



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Agronomía
Programa de Magíster en Ciencias Agronómicas

Respuesta sobre las Propiedades del Suelo, Características Fisiológicas, Enzimas Antioxidantes y síntesis de compuestos fenólicos en distintos cultivos bajo Condiciones de Riego Deficitario

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agronómicas

JORGE ERNESTO CLAUDIO BAEZA ARANZÁEZ
CHILLAN, CHILE
2024

Profesor Guía: María Dolores López Belchí
Dpto. de Producción Vegetal
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Producción Vegetal de la Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. María Dolores López Belchí
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Juan Gabriel Pérez Pérez
Instituto Valenciano de
Investigaciones Agrarias.

Comisión Evaluadora

Dr. Mauricio Schoebitz Cid
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

PhD. Richard Bastías Ibarra
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Macarena Gerding Gonzalez
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

A mi querida madre, que ya no está conmigo pero que siempre fue un apoyo incondicional en este camino académico. A mis amigos, quienes siempre me apoyaron entregándome sus conocimientos y apoyo en todo ámbito. A la academia Teagym y en especial a la Sabonim Viviana de la Rosa quien me ayudo con su disciplina y liberación en los momentos de mayor estrés. Y por sobre todo a mi querida esposa, por su gran paciencia, comprensión apoyo y amor infinito. Gracias por ser mis pilares en este proceso.

*Dedico esta tesis con mucho cariño, que sin ustedes no habría llegado hasta
acá.*

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), FONDEF IDEA ID21110050, por el financiamiento de esta tesis y a AgriChile por proporcionar las muestras vegetales.

A mis profesores:

- A la Dra. María Dolores López quien fue mi profesora guía, gracias por su gran disposición, aunque tuviese su agenda completa siempre se hacía un tiempo para ayudar, además de corregir y ayudar a redactar este escrito y por sobre todo paciencia.
- Al Dr. Juan Gabriel Pérez Pérez, quien a pesar de la distancia siempre estuvo dispuesto a ofrecer su ayuda y guía en este proceso.
- Al Dr. Mauricio Schoebitz por permitirme realizar los experimentos y análisis en su laboratorio, por su guía en el diseño y aplicación de las formulaciones.
- Al Dr. Richard Bastías por su guía en el cuidado de los plantines y establecimiento de estos, además de la corrección del manuscrito.

A la Dra. Solange Benítez, quien siempre tuvo la disposición de entregar sus conocimientos para plantear un mejor ensayo con el fin de una mejor tesis. gracias por su tiempo y consejos.

A Rocío Carrasco por ayudarme en el cuidado de los plantines y guía de cómo utilizar los equipos, de verdad muchas gracias por todo esto.

A Felipe Noriega por su guía y paciencia en el momento de utilizar los equipos para que estos fueran empleados de manera pulcra, de verdad muchas gracias por ello.

A todo el equipo del laboratorio por su apoyo y amistad, quienes hicieron de esta experiencia una inolvidable y amena.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, amigos y amigas quienes me acompañaron y estuvieron siempre conmigo.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xii
SUMMARY.....	xvi
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
HORMONAS Y DEFICIT HÍDRICO.....	10
Ácido abscísico, etileno, jasmonatos y salicilatos y su rol en el estrés hídrico	10
Giberelinas, auxinas y citoquininas.....	13
Otras fitohormonas: Brasinoesteroides y estrigolactonas.....	15
CONSIDERACIONES FINALES.....	16
Hipótesis.....	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Específicos.....	18
REFERENCIAS.....	19
CAPITULO II.....	29
Effective Method for Immobilizing Rhizobacteria to Enhance Soil Properties and Improve the Physiological and Enzyme-Antioxidant Characteristics of Hazelnut under Deficit Irrigation Conditions.....	29
GRAPHICAL ABSTRACT.....	30
ABSTRACT.....	30
1. Introduction.....	31
2. Materials and methods.....	35
3. Results.....	41
4. Discussion.....	50

5. Conclusions.....	55
References	56
CAPITULO III.....	70
Microencapsulados de <i>Bacillus safensis</i> en una matriz de alginato y su impacto en el contenido de compuestos fenólicos en albahaca morada	70
1. INTRODUCCIÓN	70
2. MATERIALES Y METODOS.....	71
3. RESULTADOS.....	72
4. CONCLUSIONES	77
REFERENCIAS	78
CONCLUSIONES GENERALES	81
PRODUCTIVIDAD	82
Publicaciones	82
Participación en proyectos de investigación	82
Asistencia a congresos:	83
DATOS SUPLEMENTARIOS	86

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I

	Página
Tabla 1 Efecto de diferentes tratamientos de riego sobre el rendimiento, el peso del grano, el peso del fruto, la relación grano/fruto, el contenido de α -tocoferol en el grano y la productividad del agua (WP) en <i>Corylus avellana</i> L.....	5
Tabla 2 Tipos de osmolitos y su función en plantas.....	7
Tabla 3 Ejemplo de estrés oxidativos de cultivos sometidos a distintos tratamientos de sequía.....	8

CAPITULO II

Effective Method for Immobilizing Rhizobacteria to Enhance Soil Properties and Improve the Physiological and Enzyme-Antioxidant Characteristics of Hazelnut under Deficit Irrigation Conditions

Table 1 Leaf gas exchange parameters measured in hazelnut plants as affected by deficit irrigation.....	43
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

CAPITULO III

Microencapsulados de *Bacillus safensis* en una matriz de alginato y su impacto en el momento de la siembra en albahaca morada

Tabla 1 Días de germinación post siembra e inoculación	72
--------------------------------------------------------------	-----------

Tabla 2	Identificación y cuantificación total de antocianos	77
Datos Suplementarios		
Table 1S	Characterization of beads developed through JetCutter technology.....	86
Table 2S	Changes in Soil characteristics for the trial.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

	Pagina
Figura 1	Esquema de fijación de carbono en condiciones normales... 2
Figura 2	Esquema de la fijación del carbono bajo estrés hídrico..... 3
Figura 3	Modelo del papel de los factores de señalización en el cierre estomático y la señalización retrógrada durante el estrés hídrico..... 9

CAPITULO II

Effective Method for Immobilizing Rhizobacteria to Enhance Soil Properties and Improve the Physiological and Enzyme-Antioxidant Characteristics of Hazelnut under Deficit Irrigation Conditions

Figure 1	Foliar Proline and Root Proline Content (nmol/g) in Corylus avellana Plants.....	44
Figure 2	Foliar Abscisic Acid (ABA) Content (mg 100 g ⁻¹) in Corylus avellana Plants.....	45

Figure 3	Evaluation of phytohormones in the root net a). Root Abscisic Acid (ABA) Content (mg 100 g ⁻¹), b). Root Indole-3-Acetic Acid (IAA) Content (mg 100 g ⁻¹), c). Root Indole Butyric Acid (IBA) Content (mg 100 g ⁻¹) in <i>Corylus avellana</i> Plants.....	46
Figure 4	Evaluation of Antioxidant enzyme system net a). Superoxide dismutase (SOD) (U mg ⁻¹ h ⁻¹) Content, b). Ascorbate peroxidase (APX) (mmol ASC mg prot ⁻¹ h ⁻¹) Content c). Glutathione reductase GR (mmol NADH mg prot ⁻¹ h ⁻¹) Content in <i>Corylus avellana</i> Plants.....	47
Figure 5	PCA analysis of the different water deficit treatments and the physiological and biochemical variables in hazelnut.....	49

CAPITULO III

Microencapsulados de *Bacillus safensis* en una matriz de alginato y su impacto en el momento de la siembra en albahaca morada

Figura 1	Altura de los brotes transcurrido 20 días.....	73
Figura 2	Peso total de los brotes por repetición de cada tratamiento..	74
Figura 3	Actividad de la peroxidasa (POX).....	75
Figura 4	Actividad de la Glutación reductasa (GR).....	76

Datos Suplementarios

Figure 1S	Evaluation of aerial part in <i>Corylus avellana</i> plants, a) Total dry weight (g); b) Defoliated Dry Weight (g); c) Foliar Dry Weight (g).....	88
-----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 2S	Evaluation of root part in <i>Corylus avellana</i> plants a) Root Length (cm), b) Number of Green Roots in <i>Corylus avellana</i> Plants.....	89
Figure 3S	Evaluation of the soil in <i>Corylus avellana</i> Plants, a). Fluorescein Diacetate Hydrolysis (FDA) ($\mu\text{g F g}^{-1}$ dry soil), b). Total Organic Carbon (TOC) Microbial Biomass (MB) (mg kg^{-1} DW).....	90

RESUMEN

La agricultura constituye uno de los procesos más relevantes a nivel global, no solo por su rol fundamental en la alimentación de la población, sino también por su impacto en el mantenimiento de un equilibrio ecosistémico. Actualmente, este sector enfrenta diversas adversidades, como el incremento en los costos de los agroinsumos y la escasez de ciertos recursos esenciales.

En este contexto, el cambio climático ha emergido como un tema central en el ámbito agrícola, dada su capacidad de impactar indiscriminadamente a nivel global, independientemente de la ubicación geográfica, el nivel socioeconómico o el grado de desarrollo de los países. Chile, reconocido por su marcada diversidad climática, ha sufrido de manera significativa las consecuencias de este fenómeno. Entre los efectos más notorios destacan lluvias excesivas en invierno o, en contraste, la ausencia total de precipitaciones en la estación estival. Desde 2010, el país experimentó un período prolongado de déficit hídrico, conocido como megasequía, que se extendió por más de una década. Este evento afectó especialmente a la zona centro-sur de Chile, una región clave para la producción frutícola.

Estos eventos climáticos tienen un impacto significativo en los productores agrícolas, quienes se ven obligados a realizar mayores inversiones para garantizar la continuidad de sus cultivos y minimizar las pérdidas. Por ello, resulta fundamental comprender cómo los déficits hídricos afectan a los cultivos y desarrollar estrategias para mitigar sus consecuencias.

La escasez de agua induce estrés en las plantas, un fenómeno que, en muchos casos, se manifiesta de forma visual en etapas avanzadas, dificultando la implementación oportuna de medidas correctivas. Este estrés hídrico puede influir en múltiples aspectos fisiológicos y bioquímicos de las plantas. Por consiguiente, es crucial establecer sistemas de monitoreo constante que permitan evaluar el grado de afectación de los cultivos, identificando los

parámetros clave para determinar su estado hídrico y fisiológico de manera precisa y en tiempo real.

Los efectos del déficit hídrico en las plantas pueden manifestarse a nivel fisiológico y bioquímico. Entre los efectos fisiológicos destacan la caída prematura de hojas, la reducción en la tasa fotosintética y, como consecuencia, una disminución en el rendimiento agronómico. Por otro lado, los efectos bioquímicos son más complejos de evaluar, ya que no son visibles a simple vista y requieren metodologías específicas para su medición.

Entre los cambios bioquímicos más relevantes se encuentra el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales están estrechamente relacionadas con el estrés oxidativo en las plantas. En respuesta a este fenómeno, las plantas incrementan la actividad de enzimas antioxidantes como mecanismo de defensa. Adicionalmente, se observa un aumento en la concentración de ciertas fitohormonas, que desempeñan un papel clave tanto en el desarrollo vegetal como en la respuesta adaptativa frente al estrés. A nivel molecular, las respuestas genéticas proporcionan instrucciones específicas sobre cómo reaccionan las plantas bajo estas condiciones. Sin embargo, estas respuestas suelen ser más complejas de interpretar y están determinadas por las características individuales de cada cultivo.

En la zona centro-sur de Chile, uno de los cultivos que más susceptible a las adversidades climáticas es el avellano europeo (*Corylus avellana* L.), una especie caducifolia originaria del Medio Oriente, cuyo fruto es altamente valorado en la agroindustria, especialmente por su demanda creciente impulsada por empresas como AgriChile. Este árbol presenta características particulares frente al estrés ambiental, siendo su densidad estomática en las hojas un rasgo distintivo que influye en su respuesta fisiológica.

La producción de avellano europeo ha sido significativamente impactada por la reducción de las precipitaciones, dificultando cada vez más su manejo agrícola. Aunque se han implementado avances en la eficiencia del riego mediante

técnicas modernas y equipos que permiten determinar con mayor precisión el momento y la forma óptima de riego, es posible que estas medidas no sean suficientes a largo plazo. En este contexto, se están desarrollando nuevas estrategias para optimizar el uso del agua. Entre ellas, destacan los hidrogeles, polímeros con una alta capacidad de retención de agua, que prolongan la disponibilidad hídrica en el suelo, disminuyen la frecuencia de riego y favorecen la humedad en el entorno radicular de los cultivos.

