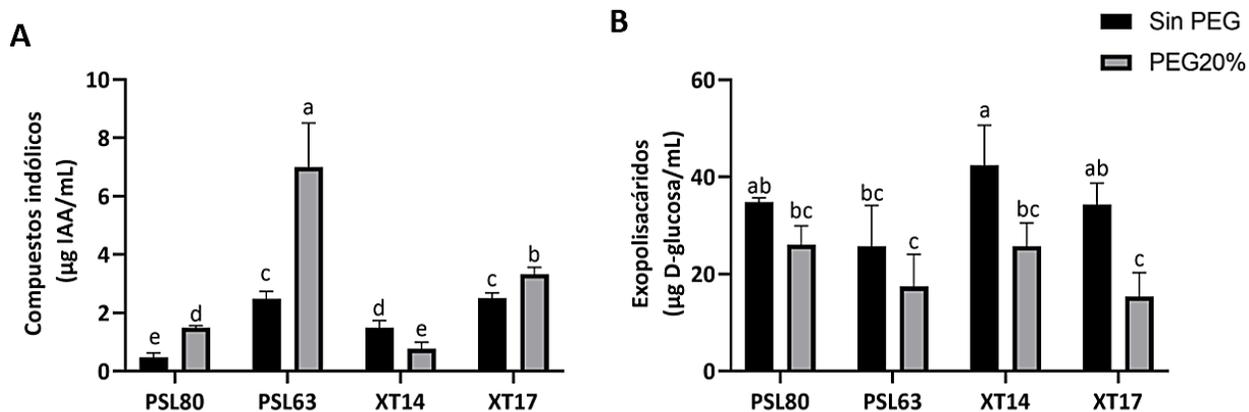
- **Actividades de promoción del crecimiento en condiciones simuladas de estrés por déficit hídrico**

Considerando que las cepas PSL63, PSL80, XT14 y XT17 se seleccionaron como PGPB con potencial de mitigar el estrés por sequía en plantas de maíz, resultó crucial determinar si algunas de sus características de promoción del crecimiento permanecían activas en condiciones de déficit hídrico. Por esta razón, la capacidad de producir compuestos indólicos tipo IAA y EPS también se evaluó bajo estrés hídrico, el cual fue inducido mediante la adición de PEG 6000 al medio de crecimiento a una concentración del 20% (p/v).

En el caso de los compuestos indólicos, las concentraciones medidas en el sobrenadante oscilaron entre 0,8 y 7,0  $\mu\text{g}$  IAA/mL (Figura 4-12, A). El estrés osmótico tuvo un efecto considerable ( $p < 0,05$ ) en este parámetro para las cepas PSL80 y PSL63, incrementándolo hasta en 3,2 y 2,8 veces respectivamente, y en un 33,0% en la cepa XT17 frente a la condición sin estrés. Sin embargo, en el caso de la cepa XT14, se afectó negativamente ( $p < 0,05$ ) reduciéndose en un 47,8%. La cepa PSL63 presentó la mayor capacidad en este aspecto, tanto en condiciones estrés y sin estrés, mostrando especialmente una respuesta notoria en la expresión de estos compuestos reguladores del crecimiento bajo condiciones de estrés, alcanzando una producción de 7,0  $\mu\text{g}$  IAA/mL.

El patrón observado en el comportamiento de las concentraciones de los compuestos tipo IAA, difiere de lo mencionado en algunos estudios llevados a cabo en configuraciones experimentales semejantes, donde la producción de IAA de cepas pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas* y *Bacillus* disminuyó ante el estrés hídrico simulado (Azeem et al., 2022; Karimzadeh et al., 2021; Saikia et al., 2018). Sobre este hecho, se ha sugerido que el IAA sintetizado por las bacterias no sólo sirve para mediar la relación planta-microorganismo, sino que también desempeña un rol en la protección celular ante el estrés ambiental, como el de tipo osmótico (Forni et al., 2017; Kaushal &

Wani, 2016a; Spaepen et al., 2007). Por ejemplo, Bianco et al. (2006) observaron que, cerca del 50% de la población bacteriana de *Escherichia coli* K-12 libre de IAA (control) murió tras ser sometida a estrés osmótico, mientras que el 70% de aquellas que fueron tratadas con IAA permanecieron viables. Los autores encontraron que el IAA en el medio desencadenó en las células un mayor nivel de alerta y protección contra condiciones adversas externas, al activar de manera coordinada diferentes sistemas de defensa tales como el ajuste osmótico y la reestructuración de la pared celular.



**Figura 4-12.** Producción de compuestos indólicos (A) y de exopolisacáridos (B) de las PGPB en condiciones de crecimiento óptimas y bajo estrés hídrico simulado por PEG 6000 al 20% p/v. Los datos corresponden a la media de 3 réplicas  $\pm$  DE. Letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes a  $p < 0,05$ .

En relación a lo mencionado anteriormente, Marulanda et al. (2009) sugieren que el incremento en la síntesis bacteriana de fitohormonas en condiciones de estrés osmótico, puede ayudar en la selección de cepas tolerantes mejor adaptadas y, por ende, servir como marcador de la resistencia a la sequía. En este sentido, dado que las cepas evaluadas no sólo fueron capaces de producir compuestos tipo IAA usando como precursor al triptófano, sino que la mayoría de ellas (PSL63, PSL80 y XT17) lograron aumentar los niveles de compuestos indólicos en la condición de estrés aplicada (Figura 4-12, A), podría indicar que la producción de este tipo de compuestos está relacionada con la capacidad de los aislamientos para adaptarse a condiciones de déficit hídrico. Además, considerando el hecho de que las plantas secretan naturalmente triptófano a través de sus raíces (Idris et al., 2007; Kravchenko et al., 2004), este atributo de las cepas podría ser bastante prometedor para estimular el crecimiento de las plantas y mejorar el rendimiento de cultivos durante los períodos de sequía.

En cuanto a los EPS, se determinaron concentraciones en el rango de 15,4 a 26,0  $\mu$ g D-glucosa/mL en condiciones de estrés osmótico. La producción de EPS en las cuatro cepas evaluadas se afectó negativamente en presencia del PEG en contraste con la condición normal (Figura 4-12, B), aunque la disminución sólo fue significativa estadísticamente ( $p < 0,05$ ) en el caso de XT14 y XT17, donde

la concentración se redujo en 39,3 y 55,1% respectivamente. Aun así, la capacidad de la cepa XT14 para producir EPS sobresalió en relación a las demás, logrando niveles de 25,7  $\mu\text{g}$  D-glucosa/mL, cantidad estadísticamente similar a la concentración más alta determinada bajo estrés en el presente estudio (26,0  $\mu\text{g}$  D-glucosa/mL, de PSL80).

Se ha señalado que la secreción de EPS cumple una función clave en la protección de las bacterias frente a ambientes hostiles (Bouremani et al., 2023; Donot et al., 2012). Además, se ha encontrado una relación entre el incremento de los niveles EPS y las condiciones deficientes de agua, debido a sus propiedades higroscópicas que permiten retener la humedad y facilitar la difusión de fuentes de carbono alrededor de la célula (Ali et al., 2014). Por ejemplo, Ashry et al. (2022) reportaron un incremento significativo en la producción de EPS de cepas de *Bacillus* spp. cuando se crecieron en medios de cultivo sumamente estresantes osmóticamente (potenciales hídricos de -0,73 a -1,2 MPa) en comparación con las condiciones sin estrés. También, Khan y Singh (2021) obtuvieron resultados similares en cepas de *Pseudomonas* sp. y *Serratia marcescens* sp., expuestas a estrés osmótico inducido mediante PEG 6000.

Sin embargo, los resultados de este estudio difieren de los hallazgos mencionados en cuanto a la tendencia en la síntesis de EPS bajo condiciones de estrés osmótico. Una posible razón podría ser la disminución de la población bacteriana causada por el estrés (Figura 4.8), lo que a su vez llevaría a una reducción en los niveles de EPS en el sobrenadante. Debido a que los resultados no se expresaron en función del tamaño de la población (p. ej. con base en mg de proteína celular o UFC), no es posible observar cambios sutiles en la producción de estos compuestos. Así mismo, es posible que las cepas estudiadas utilicen otras estrategias para adaptarse y protegerse durante períodos de escasez de agua, como la acumulación de prolina, trehalosa y glicina betaína al interior de la célula y la expresión de HSP (Ngumbi & Kloepper, 2016; Vílchez et al., 2016). Aun así, otros autores también han observado situaciones similares en respuesta al estrés osmótico. Por ejemplo, Ghosh et al. (2019) mencionaron que las cepas tolerantes *P. aeruginosa* PM389 y *B. tequilensis* J12 produjeron una cantidad menor o similar de EPS en comparación con sus contrapartes no estresadas. También, Ansari et al. (2021) reportaron la disminución hasta del 57,8% en la producción de EPS a -0,49 MPa en la cepa tolerante al déficit hídrico *P. azotoformans* FAP5. Por tanto, se requieren estudios adicionales para comprender mejor los mecanismos subyacentes y el trasfondo de estos comportamientos relacionados con la tolerancia de las cepas al estrés osmótico.

Por otro lado, es importante resaltar que, si bien los EPS son un constituyente fundamental de la biopelícula, la disminución en los niveles *in vitro* no necesariamente indica un detrimento en la formación de este importante mecanismo durante la interacción con la planta (Qurashi & Sabri, 2012). Esto se debe a dos condiciones principalmente. En primer lugar, ciertos polisacáridos exudados por la planta pueden disparar la formación de biopelícula de las bacterias en la proximidad de las raíces, al actuar como señales de control del regulador transcripcional maestro Spo0A y fuente de carbohidratos para la síntesis de EPS (Zhang et al., 2015; Beauregard et al., 2013). En segundo lugar, durante condiciones de estrés ambiental como la deshidratación, aumenta la competencia bacteriana por los nutrientes disponibles, lo que conlleva a que las bacterias reviertan

su estado plantónico y adopten un ensamblaje sésil que les permita protegerse y acceder fácilmente a los exudados radicales, formando microcolonias y biopelículas sobre las raíces (Kasim et al., 2016).

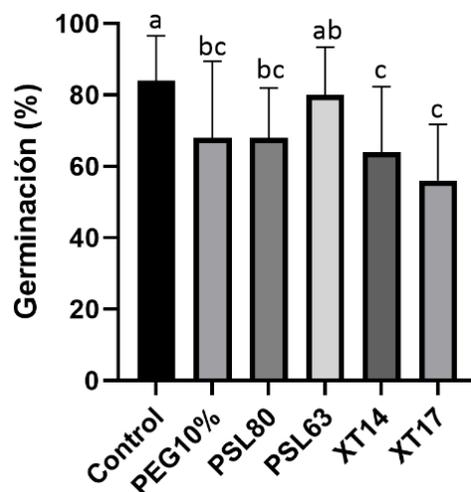
En resumen, la habilidad de las cepas osmotolerantes PSL80, PSL63, XT14 y XT17 para producir compuestos indólicos y EPS, fue detectada a nivel *in vitro* tanto en condiciones normales como en estrés osmótico (-0,45 MPa). Fue posible observar que el ambiente estresante del medio de crecimiento, provocó el incremento de la síntesis de compuestos tipo IAA en la mayoría de las cepas, mientras afectó negativamente la producción de EPS. De igual forma, el estrés afectó diferencialmente a las cepas de la misma especie/género influenciando su capacidad para sintetizar y liberar fitohormonas y exopolisacáridos. No obstante, los resultados obtenidos en esta sección (4.3.2) permitieron confirmar que todas las cepas poseen atributos de promoción del crecimiento para los cuales se ha descrito su potencial en la mitigación del estrés por déficit hídrico en cereales (Azeem et al., 2022; Devarajan et al., 2021; Latif et al., 2022).

#### 4.3.3 Efecto de las PGPR sobre la germinación en condiciones de déficit hídrico

Las semillas necesitan el estímulo del agua para activarse metabólicamente, romper la fase de dormancia y germinar (Aslam et al., 2015; Bewley, 1997). En ambientes secos, este proceso se puede ver inhibido debido a la pérdida de humedad del suelo (Aslam et al., 2015). En el contexto agrícola, la afectación del proceso de germinación conduce a una emergencia tardía o reducida y al pobre establecimiento de las plántulas, lo cual posteriormente disminuye el número de plantas por unidad de área y la producción de los cultivos (Abdelaal et al., 2021; Ilyas et al., 2021). Con el objeto de evaluar el efecto de las cepas seleccionadas sobre la germinación bajo condiciones de déficit hídrico, se llevó a cabo un ensayo *in vitro* en semillas de maíz ICA V109 tratadas con PGPB en presencia de PEG 6000 al 10% p/v (potencial hídrico teórico de -0,13 MPa), para inducir el estrés osmótico.

Los resultados evidenciaron (Figura 4-13) que el estrés osmótico generado por el PEG al 10%, ocasionó una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) del 19,0% de la germinación de las semillas de maíz sin inocular (control estrés), después de tres días de incubación. La germinación pasó del 84% en el control sin estrés, al 68% en el control expuesto al PEG. Adicionalmente, se confirmó que la disminución en la germinación se debió al estrés osmótico, al observar que las semillas que no habían germinado, lograron hacerlo al ser humedecidas en agua y puestas nuevamente en incubación (datos no mostrados).

En el caso de las semillas tratadas con las PGPB, la inoculación de la cepa *P. fluorescens* PSL63 aumentó el porcentaje de germinación en un 17,6%, aunque sin llegar a diferenciarse estadísticamente del control de estrés (Figura 4-13). Con los otros tratamientos bacterianos, no hubo un efecto relevante sobre este parámetro.



**Figura 4-13.** Evaluación *in vitro* del efecto de la inoculación de PGPB sobre la germinación (%) del maíz ICA V109 en presencia de PEG 6000 al 10% p/v. Los datos corresponden a la media de 10 réplicas  $\pm$  DE. Letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes a  $p < 0,05$ .

Los datos obtenidos permitieron constatar que el estrés impuesto afectó negativamente el proceso de germinación y que la inoculación de las semillas con la cepa PSL63, logró reducir el impacto en la variable, siendo posible alcanzar un desempeño similar al del control sin estrés. Este hecho, podría guardar relación con algunas de las capacidades de promoción del crecimiento de la cepa PSL63 observadas en condiciones de estrés hídrico (mencionadas en la sección 4.3.3), como lo son la producción de EPS (17,41  $\mu\text{g}$  D-glucosa/mL) y de compuestos tipo IAA (7,0  $\mu\text{g}$  IAA/mL). Los EPS pueden favorecer la retención de humedad en el medio y facilitar la adsorción de agua de la semilla, permitiendo que se alcance el umbral de hidratación requerido por el embrión para dar inicio a la elongación celular y el desarrollo de la radícula (Bouremani et al., 2023; Garrard, 1954). Por su parte, los compuestos indólicos tipo IAA exógenos, pueden acelerar los procesos metabólicos implicados en la germinación y emergencia de la raíz, al regular las hormonas endógenas y el metabolismo de la sacarosa en la semilla (T. Zhao et al., 2020). Estas afirmaciones son consistentes con los reportado en investigaciones previas. Por ejemplo, Ilyas et al. (2020) informaron de una mejora parecida (18,2%) en el porcentaje de germinación de semillas de trigo sometidas a estrés osmótico generado por PEG 6000, gracias a la inoculación combinada de dos cepas productoras de EPS (*Bacillus subtilis* y *Azospirillum brasilense*). De manera similar, Bakhshandeh et al. (2020) hallaron mejoría en la germinación *in vitro* de semillas de soya expuestas a condiciones de déficit hídrico, cuando fueron tratadas con cepas de *Bacillus* spp. capaces de sintetizar IAA.