Aunque los hidrogeles sintéticos han mostrado ser efectivos en la retención de agua, su origen no natural plantea problemas ambientales y de sostenibilidad. En respuesta a esta limitación, han surgido biopolímeros derivados de fuentes vegetales, como el alginato extraído de algas marinas. Este compuesto, aunque no iguala la capacidad de retención hídrica de los polímeros sintéticos, representa una solución más ecológica y amigable con el medio ambiente. Sin embargo, estas alternativas aún enfrentan desafíos, lo que resalta la necesidad de innovar en el desarrollo de tecnologías más efectivas para garantizar la calidad y seguridad de los cultivos frente a condiciones adversas.

En la actualidad, una de las estrategias prometedoras para mitigar el estrés hídrico es el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés). Estas bacterias interactúan de manera beneficiosa con las raíces de los cultivos, aumentando su tolerancia al estrés mediante diversos mecanismos, como el incremento en el desarrollo del sistema radicular y la producción de compuestos antioxidantes. Dentro de este grupo, el género *Bacillus* destaca por su eficacia y resiliencia. Estas bacterias son conocidas por estimular la síntesis de fitohormonas que favorecen el crecimiento radicular, mejorando la capacidad de las plantas para enfrentar condiciones de déficit hídrico y optimizando su desempeño bajo estrés.

La combinación de hidrogeles y bacterias del género *Bacillus* representa una solución prometedora para mitigar los efectos del estrés hídrico, promoviendo cultivos más saludables y productivos incluso en condiciones de escasez de

agua. Además, los biopolímeros como el alginato proporcionan un medio adecuado para la inmovilización y transporte de estas bacterias benéficas, facilitando su aplicación directa en los predios donde se requieran.

En este sentido, se evaluó la respuesta del suelo y de las plántulas de avellano europeo (*Corylus avellana* L.) a la aplicación de un biofertilizante basado en hidrogeles y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Los resultados indicaron diferencias significativas en el contenido de prolina, tanto foliar como radical, entre las plantas tratadas con el bioestimulante y las no tratadas. Estas diferencias fueron más pronunciadas en las plantas sometidas al nivel más severo de restricción hídrica (30 % de riego, 30I), en comparación con aquellas bajo condiciones de riego completo (F1) o moderado (60I).

Además, como se ha señalado, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) poseen la capacidad de incrementar el contenido de antioxidantes en las plantas. Este efecto no solo mejora la tolerancia de los cultivos al estrés, sino que también tiene implicaciones relevantes en la síntesis de compuestos fenólicos, favoreciendo el desarrollo de alimentos nutraceuticos. En este contexto, en el tercer capítulo se estudió la relación entre la aplicación de este biofertilizante y la síntesis de compuestos fenólicos en *Ocimum basilicum* var. *Purpurascens* (albahaca morada). Los resultados mostraron que el contenido de antocianos en el control fue significativamente menor en comparación con todos los tratamientos, siendo el tratamiento con el biofertilizante el que presentó las mayores diferencias significativas.

Estas herramientas han demostrado un gran potencial para enfrentar los desafíos actuales en la agricultura, subrayando la importancia de continuar investigando y desarrollando tecnologías innovadoras. De este modo, se pueden establecer estrategias sostenibles que contribuyan a un futuro agrícola más resiliente, garantizando al mismo tiempo una mayor seguridad alimentaria.

SUMMARY

Agriculture is one of the most important processes at the global level, not only because of its fundamental role in feeding the population, but also because of its impact on the maintenance of an ecosystemic balance. The sector is currently facing several challenges, such as the rising cost of agro-inputs and the scarcity of certain essential resources.

In this context, climate change has emerged as a central issue in the agricultural sector, given its capacity to have an indiscriminate global impact, regardless of the geographical location, socioeconomic level or degree of development of the countries. Chile, known for its marked climatic diversity, has suffered significantly from the consequences of this phenomenon. Among the most notorious effects are excessive rainfall in winter or, in contrast, the total absence of precipitation in this season. Since 2010, the country experienced a prolonged period of water deficit, known as the “megadrought”, which lasted for more than a decade. This event especially affected south-central Chile, a key region for fruit production.

These climatic events have a significant impact on agricultural producers, who are forced to make greater investments to ensure the continuity of their crops and minimize losses. It is therefore essential to understand how water deficits affect crops and to develop strategies to mitigate their consequences.

Water scarcity induces stress in plants, a phenomenon that, in many cases, manifests itself visually in advanced stages, making it difficult to implement corrective measures in a timely manner. This water stress can influence multiple physiological and biochemical aspects of plants. Therefore, it is crucial to establish constant monitoring systems to assess the degree to which crops are affected, identifying key parameters to determine their water and physiological status accurately and in real time.

The effects of water deficit on plants can be manifested at the physiological and biochemical levels. Physiological effects include premature leaf drop, reduction in photosynthetic rate and, consequently, a decrease in agronomic yield. On the

other hand, biochemical effects are more complex to evaluate, since they are not visible to the naked eye and require specific methodologies for their measurement.

Among the most relevant biochemical changes is the increase in the production of reactive oxygen species (ROS), which are closely related to oxidative stress in plants. In response to this phenomenon, plants increase the activity of antioxidant enzymes as a defense mechanism. In addition, an increase in the concentration of certain phytohormones, which play a key role in plant development and in the adaptive response to stress, is observed. At the molecular level, genetic responses provide specific instructions on how plants react under these conditions. However, these responses are often more complex to interpret and are determined by the individual characteristics of each crop.

In south-central Chile, one of the crops that has suffered the most from climatic adversities is the European hazelnut (*Corylus avellana* L.), a deciduous species native to the Middle East, whose fruit is highly valued in the agroindustry, especially because of its growing demand driven by companies such as AgriChile. This tree has characteristics in the face of environmental stress, being its stomatal density in the leaves a distinctive feature that influences its physiological response.

European hazelnut production has been significantly impacted by reduced rainfall, making agricultural management increasingly difficult. Although advances in irrigation efficiency have been implemented through modern techniques and equipment that allow more precise determination of the optimal timing and form of irrigation, these measures may not be sufficient in the long term. In this context, new strategies are being developed to optimize water use. These include hydrogels, polymers with a high water retention capacity, which prolong water availability in the soil, reduce the frequency of irrigation and promote moisture in the root environment of crops.

Although synthetic hydrogels have been shown to be effective in water retention, their non-natural origin raises environmental and sustainability issues. In response to this limitation, biopolymers derived from plant sources, such as alginate extracted from seaweed, have emerged. This compound, although it does not match the water retention capacity of synthetic polymers, represents a greener and more environmentally friendly solution. However, these alternatives still face challenges, highlighting the need for innovation in the development of more effective technologies to ensure crop quality and safety in adverse conditions.

Currently, one of the promising strategies to mitigate water stress is the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). These bacteria interact beneficially with crop roots, increasing their tolerance to stress through various mechanisms, such as increased root system development and the production of antioxidant compounds. Within this group, the genus *Bacillus* stands out for its efficacy and resilience. These bacteria are known to stimulate the synthesis of phytohormones that favor root growth, improving the ability of plants to cope with water deficit conditions and optimizing their performance under stress.

The combination of hydrogels and bacteria of the *Bacillus* genus represents a promising solution to mitigate the effects of water stress, promoting healthier and more productive crops even under conditions of water scarcity. In addition, biopolymers such as alginate provide a suitable medium for the immobilization and transport of these beneficial bacteria, facilitating their direct application in the fields where they are required.

In this sense, the response of soil and European hazelnut (*Corylus avellana* L.) seedlings to the application of a biofertilizer based on hydrogels and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) was evaluated. The results indicated significant differences in both foliar and root proline content between plants treated with the biostimulant and untreated plants. These differences were more pronounced in

plants subjected to the most severe level of water restriction (30% irrigation, 30I) compared to those under full (F1) or moderate (60I) irrigation conditions.

Furthermore, as noted, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) possess the ability to increase the antioxidant content of plants. This effect not only improves crop tolerance to stress, but also has relevant implications in the synthesis of phenolic compounds, favoring the development of nutraceutical foods. In this context, the third chapter studied the relationship between the application of this biofertilizer and the synthesis of phenolic compounds in *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* (purple basil). The results showed that the anthocyanin content in the control was significantly lower compared to all treatments, being the treatment with the biofertilizer the one that presented the greatest significant differences.

These tools have shown great potential to address current challenges in agriculture, underlining the importance of continuing research and development of innovative technologies. In this way, sustainable strategies can be established that contribute to a more resilient agricultural future, while ensuring greater food security.

CAPÍTULO I

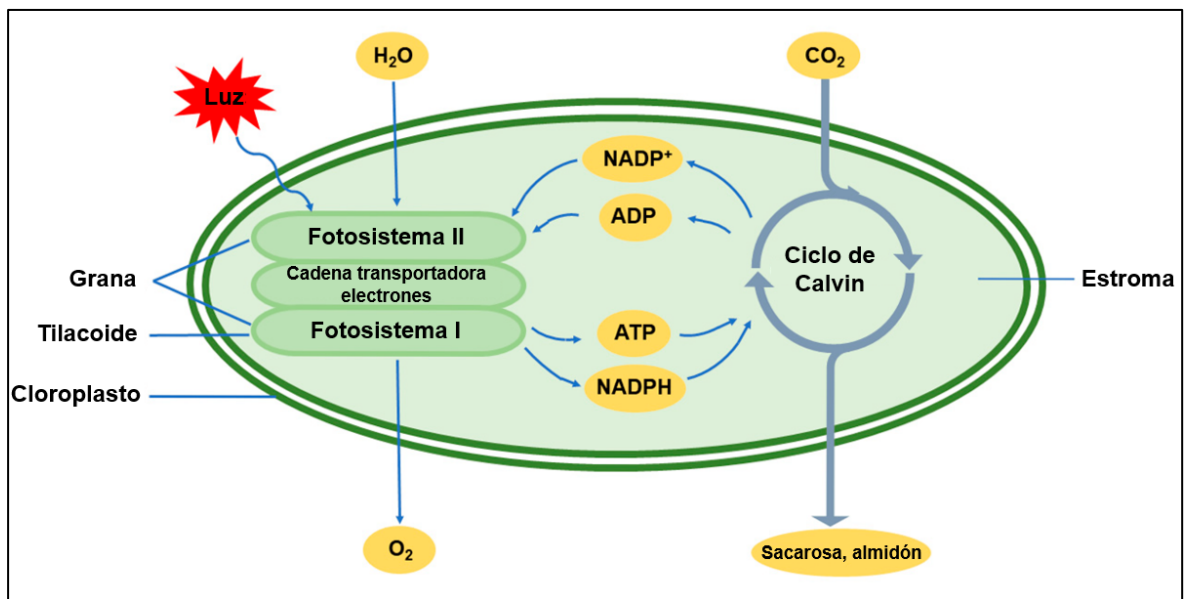
INTRODUCCIÓN GENERAL

La sequía es uno de los problemas más complejos a nivel mundial para la agricultura y la seguridad alimentaria (Rojas, 2020). Chile no está fuera de estos eventos de sequía y en la zona centro sur han ocurrido sucesos por más de 10 años, denominándose mega-sequía (Garreaud et al., 2020). Esta ha provocado un aumento de la temperatura ambiental desencadenando una mayor demanda hídrica de los cultivos por aumento de evapotranspiración y falta de lluvia (Naumann et al., 2018). Además, la sequía u otras situaciones de estrés hídrico desencadenan una serie de respuestas en los cultivos que pueden ir en desmedro de su producción y/o correcto funcionamiento metabólico. Dentro de la capacidad de adaptación, las plantas activan mecanismos bioquímicos y fisiológicos, desencadenando cambios microbiológicos en el suelo, que les ayuda a desarrollar estrategias para mitigar los efectos ocasionados por estrés hídrico (Xie et al., 2019).

Las relaciones hídricas de las plantas afectan a los procesos fisiológicos. El agua de las plantas, en su camino desde el suelo a la atmósfera, es absorbida por la raíz, luego fluye por el xilema, se evapora en los espacios intercelulares del mesófilo, y finalmente difunde como vapor de agua a la atmósfera, especialmente a través de los poros estomáticos que en alto número perforan la epidermis. La cantidad de agua que fluye a través de la planta o circula por unidad de superficie de cultivo depende de la oferta de agua del suelo, de las características estructurales y funcionales de la planta o el cultivo, y de las condiciones atmosféricas. El estado hídrico de la planta dependerá del balance entre el agua que la planta absorbe del suelo y la que pierde por transpiración. En el interior de la planta, el potencial hídrico es elevado en las raíces y disminuye progresivamente en el tallo, fundamentalmente por una disminución en el

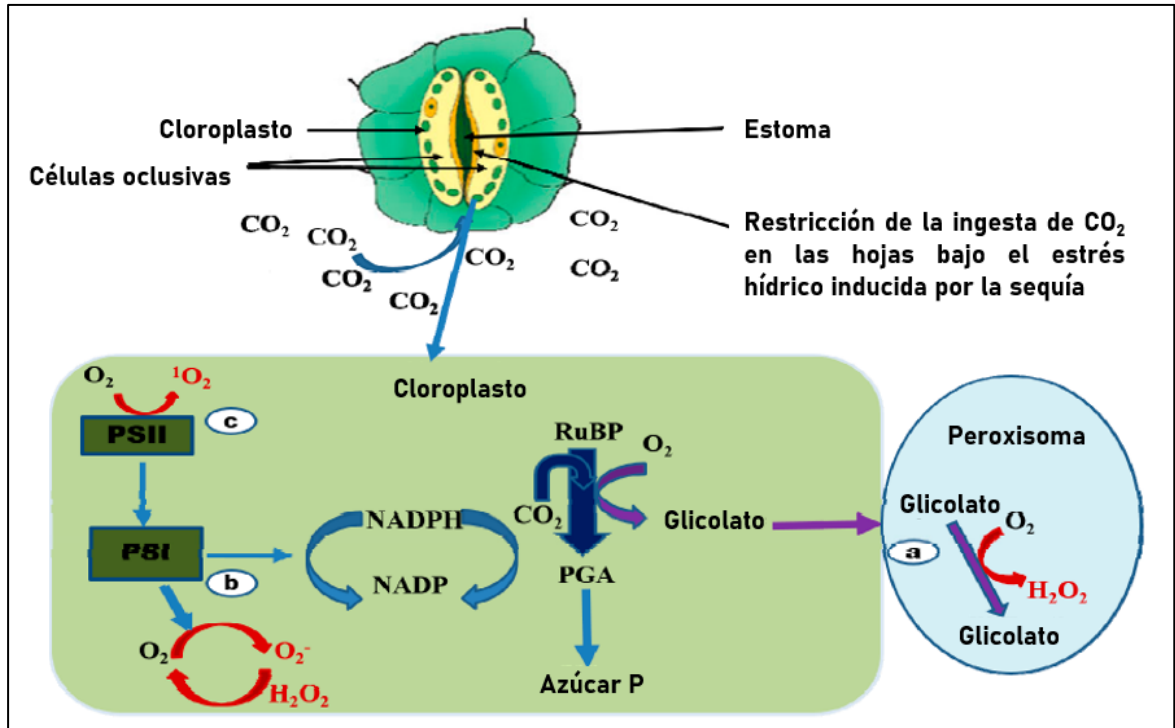
potencial de presión hidrostática generado por la evaporación del agua en las hojas. Estas relaciones hídricas impactan directamente en la fotosíntesis (McCully, 1999; Schweiger et al., 2022; Zhang et al., 2017). En condiciones normales la fijación del carbono se describe como se observa en la Figura 1, sin embargo, bajo estrés hídrico, se desencadena un desequilibrio en la fijación de carbono durante la actividad fotosintética (Figura 2), ya que ocurre un cierre estomático, generando un cambio en el potencial osmótico e interrumpiendo el mecanismo fotosintético de las plantas. Con ello se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), como el oxígeno singlete (1O_2) en el fotosistema II y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) junto con el superóxido (O_2^-) en el fotosistema I causando daño celular por oxidación de las proteínas (Asada, 2006; Noctor et al., 2014; Pinheiro & Chaves, 2011).

Figura 1. Esquema de fijación de carbono en condiciones normales



Fuente: Adaptado de (Gan et al., 2019)

Figura 2. Esquema de la fijación del carbono bajo estrés hídrico.



Fuente: Adaptado de (Ojuederie et al., 2019)

La escasez de agua reduce la actividad fotosintética, reduciendo el área foliar, cerrando los estomas y disminuyendo la eficiencia de la fijación del carbono (Hemati et al., 2022). Por tanto, el impacto fisiológico más importante del estrés hídrico en plantas es la limitación de la fotosíntesis.

En estudios realizados en rosa de Damasco (*Rosa damascena*) se comparó el impacto de los tratamientos de sequía con la tasa de fotosíntesis neta, tasa de transpiración, conductancia estomática, eficiencia instantánea en el uso del agua, temperatura interna del agua en la hoja y de las hojas maduras completamente expandidas. En sequía leve (50 % de capacidad de campo (CC)) se observó una reducción del 31 % en la fotosíntesis, del 19 % en la conductancia estomática y de un 65 % en la eficiencia instantánea en el uso del agua, aumentando la tasa de transpiración dos veces. La sequía severa (25 % de capacidad de campo)

obtuvo resultados aún más pronunciados, reduciendo la fotosíntesis en un 55 % y la conductancia estomática en un 36 %, en relación con las plantas bien regadas (Al-Yasi et al., 2020).

Por otro lado, como se ha señalado anteriormente, la clorofila puede reflejar el estado de crecimiento de las plantas y el grado de estrés, ya que es el pigmento más importante y eficaz en la fotosíntesis (Yang et al., 2021). Se ha comprobado que la degradación de las moléculas de clorofila se acelera con el estrés por sequía, siendo esta degradación mucho mayor en las células mesófilas que en células o vainas vasculares en plantas C4 como el maíz (Hemati et al., 2022). En cultivares de trigo susceptibles a estrés hídrico el nivel de clorofila disminuye significativamente en condiciones de sequía, mientras que el contenido de clorofila de los cultivares de trigo resistentes se mantiene (Zaefyzadeh et al., 2009). En plántulas de alcornoque chino (*Quercus variabilis*), los contenidos de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), carotenoides (Car) y clorofila total disminuyeron significativamente al 40 % y al 20 % de la capacidad de campo, a pesar de que no hubo cambios significativos en las relaciones Chl *a*/Chl *b* y Car/Chl (Wu et al., 2013).

Además de los efectos descritos, es importante mencionar que la sequía suele ir acompañada con altas temperaturas, afectando y dificultando el crecimiento de los cultivos. En un estudio previo en maíz (*Zea mays*) donde se combinaba sequía y estrés térmico, se observó una reducción significativa tanto de la altura de la planta como de su peso fresco y del peso seco de los brotes, además del diámetro del tallo y área foliar (Hussain et al., 2019).

En otro estudio previo realizado en huertos de frutales de *Corylus avellana* L., sometidos a distintos tratamientos de riego, se pudo apreciar una disminución significativa en el rendimiento, peso del grano y peso del fruto entre el tratamiento de mayor riego versus el de menor (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de diferentes tratamientos de riego sobre el rendimiento, el peso del grano, el peso del fruto, la relación grano/fruto, el contenido de α -tocoferol en el grano y la productividad del agua (WP) en *Corylus avellana* L.

T	Rendimiento (kg árbol ⁻¹)		Peso grano (g)		Peso fruto (g)		Grano/Fruto (%)	α - tocoferol (μ g ⁻¹)	WP (kg m ⁻³)	
T1	8,1	a	1,52	a	3,32	a	44,5	392,3	0,51	c
T2	8,0	ab	1,46	ab	3,25	ab	42,2	418,1	0,68	b
T3	7,8	ab	1,41	b	3,14	ab	41,6	409,2	0,76	ab
T4	7,5	b	1,37	b	3,04	b	42,6	428,8	0,86	a

T1 (control), fueron regadas con el 100 % de la evapotranspiración real con un potencial hídrico del tallo de $>-0,7$ MPa, T2, T3 y T4 se regaron cuando el potencial alcanzó los $-1,0$, $-1,3$ y $-1,7$ MPa, respectivamente. (T: tratamiento). Fuente: Adaptado de (Ortega-Farias et al., 2020).

El crecimiento radicular en las plantas también se ve afectado por estrés hídrico, ya que el crecimiento de las raíces se ve favorecido sobre el de las hojas, gracias al ajuste osmótico que permite renovar el crecimiento en las raíces (Lisar et al., 2012).

Un mecanismo bioquímico que ayuda a la aclimatación de las plantas en un suelo seco o salino es el ajuste osmótico. Varias células vegetales tolerantes a la sequía acumulan solutos para regular su potencial y, por tanto, bajar el potencial hídrico (ψ) durante períodos transitorios o prolongados de estrés. Esta capacidad se denomina ajuste osmótico (AO, por sus siglas en inglés) (Bhatla & Lal, 2018). El AO, es la acumulación de solutos en las células de las plantas superiores, conocidos como osmolitos, en respuesta a los déficits de agua (Turner, 2018).

Los osmoprotectores son iones inorgánicos y solutos orgánicos, que ajustan el potencial osmótico mediante el aumento o disminución de sus concentraciones y, por lo tanto, aumentan la retención de agua celular durante el estrés hídrico (Ozturk et al., 2021). Esta acumulación de solutos produce una disminución del ψ en raíces, siendo menor que el del suelo, el cual suele estar entre $1,2$ a $1,8$ MPa permitiendo así a la planta poder captar agua del medio (Munns et al., 2020).

Los azúcares, cumplen un rol importante para el crecimiento y reguladores de la expresión génica además de funcionar como osmoprotectores durante el estrés (Iqbal & Nazar, 2015). La respuesta inicial al estrés por sequía parece estar asociada a un aumento de monosacáridos, mientras que la respuesta más tardía parece estar asociada a un aumento de fructanos (Kerepesi & Galiba, 2000).

Las plantas acumulan estas moléculas con función osmótica durante los episodios de exposición al estrés abiótico, donde también encontramos aminoácidos. Entre estos osmolitos encontramos prolina, glicina betaína y ácido gamma-aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés) que se han convertido en candidatos para mejorar la tolerancia al estrés (Iqbal & Nazar, 2015). La prolina es un protector de los osmolitos, siendo fundamental también para la síntesis de proteínas (Liang et al., 2013). La prolina actúa como soluto compatible para proteger las células vegetales bajo estrés osmótico y actúa como chaperona molecular (Iqbal & Nazar, 2015), así como también aumenta las actividades enzimáticas (Furlan et al., 2020). También se ha reportado que la prolina alivia la acidosis citoplasmática, estabiliza las proteínas, incluidas las enzimas antioxidantes, y minimiza los efectos dañinos de las ROS a través de varios mecanismos (Furlan et al., 2020).

Por otro lado, glicina betaína (N,N,N-trimetilglicina) se acumula ampliamente en las plantas y otros organismos (Chen & Murata, 2002). La glicina betaína (GB) es un soluto compatible que actúa en la osmorregulación, siendo un pequeño metabolito orgánico, el cual puede desempeñar potencialmente un papel crucial en la protección eficaz contra la sal, la sequía y el estrés por temperaturas extremas (Chen y Murata, 2008, 2011; Giri, 2011). La biosíntesis de GB es inducible por el estrés y su concentración varía entre las especies vegetales, oscilando entre 40 y 400 $\mu\text{mol (g Peso seco)}^{-1}$ (Iqbal & Nazar, 2015) (Tabla 2).

Tabla 2. Tipos de osmolitos y su función en plantas.

Tipo de osmolitos	Osmolitos	Función
Aminoácidos	Prolina, alanina, glicina, glutamina, asparagina, ácido γ -aminobutírico, ácido pipercolico citrulina, ornitina	Precursores de la mayoría de los osmolitos, alivio de la acidosis citoplasmática, previene el daño de la membrana y la toxicidad iónica
Compuestos de amonio cuaternario	Glicina-betaína, β -alanina betaína, prolina betaína, colina-O-sulfato, hidroxiprolina betaína, pipercolato betaína	Protección contra el daño de la membrana, actividad enzimática, regulación de ROS desintoxicación
Sulfonio terciario compuestos	Dimetil sulfonopropionato (DMSP)	Osmoprotección, desintoxicación exceso de azufre
Azúcares	Sacarosa, trehalosa, fructosa, maltosa, ramnosa	Ajuste osmótico y en estabilización de las membranas
Alcoholes de azúcar	Pinitol, manitol, mioinositol, ononitol, sorbitol	Facilita el ajuste osmótico ajuste osmótico y actúa como moléculas de señalización

Fuente: Adaptado de (Iqbal & Nazar, 2015)

A nivel molecular, los principales marcadores de estrés oxidativo inducidos por la sequía son la peroxidación lipídica (LPO por sus siglas en inglés) medido por el contenido de malondialdehído (MDA) y la acumulación de H_2O_2 , que causan la disfunción de varios procesos celulares y fisiológicos, incluyendo la conductancia estomática, las funciones de la membrana, la eficiencia del uso del agua, la eficiencia de la carboxilación, la respiración, la fotosíntesis o la transpiración. Diferentes estudios indican un aumento del contenido de MDA y H_2O_2 bajo estrés por sequía en muchas especies de plantas, como son raps, maíz, soja, alfalfa, a, etc., que junto con otros ROS tóxicos da lugar a daños oxidativos (Hasanuzzaman et al., 2020).