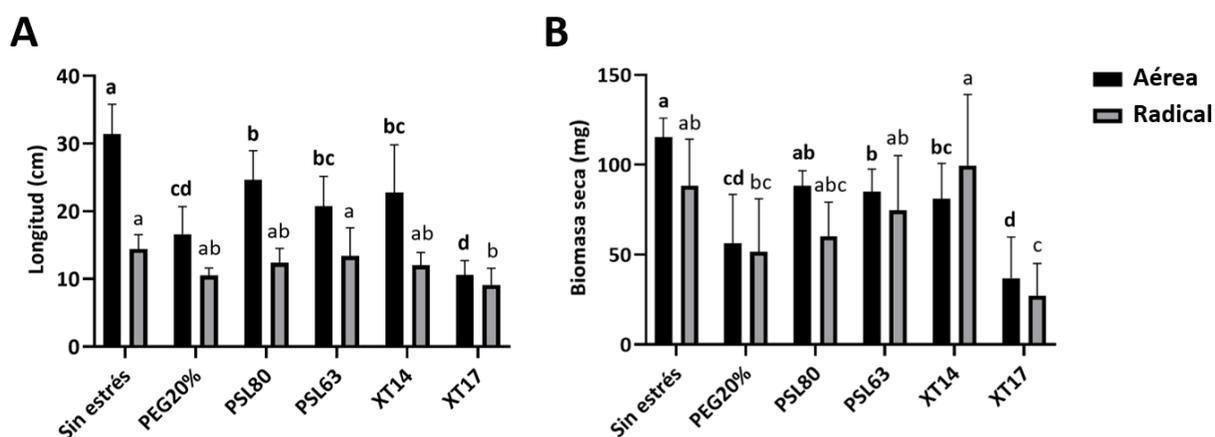
Por otra parte, los resultados anteriores que muestran el escaso o nulo efecto de la inoculación de las cepas sobre la germinación del maíz en este nivel de estrés osmótico, permiten entrever la importancia de evaluar el impacto del tratamiento bacteriano en la mitigación del estrés por sequía en diferentes estadios de desarrollo de la planta. Tal como se evidenció en el presente estudio, el efecto protector o de mitigación del estrés ejercido por las PGPB en el maíz ICA V109 fue diferente en el estado de planta y de semilla. Estos hallazgos, arrojan luz sobre dos puntos relevantes que

convendría profundizar en investigaciones futuras y que a menudo no son abordados; el momento óptimo en el que se debería aplicar el tratamiento bacteriano en las plantas a fin de maximizar los beneficios proporcionados por las PGPB y el alcance de su capacidad para mitigar el estrés en diferentes etapas del desarrollo de la planta.

#### 4.3.4 Colonización y permanencia de las PGPB en las raíces del maíz en sequía simulada

Para evaluar la capacidad de las cepas de colonizar las raíces y permanecer en ellas en condiciones de estrés por déficit hídrico, se realizó un experimento en cámara de crecimiento utilizando un sistema cerrado de frascos de vidrio con semillas de maíz germinadas y gravilla estéril como medio de soporte. En cada frasco se adicionó una solución nutritiva de Hoagland al 50% (v/v) suplementada con 20% (p/v) de PEG 6000, para simular las condiciones de estrés a un potencial hídrico teórico de -0,45 MPa (Michel & Kaufmann, 1973) durante 11 días. Al finalizar el experimento, se registraron las variaciones en la longitud y biomasa seca (aérea y radical) de las plantas, así como del número de colonias presentes en la rizósfera.

El estrés tuvo un impacto mayor en el crecimiento aéreo que en el de las raíces (Figura 4-14). En las plantas sin inoculación sometidas a estrés osmótico, la longitud y la biomasa seca aérea se redujeron en un 47,2% y 51,3% respectivamente, en contraste con las plantas sin estrés. También se observó la disminución de estos parámetros a nivel de las raíces en un 27,1% y 41,6% respectivamente (Figura 4-14), aunque sin alcanzar significancia estadística. Así mismo, se evidenció que el estrés provocó el enrollamiento foliar e influyó negativamente en el desarrollo del número de hojas, reduciéndose de tres (en el control sin estrés) a dos hojas por planta (Figura 4-15, A-B).

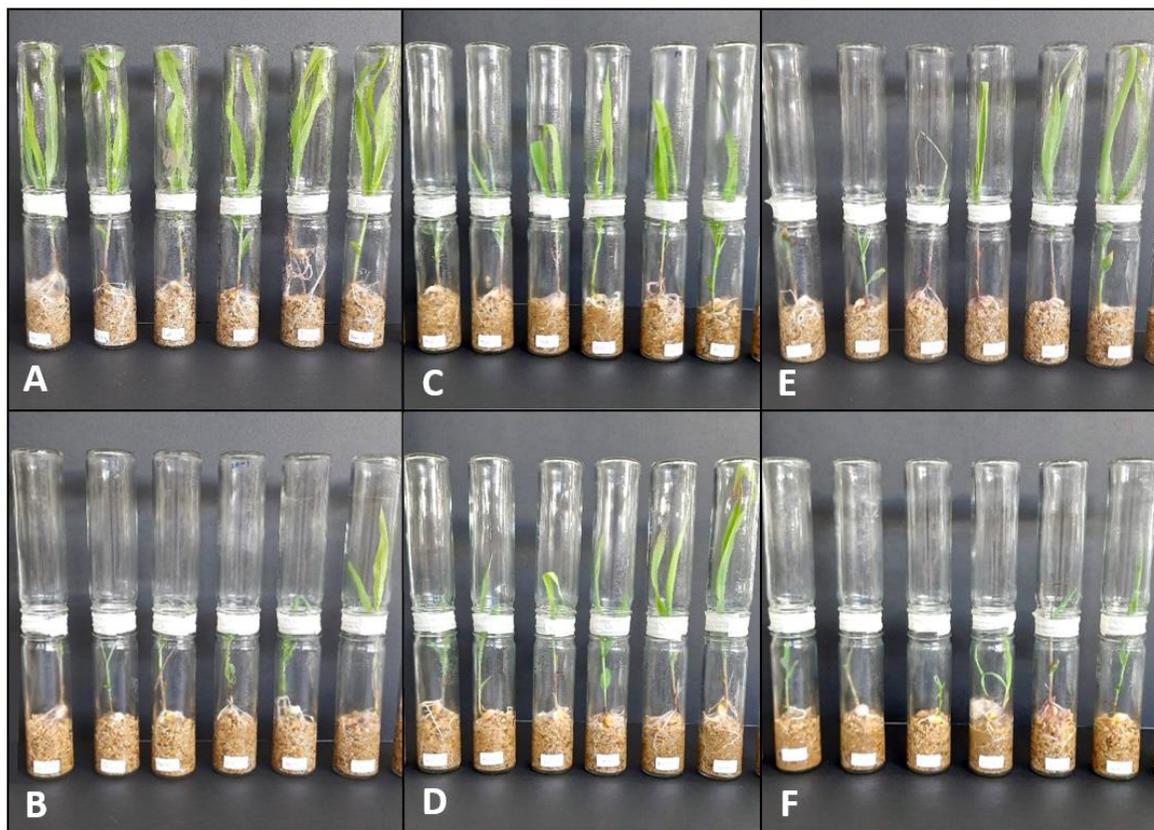


**Figura 4-14.** Efecto de la inoculación de PSL80, PSL63, XT14 y XT17 en plantas de maíz tras 11 días de déficit hídrico inducido mediante la adición de PEG 6000 al 20% (p/v) sobre la longitud (A) y biomasa seca (C) aérea y de raíz, en un sistema gnotobiótico. Los datos presentados corresponden a la media de 5 réplicas  $\pm$  DE. Letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes a un  $p < 0,05$  para cada parámetro medido la parte aérea (letras resaltadas en negrita) o las raíces (sin negrita).

En relación a los aislamientos, las cepas PSL63, PSL80 y XT14 atenuaron considerablemente el impacto del estrés en todos los parámetros morfológicos evaluados (Figura 4-14). En términos de la longitud de la parte aérea, se evidenciaron incrementos de hasta el 48,3% en comparación con el grupo control de estrés, siendo la cepa PSL80 la que exhibió el mayor desempeño ( $p < 0,05$ ). En cuanto a las raíces, los aumentos oscilaron entre el 14,3% y 27,4%, destacándose la cepa PSL63 en este aspecto.

A nivel de biomasa, estos tres aislamientos promovieron la acumulación de peso seco aéreo en el rango del 44,1% al 57,1% respecto a las plantas estresadas, siendo la variación significativa ( $p < 0,05$ ) en el caso de las cepas PSL80 y PSL63 (Figura 4-14). En las raíces, la cepa XT14 también exhibió un desempeño importante al incrementar la acumulación de biomasa en el sistema radical en un 93,2% en relación al control sometido a estrés, y hasta un 12,9% más en comparación con las plantas en condiciones óptimas de humedad.

En contraste con lo anterior, en el caso de la cepa XT17, su inoculación en las plantas no tuvo un efecto mitigador del estrés en los parámetros medidos, e incluso, se observó un rendimiento menor en comparación con las plantas control con PEG, aunque sin ser estadísticamente relevante.



**Figura 4-15.** Plántulas de maíz después de 11 días de estrés de sequía simulada en un sistema gnotobiótico de crecimiento. A) Control sin estrés, B) Control estresado (con PEG 6000 al 20% p/v), C) PSL80, D) PSL63, E) XT14 y F) XT17.

Por otro lado, tras 11 días de estrés, fue posible recuperar las bacterias correspondientes a cada tratamiento de la rizósfera de las plantas. En términos generales, las *Pseudomonas* spp. se encontraron en las raíces en cantidades celulares mayores que los *Bacillus* spp. La cepa PSL63 presentó los conteos más altos ( $p < 0,05$ ) con un promedio de  $4,4 \times 10^{-8}$  UFC/g Peso Seco (PS) raíz, seguida por PSL80 con  $1,3 \times 10^{-8}$  UFC/g PS raíz, mientras que las poblaciones de XT14 y XT17 estuvieron en un orden de magnitud menor, con  $2,1 \times 10^{-7}$  UFC/g PS raíz y  $1,0 \times 10^{-7}$  UFC/g PS raíz, respectivamente, a pesar de que todas las cepas partieron de un inóculo ajustado a  $1,0 \times 10^{-7}$  UFC/mL aproximadamente. Estos valores se presentan en la Tabla 4-6 expresados logarítmicamente ( $\text{Log}_{10}$ ). En los controles, no se observaron crecimientos de colonias entre las diluciones de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  sembradas en placas LB con ampicilina.

**Tabla 4-6.** Recuento de células de las cepas PSL80, PSL63, XT14 y XT17 presentes la rizósfera del maíz. Los recuentos celulares se determinaron en plántulas de maíz después de 11 días de estrés osmótico inducido por PEG al 20%.

Tratamiento	Log UFC/g PS raíz*	
Control sin estrés	No detectado**	
Control de estrés (PEG 20%)	No detectado**	
PSL80	8,0	ab
PSL63	8,5	a
XT14	7,3	bc
XT17	7,0	c

\*Los datos presentados corresponden a la media de 3 réplicas  $\pm$  DE. Letras distintas indican grupos estadísticamente diferentes a un  $p < 0,05$  bajo la prueba de rango múltiple de HSD de Tukey. PS: Peso seco.

\*\*No se detectaron colonias en las diluciones entre  $10^{-2}$  y  $10^{-6}$ .

En este modelo experimental, se evidenció un efecto más pronunciado del estrés por déficit hídrico en las plantas del grupo control en los parámetros de longitud y biomasa seca, en comparación con los resultados hallados en el ensayo de invernadero (sección 4.1.2). Por ejemplo, en el experimento en cámara de crecimiento donde se indujo el estrés mediante la aplicación de PEG, se presentó una reducción significativa del 47,2% en la longitud de la parte aérea, y en la biomasa seca tanto aérea como radical en más del 41%. En contraste, en el ensayo en invernadero, el crecimiento longitudinal aéreo no se vio afectado, la pérdida de biomasa seca aérea llegó máximo al 24% y en cuanto a las raíces, se estimuló su crecimiento tras la suspensión del riego hasta un 76% (sección 4.1.2). Las discrepancias encontradas entre ambos modelos (inducción de déficit hídrico mediante PEG y cese de riego), tanto en la magnitud del impacto del estrés como en los cambios observados en las respuestas morfológicas de las plantas de maíz ICA V109, sugieren que el nivel de estrés alcanzado en ambas configuraciones experimentales fue diferente, siendo más intenso en presencia del agente estresor osmótico (PEG) y en plantas de menor desarrollo.

Sobre este hecho, Aslam et al., (2015) señala que ante una sequía leve, las plantas activan mecanismos de evitación que promueven el crecimiento de las raíces. En cambio, en situaciones

de estrés de intensidad moderada a severa, la densidad, volumen y número de raíces tienden a reducirse, lo que resulta en un sistema radical menos desarrollado. Así mismo, las plantas de maíz responden de manera distinta a la sequía según la etapa de crecimiento en la que se encuentren. Por ejemplo, si el estrés hídrico ocurre durante las etapas de emergencia y establecimiento, la afectación en la elongación del tallo puede ser mayor que en etapas fenológicas más avanzadas (Zaman-Allah et al., 2016; Aslam et al., 2015). Estos hallazgos son coherentes con los resultados observados en este estudio.

Se ha mencionado que durante el estrés por sequía, las plantas incrementan la liberación de compuestos ricos en carbono orgánico a través de sus raíces (hasta un 71% más) y modifican el perfil de su rizodeposición (Henry et al., 2007), para favorecer rápidamente la composición y función de la comunidad microbiana de la rizósfera que les ayuda en su supervivencia (Karlowsky et al., 2018; Naylor & Coleman-Derr, 2018). Las bacterias del suelo son mayormente dependientes de los aportes de carbono derivados de las plantas para obtener energía y desarrollarse (Glick, 2020).

En el presente trabajo, se utilizó un montaje experimental bajo condiciones osmóticas estresantes, donde la única fuente de carbono disponible para las bacterias inoculadas en el sustrato, se encontraba en los compuestos exudados por las plantas. Con ello, se buscaba promover la quimiotaxis de las bacterias hacia las raíces y observar su capacidad para colonizar y persistir en ellas durante el déficit hídrico.

Teniendo como base los recuentos celulares, se encontró que las cepas evaluadas lograron establecerse en la superficie de las raíces de las plantas y mantenerse a lo largo del ensayo, siendo más exitosas en esta labor las cepas de *Pseudomonas fluorescens* (8,0 a 8,5 Log UFC/g PS raíz). En el caso de las cepas de *Bacillus* spp., en XT14 se presentaron recuentos aproximadamente un 5% superiores (en escala logarítmica) en comparación con XT17, difiriendo de los resultados hallados en los ensayos de tolerancia a estrés osmótico en cultivo líquido, donde XT14 presentó poblaciones considerablemente ( $p < 0,05$ ) de menor tamaño en el mismo nivel de estrés empleado, es decir, a una concentración de PEG del 20% p/v (sección 4.3.2, Figura 4-11). Lo anterior, podría sugerir una afinidad mayor de la cepa XT14 hacia los exudados del maíz y un mejor desempeño bajo estrés osmótico prolongado.

Resulta interesante resaltar que las cepas con las mayores densidades poblacionales en las raíces mostraron los resultados más prometedores en la mitigación del estrés (Figura 4-14). Este hallazgo concuerda con estudios anteriores realizados con cepas pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas* y *Bacillus*, donde se encontró que la eficaz colonización de las PGPB bajo estrés por sequía era elemental para mejorar atributos de crecimiento en las plantas de maíz, maní y trigo (Ahmad Ansari et al., 2023; Cesari et al., 2019; Niu et al., 2018). Por ejemplo, Sandhya et al. (2010), reportaron un efecto positivo superior sobre la biomasa seca de las plantas de maíz en condiciones de estrés hídrico, en aquellas donde las cepas de *Pseudomonas* se encontraban abundantemente en las raíces ( $4,0 \times 10^6$  a  $1,2 \times 10^8$  UFC/g suelo-raíz). Los autores sugieren que una población mayor

de bacterias tolerantes presente en las raíces de las plantas, puede estimular la rizodeposición, y consecuentemente, apoyar el incremento de la densidad bacteriana en la rizósfera, logrando un efecto más intenso en la promoción del crecimiento de la planta.

Entre las ventajas de usar las PGPB tolerantes a bajos potenciales hídricos, se destaca su capacidad mejorada para sobrevivir y persistir en el suelo durante la sequía en comparación con las bacterias no adaptadas. Esta característica, les permite competir de manera eficiente y colonizar la rizósfera, siendo este un paso crítico para lograr la interacción estrecha con la planta y establecer una relación simbiótica, que conlleve a la estimulación del crecimiento y tolerancia del estrés (Niu, 2018; Marulanda, 2009). Si bien en esta investigación no se determinó la formación de biopelícula sobre las raíces, es plausible que este haya sido el principal mecanismo por el cual las cepas se adhirieron y lograron permanecer en la rizósfera. Esta suposición se basa en su capacidad comprobada para secretar EPS en condiciones de estrés osmótico (sección 4.3.2), así como en los pasos metodológicos que se siguieron para recuperar sólo las bacterias que estuvieran fuertemente adheridas a la superficie radical, los cuales implicaron fases de lavado, agitación y sonicación.

Por otro lado, respecto a la diferencia notoria en la modulación de la respuesta de la planta y la mitigación del estrés, ejercido por la inoculación de estas cepas sobre la misma variedad de maíz en el experimento en condiciones de laboratorio frente al de invernadero (sección 4.1.2), podría atribuirse por lo menos a tres factores hipotéticos. El primero de ellos, se debe a las condiciones estériles en las que fue conducido el ensayo en cámara de crecimiento. Al utilizarse semillas desinfectadas superficialmente y un sustrato estéril, es probable que se haya evitado la competencia en la rizósfera con la comunidad microbiana nativa del suelo, dando ventaja al establecimiento de las cepas en las raíces y facilitado su interacción con la planta, permitiendo así observar un efecto más evidente en la mitigación del estrés. El segundo factor, podría deberse a un nivel de estrés mayor experimentado en las condiciones de laboratorio. Se ha reportado en estudios previos (García et al., 2017; Rolli et al., 2015; Sandhya et al., 2010), que la expresión de rasgos asociados a la promoción del crecimiento en las bacterias puede ser estimulada por el aumento del estrés, por lo que es factible que se hayan obtenido mejores resultados en la ganancia de biomasa y elongación de las plantas expuestas a condiciones más intensas. El tercer factor, podría atribuirse a la edad de la planta. Los resultados más favorables tras la inoculación de las cepas hallados en condiciones de laboratorio, podrían indicar que las PGPB evaluadas proporcionan un efecto mayor en la mitigación del estrés cuando han sido inoculadas desde las etapas tempranas de desarrollo de la planta en lugar de la semilla.

En resumen, con base en los resultados anteriores, se puede inferir que la capacidad de las cepas osmotolerantes PSL80, PSL63 y XT14 de expresar múltiples rasgos de PGP, tales como la habilidad para establecerse en la rizósfera, secretar fitohormonas (compuestos tipo IAA), mineralizar fósforo orgánico, captar hierro por medio de sideróforos (Moreno-Galván, Cortés-Patiño, et al., 2020; Laverde-Robayo, 2016), y en especial, de producir EPS, desempeñó un papel crucial en la

modulación de la respuesta de la planta, permitiendo contrarrestar los efectos nocivos del estrés osmótico inducido mediante el PEG.

En este sentido, los hallazgos mencionados tanto en los experimentos de invernadero como en laboratorio, sugieren que estas cepas tienen potencial para el desarrollo de bioinoculantes que mejoren significativamente la tolerancia de los cultivos en sitios con sequías recurrentes.

En la Tabla 4-7 se resumen los impactos y las reacciones fisiológicas y bioquímicas en la planta asociadas a la inoculación, así como los posibles mecanismos de acción bacterianos (rasgos de promoción del crecimiento) relacionados con la mitigación del estrés hídrico en el modelo del maíz, para las cepas que presentaron mayor potencial: PSL80, PSL63 y XT14.

**Tabla 4-7.** Beneficios de la inoculación de las PGPB en el maíz ante el déficit hídrico y sus posibles métodos de acción

<b>Cepa bacteriana</b>	<b>Posibles mecanismos de acción</b>	<b>Impacto en la planta asociado a la PGPB</b>	<b>Reacciones fisiológicas y bioquímicas asociadas a la PGPB</b>
<b>PSL63</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tolerancia a estrés osmótico (-0,45 MPa)</li> <li>- Establecimiento eficiente en las raíces</li> <li>- Producción compuestos indólicos (IAA)</li> <li>- Solubilización y mineralización de fósforo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incremento de biomasa seca aérea y radical (invernadero e <i>in vitro</i>)</li> <li>- Incremento de longitud de raíces (<i>in vitro</i>)</li> <li>- Mejora la germinación de semillas (<i>in vitro</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de prolina</li> <li>- Aumento de actividad GR</li> <li>- Aumento de Chla en hojas</li> </ul>
<b>PSL80</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tolerancia a estrés osmótico (-0,45 MPa)</li> <li>- Establecimiento eficiente en las raíces</li> <li>- Producción de EPS</li> <li>- Solubilización y mineralización de fósforo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incremento de RWC foliar (invernadero)</li> <li>- Incremento de biomasa seca aérea (<i>in vitro</i>)</li> <li>- Incremento de biomasa seca de las raíces (casa de malla)</li> <li>- Incremento de longitud de la parte aérea (<i>in vitro</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de solutos compatibles (azúcares totales solubles y prolina)</li> <li>- Aumento de Chla en hojas</li> <li>- Disminución de Car</li> <li>- Disminución de actividad GR y APX</li> </ul>
<b>XT14</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tolerancia a estrés osmótico (-0,95 MPa)</li> <li>- Establecimiento eficiente en las raíces</li> <li>- Producción de EPS</li> <li>- Solubilización de fósforo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incremento de biomasa seca aérea y radical (invernadero e <i>in vitro</i>)</li> <li>- Incremento de longitud aérea (<i>in vitro</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de actividad GR</li> <li>- Aumento de Chla en hojas</li> <li>- Disminución de actividad APX</li> <li>- Disminución de Car</li> </ul>



## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

En el maíz ICA V109, el estrés por déficit hídrico generó una respuesta diferente a nivel morfológico, bioquímico y fisiológico dependiendo del grado de estrés percibido por la planta. El estrés leve (bajo condiciones de invernadero), si bien impactó negativamente la ganancia de biomasa seca aérea, reduciéndola hasta un 24%, activó la respuesta antioxidante enzimática (a través de GR) y no enzimática (por medio de carotenoides) en las hojas, promovió la acumulación de solutos compatibles como prolina (+48%) y azúcares solubles (+74%) e indujo notablemente la formación de raíces (+76%) en comparación con las plantas irrigadas. Esto le permitió a la planta sostener sin mayores pérdidas el crecimiento longitudinal aéreo y el RWC. No obstante, cuando el estrés fue más intenso (moderado a severo), como el presentado en los ensayos de casa de malla e *in vitro*, se afectó significativamente la acumulación de biomasa aérea y radical (-61 y -42% respectivamente), y la altura (-47,2%). Adicionalmente, las plantas exhibieron un mayor nivel de deshidratación, evidenciado por reducciones significativas en el RWC y la conductancia estomática ( $g_s$ ). En este sentido, se presume que la variedad de maíz empleada posee un grado de tolerancia que le permite hacer frente al estrés por sequía leve, activando mecanismos de defensa y adaptación, pero su capacidad de respuesta se ve superada en condiciones de estrés más severo.

Por otra parte, los resultados obtenidos a nivel de invernadero revelaron que la bacterización con la mayoría de las cepas evaluadas moduló los mecanismos de respuesta al estrés hídrico en el maíz, afectando enzimas, pigmentos y/u osmolitos, de manera específica en cada interacción planta-bacteria. Se observó que, algunas de ellas reforzaron la capacidad intrínseca de la planta para resistir el estrés, lo cual se tradujo en una mejora notable en el estado hídrico (como con la *Pseudomonas* PSL80) y un aumento significativo en la ganancia de biomasa aérea (en los casos de PSL63, MT1C8, XT14 y MGC9), alcanzando hasta un 51% más que en las plantas control sin riego. En consecuencia, la inoculación con PGPB se presenta como una alternativa favorable para hacer frente a la sequía agronómica.

En las condiciones de estrés inducido mediante PEG (*in vitro*), las cepas *Pseudomonas fluorescens* PSL80 y PSL63 y, *Bacillus aryabhatai* XT14, exhibieron un desempeño superior en la mitigación del estrés en las plantas en comparación con las demás pruebas realizadas a lo largo de este trabajo. Se observaron incrementos significativos en la biomasa seca tanto aérea como de raíz, hasta un 57% y 93%, respectivamente, frente al control de sequía no inoculado. En contraste, en el ensayo

de casa de malla, la inoculación con las cepas no alteró la respuesta de las plantas en la mayoría de los parámetros evaluados, indicando que su desempeño se ve limitado en condiciones de estrés severo. Por ende, utilizar estas cepas en un rango de intensidad de estrés hídrico de leve a moderado permite potenciar sus beneficios.

El ensayo en cámara de crecimiento se propone como un experimento *in vitro* apropiado para la evaluación del estrés por déficit hídrico en las plantas y para analizar el efecto directo de las PGPB en su mitigación. Este enfoque proporciona un mayor control y uniformidad en el grado de estrés osmótico aplicado a cada unidad experimental, así como en los parámetros ambientales, al mismo tiempo que evita la interferencia de los microorganismos nativos del suelo. No obstante, para validar plenamente el potencial de las PGPB como agentes mitigadores del estrés, se requiere conducir estudios adicionales en condiciones más cercanas a las del cultivo.

También fue posible corroborar que la inoculación bacteriana tuvo efectos positivos en la disminución del estrés hídrico independientemente de los medios de soporte utilizados, como suelo y gravilla, la condición de esterilidad del sustrato y la forma de inducción del déficit hídrico, como el cese del riego y el uso de un estresor osmótico (PEG). Lo anterior, evidenció la capacidad de las bacterias para interactuar con la planta en diferentes ambientes bajo estrés.

Finalmente, los resultados de este estudio indicaron que las cepas osmotolerantes *Pseudomonas fluorescens* PSL80 y PSL63 y *Bacillus aryabhatai* XT14 expresan múltiples rasgos de PGP que incluyen la habilidad de establecerse en la rizósfera en condiciones de estrés, secretar fitohormonas (compuestos tipo IAA), mineralizar y solubilizar fósforo y producir EPS. Estos rasgos de promoción desempeñaron un papel crucial en la modulación de la respuesta de la planta al estrés osmótico inducido por PEG y, muy probablemente, en los ensayos de déficit hídrico en matera. Se sugiere que la acumulación de los solutos compatibles prolina y carbohidratos solubles, así como el aumento de clorofila a y de la actividad antioxidante de GR inducida por las bacterias, permitieron contrarrestar los efectos nocivos y mejorar la tolerancia de la planta al estrés hídrico. Por tanto, se considera que estas cepas poseen un potencial significativo para el desarrollo de bioinoculantes que mejoren la tolerancia de los cultivos en regiones propensas a la sequía.

## 5.2 Recomendaciones

En futuros proyectos que busquen evaluar la respuesta de las plantas inoculadas con PGPB al estrés por sequía llevados a cabo en materas, se recomienda ajustar la duración del ensayo principalmente con base en el nivel de deshidratación de la planta y otros cambios morfológicos observables (como pérdida de turgencia o plegado de las hojas), dependiendo de la intensidad del estrés deseado. Si bien, medir la pérdida de humedad del sustrato es una práctica común, no se relaciona directamente con el grado de estrés percibido por la planta, ya que algunas de ellas poseen mecanismos de resistencia al estrés que podrían enmascarar o dificultar la interpretación del efecto de la aplicación bacteriana.

En esta misma línea, se recomienda poner a punto la metodología para evaluar el estrés por déficit hídrico en las condiciones específicas de casa de malla y de esta forma, verificar el efecto de las PGPB en la mitigación del estrés en un ambiente similar al de campo en el departamento del Cesar.

Es crucial continuar verificando que los rasgos de promoción y crecimiento de las cepas se encuentren activos aún en condiciones simuladas o inducidas de estrés hídrico, tales como la capacidad de solubilizar fósforo a partir de diferentes fuentes inorgánicas y la actividad de ACC desaminasa, para lograr establecer conexiones con los efectos de mitigación observados en planta.

Se recomienda conducir experimentos y análisis adicionales tendientes a determinar los mecanismos subyacentes a través de los cuales las bacterias con desempeño sobresaliente confieren tolerancia al déficit hídrico en las plantas. Esto podría incluir la evaluación de la expresión de genes en la planta asociados con la tolerancia al estrés por deshidratación y oxidativo que puedan ser estimulados tras la inoculación bacteriana, así como la detección de genes en las cepas vinculados a la tolerancia osmótica y promoción del crecimiento.

Al margen de los resultados de este trabajo, resultaría conveniente conducir pruebas de mayor duración y en campo, para determinar el efecto protector de las cepas frente al estrés hídrico en diferentes estados de desarrollo del maíz y bajo condiciones ambientales reales. Es importante incluir el monitoreo de parámetros fisiológicos adicionales que permitan ampliar el conocimiento sobre los efectos del estrés en la planta (por ejemplo, la medición de la tasa de transpiración, la fluorescencia de la clorofila y eficiencia del uso del agua), así como cambios a nivel anatómicos en la planta (p.ej. engrosamiento de cutícula, formación de tricomas y densidad de estomas).

Dado los resultados con las tres cepas más promisorias en la mitigación del estrés y considerando que en la literatura se encuentra evidencia sobre los mayores beneficios de las co-inoculaciones, se aconseja conducir experimentos que permitan validar esta idea. Podría existir complementariedad en las características de promoción de las bacterias y que sus efectos benéficos sobre la planta en estrés, sean potenciados.

En las pruebas de colonización, fue posible aislar las cepas de las raíces de las plantas, lo cual sugiere que las bacterias podrían haber sido atraídas por los exudados radicales. Se recomienda llevar a cabo investigaciones adicionales para esclarecer el fenómeno, puesto que podría ser un área de estudio con posibles aplicaciones para fortalecer la efectividad de las cepas en la colonización y protección de las plantas.

Por último, considerando que las plantas son más susceptibles a infecciones en situaciones de estrés, se recomienda evaluar la actividad antagonista de las cepas seleccionadas (PSL80, PSL63 y XT14) frente a los principales patógenos del maíz.

## 6. Material suplementario

## Anexo 1. Composición del abono orgánico ABONAZA

Nombre comercial del producto: ABONAZA

No. Registro ICA: 482 (04/11/1994)



**Tabla suplementaria 6-1.** Composición porcentual del abono orgánico ABONAZA, declarada en el empaque del producto.

<b>Componente</b>	<b>Aporte máximo (%)</b>
Nitrógeno total (N)	2,36
Fósforo total (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	2,34
Potasio soluble (K <sub>2</sub> O)	1,95
Calcio (Ca)	3,23
Carbono orgánico oxidable total	15,00
Relación Carbono Nitrógeno (C/N)	6,22
Cenizas	42,86
Humedad	17,28

### Otras características

- Preparado a partir de: Gallinaza compostada (85%) y Porquinaza compostada (15%)
- pH: 6,35
- Densidad a 20°C (base seca): 0,42 g/cm<sup>3</sup>
- Capacidad de retención de agua: 205,00%
- Microelementos: Calcio, Hierro, Cobre, Zinc, Magnesio, Cobalto, Boro, entre otros.
- Contenido de metales pesados: No excede los límites establecidos en la NTC-5167 (primera actualización).

## Anexo 2. Prueba preliminar de germinación del maíz ICA V109 bajo estrés osmótico inducido por PEG

Se realizó una prueba preliminar para determinar la concentración más adecuada de PEG 6000 que se podría utilizar para afectar la germinación del maíz sin llegar a inhibirla y así, probar posteriormente el efecto de las PGPB sobre esta variable en condiciones de déficit hídrico inducido. La prueba se realizó como se describe en la sección 3.3.2 con semillas estériles y agua ultrapura. Se realizaron tres repeticiones independientes de la prueba.

**Tabla suplementaria 6-2.** Pruebas de germinación de semillas de maíz ICA V109 a los 3 días con diferentes concentraciones de PEG 6000. Se utilizaron 50 semillas de maíz para cada prueba.

Concentraciones de PEG6000 (g/L H <sub>2</sub> O)	Número de semillas germinadas					
	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3	
	3 días	%	3 días	%	3 días	%
0	47	94%	42	84%	41	82%
5	38	76%	37	74%	38	76%
<b>10</b>	32	64%	32	64%	34	68%
20	3	6%	2	4%	3	6%
30	0	0%	0	0%	0	0%

### Anexo 3. Resultados de la variable longitud aérea de la planta en los ensayos de invernadero

**Tabla suplementaria 6-3.** Resultados de altura para los grupos 1 y 2 de los ensayos de invernadero en plantas de maíz de 10 días, con riego al 80% de la capacidad de campo. Los valores corresponden a la media de 15 réplicas por tratamiento  $\pm$  DE.