Estas respuestas bioquímicas al estrés hídrico han sido estudiadas, observando que existe una serie de vías que señalizan y desencadenan las

respuestas al estrés (Mahmood et al., 2019). Entre ellas existen compuestos y enzimas que son buenos indicadores de estrés hídrico como la señalada anteriormente prolina, o enzimas relacionadas con el estrés oxidativo como la malondialdehído, superóxido dismutasa (SOD) o catalasas, así como proteínas encargadas del transporte del agua como las acuaporinas. Los daños en los lípidos de las membranas celulares de las plantas también son causados por la radiación UV-B en presencia de oxígeno, lo que se conoce como peroxidación lipídica la cual puede definirse midiendo el contenido de MDA, que se forma a través de la oxidación y degradación de los ácidos grasos poliinsaturados (Čermelj et al., 2022). El SOD es una enzima antioxidante funcional en animales y plantas, la cual aumenta en presencia de ROS generados por estrés biótico y abiótico (Stephenie et al., 2020). La actividad de la catalasa se define como la cantidad de enzima necesaria para descomponer $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{ml}^{-1}$, la cual aumenta en presencia de estrés (Liu et al., 2021).

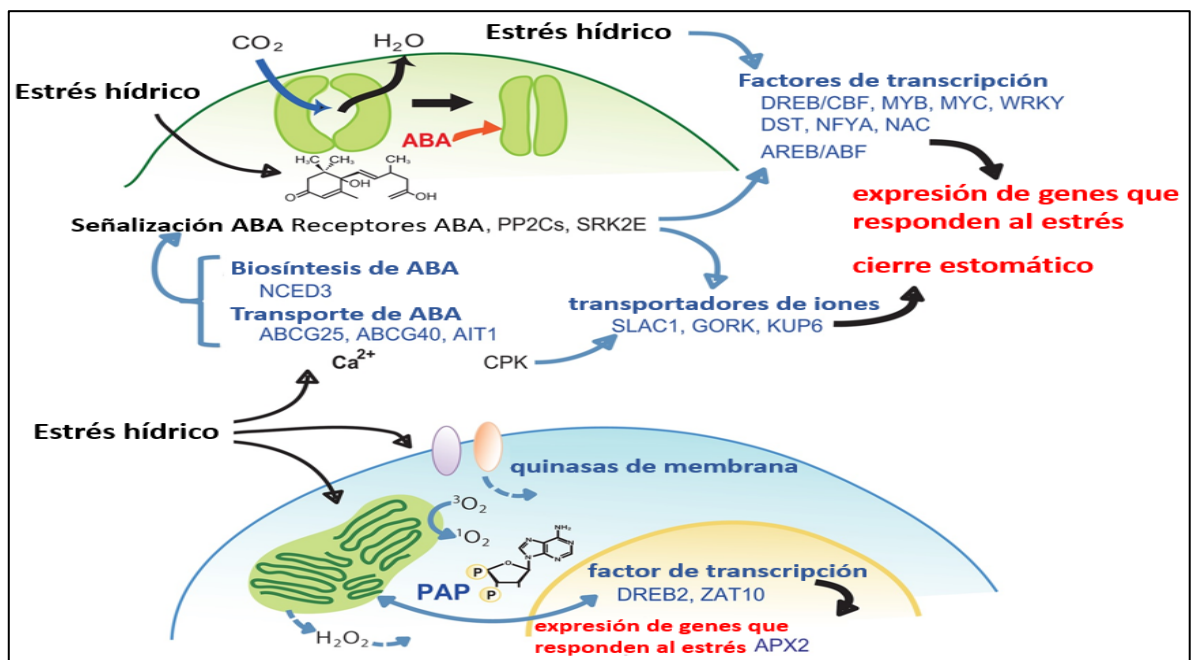
Tabla 3. Ejemplo de estrés oxidativos de cultivos sometidos a distintos tratamientos de sequía.

Especies vegetales	Niveles de estrés	Indicadores de estrés oxidativo
		Sequía
<i>Lolium perenne</i> L.	Estrés por sequía, retención de riego, 45 d	Aumento de EL. Aumento del contenido de MDA y H ₂ O ₂ .
<i>Lens culinaris</i> Medik. cv. JL-3	Las plántulas se expusieron al aire seco durante 4 h, 3 d	Reducción del índice de estabilidad de la membrana en un 57%. El contenido de MDA aumentó en un 36%.
<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	Estrés por sequía (300 mM de d-manitol), 10 d	Estrés oxidativo acelerado por la elevada generación de ROS.
<i>Brassica napus</i> L.	Déficit de agua (60% FC), 21 d	El producto de la LPO, el MDA, se ve notablemente potenciado. El contenido de H ₂ O ₂ se mantuvo sin cambios.

<i>Olea europaea</i> L.	Condición de déficit hídrico por retención de agua, 20 d	Aumento de la permeabilidad de la membrana celular.
<i>Oryza sativa</i> L.	Estrés osmótico (15% seguido de 20% de PEG), 7 d	Mayor acumulación de O ₂ ⁻ . Aumento de la LPO, así como del contenido de TBARS.

Fuente: Adaptado de (Hasanuzzaman et al., 2020)

Finalmente, se debe señalar que algunas respuestas moleculares han sido bien estudiadas bajo condiciones de estrés hídrico. El ácido abscísico (ABA) endógeno en ausencia de agua desencadena una serie de respuestas fisiológicas, y el cierre estomático, que está regulado por una red de transducción de señales. Algunos genes son clave para la biosíntesis de ABA en *Arabidopsis*, siendo su expresión rápidamente inducida por la sequía de una manera específica en el tejido vascular y desencadenando una cadena de acciones (Osakabe et al., 2014) (Figura 3). Modelo del papel de los factores de señalización en el cierre estomático y la señalización retrógrada durante el estrés hídrico.



Fuente: adaptade de (Osakabe et al., 2014)

Sin embargo, además de los osmoprotectores, enzimas oxidativas y expresión génica, cabe destacar el rol de las fitohormonas para mejorar la tolerancia al estrés hídrico que será desarrollado en los siguientes capítulos.

HORMONAS Y DEFICIT HÍDRICO

Las hormonas endógenas desempeñan un papel crucial frente al estrés abiótico y entender su rol fisiológico es clave en el desarrollo de bioestimulantes. Respuestas adecuadas durante su aplicación exógena vendrán determinadas por la hormona vegetal utilizada y su concentración, la planta o cultivo en la que se aplicará y el momento de aplicación. Entre las fitohormonas, el ácido jasmónico (JA) ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA por sus siglas en inglés), ácido giberélico (GA por sus siglas en inglés), etileno (ET), auxina y citoquinina (CK por sus siglas en inglés) ven alteradas su síntesis (Ullah et al., 2018). En los siguientes capítulos se revisará el rol de las fitohormonas para mejorar la respuesta ante situaciones de sequía.

Ácido abscísico, etileno, jasmonatos y salicilatos y su rol en el estrés hídrico

Una de las principales hormonas vegetales es el ácido abscísico (ABA), el cual regula diversos procesos fisiológicos, entre ellos el potencial hídrico, a través de la regulación estomática de las hojas, relacionado con la baja disponibilidad de agua, aumentando la producción de ABA (Waterland et al., 2010). La mayor parte del ABA se sintetiza en las raíces y luego se transporta a las partes superiores de la planta a través de los tejidos vasculares (Ramachandran et al., 2018). En *Arabidopsis thaliana* L., la sobreexpresión del gen del algodón (GhCBF3) inducido por ABA conduce a una alta tolerancia a la sequía en líneas transgénicas manteniendo los niveles de clorofila, contenido relativo de agua (RWC por sus siglas en inglés) y prolina más significativos que en la planta wild type (N. N. Wang et al., 2019). ABA desempeña dos funciones en el estrés por sequía: el equilibrio hídrico y la tolerancia a la deshidratación celular. El equilibrio hídrico se

consigue en prácticamente todas las células mediante el control de las células de guarda y la expresión de genes que producen proteínas de tolerancia a la deshidratación (Hsu et al., 2021; Razi & Muneer, 2021). Bajo estrés por sequía, ABA regula la morfofisiología y bioquímica de los cultivos siendo el cierre estomático la respuesta más efectiva y esencial en cultivos bajo estrés por sequía (Pál et al., 2018). En olivo (*Olea europaea* L.), frente estrés ambiental, como salinidad, sequía, deficiencia de fosfato, altas y bajas temperaturas, ABA actúa como molécula señal regulando las funciones estomáticas y reduciendo la transpiración en hojas (Ouledali et al., 2019).

En plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se ha demostrado que el tratamiento foliar con ABA exógeno provoca cambios adaptativos como aumento de la actividad dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GR), entre otras cosas (Li et al., 2021).

Por otro lado, el etileno (ET) es una fitohormona gaseosa que regula la senescencia, floral, la maduración del fruto, la abscisión de pétalos y hojas, y las respuestas de las plantas al estrés (Huang et al., 2022). El ET juega un papel vital ante estresores bióticos y abióticos en condiciones de sequía. El peso seco de los brotes de seis genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) fue más significativo en el grupo tolerante bajo estrés leve por sequía, relacionado con un aumento de etileno (Chandwani & Amaresan, 2022; Gautam et al., 2022).

En estudios previos, al incorporar ET de manera exógena junto con ABA en plantas de *Arabidopsis* se demostró la capacidad de inhibir los efectos del ABA impidiendo un cierre estomático debido a la aplicación de ET. Sin embargo, se han detectado resultados contradictorios, ya que al realizar experimentos similares incorporando ET exógeno en plantas de *Arabidopsis* se facilitó la acumulación en células de guarda de H₂O₂ induciendo el cierre estomático por estas vías (Desikan et al., 2006; Tanaka et al., 2005).

El ácido jasmónico (JA) y sus precursores y derivados, denominados jasmonatos (JAs), tienen una gran importancia en la regulación de procesos

fisiológicos tanto en el crecimiento como en el desarrollo de las plantas, en especial en la mediación de respuestas al estrés biótico y abiótico (Ruan et al., 2019). No obstante, en estrés hídrico, las proteínas JAs se destruyen, motivando factores de transcripción activos que regulan al alza los genes asociados con la tolerancia al estrés. Los JAs son fitohormonas complejas creadas por la descomposición de lípidos en la membrana celular en varias especies de plantas (Raza et al., 2021). Se ha demostrado que los JAs interactúan con otras fitohormonas regulando así el crecimiento y desarrollo de las plantas, facilitando la adaptación a estímulos bióticos y abióticos (Siddiqi & Husen, 2019).

En tratamientos con JAs exógeno se ha visto que afecta de manera negativamente a la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum*. Sin embargo, aún faltan estudios del impacto de los JAs en la germinación en regímenes de estrés por déficit hídrico y salinidad (Zamani et al., 2020).

El ácido salicílico (SA) es una molécula fenólica que puede recuperar eficazmente la biosíntesis de metabolitos secundarios (Ali, 2021). Además, puede desempeñar un papel en diversos procesos biológicos, como lo es la asimilación del CO₂, la antioxidación, la regulación estomática y la fotosíntesis (Iqbal et al., 2022). Algunos estudios sugieren que SA puede tener un papel en el estrés por sequía regulando los genes relacionados con la sequía a través de la regulación de la transcripción y la apertura estomática (Chhaya et al., 2021; Signorelli et al., 2019).

Además, el SA y sus derivados en tratamientos foliares y de semilla mejoran la tolerancia al estrés por sequía (Bandurska, 2013; Maghsoudi et al., 2019). Bajo condiciones de estrés por sequía, la aplicación de ácido salicílico exógeno incrementó la actividad catalasa de los cultivos de trigo (*Triticum aestivum* L.).

En resumen, estas cuatro fitohormonas, el ABA, ET, JA y SA, desempeñan funciones clave en la respuesta de las plantas al estrés hídrico, regulando procesos fisiológicos y bioquímicos que les permiten adaptarse y sobrevivir en condiciones de escasez de agua.

Giberelinas, auxinas y citoquininas

Los ácidos giberélicos (GAs por sus siglas en inglés) (ácido carboxílico diterpenoide tetracíclico) pueden potenciar el desarrollo y crecimiento en diferentes etapas de las plantas al impulsar la elongación y división celular en los diferentes ciclos de vida de estas (Kalra & Bhatla, 2018). El GA es una fitohormona que está asociada con la germinación de semillas, elongación de tallo y desarrollo reproductivo en plantas, como estudios previos han demostrado en arroz (*Oryza sativa* L.), además de tener una íntima relación con la tolerancia al estrés por sequía (Rasheed et al., 2020). La deficiencia en la biosíntesis de GAs causa cambios significativos en el metabolismo primario, principalmente debido al estrés por sequía, mejorando la tolerancia al estrés hídrico, al aumentar el mantenimiento del contenido de agua (Hedden, 2020; Omena-Garcia et al., 2019). Los síntomas de deficiencia de giberelinas (GAs) se parecen fenotípicamente a los síntomas de estrés por sequía, por ejemplo, bajo un estrés hídrico prolongado, las plantas muestran una reducción en la altura, el desarrollo foliar y el desarrollo de flores y frutos (Kumar, 2020; Salazar-Cerezo et al., 2018).

La aplicación exógena de GAs mejoró la tolerancia al estrés hídrico de las plantas de maíz manteniendo la permeabilidad de la membrana, aumentando el contenido de Chl y mejorando el contenido relativo de agua de la hoja. También se encontró que el tratamiento con dosis bajas de GAs exógenas, mejora la germinación de las semillas de trigo bajo estrés por sequía (Salih, 2020).