Tratamiento	Altura (cm)	DE	ANOVA
<b>Grupo 1</b>			$p = 0,2737$
XT14	29,3	5,2	Sin diferencias estadísticas
MT1C8	28,5	4,7	
2755	28,2	5,1	
PSL80	31,3	6,2	
PSL63	32,1	5,7	
Cont. Irrigado	30,3	5,0	
Cont. Sequía	31,7	5,5	
<b>Grupo 2</b>			
MGC9	19,4	2,3	Sin diferencias estadísticas
XT17	19,5	2,6	
XT13	19,4	3,0	
XT110	19,4	2,0	
XT38	19,9	1,9	
Cont. Irrigado	19,7	2,0	
Cont. Sequía	17,9	2,2	

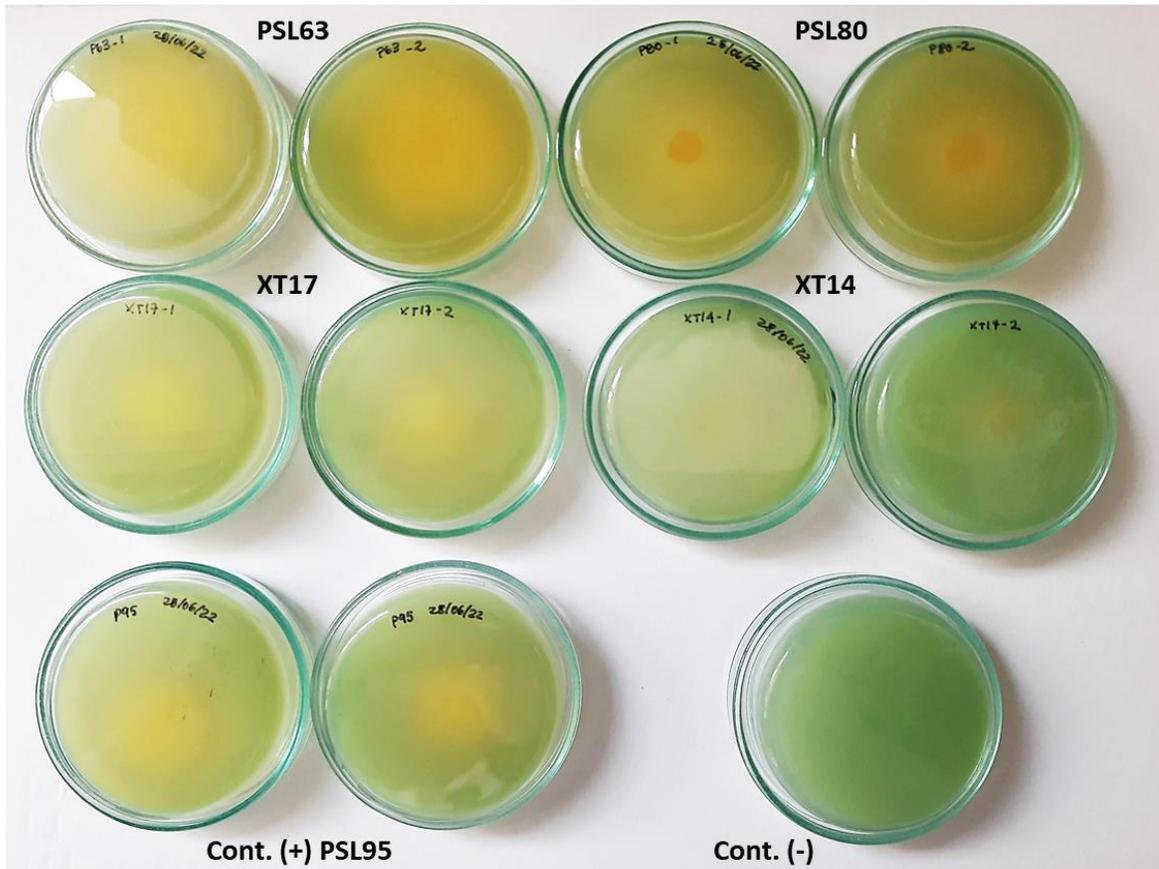
**Tabla suplementaria 6-4.** Resultados de altura para los grupos 1 y 2 de los ensayos de invernadero en plantas de maíz de 31 días, después de 11 días de estrés hídrico. Los valores corresponden a la media de 15 réplicas por tratamiento  $\pm$  DE.

Tratamiento	Altura (cm)	DE	ANOVA
<b>Grupo 1</b>			$p = 0,0607$
XT14	48,8	8,9	Sin diferencias estadísticas
MT1C8	48,5	5,5	
2755	44,8	7,5	
PSL80	44,2	6,5	
PSL63	50,7	5,1	
Cont. Irrigado	45,3	6,5	
Cont. Sequía	49,5	7,4	

**Continuación Tabla suplementaria 6-4.** Resultados de altura para los grupos 1 y 2 de los ensayos de invernadero en plantas de maíz de 31 días, después de 11 días de estrés hídrico. Los valores corresponden a la media de 15 réplicas por tratamiento  $\pm$  DE.

Tratamiento	Altura (cm)	DE	ANOVA
<b>Grupo 2</b>			$p = 0,3249$
MGC9	46,5	6,7	
XT17	42,7	4,4	
XT13	43,8	6,0	
			Sin diferencias estadísticas
XT110	44,3	6,8	
XT38	41,3	5,7	
Cont. Irrigado	43,0	4,8	
Cont. Sequía	43,7	5,5	

## Anexo 4. Resultados de solubilización de fosfato tricálcico en placas NBRIP



**Figura suplementaria 6-1.** Prueba preliminar de solubilización de fosfato tricálcico en placas de NBRIP, con indicador de pH a las 24 h de inoculación. El color verde del medio indica un pH aproximado de 7,0. Entre menor es el pH, este se torna amarillo.

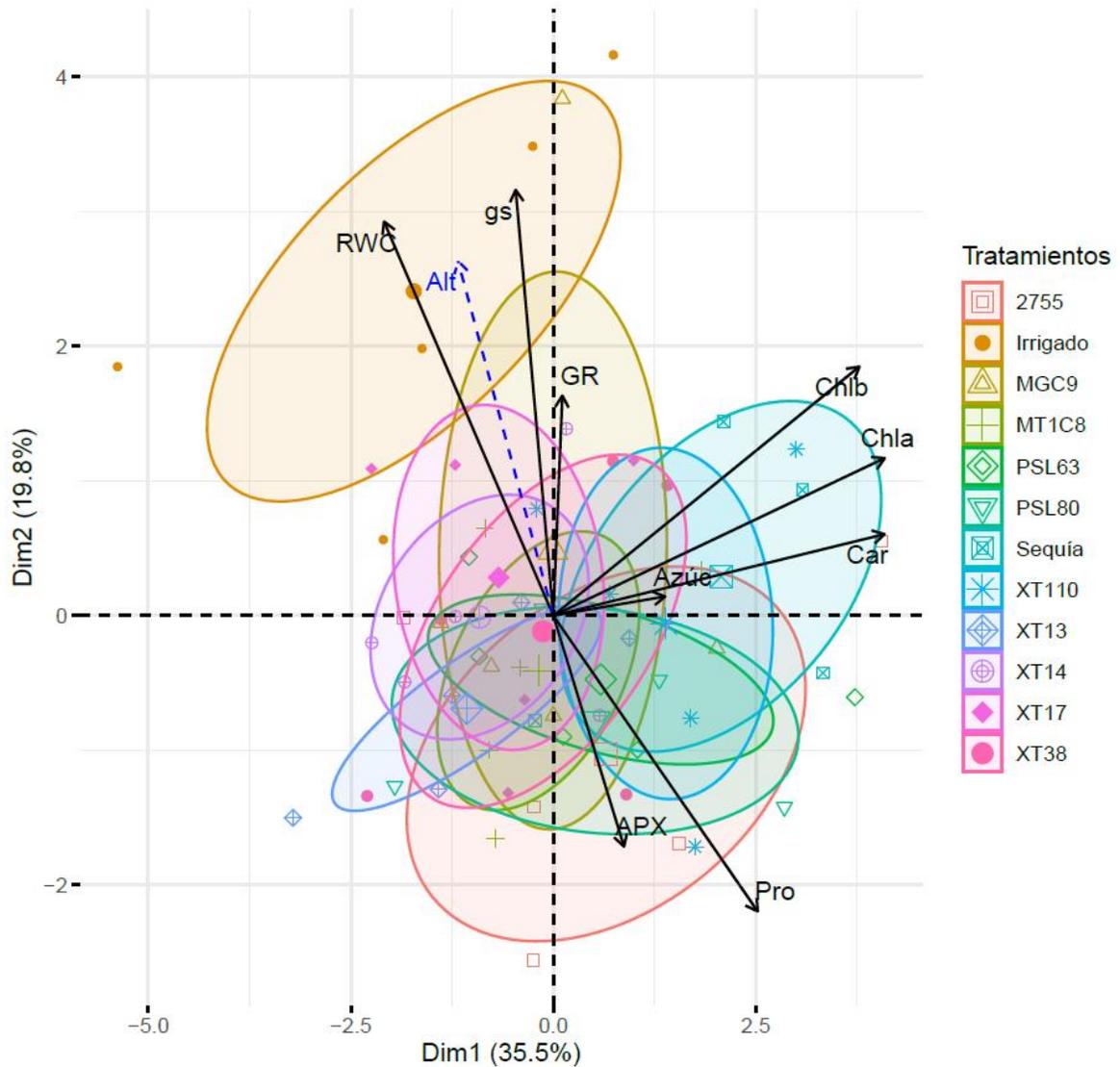
## Anexo 5. Resultados de parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos determinados en el ensayo de casa de malla

**Tabla suplementaria 6-5.** Efecto de la inoculación de las PGPB sobre parámetros fisiológicos y bioquímicos en plantas de maíz de inoculadas con PGPB en condiciones de déficit hídrico

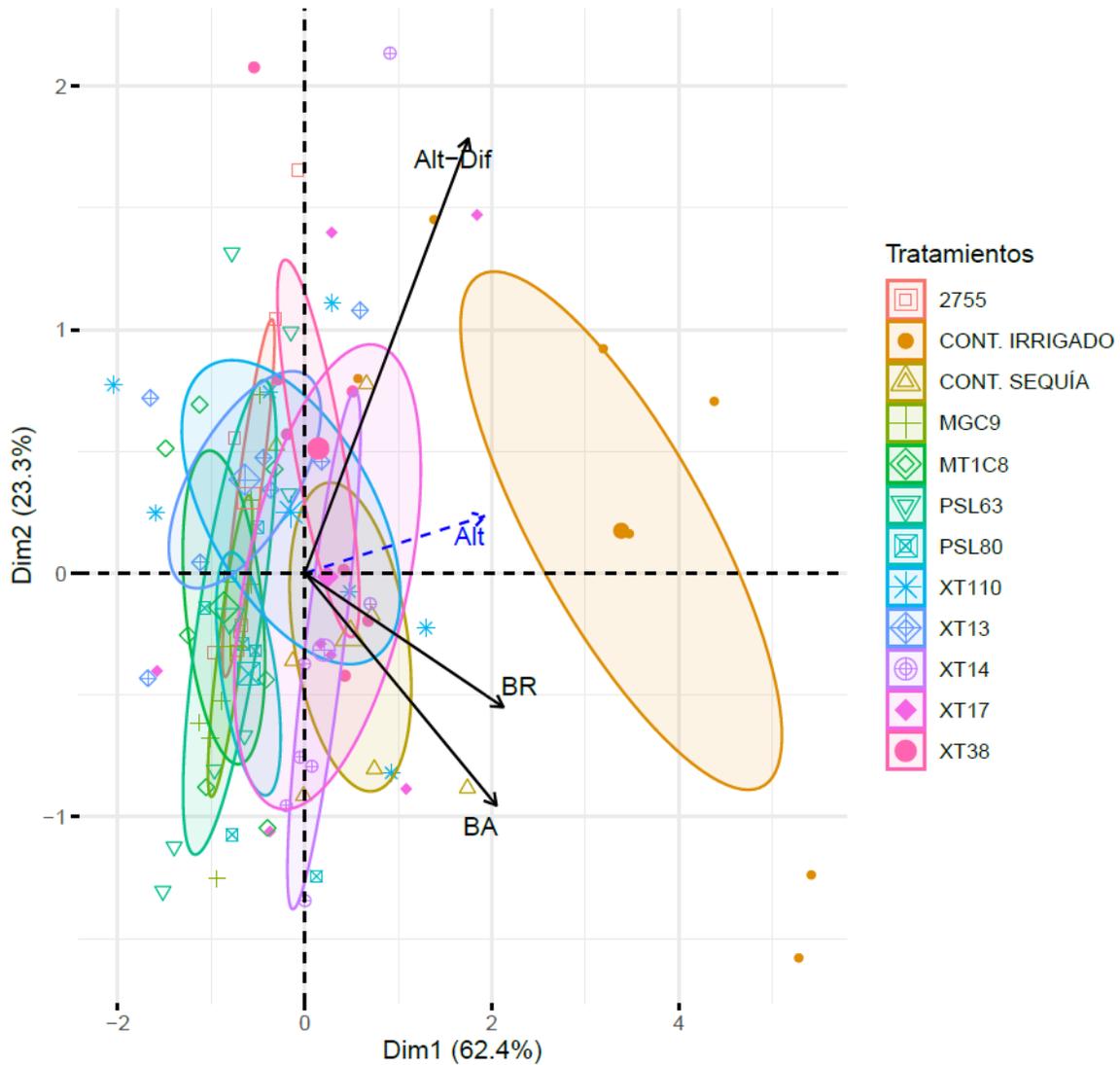
Tratamiento	Long. 20 (cm)	$g_s$ 21 (mmol/m <sup>2</sup> s)	$g_s$ 26 (mmol/m <sup>2</sup> s)	Chla (µg/g PF)	Chlb (µg/g PF)	Car (µg/g PF)
Control Irrigado	89,6± 11,9 a	364,7±133,7	366,3±81,8	1151,7±299,8	363,2±112,1	156,7±41,7
Control Sequía	88,5±9,1 ab	369,0±60,6	300,3±95,9	1460,7±218,8	449,9±62,5	202,4±25,0
PSL63	83,6±11,5abc	418,5± 128,8	358,1±96,2	1349,3±184,3	395,6±75,4	176,5±27,4
PSL80	82,4±6,7abc	491,0±99,8	313,6±166,9	1277,7±205,9	370,3±73,6	184,0±28,5
MGC9	85,5±5,4abc	386,1±21,7	298,8±104,5	1286,8±127,5	378,2±48,8	170,5±24,5
MT1C8	82,5±11,6abc	414,0±95,1	276,7±54,2	1231,5±178,3	364,3±55,8	170,5±19,1
2755	84,3±4,6abc	433,9±114,0	295,3±97,2	1300,3±260,1	389,3±93,2	182,0±41,1
XT13	80,9±12,8bc	370,7±99,5	312,2±126,6	1103,4±191,9	346,0±77,7	154,4±31,3
XT14	85,5±5,1abc	369,1±134,8	256,8±46,4	1121,3±131,3	346,0±51,8	158,3±22,1
XT17	80,0±9,6c	416,1±135,4	253,0±89,5	1188,5±147,5	366,8±58,0	156,6±15,3
XT38	77,2±12,9c	358,7±97,1	390,0±97,8	1214,4±173,9	380,4±70,9	158,9±24,8
XT110	79,8±14,5c	340,8±110,1	313,5±98,9	1407,3±127,9	430,1±42,0	186,4±28,6
	$p < 0,05$	Sin diferencias estadísticas				

Los datos corresponden a la media de 5 réplicas por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias estadísticas a un  $p < 0,05$  entre tratamientos mediante la prueba de Duncan. Long. 20: Longitud de la parte aérea de la planta medida a los 20 días PS;  $g_s$  21: Conductancia estomática medida en el día 21 PS;  $g_s$  26: Conductancia estomática medida en el día 26 PS; Chla: Contenido de Clorofila a; Chlb: Contenido de Clorofila b; Car: Contenido de Carotenoides; PF: Peso Fresco.

## Anexo 6. Análisis de Componentes Principales (PCA) de parámetros de respuesta monitoreados en el maíz ICA V109 inoculado con PGPB (casa de malla)



**Figura suplementaria 6-2.** PCA de atributos fisiológicos y bioquímicos estudiados en las plantas de maíz inoculadas con PGPB bajo estrés por sequía. El PCA explica el 55,3 % de la varianza observada y las elipses representan el intervalo de confianza del 95% para cada tratamiento. Nótese la separación formada entre los grupos del tratamiento control irrigado (color naranja, símbolo ●) y el de sequía (color azul agua marina, símbolo ◻) RWC: Contenido Hídrico Relativo; gs: Conductancia estomática; Alt: Altura de la planta; GR: Actividad enzimática de Glutación Reductasa; APX: Actividad enzimática de Ascorbato Peroxidasa; Azúc: Azúcares totales solubles; Chla: Clorofila a; Chlb: Clorofila b; Car: Carotenoides; Pro: Prolina



**Figura suplementaria 6-3.** PCA de atributos morfológicos estudiados en las plantas de maíz inoculadas con PGPB bajo estrés por sequía. El PCA explica el 85,7% de la varianza observada y el tamaño de las elipses representan el intervalo de confianza del 95% para cada tratamiento. Nótese la separación formada entre los grupos del tratamiento control irrigado (color naranja, símbolo •) y el de sequía (color café, símbolo  $\Delta$ ). BA: Biomasa Seca aérea; BR: Biomasa seca de raíces; Alt: Altura de la planta; Alt-Dif: Diferencia de altura de la planta entre el día 20 y 31 PS.

## 7. Referencias Bibliográficas

- Abdelaal, K., Alkahtani, M., Attia, K., Hafez, Y., Király, L., & Künstler, A. (2021). The Role of Plant Growth-Promoting Bacteria in Alleviating the Adverse Effects of Drought on Plants. *Biology*, *10*(6), 520. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10060520>
- Abrahám, E., Hourton-Cabassa, C., Erdei, L., & Szabados, L. (2010). Methods for determination of proline in plants. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *639*, 317–331. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0\\_20/COVER/](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_20/COVER/)
- Ahmad Ansari, F., Ahmad, I., & Pichtel, J. (2023). Synergistic effects of biofilm-producing PGPR strains on wheat plant colonization, growth and soil resilience under drought stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *30*(6), 103664. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2023.103664>
- Akhtar, S. S., Amby, D. B., Hegelund, J. N., Fimognari, L., Großkinsky, D. K., Westergaard, J. C., Müller, R., Moelbak, L., Liu, F., & Roitsch, T. (2020). *Bacillus licheniformis* FMCH001 Increases Water Use Efficiency via Growth Stimulation in Both Normal and Drought Conditions. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 297. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00297>
- Ali, S., & Khan, N. (2021). Delineation of mechanistic approaches employed by plant growth promoting microorganisms for improving drought stress tolerance in plants. *Microbiological Research*, *249*, 126771. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126771>
- Ali, S. Z., Sandhya, V., & Rao, L. V. (2014). Isolation and characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide-producing fluorescent *Pseudomonas* sp. *Annals of Microbiology*, *64*(2), 493–502. <https://doi.org/10.1007/S13213-013-0680-3/FIGURES/6>
- Allard-Massicotte, R., Tessier, L., Lécuyer, F., Lakshmanan, V., Lucier, J. F., Garneau, D., Caudwell, L., Vlamakis, H., Bais, H. P., & Beaugerard, P. B. (2016). *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *MBio*, *7*(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01664-16>
- Almansouri, M., Kinet, J.-M., & Lutts, S. (2001). Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and Soil*, *231*, 243–254.
- Amaya-Gómez, C. V., Porcel, M., Mesa-Garriga, L., Gómez-Álvarez, M. I., Zhou, N.-Y., & Tong, S. J. (2020). A Framework for the Selection of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Based on Bacterial Competence Mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(14).
- Anjum, S. A., Tanveer, M., Ashraf, U., Hussain, S., Shahzad, B., Khan, I., & Wang, L. (2016). Effect of progressive drought stress on growth, leaf gas exchange, and antioxidant production in two maize cultivars. *Environmental Science and Pollution Research* *23*:17, *23*(17), 17132–

17141. <https://doi.org/10.1007/S11356-016-6894-8>

- Anjum, S. A., Ashraf, U., Tanveer, M., Khan, I., Hussain, S., Shahzad, B., Zohaib, A., Abbas, F., Saleem, M. F., Ali, I., & Wang, L. C. (2017). Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. *Frontiers in Plant Science*, 8(FEBRUARY), 69. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.00069/BIBTEX>
- Anjum, S. A., Ashraf, U., Zohaib, A., Tanveer, M., Naeem, M., Ali, I., Tabassum, T., & Nazir, U. (2017). Growth and developmental responses of crop plants under drought stress: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 104(3), 267–276. <https://doi.org/10.13080/z-a.2017.104.034>
- Anjum, S. A., Xie, X.-Y., Wang, L.-C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6(9), 2026–2032. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.027>
- Ansari, F. A., Jabeen, M., & Ahmad, I. (2021). Pseudomonas azotoformans FAP5, a novel biofilm-forming PGPR strain, alleviates drought stress in wheat plant. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-03045-9>
- Armada, E., Roldán, A., & Azcon, R. (2014). Differential Activity of Autochthonous Bacteria in Controlling Drought Stress in Native Lavandula and Salvia Plants Species Under Drought Conditions in Natural Arid Soil. *Microbial Ecology*, 67(2), 410–420. <https://doi.org/10.1007/S00248-013-0326-9/FIGURES/4>
- Aroca, R. (2012). Plant Responses to Drought Stress. In R. Aroca (Ed.), *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features* (Issue October 2012). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0>
- Arzanesh, M. H., Alikhani, H. A., Khavazi, K., Rahimian, H. A., & Miransari, M. (2011). Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 197–205. <https://doi.org/10.1007/S11274-010-0444-1/TABLES/7>
- Asghari, B., Khademian, R., & Sedaghati, B. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) confer drought resistance and stimulate biosynthesis of secondary metabolites in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) under water shortage condition. *Scientia Horticulturae*, 263(July 2019), 109132. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109132>
- Ashry, N. M., Alaidaroos, B. A., Mohamed, S. A., Badr, O. A. M., El-Saadony, M. T., & Esmael, A. (2022). Utilization of drought-tolerant bacterial strains isolated from harsh soils as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1760–1769. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.10.054>
- Aslam, M., Maqpool, M., & Cengiz, R. (2015). Drought stress in maize (*Zea Mays* L.): effects, resistance mechanisms, global achievements, and biological strategies. In *Springer Briefs in Agriculture* (Vol. 8, Issue December). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25442-5>
- Avramova, V., Abdelgawad, H., Zhang, Z., Fotschki, B., Casadevall, R., Vergauwen, L., Knapen, D., Taleisnik, E., Guisez, Y., Asard, H., & Beemster, G. T. S. (2015). Drought induces distinct growth response, protection, and recovery mechanisms in the maize leaf growth zone. *Plant Physiology*, 169(2), 1382–1396. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00276>

- Avramova, V., Nagel, K. A., Abdelgawad, H., Bustos, D., Duplessis, M., Fiorani, F., & Beemster, G. T. S. (2016). Screening for drought tolerance of maize hybrids by multi-scale analysis of root and shoot traits at the seedling stage. *Journal of Experimental Botany*, *67*(8), 2453–2466. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERW055>
- Azeem, M., Haider, M. Z., Javed, S., Saleem, M. H., & Alatawi, A. (2022). Drought Stress Amelioration in Maize (*Zea mays* L.) by Inoculation of *Bacillus* spp. Strains under Sterile Soil Conditions. *Agriculture*, *12*(1), 50. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE12010050>
- Bakhshandeh, E., Gholamhosseini, M., Yaghoobian, Y., & Pirdashti, H. (2020). Plant growth promoting microorganisms can improve germination, seedling growth and potassium uptake of soybean under drought and salt stress. *Plant Growth Regulation*, *90*(1), 123–136. <https://doi.org/10.1007/S10725-019-00556-5/FIGURES/3>
- Barnabás, B., Jäger, K., & Fehér, A. (2008). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell & Environment*, *31*(1), 11–38. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2007.01727.X>
- Bashan, Y., Holguin, G., & De-Bashan, L. E. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). <https://doi.org/10.1139/W04-035>, *50*(8), 521–577. <https://doi.org/10.1139/W04-035>
- Bashan, Y., Kamnev, A. A., & de-Bashan, L. E. (2012). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils* *2012* *49*:4, *49*(4), 465–479. <https://doi.org/10.1007/S00374-012-0737-7>
- Basu, A., Prasad, P., Das, S. N., Kalam, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., & El Enshasy, H. (2021). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. *Sustainability*, *13*(3), 1140. <https://doi.org/10.3390/su13031140>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, *39*(1), 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Batool, T., Ali, S., Seleiman, M. F., Naveed, N. H., Ali, A., Ahmed, K., Abid, M., Rizwan, M., Shahid, M. R., Alotaibi, M., Al-Ashkar, I., & Mubushar, M. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports 2020* *10*:1, *10*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73489-z>
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2013). *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(17), E1621–E1630. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1218984110/SUPPL\\_FILE/PNAS.201218984SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1218984110/SUPPL_FILE/PNAS.201218984SI.PDF)
- Bewley, J. D. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, *9*, 1055–1056.
- Bhatt, R. M., Selvakumar, G., Upreti, K. K., & Boregowda, P. C. (2015). Effect of Biopriming with

- Enterobacter Strains on Seed Germination and Seedling Growth of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Under Osmotic Stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 85(1), 63–69. <https://doi.org/10.1007/s40011-014-0333-8>
- Bianco, C., Imperlini, E., Calogero, R., Senatore, B., Amoresano, A., Carpentieri, A., Pucci, P., & Defez, R. (2006). Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. *Archives of Microbiology*, 185(5), 373–382. <https://doi.org/10.1007/S00203-006-0103-Y/TABLES/5>
- Borrell, A. K., Hammer, G. L., & Douglas, A. C. L. (2000). Does maintaining green leaf area in sorghum improve yield under drought? I. Leaf growth and senescence. *Crop Science*, 40(4), 1026–1037. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4041026x>
- Bouremani, N., Cherif-Silini, H., Silini, A., Bouket, A. C., Luptakova, L., Alenezi, F. N., Baranov, O., & Belbahri, L. (2023). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Rampart against the Adverse Effects of Drought Stress. *Water*, 15(3), 418. <https://doi.org/10.3390/w15030418>
- Carlson, R., Tugizimana, F., Steenkamp, P. A., Dubery, I. A., Hassen, A. I., & Labuschagne, N. (2020). Rhizobacteria-induced systemic tolerance against drought stress in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Microbiological Research*, 232, 126388. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126388>
- Cassel, D. K., & Nielsen, D. R. (1986). Field Capacity and Available Water Capacity. In A. Klute (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 1: Physical and Mineralogical Methods* (2nd ed., Vol. 9, Issue 9, pp. 901–926). American Society of Agronomy. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.1.2ed.c36>
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 Suppl), 1011. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600016>
- Cesari, A., Paulucci, N., López-Gómez, M., Hidalgo-Castellanos, J., Plá, C. L., & Dardanelli, M. S. (2019). Restrictive water condition modifies the root exudates composition during peanut-PGPR interaction and conditions early events, reversing the negative effects on plant growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.08.015>
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. In *Annals of Botany* (Vol. 103, Issue 4, pp. 551–560). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P. R., Vater, J., Süßmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., & Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 25(9), 1007–1014. <https://doi.org/10.1038/nbt1325>
- Comas, L. H., Becker, S. R., Cruz, V. M. V., Byrne, P. F., & Dierig, D. A. (2013). Root traits contributing to plant productivity under drought. *Frontiers in Plant Science*, 4(NOV), 442.

- <https://doi.org/10.3389/FPLS.2013.00442/BIBTEX>
- Cortés-Patiño, S., Vargas, C., Álvarez-Flórez, F., Bonilla, R., & Estrada-Bonilla, G. (2021). Potential of herbaspirillum and azospirillum consortium to promote growth of perennial ryegrass under water deficit. *Microorganisms*, *9*(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010091>
- Creus, C. M., Sueldo, R. J., & Barassi, C. A. (2004). Water relations and yield in Azospirillum-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canadian Journal of Botany*, *82*(2), 273–281. <https://doi.org/10.1139/b03-119>
- Cruz, C., Gomez, L., & Uribe, D. (2017). Bio-based management of rice straw under different C:N ratios using microbial co-inocula and plant growth promoters. *Revista Colombiana de Biotecnol*, *19*, 47–62. <https://doi.org/10.5446/rev.colomb.biote.v19n2.70168>
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior*, *3*(3), 156–165. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5536>
- DANE. (2019). *Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA): Serie histórica por departamento cultivos transitorios (2012 - II semestre 2019)*. <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/agropecuario/encuesta-nacional-agropecuaria-ena>
- Danish, S., Zafar-Ul-Hye, M., Mohsin, F., & Hussain, M. (2020). ACC-deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria and biochar mitigate adverse effects of drought stress on maize growth. *PLoS ONE*, *15*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230615>
- Daryanto, S., Wang, L., & Jacinthe, P.-A. (2016). Global Synthesis of Drought Effects on Maize and Wheat Production. *PLOS ONE*, *11*(5), e0156362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156362>
- Dasgupta, D., Paul, A., Acharya, K., Minkina, T., Mandzhieva, S., Gorovtsov, A. V., Chakraborty, N., & Keswani, C. (2023). Bioinoculant mediated regulation of signalling cascades in various stress responses in plants. *Heliyon*, *9*(1), e12953. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E12953>
- de Carvalho, R. C., Cunha, A., & da Silva, J. M. (2011). Photosynthesis by six Portuguese maize cultivars during drought stress and recovery. *Acta Physiologiae Plantarum*, *33*(2), 359–374. <https://doi.org/10.1007/S11738-010-0555-1/FIGURES/10>
- De Micco, V., & Aronne, G. (2012). Morpho-Anatomical Traits for Plant Adaptation to Drought. In R. Aroca (Ed.), *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features* (Issue June 2015, pp. 1–466). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0>
- Devarajan, A. K., Muthukrishnan, G., Truu, J., Truu, M., Ostonen, I., Subramanian Kizhaeral, S., Panneerselvam, P., & Gopalasubramanian, S. K. (2021). The Foliar Application of Rice Phyllosphere Bacteria induces Drought-Stress Tolerance in *Oryza sativa* (L.). *Plants* *2021*, Vol. *10*, Page 387, *10*(2), 387. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10020387>
- Dimkpa, C., Weinand, T., & Asch, F. (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment*, *32*(12), 1682–1694. <https://doi.org/10.1111/J.1365->

3040.2009.02028.X

- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, *87*(2), 951–962. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2011.08.083>
- Drobot, R., Draghia, A. F., Sîrbu, N., & Dinu, C. (2022). Synthetic Drought Hydrograph. *Hydrology* *2023*, Vol. 10, Page 10, *10*(1), 10. <https://doi.org/10.3390/HYDROLOGY10010010>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, *28*(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Edmeades, G. O. (2008). Drought Tolerance in Maize: an Emerging Reality. In *James Clive. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops* (Vol. 39, p. 12). ISAAA. <http://www.isaaa.org>
- Embiale, A., Hussein, M., Husen, A., Sahile, S., & Mohammed, K. (2016). Differential Sensitivity of *Pisum sativum* L. Cultivars to Water-deficit Stress: Changes in Growth, Water Status, Chlorophyll Fluorescence and Gas Exchange Attributes. *Journal of Agronomy*, *15*(2), 45–57. <https://doi.org/10.3923/ja.2016.45.57>
- Estrada, G. A., Baldani, V. L. D., de Oliveira, D. M., Urquiaga, S., & Baldani, J. I. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant and Soil*, *369*(1–2), 115–129. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1550-7>
- Fadiji, A. E., Santoyo, G., Yadav, A. N., & Babalola, O. O. (2022). Efforts towards overcoming drought stress in crops: Revisiting the mechanisms employed by plant growth-promoting bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 2943. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.962427>
- 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*(4), 673–689. <https://doi.org/10.1007/S00018-014-1767-0/METRICS>
- Fang, Yan, Du, Y., Wang, J., Wu, A., Qiao, S., Xu, B., Zhang, S., Siddique, K. H. M., & Chen, Y. (2017). Moderate Drought Stress Affected Root Growth and Grain Yield in Old, Modern and Newly Released Cultivars of Winter Wheat. *Frontiers in Plant Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.00672>
- FAO. (2023a). *FAOSTAT: Crops and livestock products, Production Quantity + Crops primary*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- FAO. (2023b). *FAOSTAT: Food Balances*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>
- FAO, F. and A. O. of the U. N. (2017). *The impact of disasters and crises on agriculture and food security*. [www.fao.org/publications](http://www.fao.org/publications)
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. In *Agronomy for Sustainable Development* (Vol. 29, Issue 1, pp. 185–212). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/agro:2008021>