La auxina fue la primera fitohormona identificada, la cual influye en la diferenciación y desdiferenciación celular, la morfología o arquitectura de raíces, además del crecimiento de estas, el geotropismo, el desarrollo de los órganos florales y la latencia de semillas (Gomes & Scortecci, 2021). Se ha descubierto un vínculo cercano entre el contenido de auxina y la respuesta de las plantas al estrés por sequía. También se ha demostrado que la homeostasis de la auxina regula la producción de ABA y las respuestas al estrés por sequía (Farhangi-Abriz & Torabian, 2018). Algunos estudios sugieren que las auxinas, específicamente

el ácido indol acético (IAA), tiene una relación directa con la tolerancia en la sequía en plantas de maíz y *Arabidopsis* (Quiroga et al., 2020; Salehin et al., 2019).

Al aplicar IAA exógeno en plantas de trébol, estas aumentaron significativamente el contenido relativo de agua y la clorofila, en comparación al control. Además, tanto el ABA como el JA, incrementaron su expresión de genes sensibles a auxinas, genes sensibles al estrés por sequía y disminuyó la expresión de genes de senescencia foliar (Zhang et al., 2020).

Por otro lado, tenemos las citoquininas (CKs). Algunas de las funciones de las citoquininas son el control de la división celular, la fuerza del sumidero fotosintético, la estabilidad de la unidad, la diferenciación celular, el retraso de la senescencia, la absorción de nutrientes, la germinación y el desarrollo de flores y semillas, y la prevención de la iniciación de raíces laterales (Müller & Munné-Bosch, 2021; Verma et al., 2022). Bajo condiciones de estrés por déficit hídrico la gestión eficaz del agua es crucial para superarlas. Junto con el aumento del tamaño de las raíces que permite un acceso más fácil a una fuente de agua. Se ha descubierto que las CKs juegan un papel regulador en diferentes procesos relacionados con los estomas, como la conductancia y la densidad estomáticas. Niveles bajos de CK generalmente tienen un efecto positivo en el estado hídrico de la planta, como se ha observado en plantas transgénicas que sobreexpresan genes de CK deshidrogenasa (Farber et al., 2016; Hai et al., 2020; Hu et al., 2013; Vojta et al., 2016). También se ha descrito que protege de la maquinaria fotosintética, promueve los sistemas antioxidantes, la diafonía con otras fitohormonas de estrés (Pavlů et al., 2018).

La aplicación exógena de CKs en plantas de trigo sometidas a estrés por sequía y altas temperaturas, mejoró significativamente el contenido relativo de agua foliar, índice de estabilidad de la membrana, la clorofila y también disminuyó la peroxidación lipídica (Kumari et al., 2018).

En resumen, estas tres fitohormonas auxinas, GAs, y CKs, desempeñan funciones importantes en la respuesta de las plantas al estrés hídrico. Su regulación y aplicación exógena pueden mejorar la tolerancia al estrés por sequía, manteniendo el crecimiento, el desarrollo y el estado hídrico adecuado de las plantas.

Otras fitohormonas: Brasinoesteroides y estrigolactonas

Los brasinoesteroides (BR) son hormonas esteroideas esenciales para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Estas hormonas controlan la división, elongación y diferenciación de varios tipos de células a lo largo de todo el ciclo vital de la planta (Planas-Riverola et al., 2019). Además, los BR cumplen otras funciones fisiológicas, como la flexión de las hojas, la biosíntesis del etileno, la germinación de las semillas y la activación de la bomba de protones. Otras funciones incluyen la morfogénesis tisular, la reproducción, la rizogénesis, el desarrollo del tejido vascular, la senescencia, la abscisión y la floración (Kahlaoui et al., 2016). Se observó que los cultivares de maíz tolerantes a la sequía tienen más BR endógenos, y que deficiencia de BR en tomate reveló que la señalización de esta fitohormona es necesaria para la tolerancia a la sequía (Jogawat et al., 2021).

Al incorporar exógenamente BR en plantas de tomate se pudo asociar con un mayor contenido de clorofila, que a su vez aumentó la eficiencia fotosintética neta, mejorando la capacidad antioxidante y elevando los niveles de genes y enzimas del ciclo ascorbato-glutación, que incluyeron principalmente superóxido GR, SOD, APX y CAT (Shu et al., 2016).

Las estrigolactonas (SLs) son unas fitohormonas clasificadas recientemente como tal, derivadas de los carotenoides y extraídas de malezas parasitarias (Ruyter-Spira et al., 2013). Algunas de las funciones de las SLs es la facilitación de la interacción planta hongos micorrícicos, estimulando el metabolismo y ramificación de estos además de influir en la nodulación, principalmente en el número óptimo de estos en leguminosas (Bonfante & Genre, 2010; Foo & Davies,

2011). También se han detectado un efecto sobre la arquitectura de las raíces, al estimular la elongación de la raíz primaria y suprimir el desarrollo de las raíces laterales (Ruyter-Spira et al., 2011). Se han descrito su interacción con diversas hormonas como auxinas, citoquininas, ácido abscísico y brasinoesteroides (Faizan et al., 2020).

La aplicación de estrigolactona exógena en mutantes de arroz y en *Arabidopsis* deficientes de esta hormona inhibió la ramificación de los brotes (Umehara et al., 2008). También la aplicación exógena de esta fitohormona podría aliviar los síntomas de sequía en las plántulas de Cabernet Sauvignon (*Vitis vinífera* L) (W. ni Wang et al., 2021).

En resumen, los brasinoesteroides (BR) son hormonas que controlan el crecimiento y desarrollo de las plantas, mientras que las estrigolactonas (SLs) regulan la interacción con hongos micorrícicos y la arquitectura de las raíces. La aplicación exógena de BR puede mejorar la fotosíntesis y la capacidad antioxidante, mientras que las SLs pueden inhibir la ramificación de los brotes y aliviar los síntomas de sequía en algunas especies.

CONSIDERACIONES FINALES

A partir de la revisión realizada se puede destacar que las fitohormonas son mediadoras clave en la respuesta de las plantas al estrés por sequía, regulando diversos procesos fisiológicos en la planta, incluyendo el equilibrio hídrico, la tolerancia a la deshidratación celular, la senescencia, la maduración del fruto, y la abscisión de pétalos y hojas.

El ácido abscísico (ABA) es una de las principales hormonas del estrés vegetal, regulando la apertura y cierre estomático además de mecanismos de adaptación de plantas en respuesta a la baja disponibilidad de agua. Además, el etileno, salicilatos, jasmonatos, giberelinas, auxinas y citoquininas también juega un papel vital en la respuesta de las plantas al estrés por sequía, interactuando directa o indirectamente con otras fitohormonas, estimulando la expresión de

genes, produciendo antioxidantes en consecuencia aumentando la tolerancia a la sequía.

Las nuevas fitohormonas como los brasinoesteroides y las estrigolactonas han demostrado tener un impacto significativo en la tolerancia a la sequía, la interacción con microorganismos del suelo, la arquitectura de la raíz y la regulación de la expresión génica.

Con todo esto vemos que más investigación es requerida en relación con las fitohormonas y su crosstalk, especialmente para desarrollar bioestimulantes que promuevan la sostenibilidad y la productividad en los cultivos actuales, frente a desafíos como la sequía.

Finalmente cabe señalar que el desarrollo de tecnologías como los biofertilizantes a base de hidrogeles y PGPR, para mitigar el déficit hídrico, representan una alternativa para controlar la señalización hormonal, el estrés oxidativo y la síntesis de prolina, en plantas bajo regímenes deficitarios de riego.

Hipótesis

H1. Los plantines de *Corylus avellana* L. var. Giffoni tratados con hidrogeles microencapsulados que contienen *Bacillus safensis* inmovilizado en una matriz de alginato presentan una mayor tolerancia fisiológica y bioquímica al déficit hídrico, debido a un mayor desarrollo radical y actividad enzimática.

H2. Los brotes de albahaca morada (*Ocimum basilicum* var. *Purpurascens*) tratados con hidrogeles presentan un mayor contenido de compuestos fenólicos, como antocianos, lo que mejora su capacidad nutracéutica.

Objetivo General

Evaluar el efecto de hidrogeles formulados con *B. safensis* inmovilizado sobre la tolerancia al déficit hídrico en plantines de *Corylus avellana* L. var. Giffoni, midiendo parámetros fisiológicos, bioquímicos y microbiológicos durante el

periodo de restricción hídrica, así como sobre la calidad nutricional de la albahaca morada.

Objetivos Específicos

- Determinar el impacto del Biofertilizante inmovilizado sobre el crecimiento y desarrollo radical de los plantines bajo diferentes niveles de restricción hídrica.
- Evaluar la respuesta fisiológica de los plantines a los tratamientos con biofertilizante, incluyendo la eficiencia en el uso del agua y las características fotosintéticas.
- Cuantificar los cambios en la actividad antioxidante y en la acumulación de osmoprotectores (prolina) en las hojas y raíces de los plantines sometidos a estrés hídrico.
- Analizar la influencia del biofertilizante en la actividad microbológica y en las propiedades del suelo, especialmente en la biomasa microbiana y la actividad enzimática.
- Evaluar el impacto de los hidrogeles sobre la calidad nutricional de la albahaca morada.

REFERENCIAS

- Ali, B. (2021). Salicylic acid: An efficient elicitor of secondary metabolite production in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 31, 101884. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101884>
- Al-Yasi, H., Attia, H., Alamer, K., Hassan, F., Ali, E., Elshazly, S., Siddique, K. H. M., & Hessini, K. (2020). Impact of drought on growth, photosynthesis, osmotic adjustment, and cell wall elasticity in Damask rose. *Plant Physiology and Biochemistry*, 150(February), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.038>
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141(2), 391–396. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>
- Bandurska, H. (2013). Salicylic Acid: An Update on Biosynthesis and Action in Plant Response to Water Deficit and Performance Under Drought. *Salicylic Acid*, 1–14. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6428-6_1
- Bhatla, S. C., & Lal, M. A. (2018). Abiotic Stress. *En Plant Physiology, Development and Metabolism*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1>
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant - Fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(4), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>
- Čermelj, A. M., Golob, A., Vogel-Mikuš, K., & Germ, M. (2022). Silicon mitigates negative impacts of drought and uv-b radiation in plants. *Plants*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/plants11010091>
- Chandwani, S., & Amaresan, N. (2022). Role of ACC deaminase producing bacteria for abiotic stress management and sustainable agriculture production. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(16), 22843–22859. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18745-7>
- Chen, T. H. H., & Murata, N. (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 250–257. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00255-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00255-8)
- Chen, T. H. H., & Murata, N. (2008). Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Science*, 13(9), 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.06.007>
- Chen, T. H. H., & Murata, N. (2011). Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: Mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell and Environment*, 34(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02232.x>

- Chhaya, Yadav, B., Jogawat, A., Gnanasekaran, P., Kumari, P., Lakra, N., Lal, S. K., Pawar, J., & Narayan, O. P. (2021). An overview of recent advancement in phytohormones-mediated stress management and drought tolerance in crop plants. *Plant Gene*, 25(September 2020), 100264. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2020.100264>
- Desikan, R., Last, K., Harrett-Williams, R., Tagliavia, C., Harter, K., Hooley, R., Hancock, J. T., & Neill, S. J. (2006). Ethylene-induced stomatal closure in Arabidopsis occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. *Plant Journal*, 47(6), 907–916. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02842.x>
- Faizan, M., Faraz, A., Sami, F., Siddiqui, H., Yusuf, M., Gruszka, D., & Hayat, S. (2020). Role of strigolactones: Signalling and crosstalk with other phytohormones. *Open Life Sciences*, 15(1), 217–228. <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0022>
- Farber, M., Attia, Z., & Weiss, D. (2016). Cytokinin activity increases stomatal density and transpiration rate in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6351–6362. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw398>
- Farhangi-Abriz, S., & Torabian, S. (2018). Biochar Increased Plant Growth-Promoting Hormones and Helped to Alleviate Salt Stress in Common Bean Seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(2), 591–601. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9756-9>
- Foo, E., & Davies, N. W. (2011). Strigolactones promote nodulation in pea. *Planta*, 234(5), 1073–1081. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1516-7>
- Furlan, A. L., Bianucci, E., Giordano, W., Castro, S., & Becker, D. F. (2020). Proline metabolic dynamics and implications in drought tolerance of peanut plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 151(April), 566–578. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.04.010>
- Gan, P., Liu, F., Li, R., Wang, S., & Luo, J. (2019). Chloroplasts—beyond energy capture and carbon fixation: Tuning of photosynthesis in response to chilling stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms20205046>
- Garreaud, R. D., Boisier, J. P., Rondanelli, R., Montecinos, A., Sepúlveda, H. H., & Veloso-Aguila, D. (2020). The Central Chile Mega Drought (2010–2018): A climate dynamics perspective. *International Journal of Climatology*, 40(1), 421–439. <https://doi.org/10.1002/joc.6219>
- Gautam, H., Fatma, M., Sehar, Z., Iqbal, N., Albaqami, M., & Khan, N. A. (2022). Exogenously-Sourced Ethylene Positively Modulates Photosynthesis, Carbohydrate Metabolism, and Antioxidant Defense to Enhance Heat Tolerance in Rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031031>