- FENALCE. (2011). *ASPECTOS TÉCNICOS DE LA PRODUCCIÓN DE MAÍZ EN COLOMBIA*. Federación Nacional de Cultivadores de Cereales, Leguminosas y Soya. [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/19418/45021\\_60774.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/19418/45021_60774.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- FENALCE. (2021). *Indicadores Cerealistas 2021B*.
- FENALCE. (2023a). *Histórico de área, producción y rendimiento Cereales y leguminosas*. <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiM2FiYzZM5ZTAAtNjFmNi00MGQyLWFiYzYtNGI0YTJiZCwzZWQwliwidCI6IjU2MmQ1YjJlLTBmMzEtNDdmOC1iZTk4LTNmMjI4Nzc4MDBhOCJ9>
- FENALCE. (2023b). *Importaciones de cereales y leguminosas*. <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiZjBjODljNTktZTdiMy00OWNlLTk5OGEtMWYyZDM3NTczZWZhiwidCI6IjU2MmQ1YjJlLTBmMzEtNDdmOC1iZTk4LTNmMjI4Nzc4MDBhOCJ9&pageName=ReportSection639662e3be90024da888>
- Flexas, J., & Medrano, H. (2002). Drought-inhibition of Photosynthesis in C3 Plants: Stomatal and Non-stomatal Limitations Revisited. *Annals of Botany*, 89(2), 183–189. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCF027>
- Forni, C., Duca, D., & Glick, B. R. (2017). Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant and Soil*, 410(1–2), 335–356. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3007-x>
- García, J. E., Maroniche, G., Creus, C., Suárez-Rodríguez, R., Ramirez-Trujillo, J. A., & Groppa, M. D. (2017). In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different Azospirillum native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological Research*, 202, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.007>
- Garrard, A. (1954). THE EFFECTS OF  $\beta$ -INDOLYLACETIC ACID ON THE GERMINATION AND ROOT GROWTH OF CERTAIN MEMBERS OF THE CRUCIFERAE. *New Phytologist*, 53(2), 165–176. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.1954.TB05234.X>
- Ge, T., Sui, F., Bai, L., Tong, C., & Sun, N. (2012). Effects of water stress on growth, biomass partitioning, and water-use efficiency in summer maize (*Zea mays* L.) throughout the growth cycle. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(3), 1043–1053. <https://doi.org/10.1007/S11738-011-0901-Y/TABLES/3>
- Ghannoum, O. (2009). C4 Photosynthesis and water stress. *Ann Bot*, 103(4), 635–644. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn093>
- Ghosh, A., Biswas, D. R., Das, S., Das, T. K., Bhattacharyya, R., Alam, K., & Rahman, M. M. (2023). Rice straw incorporation mobilizes inorganic soil phosphorus by reorienting hysteresis effect under varying hydrothermal regimes in a humid tropical Inceptisol. *Soil and Tillage Research*, 225, 105531. <https://doi.org/10.1016/J.STILL.2022.105531>
- Ghosh, D., Gupta, A., & Mohapatra, S. (2019). A comparative analysis of exopolysaccharide and phytohormone secretions by four drought-tolerant rhizobacterial strains and their impact on

- osmotic-stress mitigation in *Arabidopsis thaliana*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(6), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S11274-019-2659-0/FIGURES/7>
- Ghosh, D., Sen, S., & Mohapatra, S. (2018). Drought-mitigating *Pseudomonas putida* GAP-P45 modulates proline turnover and oxidative status in *Arabidopsis thaliana* under water stress. *Annals of Microbiology*, 68(9), 579–594. <https://doi.org/10.1007/S13213-018-1366-7/FIGURES/5>
- Ghosh, D., Sen, S., & Mohapatra, S. (2017). Modulation of proline metabolic gene expression in *Arabidopsis thaliana* under water-stressed conditions by a drought-mitigating *Pseudomonas putida* strain. *Annals of Microbiology*, 67(10), 655–668. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1294-y>
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., Pereira, E., & Tuteja, N. (2013). Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 70, pp. 204–212). Elsevier Masson. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.032>
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012, 1–15. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Glick, B. R. (2020). Beneficial plant-bacterial interactions. In *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-44368-9>
- Gomez-Ramirez, L. F., & Uribe-Velez, D. (2021). Phosphorus Solubilizing and Mineralizing *Bacillus* spp. Contribute to Rice Growth Promotion Using Soil Amended with Rice Straw. *Current Microbiology*, 78(3), 932–943. <https://doi.org/10.1007/S00284-021-02354-7/TABLES/3>
- Goswami, D., Vaghela, H., Parmar, S., Dhandhukia, P., & Thakker, J. N. (2013). Plant growth promoting potentials of *Pseudomonas* spp. strain OG isolated from marine water. *Journal of Plant Interactions*, 8(4), 281–290. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.768360>
- Govaerts, B., Vega, D., Chávez, X., Narro, L., San Vicente, F., Palacios, N., González, G., Ortega, P., Carvajar, A., Arcos, A., Bolaños, J., Romero, N., Bolaños, J., & Vanegas, Y. (2019). Maíz para Colombia: Visión 2030. In *CYMMIT CIAT. CYMMIT - CIAT*. <https://www.fenalce.org/archivos/maiz2030.pdf>
- Grote, U., Fasse, A., Nguyen, T. T., & Erenstein, O. (2021). Food Security and the Dynamics of Wheat and Maize Value Chains in Africa and Asia. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 317. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2020.617009/BIBTEX>
- Gupta, A., Rico, A., & Caño, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368(6488), 266–269. <https://doi.org/10.1126/science.aaz7614>
- Gururani, M. A., Upadhyaya, C. P., Baskar, V., Venkatesh, J., Nookaraju, A., & Park, S. W. (2013). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Abiotic Stress Tolerance in *Solanum tuberosum* Through Inducing Changes in the Expression of ROS-Scavenging Enzymes and

- Improved Photosynthetic Performance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(2), 245–258. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9292-6>
- Hagaggi, N. S. A., & Abdul-Raouf, U. M. (2022). Drought-tolerant *Sphingobacterium changzhouense* Alv associated with *Aloe vera* mediates drought tolerance in maize (*Zea mays*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2022 38:12, 38(12), 1–11. <https://doi.org/10.1007/S11274-022-03441-Y>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S., Mahmud, J., Fujita, M., & Fotopoulos, V. (2020). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- Henry, A., Doucette, W., Norton, J., & Bugbee, B. (2007). Changes in Crested Wheatgrass Root Exudation Caused by Flood, Drought, and Nutrient Stress. *Journal of Environmental Quality*, 36(3), 904–912. <https://doi.org/10.2134/JEQ2006.0425SC>
- Hiscox, J. D., & Israelstam, G. F. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57(12), 1332–1334. <https://doi.org/10.1139/b79-163>
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station*, 347(2nd edit). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19500302257>
- Hoben, H. J., & Somasegaran, P. (1982). Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), 1246–1247. <https://doi.org/10.1128/AEM.44.5.1246-1247.1982>
- Hossain, M. M., Lam, H. M., & Zhang, J. (2015). Responses in gas exchange and water status between drought-tolerant and -susceptible soybean genotypes with ABA application. *The Crop Journal*, 3(6), 500–506. <https://doi.org/10.1016/J.CJ.2015.09.001>
- Hsiao, T. C. (1973). Plant Responses to Water Stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24(1), 519–570. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.24.060173.002511>
- Hsiao, T. C., & Xu, L. K. (2000). Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany*, 51(350), 1595–1616. <https://doi.org/10.1093/JEXBOT/51.350.1595>
- Hussain, H. A., Hussain, S., Khaliq, A., Ashraf, U., Anjum, S. A., Men, S., & Wang, L. (2018). Chilling and Drought Stresses in Crop Plants: Implications, Cross Talk, and Potential Management Opportunities. *Frontiers in Plant Science*, 9, 393. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00393>
- Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., & Borriss, R. (2007). Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0619>, 20(6), 619–626.

<https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0619>

- Ilyas, M., Nisar, M., Khan, N., Hazrat, A., Khan, A. H., Hayat, K., Fahad, S., Khan, A., & Ullah, A. (2021). Drought Tolerance Strategies in Plants: A Mechanistic Approach. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(3), 926–944. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10174-5>
- Ilyas, N., Mumtaz, K., Akhtar, N., Yasmin, H., Sayyed, R. Z., Khan, W., Enshasy, H. A. El, Dailin, D. J., Elsayed, E. A., & Ali, Z. (2020). Exopolysaccharides Producing Bacteria for the Amelioration of Drought Stress in Wheat. *Sustainability*, 12(21), 8876. <https://doi.org/10.3390/su12218876>
- Imran, M., Mpovo, C. L., Aaqil Khan, M., Shaffique, S., Ninson, D., Bilal, S., Khan, M., Kwon, E. H., Kang, S. M., Yun, B. W., & Lee, I. J. (2023). Synergistic Effect of Melatonin and Lysinibacillus fusiformis L. (PLT16) to Mitigate Drought Stress via Regulation of Hormonal, Antioxidants System, and Physio-Molecular Responses in Soybean Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8489. <https://doi.org/10.3390/IJMS24108489/S1>
- Integrated Taxonomic Information System (ITIS). (2023). *ITIS - Report: Zea mays*. [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=42269#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=42269#null)
- Kamara, A. Y., Menkir, A., Badu-Apraku, B., & Ibikunle, O. (2003). The influence of drought stress on growth, yield and yield components of selected maize genotypes. *The Journal of Agricultural Science*, 141(1), 43–50. <https://doi.org/10.1017/S0021859603003423>
- Karimzadeh, J., Alikhani, H. A., Etesami, H., & Pourbabaei, A. A. (2021). Improved Phosphorus Uptake by Wheat Plant (*Triticum aestivum* L.) with Rhizosphere Fluorescent Pseudomonads Strains Under Water-Deficit Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(1), 162–178. <https://doi.org/10.1007/S00344-020-10087-3/FIGURES/7>
- Karlowsky, S., Augusti, A., Ingrisich, J., Akanda, M. K. U., Bahn, M., & Gleixner, G. (2018). Drought-Induced Accumulation of Root Exudates Supports Post-drought Recovery of Microbes in Mountain Grassland. *Frontiers in Plant Science*, 9, 402696. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01593>
- Kasim, W. A., Gaafar, R. M., Abou-Ali, R. M., Omar, M. N., & Hewait, H. M. (2016). Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(2), 217–227. <https://doi.org/10.1016/J.AOAS.2016.07.003>
- Kaushal, M., & Wani, S. P. (2016a). Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. *Annals of Microbiology*, 66(1), 35–42. <https://doi.org/10.1007/S13213-015-1112-3/METRICS>
- Kaushal, M., & Wani, S. P. (2016b). Rhizobacterial-plant interactions: Strategies ensuring plant growth promotion under drought and salinity stress. In *Agriculture, Ecosystems and Environment* (Vol. 231, pp. 68–78). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.06.031>
- Keskin, A., Tumer, E. I., & Birinci, A. (2010). Analysis of the factors affecting the instrument and machinery assets in enterprises that deal with agricultural production: The case of erzurum province. *African Journal of Agricultural Research*, 5(8), 600–605. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.027>

- Khabbaz, S. E., Ladhalakshmi, D., Babu, M., Kandan, A., Ramamoorthy, V., Saravanakumar, D., Al-Mughrabi, T., & Kandasamy, S. (2019). Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) - A Versatile Tool for Plant Health Management. *Canadian Journal of Pesticides & Pest Management*, 1(1), 1. <https://doi.org/10.34195/can.j.ppm.2019.05.001>
- Khan, A., & Singh, A. V. (2021). Multifarious effect of ACC deaminase and EPS producing *Pseudomonas* sp. and *Serratia marcescens* to augment drought stress tolerance and nutrient status of wheat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(12), 1–17. <https://doi.org/10.1007/S11274-021-03166-4/FIGURES/4>
- Khoshru, B., Mitra, D., Khoshmanzar, E., Myo, E. M., Uniyal, N., Mahakur, B., Mohapatra, P. K. Das, Panneerselvam, P., Boutaj, H., Alizadeh, M., Cely, M. V. T., Senapati, A., & Rani, A. (2020). Current scenario and future prospects of plant growth-promoting rhizobacteria: an economic valuable resource for the agriculture revival under stressful conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 43(20), 3062–3092. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1799004>
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. In *Nature* (Vol. 286, Issue 5776, pp. 885–886). <https://doi.org/10.1038/286885a0>
- Knights, H. E., Jorin, B., Haskett, T. L., & Poole, P. S. (2021). Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. *Environmental Microbiology Reports*, 13(4), 428–444. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12934>
- Kour, D., Rana, K. L., Sheikh, I., Kumar, V., Yadav, A. N., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2020). Alleviation of Drought Stress and Plant Growth Promotion by *Pseudomonas libanensis* EU-LWNA-33, a Drought-Adaptive Phosphorus-Solubilizing Bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 90(4), 785–795. <https://doi.org/10.1007/S40011-019-01151-4/FIGURES/4>
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A. N., Yadav, N., Kumar, M., Kumar, V., Vyas, P., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2020). Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23(December 2019), 101487. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487>
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A. N., Yadav, N., Kumar, V., Kumar, A., Sayyed, R. Z., Hesham, A. E.-L., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2019). Drought-Tolerant Phosphorus-Solubilizing Microbes: Biodiversity and Biotechnological Applications for Alleviation of Drought Stress in Plants. In N. K. Arora (Ed.), *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management* (pp. 255–308). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-6536-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-13-6536-2_13)
- Kränzlein, M., Geilfus, C. M., Franzisky, B. L., Zhang, X., Wimmer, M. A., & Zörb, C. (2021). Physiological Responses of Contrasting Maize (*Zea mays* L.) Hybrids to Repeated Drought. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(7), 2708–2718. <https://doi.org/10.1007/S00344-021-10468-2/FIGURES/5>
- Kravchenko, L. V., Azarova, T. S., Makarova, N. M., & Tikhonovich, I. A. (2004). The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phyto-stimulating activity of rhizobacteria.

- Microbiology*, 73(2), 156–158.  
<https://doi.org/10.1023/B:MICI.0000023982.76684.9D/METRICS>
- Kumar, V., & Narula, N. (1999). Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils*, 28(3), 301–305. <https://doi.org/10.1007/S003740050497/METRICS>
- Lara-Bosso, L. S. (2007). *Determinación del potencial agronómico de aislamientos nativos de Pseudomonas fluorescens en términos de su capacidad solubilizadora de fosfatos y antagonista contra Rhizoctonia solani*. Universidad Nacional de Colombia.
- Latif, M., Bukhari, S. A. H., Alrajhi, A. A., Alotaibi, F. S., Ahmad, M., Shahzad, A. N., Dewidar, A. Z., & Mattar, M. A. (2022). Inducing Drought Tolerance in Wheat through Exopolysaccharide-Producing Rhizobacteria. *Agronomy* 2022, Vol. 12, Page 1140, 12(5), 1140. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12051140>
- Laverde-Robayo, P. (2016). *CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE Pseudomonas spp. CON POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE AGENTES FITOPATÓGENOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE PAPA*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K., & Dietz, K. J. (2019). The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. *Antioxidants* 2019, Vol. 8, Page 94, 8(4), 94. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8040094>
- Leal-Medina, G. I. (2018). *Selección de bacterias aerobias formadoras de Endospora (BAFEs) con capacidad de promoción de crecimiento vegetal, provenientes de cultivos de caña panelera con manejos agronómicos contrastantes* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/63901>
- Lephatsi, M., Nephali, L., Meyer, V., Piater, L. A., Buthelezi, N., Dubery, I. A., Opperman, H., Brand, M., Huyser, J., & Tugizimana, F. (2022). Molecular mechanisms associated with microbial biostimulant-mediated growth enhancement, priming and drought stress tolerance in maize plants. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14570-7>
- Li, L., Gu, W., Li, J., Li, C., Xie, T., Qu, D., Meng, Y., Li, C., & Wei, S. (2018). Exogenously applied spermidine alleviates photosynthetic inhibition under drought stress in maize (*Zea mays* L.) seedlings associated with changes in endogenous polyamines and phytohormones. *Plant Physiology and Biochemistry*, 129, 35–55. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2018.05.017>
- Lichtenthaler, H. K. (1996). Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. *Journal of Plant Physiology*, 148(1–2), 4–14. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80287-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80287-2)
- Liu, C., Liu, Y., Guo, K., Fan, D., Li, G., Zheng, Y., Yu, L., & Yang, R. (2010). Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environmental and Experimental Botany*, 71, 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.11.012>
- Lopes, M. S., Araus, J. L., van Heerden, P. D. R., & Foyer, C. H. (2011). Enhancing drought tolerance in C4 crops. *Journal of Experimental Botany*, 62(9), 3135–3153.