- Giri, J. (2011). Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6(11), 1746–1751. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17801>
- Gomes, G. L. B., & Scortecci, K. C. (2021). Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant Biology*, 23(6), 894–904. <https://doi.org/10.1111/plb.13303>
- Hai, N. N., Chuong, N. N., Tu, N. H. C., Kisiala, A., Hoang, X. L. T., & Thao, N. P. (2020). Role and regulation of cytokinins in plant response to drought stress. *Plants*, 9(4), 10–12. <https://doi.org/10.3390/plants9040422>
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Parvin, K., Bhuiyan, T. F., Anee, T. I., Nahar, K., Hossen, M. S., Zulfiqar, F., Alam, M. M., & Fujita, M. (2020). Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: A review of recent experimental evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–44. <https://doi.org/10.3390/ijms21228695>
- Hedden, P. (2020). The current status of research on gibberellin biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 61(11), 1832–1849. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcaa092>
- Hemati, A., Moghiseh, E., Amirifar, A., Mofidi-Chelan, M., & Asgari Lajayer, B. (2022). Physiological Effects of Drought Stress in Plants. En *Plant Stress Mitigators*. https://doi.org/10.1007/978-981-16-7759-5_6
- Hsu, P. K., Dubeaux, G., Takahashi, Y., & Schroeder, J. I. (2021). Signaling mechanisms in abscisic acid-mediated stomatal closure. *Plant Journal*, 105(2), 307–321. <https://doi.org/10.1111/tpj.15067>
- Hu, L., Wang, Z., & Huang, B. (2013). Effects of cytokinin and potassium on stomatal and photosynthetic recovery of kentucky bluegrass from drought stress. *Crop Science*, 53(1), 221–231. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.05.0284>
- Huang, T. H., Hsu, W. H., Mao, W. T., & Yang, C. H. (2022). The Oncidium Ethylene Synthesis Gene Oncidium 1-Aminocyclopropane-1 Carboxylic Acid Synthase 12 and Ethylene Receptor Gene Oncidium ETR1 Affect GA–DELLA and Jasmonic Acid Signaling in Regulating Flowering Time, Anther Dehiscence, and Flower Senescence in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 13(April). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.785441>
- Hussain, H. A., Men, S., Hussain, S., Chen, Y., Ali, S., Zhang, S., Zhang, K., Li, Y., Xu, Q., Liao, C., & Wang, L. (2019). Interactive effects of drought and heat stresses on morpho-physiological attributes, yield, nutrient uptake and oxidative status in maize hybrids. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40362-7>
- Iqbal, N., Fatma, M., Gautam, H., Sehar, Z., Rasheed, F., Khan, M. I. R., Sofo, A., & Khan, N. A. (2022). Salicylic Acid Increases Photosynthesis of Drought Grown

- Mustard Plants Effectively with Sufficient-N via Regulation of Ethylene, Abscisic Acid, and Nitrogen-Use Efficiency. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(5), 1966–1977. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10565-2>
- Iqbal, N., & Nazar, R. (2015). Osmolytes and plants acclimation to changing environment: Emerging omics technologies. En *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2616-1>
- Jogawat, A., Yadav, B., Chhaya, Lakra, N., Singh, A. K., & Narayan, O. P. (2021). Crosstalk between phytohormones and secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1106–1132. <https://doi.org/10.1111/ppl.13328>
- Kahlaoui, B., Misle, E., Khaskhoussy, K., Jaouadi, I., & Hachicha, M. (2016). Brassinosteroids and drought tolerance in plants. En *Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach* (2^a ed., pp. 600–607). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119054450.ch34>
- Kalra, G., & Bhatla, S. C. (2018). Gibberellins. En *Plant Physiology, Development and Metabolism*, 617–628. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1_17
- Kerepesi, I., & Galiba, G. (2000). Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science*, 40(2), 482–487. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.402482x>
- Kumar, B. (2020). Plant Bio-regulators for Enhancing Grain Yield and Quality of Legumes: A Review. *Agricultural Reviews*, 42(Of), 175–182. <https://doi.org/10.18805/ag.r-2068>
- Kumari, S., Kumar, S., & Prakash, P. (2018). Exogenous application of cytokinin (6-BAP) ameliorates the adverse effect of combined drought and high temperature stress in wheat seedling. ~ 1176 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 1176–1180.
- Li, S., Liu, J., Liu, H., Qiu, R., Gao, Y., & Duan, A. (2021). Corrigendum: Role of Hydraulic Signal and ABA in Decrease of Leaf Stomatal and Mesophyll Conductance in Soil Drought-Stressed Tomato (Frontiers in Plant Science, (2021), 12, (653186), 10.3389/fpls.2021.653186). *Frontiers in Plant Science*, 12(August), 10–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.710792>
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., & Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(9), 998–1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>

- Lisar, S. Y. S., Motafakkerazad, R., Hossain, M. M., & Rahman, I. M. M. (2012). *Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses*, (I. M. M. Rahman & H. Hasegawa (eds.); p. Ch. 0). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/39363>
- Liu, R. N., Jiao, T. Q., Li, J., Wang, A. Y., Li, Y. X., Wu, S. J., Du, L. Q., Dijkwel, P. P., & Zhu, J. B. (2021). Drought-induced increase in catalase activity improves cotton yield when grown under water-limiting field conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, November 2020, 1–15. <https://doi.org/10.1111/jac.12533>
- Maghsoudi, K., Emam, Y., Ashraf, M., & Arvin, M. J. (2019). Alleviation of field water stress in wheat cultivars by using silicon and salicylic acid applied separately or in combination. *Crop and Pasture Science*, 70(1), 36–43. <https://doi.org/10.1071/CP18213>
- Mahmood, T., Khalid, S., Abdullah, M., Ahmed, Z., Shah, M. K. N., Ghafoor, A., & Du, X. (2019). Insights into Drought Stress Signaling in Plants and the Molecular Genetic Basis of Cotton Drought Tolerance. *Cells*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/cells9010105>
- McCully, M. E. (1999). Root xylem embolisms and refilling. Relation to water potentials of soil, roots, and leaves, and osmotic potentials of root xylem sap. *Plant Physiology*, 119(3), 1001–1008. <https://doi.org/10.1104/pp.119.3.1001>
- Müller, M., & Munné-Bosch, S. (2021). Hormonal impact on photosynthesis and photoprotection in plants. *Plant Physiology*, 185(4), 1500–1522. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab119>
- Munns, R., Passioura, J. B., Colmer, T. D., & Byrt, C. S. (2020). Osmotic adjustment and energy limitations to plant growth in saline soil. *New Phytologist*, 225(3), 1091–1096. <https://doi.org/10.1111/nph.15862>
- Naumann, G., Alfieri, L., Wyser, K., Mentaschi, L., Betts, R. A., Carrao, H., Spinoni, J., Vogt, J., & Feyen, L. (2018). Global Changes in Drought Conditions Under Different Levels of Warming. *Geophysical Research Letters*, 45(7), 3285–3296. <https://doi.org/10.1002/2017GL076521>
- Noctor, G., Mhamdi, A., & Foyer, C. H. (2014). The roles of reactive oxygen metabolism in drought: Not so cut and dried. *Plant Physiology*, 164(4), 1636–1648. <https://doi.org/10.1104/pp.113.233478>
- Ojuederie, O. B., Olanrewaju, O. S., & Babalola, O. O. (2019). Plant growth promoting rhizobacterial mitigation of drought stress in crop plants: Implications for sustainable agriculture. *Agronomy*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/agronomy9110712>
- Omena-Garcia, R. P., Oliveira Martins, A., Medeiros, D. B., Vallarino, J. G., Mendes Ribeiro, D., Fernie, A. R., Araújo, W. L., & Nunes-Nesi, A. (2019). Growth and

metabolic adjustments in response to gibberellin deficiency in drought stressed tomato plants. *Environmental and Experimental Botany*, 159(November 2018), 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.12.011>

- Ortega-Farias, S., Villalobos-Soublett, E., Riveros-Burgos, C., Zúñiga, M., & Ahumada-Orellana, L. E. (2020). Effect of irrigation cut-off strategies on yield, water productivity and gas exchange in a drip-irrigated hazelnut (*Corylus avellana* L. cv. Tonda di Giffoni) orchard under semiarid conditions. *Agricultural Water Management*, 238(March), 106173. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106173>
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5(MAR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>
- Ouledali, S., Ennajeh, M., Ferrandino, A., Khemira, H., Schubert, A., & Secchi, F. (2019). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on the control of stomata functioning by abscisic acid (ABA) in drought-stressed olive plants. *South African Journal of Botany*, 121, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.10.024>
- Ozturk, M., Turkyilmaz Unal, B., García-Caparrós, P., Khursheed, A., Gul, A., & Hasanuzzaman, M. (2021). Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1321–1335. <https://doi.org/10.1111/ppl.13297>
- Pál, M., Tajti, J., Szalai, G., Peeva, V., Végh, B., & Janda, T. (2018). Interaction of polyamines, abscisic acid and proline under osmotic stress in the leaves of wheat plants. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31297-6>
- Pavlů, J., Novák, J., Koukalová, V., Luklová, M., Brzobohatý, B., & Černý, M. (2018). Cytokinin at the crossroads of abiotic stress signalling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 1–36. <https://doi.org/10.3390/ijms19082450>
- Pinheiro, C., & Chaves, M. M. (2011). Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 869–882. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq340>
- Planas-Riverola, A., Gupta, A., Betegoñ-Putze, I., Bosch, N., Ibañez, M., & Cano-Delgado, A. I. (2019). Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development (Cambridge)*, 146(5), 1–11. <https://doi.org/10.1242/dev.151894>
- Quiroga, G., Erice, G., Aroca, R., Zamarreño, Á. M., García-Mina, J. M., & Ruiz-Lozano, J. M. (2020). Radial water transport in arbuscular mycorrhizal maize plants under drought stress conditions is affected by indole-acetic acid (IAA)

- application. *Journal of Plant Physiology*, 246–247(December 2019), 153115. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153115>
- Ramachandran, P., Wang, G., Augstein, F., De Vries, J., & Carlsbecker, A. (2018). Continuous root xylem formation and vascular acclimation to water deficit involves endodermal ABA signalling via miR165. *Development (Cambridge)*, 145(3), 1–7. <https://doi.org/10.1242/dev.159202>
- Rasheed, A., Hassan, M. U., Aamer, M., Batool, M., Fang, S., WU, Z., & LI, H. (2020). A Critical Review on the Improvement of Drought Stress Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(4), 1756–1788. <https://doi.org/10.15835/nbha48412128>
- Raza, A., Charagh, S., Zahid, Z., Mubarik, M. S., Javed, R., Siddiqui, M. H., & Hasanuzzaman, M. (2021). Jasmonic acid: a key frontier in conferring abiotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 40(8), 1513–1541. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02614-z>
- Razi, K., & Muneer, S. (2021). Drought stress-induced physiological mechanisms, signaling pathways and molecular response of chloroplasts in common vegetable crops. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(5), 669–691. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1874280>
- Rojas, O. (2020). Agricultural extreme drought assessment at global level using the FAO-Agricultural Stress Index System (ASIS). *Weather and Climate Extremes*, 27(May 2018), 100184. <https://doi.org/10.1016/j.wace.2018.09.001>
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng, J., & Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102479>
- Ruyter-Spira, C., Al-Babili, S., van der Krol, S., & Bouwmeester, H. (2013). The biology of strigolactones. *Trends in Plant Science*, 18(2), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.10.003>
- Ruyter-Spira, C., Kohlen, W., Charnikhova, T., van Zeijl, A., van Bezouwen, L., de Ruijter, N., Cardoso, C., Lopez-Raez, J. A., Matusova, R., Bours, R., Verstappen, F., & Bouwmeester, H. (2011). Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in arabidopsis: Another belowground role for strigolactones? *Plant Physiology*, 155(2), 721–734. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166645>
- Salazar-Cerezo, S., Martínez-Montiel, N., García-Sánchez, J., Pérez-y-Terrón, R., & Martínez-Contreras, R. D. (2018). Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiological Research*, 208(January), 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.010>