- <https://doi.org/10.1093/jxb/err105>
- Loscos-Aranda, D. J. (2007). *Metabolismo de Ascorbato y Tioles en Leguminosas* [Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIC]. <https://digital.csic.es/bitstream/10261/3020/1/2007-TesisJorgeLoscos.pdf>
- Lu, Y., Li, Y., Zhang, J., Xiao, Y., Yue, Y., Duan, L., Zhang, M., & Li, Z. (2013). Overexpression of Arabidopsis Molybdenum Cofactor Sulfurase Gene Confers Drought Tolerance in Maize (*Zea mays* L.). *PLoS ONE*, *8*(1), e52126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052126>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, *63*, 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Ma, X., Sukiran, N. L., Ma, H., & Su, Z. (2014). Moderate drought causes dramatic floral transcriptomic reprogramming to ensure successful reproductive development in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-164/FIGURES/6>
- Maazou, A.-R. S., Tu, J., Qiu, J., Liu, Z., Maazou, A.-R. S., Tu, J., Qiu, J., & Liu, Z. (2016). Breeding for Drought Tolerance in Maize (*Zea mays* L.). *American Journal of Plant Sciences*, *7*(14), 1858–1870. <https://doi.org/10.4236/AJPS.2016.714172>
- MacAlister, D., Muasya, A. M., Crespo, O., Ogola, J. B. O., Maseko, S., Valentine, A. J., Ottosen, C. O., Rosenqvist, E., & Chimphango, S. B. M. (2020). Stress tolerant traits and root proliferation of *Aspalathus linearis* (Burm.f.) R. Dahlgren grown under differing moisture regimes and exposed to drought. *South African Journal of Botany*, *131*, 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.SAJB.2020.03.003>
- Mancosu, N., Snyder, R. L., Kyriakakis, G., & Spano, D. (2015). Water Scarcity and Future Challenges for Food Production. *Water*, *7*(3), 975–992. <https://doi.org/10.3390/W7030975>
- Marasco, R., Rolli, E., Vigani, G., Borin, S., Sorlini, C., Ouzari, H., Zocchi, G., & Daffonchio, D. (2013). Are drought-resistance promoting bacteria cross-compatible with different plant models? <https://doi.org/10.4161/Psb.26741>, *8*(10). <https://doi.org/10.4161/PSB.26741>
- Marulanda, A., Barea, J. M., & Azcón, R. (2009). Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM Fungi and bacteria) from dry environments: Mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation*, *28*(2), 115–124. <https://doi.org/10.1007/S00344-009-9079-6/TABLES/3>
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, *166*(2), 525–530. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.025>
- McAdam, S. A. M., & Brodribb, T. J. (2016). Linking Turgor with ABA Biosynthesis: Implications for Stomatal Responses to Vapor Pressure Deficit across Land Plants. *Plant Physiology*, *171*(3), 2008–2016. <https://doi.org/10.1104/PP.16.00380>
- Mejía, D. (2003). *Maize: Post-harvest Operations*. Food and Agriculture Organization of the United

Nations (FAO).

- Mejri, M., Siddique, K. H. M., Saif, T., Abdelly, C., & Hessini, K. (2016). Comparative effect of drought duration on growth, photosynthesis, water relations, and solute accumulation in wild and cultivated barley species. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 179(3), 327–335. <https://doi.org/10.1002/jpln.201500547>
- Melgarejo, L., Romero, M., Hernandez, S., Barrera, J., Solarte, E., Suárez, D., Pérez, V., Rojas, A., Cruz, M., Moreno, L., Crespo, S., & Pérez, W. (2010). *Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal*. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia.
- Mendoza-Labrador, J., Romero-Perdomo, F., Abril, J., Hernández, J.-P., Uribe-Vélez, D., & Buitrago, R. B. (2021). Bacillus strains immobilized in alginate macrobeads enhance drought stress adaptation of Guinea grass. *Rhizosphere*, 19, 100385. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100385>
- Michel, B. E., & Kaufmann, M. R. (1973). The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiology*, 51(5), 914–916. <https://doi.org/10.1104/pp.51.5.914>
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), 453–467. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2009.02041.X>
- MinAmbiente, M. de A. y D. S. (2015). *PLAN INTEGRAL DE GESTIÓN DEL CAMBIO CLIMÁTICO TERRITORIAL DEL DEPARTAMENTO DEL CESAR*. [https://www.minambiente.gov.co/images/cambioclimatico/pdf/aproximacion\\_\\_al\\_territorio/Cesar\\_pag\\_ind.pdf](https://www.minambiente.gov.co/images/cambioclimatico/pdf/aproximacion__al_territorio/Cesar_pag_ind.pdf)
- Mishra, A. K., & Singh, V. P. (2010). A review of drought concepts. *Journal of Hydrology*, 391, 202–216. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2010.07.012>
- Morcillo, R. J. L., & Manzanera, M. (2021). *The Effects of Plant-Associated Bacterial Exopolysaccharides on Plant Abiotic Stress Tolerance*. 11, 1–19. <https://doi.org/10.3390/metabo11060337>
- Moreno-Galván, A., Cortés-Patiño, S., Romero-Perdomo, F., Uribe-Vélez, D., Bashan, Y., & Bonilla, R. (2020). Proline accumulation and glutathione reductase activity induced by drought-tolerant rhizobacteria as potential mechanisms to alleviate drought stress in Guinea grass. *Applied Soil Ecology*, 147(September), 103367. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103367>
- Moreno-Galván, A., Romero-Perdomo, F. A., Estrada-Bonilla, G., Meneses, C. H. S. G., & Bonilla, R. R. (2020). Dry-Caribbean Bacillus spp. Strains Ameliorate Drought Stress in Maize by a Strain-Specific Antioxidant Response Modulation. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 823, 8(6), 823. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8060823>
- Moreno, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179–191.
- Murshed, R., Lopez-Lauri, F., & Sallanon, H. (2008). Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle. *Analytical Biochemistry*, 383(2), 320–322. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.07.020>

- Musimwa, T. R., Molnar, T. L., Dutta, S., Dhliwayo, T., Trachsel, S., & Lee, M. (2023). Phenotypic assessment of genetic gain from selection for improved drought tolerance in semi-tropical maize populations. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 209(1), 71–82. <https://doi.org/10.1111/JAC.12592>
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Tufail, M. A., Asghar, H. N., Nazli, F., & Zahir, Z. A. (2021). Appraising the potential of EPS-producing rhizobacteria with ACC-deaminase activity to improve growth and physiology of maize under drought stress. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 463–476. <https://doi.org/10.1111/PPL.13212>
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867–880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Naseem, H., Ahsan, M., Shahid, M. A., & Khan, N. (2018). Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *Journal of Basic Microbiology*, 58(12), 1009–1022. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800309>
- Naseem, H., & Bano, A. (2014). Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 689–701. <https://doi.org/10.1080/17429145.2014.902125>
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265–270. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1999.TB13383.X>
- Naveed, M., Mitter, B., Reichenauer, T. G., Wiczorek, K., & Sessitsch, A. (2014). Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by Burkholderia phytofirmans PsJN and Enterobacter sp. FD17. *Environmental and Experimental Botany*, 97, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.014>
- Naylor, D., & Coleman-Derr, D. (2018). Drought Stress and Root-Associated Bacterial Communities. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02223>
- Nayyar, H., & Gupta, D. (2006). Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. *Environmental and Experimental Botany*, 58(1–3), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.06.021>
- Ngumbi, E., & Kloepper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, 105, 109–125. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.009>
- Nieves-Cordones, M., García-Sánchez, F., Pérez-Pérez, J. G., Colmenero-Flores, J. M., Rubio, F., & Rosales, M. A. (2019). Coping With Water Shortage: An Update on the Role of K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, and Water Membrane Transport Mechanisms on Drought Resistance. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1619. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01619/BIBTEX>
- Nio, S. A., Cawthray, G. R., Wade, L. J., & Colmer, T. D. (2011). Pattern of solutes accumulated during leaf osmotic adjustment as related to duration of water deficit for wheat at the reproductive

- stage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(10), 1126–1137.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.05.011>
- Niu, X., Song, L., Xiao, Y., & Ge, W. (2018). Drought-Tolerant Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Associated with Foxtail Millet in a Semi-arid Agroecosystem and Their Potential in Alleviating Drought Stress. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 2580.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02580>
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), 249–279.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>
- Noctor, G., Mhamdi, A., & Foyer, C. H. (2016). Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant, Cell & Environment*, 39(5), 1140–1160.  
<https://doi.org/10.1111/pce.12726>
- Noctor, G., Mhandi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., & Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 454–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02400.x>
- Nunan, N., Leloup, J., Ruamps, L. S., Pouteau, V., & Chenu, C. (2017). Effects of habitat constraints on soil microbial community function. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-04485-z>
- Ogbaga, C. C., Stepien, P., & Johnson, G. N. (2014). Sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties adopt strongly contrasting strategies in response to drought. *Physiologia Plantarum*, 152(2), 389–401. <https://doi.org/10.1111/PPL.12196>
- Ordoñez, Y. M., Fernandez, B. R., Lara, L. S., Rodriguez, A., Uribe-Vélez, D., & Sanders, I. R. (2016). Bacteria with Phosphate Solubilizing Capacity Alter Mycorrhizal Fungal Growth Both Inside and Outside the Root and in the Presence of Native Microbial Communities. *PLOS ONE*, 11(6), e0154438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154438>
- Osmolovskaya, N., Shumilina, J., Kim, A., Didio, A., Grishina, T., Bilova, T., Keltsieva, O. A., 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 2018, Vol. 19, Page 4089*, 19(12), 4089.  
<https://doi.org/10.3390/IJMS19124089>
- Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H. R., & Violic, A. D. (2001). *EL MAÍZ EN LOS TRÓPICOS: Mejoramiento y producción*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).  
<https://www.fao.org/3/x7650s/x7650s00.htm#toc>
- Palmer, W. C. (1965). *Meteorological Drought* (W. B. U.S. Department of Commerce (ed.); Vol. 30).  
[https://books.google.com.co/books?id=kyYZgnEk-L8C&lr=&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.co/books?id=kyYZgnEk-L8C&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- Pandey, V., & Shukla, A. (2015). Acclimation and Tolerance Strategies of Rice under Drought Stress. *Rice Science*, 22(4), 147–161. <https://doi.org/10.1016/J.RSCI.2015.04.001>
- Patiño-Torres, C., & Sanclemente, O. (2014). Los Microorganismos solubilizadores de Fosforo (MSF): Una Alternativa Biotecnológica Para Una Agricultura Sostenible. *Entramado*, 10(2),

- 288–297. <http://www.scielo.org.co/pdf/entra/v10n2/v10n2a18.pdf>
- Pedraza-Herrera, L. A., Bautista, J. P., Cruz-Ramírez, C. A., & Uribe-Vélez, D. (2021). IBUN2755 Bacillus strain controls seedling root and bacterial panicle blight caused by Burkholderia glumae. *Biological Control*, *153*, 104494. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104494>
- Penrose, D. M., & Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, *118*(1), 10–15. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x>
- Perea-Molina, P. A., Pedraza-Herrera, L. A., Beauregard, P. B., & Uribe-Vélez, D. (2022). A biocontrol Bacillus velezensis strain decreases pathogen Burkholderia glumae population and occupies a similar niche in rice plants. *Biological Control*, *176*, 105067. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105067>
- Pereira, S. I. A., & Castro, P. M. L. (2014). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance Zea mays growth in agricultural P-deficient soils. *Ecological Engineering*, *73*, 526–535. <https://doi.org/10.1016/j.ECOLENG.2014.09.060>
- PIDARET. (2019). *PLAN INTEGRAL DE DESARROLLO AGROPECUARIO Y RURAL CON ENFOQUE TERRITORIAL TOMO II DEPARTAMENTO DEL CESAR*. <https://www.adr.gov.co/servicios/pidaret/CESAR TOMO II.pdf>
- Piña, R. G., & Cervantes, C. (1996). Microbial interactions with aluminium. *BioMetals*, *9*(3), 311–316. <https://doi.org/10.1007/BF00817932/METRICS>
- Prasanna, B. M., Cairns, J. E., Zaidi, P. H., Beyene, Y., Makumbi, D., Gowda, M., Magorokosho, C., Zaman-Allah, M., Olsen, M., Das, A., Worku, M., Gethi, J., Vivek, B. S., Nair, S. K., Rashid, Z., Vinayan, M. T., Issa, A. R. B., San Vicente, F., Dhlwayo, T., & Zhang, X. (2021). Beat the stress: breeding for climate resilience in maize for the tropical rainfed environments. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, *134*(6), 1729–1752. <https://doi.org/10.1007/S00122-021-03773-7>
- Praveen Kumar, G., Mir Hassan Ahmed, S. K., Desai, S., Leo Daniel Amalraj, E., & Rasul, A. (2014). In Vitro Screening for Abiotic Stress Tolerance in Potent Biocontrol and Plant Growth Promoting Strains of Pseudomonas and Bacillus spp. . *International Journal of Bacteriology*, *2014*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/195946>
- Qurashi, A. W., & Sabri, A. N. (2012). Biofilm formation in moderately halophilic bacteria is influenced by varying salinity levels. *Journal of Basic Microbiology*, *52*(5), 566–572. <https://doi.org/10.1002/JOBM.201100253>
- Riva, V., Mapelli, F., Dragonetti, G., Elfahl, M., Vergani, L., Crepaldi, P., La Maddalena, N., & Borin, S. (2021). Bacterial Inoculants Mitigating Water Scarcity in Tomato: The Importance of Long-Term in vivo Experiments. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 1328. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.675552>
- Rolando, J. L., Ramírez, D. A., Yactayo, W., Monneveux, P., & Quiroz, R. (2015). Leaf greenness as a

- drought tolerance related trait in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Environmental and Experimental Botany*, *110*, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.09.006>
- Rolli, E., Marasco, R., Vigani, G., Ettoumi, B., Mapelli, F., Deangelis, M. L., Gandolfi, C., Casati, E., Previtali, F., Gerbino, R., Pierotti Cei, F., Borin, S., Sorlini, C., Zocchi, G., & Daffonchio, D. (2015). Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environmental Microbiology*, *17*(2), 316–331. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12439>
- Rozo-Leguizamón, Y., Tofiño-Rivera, A. P., Gómez-Latorre, D. A., Gómez-Ramírez, L. F., & Tamayo-Molano, P. J. (2018). Modelo productivo del frijol para el Caribe seco colombiano. In L. Gaona-García (Ed.), *Modelo productivo para el cultivo de cacao (Theobroma cacao) para el departamento de Santander*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. <http://editorial.agrosavia.co/index.php/publicaciones/catalog/download/29/20/361-1?inline=1>
- Sade, N., Galkin, E., & Moshelion, M. (2015). Measuring Arabidopsis, Tomato and Barley Leaf Relative Water Content (RWC). *BIO-PROTOCOL*, *5*(8). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1451>
- Saeid, A., Prochownik, E., & Dobrowolska-Iwanek, J. (2018). Phosphorus Solubilization by Bacillus Species. *Molecules*, *23*(11). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23112897>
- Sah, R. P., Chakraborty, M., Prasad, K., Pandit, M., Tudu, V. K., Chakravarty, M. K., Narayan, S. C., Rana, M., & Moharana, D. (2020). Impact of water deficit stress in maize: Phenology and yield components. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59689-7>
- Saikia, J., Sarma, R. K., Dhandia, R., Yadav, A., Bharali, R., Gupta, V. K., & Saikia, R. (2018). Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. *Scientific Reports*, *8*(1), 3560. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21921-w>
- Saleem, M., Nawaz, F., Hussain, M. B., & Ikram, R. M. (2021). Comparative Effects of Individual and Consortia Plant Growth Promoting Bacteria on Physiological and Enzymatic Mechanisms to Confer Drought Tolerance in Maize (*Zea mays* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *21*(4), 3461–3476. <https://doi.org/10.1007/S42729-021-00620-Y/TABLES/3>
- Samarah, N., & Alqudah, A. (2009). Effects of late-terminal drought stress on seed germination and vigor of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science*, *57*(1), 27–32. <https://doi.org/10.1080/03650340903191663>
- Samarah, N. (2005). Effects of drought stress on growth and yield of barley. *Agronomy for Sustainable Development*, *25*(1), 145–149. <https://doi.org/10.1051/AGRO:2004064>
- Sánchez-Rodríguez, E., del Mar Rubio-Wilhelmi, M., Cervilla, L. M., Blasco, B., Rios, J. J., Leyva, R., Romero, L., & Ruiz, J. M. (2010). Study of the ionome and uptake fluxes in cherry tomato plants under moderate water stress conditions. *Plant and Soil*, *335*(1), 339–347. <https://doi.org/10.1007/S11104-010-0422-2/METRICS>
- Sandhya, V., & Ali, S. Z. (2015). The production of exopolysaccharide by *Pseudomonas putida* GAP-P45 under various abiotic stress conditions and its role in soil aggregation. *Microbiology*