- Salehin, M., Li, B., Tang, M., Katz, E., Song, L., Ecker, J. R., Kliebenstein, D. J., & Estelle, M. (2019). Auxin-sensitive Aux/IAA proteins mediate drought tolerance in Arabidopsis by regulating glucosinolate levels. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12002-1>
- Salih, S., Tunçtürk, R. (2020). Low Doses of Gibberellic Acid can Enhance Germination of Wheat Seed under Advances in Crop Science and Technology. *Advances in Crop Science and Technology*, 8(January), 0–5.
- Schweiger, A., Zimmermann, T., Poll, C., Marhan, S., Leyrer, V., & Berauer, B. (2022). The need to decipher plant drought stress along the soil-plant-atmosphere continuum. *Authorea Preprints*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/oik.10136>
- Shu, S., Tang, Y., Yuan, Y., Sun, J., Zhong, M., & Guo, S. (2016). The role of 24-epibrassinolide in the regulation of photosynthetic characteristics and nitrogen metabolism of tomato seedlings under a combined low temperature and weak light stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.021>
- Siddiqi, K. S., & Husen, A. (2019). Plant response to jasmonates: current developments and their role in changing environment. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0195-6>
- Signorelli, S., Tarkowski, Ł. P., Van den Ende, W., & Bassham, D. C. (2019). Linking Autophagy to Abiotic and Biotic Stress Responses. *Trends in Plant Science*, 24(5), 413–430. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.02.001>
- Stephenie, S., Chang, Y. P., Gnanasekaran, A., Esa, N. M., & Gnanaraj, C. (2020). An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *Journal of Functional Foods*, 68(March), 103917. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103917>
- Tanaka, Y., Sano, T., Tamaoki, M., Nakajima, N., Kondo, N., & Hasezawa, S. (2005). Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 138(4), 2337–2343. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063503>
- Ullah, A., Manghwar, H., Shaban, M., Khan, A. H., Akbar, A., Ali, U., Ali, E., & Fahad, S. (2018). Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 25, Número 33, pp. 33103–33118). <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3364-5>
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., Kyojuka, J., & Yamaguchi, S. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455(7210), 195–200. <https://doi.org/10.1038/nature07272>

- Verma, S., Negi, N. P., Pareek, S., Mudgal, G., & Kumar, D. (2022). Auxin response factors in plant adaptation to drought and salinity stress. *Physiologia Plantarum*, 174(3). <https://doi.org/10.1111/ppl.13714>
- Vojta, P., Kokáš, F., Husičková, A., Grúz, J., Bergougnoux, V., Marchetti, C. F., Jiskrová, E., Ježilová, E., Mik, V., Ikeda, Y., & Galuszka, P. (2016). Whole transcriptome analysis of transgenic barley with altered cytokinin homeostasis and increased tolerance to drought stress. *New Biotechnology*, 33(5), 676–691. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.01.010>
- Wang, N. N., Xu, S. W., Sun, Y. L., Liu, D., Zhou, L., Li, Y., & Li, X. B. (2019). The cotton WRKY transcription factor (GhWRKY33) reduces transgenic Arabidopsis resistance to drought stress. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37035-2>
- Wang, W. ni, Min, Z., Wu, J. ren, Liu, B. chen, Xu, X. lei, Fang, Y. lin, & Ju, Y. lun. (2021). Physiological and transcriptomic analysis of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) reveals the alleviating effect of exogenous strigolactones on the response of grapevine to drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167(May), 400–409. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.08.010>
- Waterland, N. L., Campbell, C. A., Finer, J. J., & Jones, M. L. (2010). Abscisic acid application enhances drought stress tolerance in bedding plants. *HortScience*, 45(3), 409–413. <https://doi.org/10.21273/hortsci.45.3.409>
- Wu, M., Zhang, W. H., Ma, C., & Zhou, J. Y. (2013). Changes in morphological, physiological, and biochemical responses to different levels of drought stress in chinese cork oak (*Quercus variabilis* Bl.) seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*, 60(5), 681–692. <https://doi.org/10.1134/S1021443713030151>
- Xie, Z., Chu, Y., Zhang, W., Lang, D., & Zhang, X. (2019). *Bacillus pumilus* alleviates drought stress and increases metabolite accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Environmental and Experimental Botany*, 158(November 2018), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.021>
- Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/horticulturae7030050>
- Zaefyzadeh, M., Quliyev, R. A., Babayeva, S. M., & Abbasov, M. A. (2009). The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces. *Turkish Journal of Biology*, 33(1), 1–7. <https://doi.org/10.3906/biy-0801-12>
- Zamani, H., Arvin, M. J., Jahromi, A. A., Abdossi, V., & Torkashvand, A. M. (2020). The effect of sodium silicate and methyl jasmonate on pigments and antioxidant

activity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under salinity stress. *Tarim Bilimleri Dergisi*, 26(4), 479–487. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.561603>

Zhang, X., Xiao, Y., Wan, H., Deng, Z., Pan, G., & Xia, J. (2017). Using stable hydrogen and oxygen isotopes to study water movement in soil-plant-atmosphere continuum at Poyang Lake wetland, China. *Wetlands Ecology and Management*, 25(2), 221–234. <https://doi.org/10.1007/s11273-016-9511-1>

Zhang, Y., Li, Y., Hassan, M. J., Li, Z., & Peng, Y. (2020). Indole-3-acetic acid improves drought tolerance of white clover via activating auxin, abscisic acid and jasmonic acid related genes and inhibiting senescence genes. *BMC Plant Biol* 20, 150. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02354-y>

CAPITULO II

Effective Method for Immobilizing Rhizobacteria to Enhance Soil Properties and Improve the Physiological and Enzyme-Antioxidant Characteristics of Hazelnut under Deficit Irrigation Conditions

Jorge Baeza-Aranzáez ^a, Francisca Martin-Díaz ^a, José Ortiz ^b, Luisa Bascuñán-Godoy ^b, Mauricio Schoebitz ^c, Richard M. Bastías ^a, Juan David Giraldo ^d, Juan Gabriel Pérez-Pérez ^e, María Dolores López-Belchí^{1*}

^a Universidad de Concepción, Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Concepción, Chile, jbaeza2018@udec.cl, fmartin2018@udec.cl, rbastias@udec.cl, mlopezb@udec.cl.

^b Universidad de Concepción, Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Concepción, Chile, joseortizg@udec.cl, lubascun@udec.cl

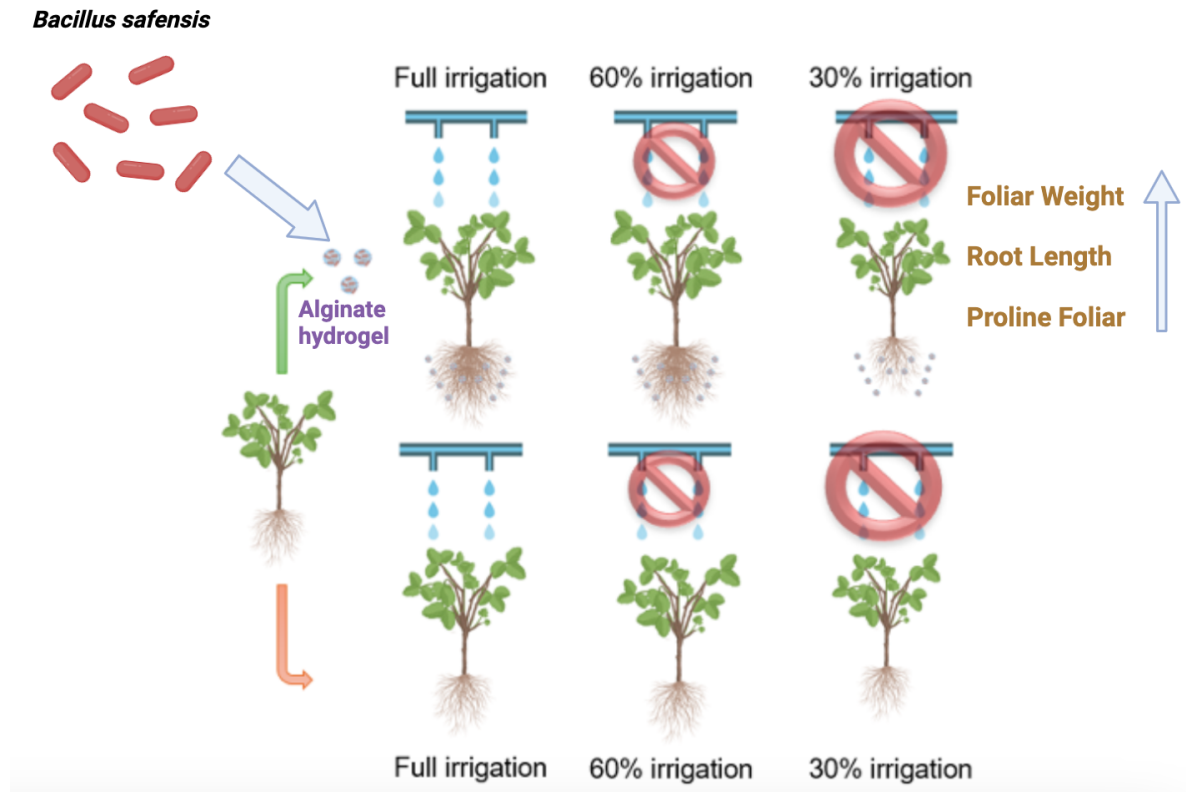
^c Universidad de Concepción, Departamento de Suelos y Recursos Naturales, Facultad de Agronomía, Concepción, Chile, mschoebitz@udec.cl.

^d Ingeniería Ambiental, Instituto de Acuicultura, Universidad Austral de Chile, Puerto Montt, Pellauco, Los Pinos s/n Balneario, Chile, juan.giraldo@uach.cl.

^e Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Centro para el Desarrollo de la Agricultura Sostenible, Spain, perez_juaperb@gva.es

*Corresponding author: mlopezb@udec.cl

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

This study explored the osmoprotectant, phytohormone, and antioxidant mechanisms of *Bacillus safensis* immobilized in calcium alginate to improve drought tolerance in hazelnut seedlings. The experiments were conducted under controlled irrigation regimes to assess physiological and biochemical responses, including photosynthetic parameters, root traits, antioxidant enzyme activities (SOD: Superoxide dismutase, GR: Glutathione reductase, APX: ascorbate peroxidase), proline content, and phytohormone levels. The results demonstrated that the solid biostimulant of *B. safensis* evaluated mitigated the adverse effects of water stress, enhancing antioxidant defense mechanisms and promoting plant growth (foliar dry weight was 50% greater compared to control) and under reduced irrigation conditions (root length was 10% superior and proline foliar

content reached 1200 nmol g⁻¹ (F.W.) under 30% water deficit), decreasing abscisic acid (ABA) content and enzymes such as SOD and APX whereas increased GR enzyme. Our results confirm the beneficial role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) immobilized in enhancing stress tolerance, highlighting *B. safensis* as a promising tool for improving drought resilience in hazelnut cultivation. Adjusting irrigation practices and incorporating microbial biofertilizer through adequate technologies are key strategies for sustainable agriculture under increasingly variable climatic conditions.

Keywords

Bacillus safensis, drought tolerance, *Corylus avellana*, antioxidant enzymes, PGPR

1. Introduction

Hydrogels have shown promise in fruit tree cultivation, particularly under challenging environmental conditions. Studies have demonstrated that the application of hydrogels to soil can enhance the growth, yield, and quality of fruit trees (Abobatta & Khalifa, 2024; Hamdy et al., 2020; Zhang et al., 2022). Hydrogel compounds have been linked to increased nutrient and water accessibility, leading to improved productivity in fruit trees such as mango trees and mandarin trees (Hamdy et al., 2020; Zhang et al., 2022). Additionally, incorporating hydrogels as a soil conditioner has been found to have a positive impact on parameters such as total yield, fruit weight, and fruit quality in fruit trees such as navel oranges (Abobatta & Khalifa, 2024). Research has also indicated that adding hydrogels to soil can increase root dry weight and improve the survival, growth, and physiological traits of different tree species, particularly under non-water stress conditions (Agaba et al., 2011; Orikiriza et al., 2013; Tomášková et al., 2023). Hydrogel application has been shown to enhance the nitrogen, phosphorus, and potassium content of fruits, suggesting its potential to improve nutrient uptake in fruit trees (Mahgoub, 2020). Moreover, the use of hydrogels has demonstrated potential for reducing water consumption, promoting seedling

formation, and enhancing post-plant survival in various fruit tree species (Cavalcante et al., 2018). However, the biochemical mechanisms involved in the application of hydrogels have rarely been studied. Hence, the study of fruit tree adaptation to water stress, the biochemical and physiological mechanisms of the plants, and microbiological changes in the soil can help us understand what happens to different species and develop strategies to mitigate the effects of water stress (Xie et al., 2019). Similarly, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) have been shown to enhance tolerance to drought stress, in addition to elevating antioxidant compounds and photosynthetic capacity (Ahmad et al., 2022; Essalimi et al., 2022; F. Liu et al., 2023; Lotfi et al., 2022).