- (Russian Federation), 84(4), 512–519.  
<https://doi.org/10.1134/S0026261715040153/METRICS>
- Sandhya, V., Ali, S. Z., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. (2010). Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regulation* 2010 62:1, 62(1), 21–30. <https://doi.org/10.1007/S10725-010-9479-4>
- Sandhya, V., Shrivastava, M., Ali, S. Z., & Sai Shiva Krishna Prasad, V. (2017). Endophytes from maize with plant growth promotion and biocontrol activity under drought stress. *Russian Agricultural Sciences*, 43(1), 22–34. <https://doi.org/10.3103/s1068367417010165>
- Sandhya, V., Z., A. S., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. (2009). Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and Fertility of Soils*, 46(1), 17–26. <https://doi.org/10.1007/S00374-009-0401-Z>
- Saravanakumar, D., Kavino, M., Raguchander, T., Subbian, P., & Samiyappan, R. (2011). Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(1), 203–209. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0539-1>
- Sati, D., Pande, V., Pandey, S. C., & Samant, M. (2022). Recent Advances in PGPR and Molecular Mechanisms Involved in Drought Stress Resistance. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 2021 23:1, 23(1), 106–124. <https://doi.org/10.1007/S42729-021-00724-5>
- Scarpellini, M., Franzetti, L., & Galli, A. (2004). Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 257–260. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2004.TB09655.X>
- Scharwies, J. D., & Dinneny, J. R. (2019). Water transport, perception, and response in plants. *Journal of Plant Research* 2019 132:3, 132(3), 311–324. <https://doi.org/10.1007/S10265-019-01089-8>
- Secretaría Distrital de Ambiente. (2021a). *Informe Mensual de Calidad del Aire de Bogotá - Junio 2021* (Issue 00716). [http://rmcab.ambientebogota.gov.co/Pagesfiles/Informe mensual Junio 2021.pdf](http://rmcab.ambientebogota.gov.co/Pagesfiles/Informe%20mensual%20Junio%202021.pdf)
- Secretaría Distrital de Ambiente. (2021b). *Informe Mensual de Calidad del Aire de Bogotá - Noviembre 2021*. [http://rmcab.ambientebogota.gov.co/Pagesfiles/Informe mensual Noviembre 2021 vf.pdf](http://rmcab.ambientebogota.gov.co/Pagesfiles/Informe%20mensual%20Noviembre%202021%20vf.pdf)
- Selvakumar, G., Bindu, G. H., Panneerselvam, P., & Ganeshamurthy, A. N. (2017). Potential and prospects of aerobic endospore-forming bacteria (AEFB) in crop production. In *Bacilli and Agrobiotechnology* (pp. 213–236). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_10)
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessaraki, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal*

- of Botany*, 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H. R., Archibald, R. L., Yang, M., Hakimi, S. M., Mo, H., & Habben, J. E. (2017). ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 15(2), 207–216. <https://doi.org/10.1111/pbi.12603>
- Shiferaw, B., Prasanna, B. M., Hellin, J., & Bänziger, M. (2011). Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Security*, 3(3), 307–327. <https://doi.org/10.1007/S12571-011-0140-5/TABLES/3>
- Shirinbayan, S., Khosravi, H., & Malakouti, M. J. (2019). Alleviation of drought stress in maize (*Zea mays*) by inoculation with *Azotobacter* strains isolated from semi-arid regions. *Applied Soil Ecology*, 133, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.09.015>
- Shulse, C. N., Chovatia, M., Agosto, C., Yoshikuni, G. Y., Hamilton, M., Deutsch, S., Yoshikuni, Y., & Blow, M. J. (2019). Engineered root bacteria release plant-available phosphate from phytate. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(18). <https://doi.org/10.1128/AEM.01210-19>
- Singh, D. P., Singh, V., Gupta, V. K., Shukla, R., Prabha, R., Sarma, B. K., & Patel, J. S. (2020). Microbial inoculation in rice regulates antioxidative reactions and defense related genes to mitigate drought stress. *Scientific Reports*, 10(1), 4818. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61140-w>
- Singh, H. B., Vaishnav, A., & Sayyed, R. Z. (2021). Antioxidants in Plant-Microbe Interaction. In Harikesh Bahadur Singh, A. Vaishnav, & R. Z. Sayyed (Eds.), *Antioxidants in Plant-Microbe Interaction*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-1350-0>
- Smirnoff, N. (2005). Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. In Nicholas Smirnoff (Ed.), *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470988565>
- Smith, I. K., Vierheller, T. L., & Thorne, C. A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, 175(2), 408–413. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90564-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90564-7)
- Smith, R. H., Bhaskaran, S., & Miller, F. R. (1985). Screening for drought tolerance in Sorghum using cell culture. *In Vitro Cellular Amp; Developmental Biology* 1985 21:10, 21(10), 541–545. <https://doi.org/10.1007/BF02620883>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Suárez, J. C., Anzola, J. A., Contreras, A. T., Salas, D. L., Vanegas, J. I., Urban, M. O., Beebe, S. E., & Rao, I. M. (2022). Photosynthetic and grain yield responses to intercropping of two common bean lines with maize under two types of fertilizer applications in the colombian amazon region. *Scientia Horticulturae*, 301, 111108. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111108>
- Sun, C., Gao, X., Chen, X., Fu, J., & Zhang, Y. (2016). Metabolic and growth responses of maize to successive drought and re-watering cycles. *Agricultural Water Management*, 172, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.04.016>

- Taiz, L., & Zeiger, E. (2003). Plant physiology. In *Annals of Botany* (3 edition, Vol. 91, Issue 6). <https://doi.org/10.1093/aob/mcg079>
- Takahashi, F., Kuromori, T., Urano, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2020). Drought Stress Responses and Resistance in Plants: From Cellular Responses to Long-Distance Intercellular Communication. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1407. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.556972>
- Tanumihardjo, S. A., McCulley, L., Roh, R., Lopez-Ridaura, S., Palacios-Rojas, N., & Gunaratna, N. S. (2020). Maize agro-food systems to ensure food and nutrition security in reference to the Sustainable Development Goals. *Global Food Security*, *25*, 100327. <https://doi.org/10.1016/J.GFS.2019.100327>
- Tiwari, G., Duraivadivel, P., Sharma, S., & Hariprasad, P. (2018). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing beneficial rhizobacteria ameliorate the biomass characters of *Panicum maximum* Jacq. by mitigating drought and salt stress. *Scientific Reports 2018 8:1*, *8*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35565-3>
- Tiwari, S., Lata, C., Chauhan, P. S., & Nautiyal, C. S. (2016). *Pseudomonas putida* attunes morphophysiological, biochemical and molecular responses in *Cicer arietinum* L. during drought stress and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*, *99*, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.11.001>
- Tiwari, S., Prasad, V., Chauhan, P. S., & Lata, C. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 283109. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.01510/BIBTEX>
- Ullah, A., Sun, H., Yang, X., & Zhang, X. (2017). Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. *Plant Biotechnology Journal*, *15*(3), 271–284. <https://doi.org/10.1111/pbi.12688>
- UN, U. N. D. of E. and S. A. (2019). *World Population Prospects 2019 Highlights*. [https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019\\_Highlights.pdf](https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf)
- Vaishnav, A., & Choudhary, D. K. (2019). Regulation of Drought-Responsive Gene Expression in *Glycine max* L. Merrill is Mediated Through *Pseudomonas simiae* Strain AU. *Journal of Plant Growth Regulation*, *38*(1), 333–342. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9846-3>
- Vardharajula, S., Zulfikar, S., Grover, M., Reddy, G., & Bandi, V. (2011). Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *J Plant Interact*, *6*(1), 1–14.
- Velázquez-Márquez, S., Conde-Martínez, V., Trejo, C., Delgado-Alvarado, A., Carballo, A., Suárez, R., Mascorro, J. O., & Trujillo, A. R. (2015). Effects of water deficit on radicle apex elongation and solute accumulation in *Zea mays* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, *96*, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.07.006>
- Vieira, V. L., Araújo, P., Gomes, G., Fracetto, M., Marcos, A., Silva, M., Prudencio, A., Pereira, A.,

- Gomes Freitas, C. C., Martins, F., Barros, R., Santana, C., Feiler, H. P., Pereira Matteoli, F., Cury Fracetto, F. J., Bran, E. J., & Cardoso, N. (2023). Potential of growth-promoting bacteria in maize (*Zea mays* L.) varies according to soil moisture. *Microbiological Research*, *271*, 127352. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127352>
- Vieira, V. L., Lira, M. A., Severino de Souza, V., Coelho de Araújo, J., Cury, F., Dini, F., Arthur, P. de A., Mendes, J., do Rêgo, F., & Monteiro, G. (2020). Bacteria from tropical semiarid temporary ponds promote maize growth under hydric stress. *Microbiological Research*, *240*, 126564. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126564>
- Vílchez, J. I., García-Fontana, C., Román-Naranjo, D., González-López, J., & Manzanera, M. (2016). Plant drought tolerance enhancement by trehalose production of desiccation-tolerant microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, *7*(SEP), 1577. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01577/BIBTEX>
- Vinocur, B., & Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 16, Issue 2, pp. 123–132). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.001>
- Vishnupradeep, R., Bruno, L. B., Taj, Z., Karthik, C., Challabathula, D., Tripti, Kumar, A., Freitas, H., & Rajkumar, M. (2022). Plant growth promoting bacteria improve growth and phytostabilization potential of *Zea mays* under chromium and drought stress by altering photosynthetic and antioxidant responses. *Environmental Technology & Innovation*, *25*, 102154. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2021.102154>
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, *184*, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, *61*(3), 199–223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>
- Wang, C. J., Yang, W., Wang, C., Gu, C., Niu, D. D., Liu, H. X., Wang, Y. P., & Guo, J. H. (2012). Induction of Drought Tolerance in Cucumber Plants by a Consortium of Three Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Strains. *PLoS ONE*, *7*(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052565>
- Wasaya, A., Manzoor, S., Yasir, T. A., Sarwar, N., Mubeen, K., Ismail, I. A., Raza, A., Rehman, A., Hossain, A., & Sabagh, A. E. L. (2021). Evaluation of Fourteen Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes by Observing Gas Exchange Parameters, Relative Water and Chlorophyll Content, and Yield Attributes under Drought Stress. *Sustainability 2021, Vol. 13, Page 4799*, *13*(9), 4799. <https://doi.org/10.3390/SU13094799>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wilhite, D. A., Glantz, M. H., & And Glantz, M. H. (1985). *Understanding the Drought*

- Phenomenon: The Role of Definitions.*  
<http://digitalcommons.unl.edu/droughtfacpub>  
<http://digitalcommons.unl.edu/droughtfacpub/20>
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology* (7th ed.). Colin Wheatley/Janice Roerig-Blong.
- Xiao, B., Chen, X., Xiang, C., Tang, N., & Zhang, Q. (2009). Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions. *Mol Plant*, 2.
- Xin, L., Zheng, H., Yang, Z., Guo, J., Liu, T., Sun, L., Xiao, Y., Yang, J., Yang, Q., & Guo, L. (2018). Physiological and proteomic analysis of maize seedling response to water deficiency stress. *Journal of Plant Physiology*, 228, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.05.005>
- Yan, M. (2015). Seed priming stimulate germination and early seedling growth of Chinese cabbage under drought stress. *South African Journal of Botany*, 99, 88–92. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2015.03.195>
- Yarzabal, L. A. (2010). *Agricultural Development in Tropical Acidic Soils: Potential and Limits of Phosphate-Solubilizing Bacteria*. 209–233. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-05076-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-05076-3_10)
- Yevjevich, V. (1967). *AN OBJECTIVE APPROACH TO DEFINITIONS AND INVESTIGATIONS OF CONTINENTAL HYDROLOGIC DROUGHTS AN OBJECTIVE APPROACH TO DEFINITIONS AND INVESTIGATIONS OF CONTINENTAL HYDROLOGIC DROUGHTS*.
- You, J., & Chan, Z. (2015). Ros regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(DEC), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01092>
- Zaman-Allah, M., Zaidi, P. H., Trachsel, S., Cairns, J. E., Vinayan, M. T., & Seetharam, K. (2016). *PHENOTYPING FOR ABIOTIC STRESS TOLERANCE IN MAIZE: DROUGHT STRESS*. CIMMYT. <https://repository.cimmyt.org/handle/10883/17716?show=full>
- Zambrano-Moreno, D. C., Avellaneda-Franco, L., Zambrano, G., & Bonilla-Buitrago, R. R. (2016). Scientometric analysis of Colombian research on bio-inoculants for agricultural production. *Universitas Scientiarum*, 21(1), 63–81. <https://doi.org/10.11144/JAVERIANA.SC21-1.SAOC>
- Zarei, T. (2022). Balancing water deficit stress with plant growth-promoting rhizobacteria: A case study in maize. *Rhizosphere*, 24, 100621. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100621>
- Zarei, T., Moradi, A., Kazemeini, S. A., Akhgar, A., & Rahi, A. A. (2020). The role of ACC deaminase producing bacteria in improving sweet corn (*Zea mays* L. var *saccharata*) productivity under limited availability of irrigation water. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-77305-6>
- Zeiger, E., & Taiz, L. (2007). *Fisiología vegetal. Volumen 2*. Universitat Jaume I.
- Zhang, N., Yang, D., Wang, D., Miao, Y., Shao, J., Zhou, X., Xu, Z., Li, Q., Feng, H., Li, S., Shen, Q., & Zhang, R. (2015). Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium

*Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates. *BMC Genomics*, 16(1), 685. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1825-5>

Zhang, Q., Acuña, J. J., Inostroza, N. G., Mora, M. L., Radic, S., Sadowsky, M. J., & Jorquera, M. A. (2019). Endophytic Bacterial Communities Associated with Roots and Leaves of Plants Growing in Chilean Extreme Environments. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-41160-X>

Zhao, T., Deng, X., Xiao, Q., Han, Y., Zhu, S., & Chen, J. (2020). IAA priming improves the germination and seedling growth in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via regulating the endogenous phytohormones and enhancing the sucrose metabolism. *Industrial Crops and Products*, 155, 112788. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112788>

Zhao, X., Jiang, Y., Liu, Q., Yang, H., Wang, Z., & Zhang, M. (2020). Effects of Drought-Tolerant Ea-DREB2B Transgenic Sugarcane on Bacterial Communities in Soil. *Frontiers in Microbiology*, 11, 704. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00704>

Zia, A., Walker, B. J., Oung, H. M. O., Charuvi, D., Jahns, P., Cousins, A. B., Farrant, J. M., Reich, Z., & Kirchhoff, H. (2016). Protection of the photosynthetic apparatus against dehydration stress in the resurrection plant *Craterostigma pumilum*. *The Plant Journal*, 87(6), 664–680. <https://doi.org/10.1111/tpj.13227>