Water shortage has been shown to have a significant impact on the physiological processes, growth, and photosynthetic capacity of fruit trees, eventually affecting their productivity and quality. Studies have demonstrated that water deficit conditions can lead to reduced gas exchange rates, altered carbon assimilation, and compromised vegetative growth in fruit tree species such as peach trees (Rahmati et al., 2015, 2018). The limitation of the light-saturated photosynthesis rate due to water stress can have a substantial effect on tree carbon acquisition and vegetative growth, highlighting the complex relationship between water availability and photosynthetic performance in fruit trees (Rahmati et al., 2018). Additionally, water deficit can influence fruit set in subsequent years by affecting bud number, size, and photosynthetic rates, which are critical for providing resources for flower development and fruit production (Hernandez-Santana et al., 2017; Klein et al., 2014).

Osmoprotectants play a vital role in mitigating the effects of water stress in fruit trees. Osmoprotectants such as proline accumulate in response to abiotic stresses, contributing to the defense mechanisms of stressed plants by regulating osmotic pressure, maintaining membrane stability, enhancing enzyme activity, and scavenging free radicals (Hassan et al., 2022). The accumulation of osmolytes and transporters, classified as osmoprotectants, can help protect

plants against abiotic stress factors such as water deficit (Murdock et al., 2014). Strategies can be developed to enhance plant resilience and productivity under challenging environmental conditions by understanding the roles of osmoprotectants and oxidative stress in fruit trees under water stress.

Phytohormones are also essential for the physiological responses of fruit trees to water-deficit conditions, influencing both leaves and roots. Phytohormones such as abscisic acid (ABA), auxins, and cytokinins are particularly significant in the context of water scarcity. ABA is known to increase in concentration during drought conditions, facilitating stomatal closure and reducing water loss through transpiration (Lang et al., 2024; Takahashi et al., 2018). This response is important for maintaining leaf turgor and overall plant health under water-limited conditions (Rao et al., 2022). Additionally, the accumulation of phytohormones in roots can signal the soil moisture status to the plant, prompting systemic responses that help in managing water stress (Sayer et al., 2021).

The relationship between phytohormones and water deficit extends to the root system, where hormonal signaling can influence root architecture and function. Under drought conditions, roots may exhibit increased auxin production, which can enhance root elongation and improve water uptake efficiency (Fresno & Munné, 2023). This is particularly relevant in fruit trees, where root-to-shoot signaling is essential for maintaining hydration and nutrient transport during periods of water scarcity (Takahashi et al., 2018). Moreover, the interaction between phytohormones and PGPR can also affect plant responses to water stress, as drought-adapted microbes may respond differently to phytohormonal signals than those under well-watered conditions (Sayer et al., 2021).

Finally, enzymes such as malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) mitigate abiotic stress in fruit trees. MDA, a marker of oxidative stress, increases under abiotic stress conditions, leading to decreased membrane fluidity and disrupted ion homeostasis in plants (Li et al., 2019). SOD is an essential intracellular metalloenzyme that catalyzes the dismutation of

superoxide anions into oxygen and hydrogen peroxide and plays a fundamental role in the antioxidant defense system (Elsheery et al., 2020). CAT, another key enzyme, scavenges hydrogen peroxide and is vital for plant growth, development, and stress tolerance (Yu et al., 2024). Studies have shown that under abiotic stress, the activity of antioxidant enzymes, such as SOD, CAT, and Peroxidase (PDO), can be altered, affecting sugar accumulation and stress responses in fruit trees (Wang et al., 2022). Understanding the molecular mechanisms underlying the regulation of these enzymes is key to enhancing stress tolerance and improving fruit quality in fruit tree species facing challenging environmental conditions.

In recent years, studies on the physiological responses of hazelnut (*Corylus avellana* L.) plants to water stress have been conducted by various authors (Cincera et al., 2019; Luciani et al., 2020; Salazar-Canales et al., 2021). Water deficit can have significant implications for hazelnut trees, affecting both their physiological responses and nut quality (Altieri et al., 2024).

In the context of contemporary agricultural practices, the need to address abiotic stresses, such as drought, has led to the development of biofertilizer that can absorb and retain water for a longer duration while also incorporating other compounds within these biopolymers (Li et al. 2019; Rattan et al. 2022). Alginate hydrogels, which retain water and gradually release it, are currently being studied. It has been reported that the absorption capacity of these hydrogels can reach up to 10 times their weight in water depending on specific conditions (Alvarez et al., 2020). Therefore, it is expected that hazelnut plants subjected to water reduction and treated with bioestimulants would present lower oxidative stress, resulting in physiological and biochemical responses similar to those of unstressed plants. Hence, the response of hazelnuts to water reduction with bioestimulants based on *B. safensis*-containing hydrogels was evaluated to determine their sustainability and resilience to deficit irrigation.

2. Materials and methods

2.1. Plant Material

Plantlets of hazelnut var. Giffoni, propagated from suckers and maintained for 18 months, were acquired from AgriChile (Maule, Chile), all established under the same nursery conditions. They were transferred for 3 weeks and adapted to a growth chamber. The chamber was maintained under a photoperiod of 16 h of lighting and 8 h of darkness, with 50% relative humidity and $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of the photosynthetic photon flux density (PPFD), radiation considered as shading leaves (sapling point $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at temperatures between $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ during the day and $14 \text{ }^{\circ}\text{C}$ to $17 \text{ }^{\circ}\text{C}$ at night.

2.2. Biostimulant formulation

Initially, *Bacillus safensis* bacteria were incubated in a 1 L flask with 400 mL of sterile solution of BBL trypticase soybean medium (Winkler, Santiago, Chile) enriched with tryptophan (Merck, Darmstadt, Germany) at a concentration of 0.2 g L^{-1} in a Memmert ICO150 incubator (Schwabach, Germany) for 24 h at $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and 140 rpm. The samples were incubated at a concentration of 0.2 g L^{-1} in a Memmert ICO150 incubator (Schwabach, Germany) for 24 h at $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and 140 rpm. The matrix solution was prepared based on medium L-guluronic alginate (Gelymar, Puerto Montt, Chile) at 2.5 % (w/w) and potato starch (Prosecor, Puerto Montt, Chile) at 1% (w/w) in distilled water. The alginate was dissolved at $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ under constant agitation, and once dissolved, starch was added under agitation until dissolved. An Ultra Turrax IKA T-18 (Germany) apparatus was used to homogenize the mixture and allow it to cool. The matrix solution was extruded using JetCutter equipment (GeniaLab, Braunschweig, Germany) with a pump velocity of 445 rpm and cut-off wheel velocity of 59 Hz. The droplets were collected in a vessel containing 2.5 % (w/w) CaCl_2 gelling solution (Sigma Aldrich, Canada) and agitated for 30 min. Subsequently, the formed particles were drained and washed in 0.85 % (w/w) NaCl solution (Merck, Santiago, Chile) under agitation for 20 min. The beads were drained, subjected to UV radiation for 30

min, and suspended in a flask containing *B. safensis* culture broth for 120 min at 28 °C and 140 rpm. Finally, the beads were analyzed, separated, and dried in a convection oven on Kraft paper at 30 °C for 24 h (Table S) (Benítez et al., 2024).

2.3. Experimental Design

Different treatments (C-FI (Control + full irrigation), B-FI (Biostimulant + full irrigation), C-60I (Control + 60% irrigation), B-60I (Biostimulant + 60% irrigation), C-30I (Control + 30% irrigation), and B-30I (Biostimulant + 30% irrigation) distributed within the plant growth chamber and using a fully randomized design, were carried out for two months. Alginate-*B. safensis* biofertilizer were applied to plants in the growth chamber and grown in pots to stimulate root growth.

Biofertilizer were manually applied by incorporating them below the soil surface (0-10 cm) in the root zone of each seedling. Two grams of biofertilizer were applied at the outset of the trial, at a concentration of 1.4×10^9 CFU g⁻¹. Both inoculated and non-inoculated plants were irrigated with type 2 water, calculated in relation to their F.C. in grams, and the trial commenced with water restriction. After 30 days, an additional 2 g of the formulation was applied, and after 30 days, the trial was terminated, resulting in a total of 60 days of water restriction.

Nondestructive samples were obtained, including measurements using an infrared gas analyzer. Subsequently, destructive samples were taken, comprising the collection of foliar and root samples that had been previously frozen in liquid nitrogen and stored in a preservative at -80°C for later analysis. Four grams of foliar sample and three grams of root sample were taken. Additionally, soil samples (100 g) were collected from the rhizospheric zone and were characterized at the beginning and end of the trial (Table S). These samples were stored in a refrigerated environment (4°C) and frozen at -20°C for later analysis. In total, six treatments, with five replicates, were used.

2.4. Plant and root characteristics

2.4.1. Canopy assessments

The dry weight of the samples, which were air-dried for several summers and then stored, was measured to determine their biomass. Total dry weight (TDW), defoliated dry weight (DDW), and foliar dry weight (FDW) were measured using an analytical balance.

2.4.2. Roots assessments

The root size of the samples was quantified using a standard one-meter measurement marked in centimeters. Images were captured, and the pixel size was calculated using ImageJ software to measure the root length of each sample. The number of new or green roots was quantified by examining all root faces and counting the number of new or green roots present in each plant.

2.5. Determination of soil microbial activity by hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA)

Fluorescein diacetate hydrolase (FDAase) enzyme activity was evaluated using a method adapted from Alef (1995). This technique is based on a colorimetric method involving the hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA). For this purpose, 0.5 g of soil was taken (with five replicates per bead soil treatment, leaving a control conditioned at 60%). The soil sample, 4.45 mL sodium phosphate buffer (pH 7.8), and 50 μ L FDAase were added to 10 mL tubes. Sodium phosphate buffer (5 mL, pH 7.8) was used as the control. The tubes were then incubated in a thermostatic bath at 25°C for 1 h at 60 rpm, removed, and placed in an ice bath to stop the reaction. The samples and controls were then added to 5 mL acetone, vortexed vigorously, and filtered through Whatman No. 40 paper. The filtrate was analyzed using a microplate reader (Biotek® Epochh-sn) at an absorbance of 490 nm and compared to a reagent blank (1 mL of distilled water and 1 mL of acetone) (Alef, 1995).

2.6. Measurement of dissolved organic carbon (DOC)

The methodology of Vance et al. (1987) with adaptations was used to quantify microbial biomass carbon. Soil samples (10 g) were collected from each treatment, all conditioned to 60% permanent wilting point moisture (WPFS). Selective fumigation was performed by adding 0.5 mL CHCl_3 to some samples and incubating them for 30 min at room temperature in the dark. Chloroform was then completely removed using a vacuum pump, and this process was repeated until complete removal was achieved. Subsequently, 40 mL of 0.5 M K_2SO_4 was added to all samples and shaken for 1 h at 220 rpm on a rotary shaker table. After shaking, the samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and filtered through 0.45 μm syringe filters. (Vance et al., 1987).

For the estimation of DOC in the TOC-SHIMADZU®-H544160 analyzer (Japan), the filtrates of the fumigated and non-fumigated samples were diluted to 1:10 (2 mL in 8 mL of HPLC-type water). The results obtained from the kit provided a DOC value of $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Using the methodology proposed by Tate et al. (1991), a constant KEC (0.20) was employed to calculate the microbial biomass (Tate, 1991).

2.7. Soil Analysis

Soil analysis was conducted at the beginning and conclusion of the experiment for each treatment. For this purpose, 50 g of soil were collected in duplicate from each treatment. The initial collection was performed at the start of the experiment and the final collection was performed at the conclusion of the experiment. The soil samples were then analyzed at the Soil Laboratory of the Universidad de Concepción (Chillán, University of Concepción).

The analyses involved standard procedures for determining the soil composition and properties relevant to the study. Specific parameters measured included soil pH, nutrient content, organic matter, and moisture levels. These measurements provided a comprehensive understanding of soil conditions and how they were affected by the treatments applied during the experiment.

2.8. Leaf gas exchange assessments

To evaluate the gas exchange the most representative central leaves of each plant from the different treatments were selected by using an Infrared Gas Analyzer (IRGA). The photosynthetic rate (P_n , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), stomatal conductance (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), and transpiration rate (E_{leaf} , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) were measured using a TARGAS-1 infrared gas analyzer (PP Systems, Amesbury, USA). This information was used to estimate instantaneous water use efficiency (WUE, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$), calculated as the ratio P_n/E_{leaf} , and intrinsic water use efficiency (WUI, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$), calculated as the ratio P_n/g_s .

2.9. Evaluation of proline as osmoprotectant in *C. avellana*

Proline extraction from the plant material (foliar and root) was conducted by heating in pure ethanol and water for 20 min. A sequential extraction technique using 80% and 50% ethanol was employed. Subsequently, proline determination was performed by preparing diluted extract solutions and proline standards in an ethanol/water mixture. The solutions were then incubated at 95°C, during which the ninhydrin reaction mixture was added. The absorbance was then measured at 520 nm in a microplate reader (Carillo & Gibon, 2011)

2.10. Evaluation of phytohormones in aerial and root area in *C. avellana*

Phytohormones, including abscisic acid (ABA), indole-3-acetic acid (IAA), and indole-3-butyric acid (IBA), were extracted from fresh plant material (foliar and roots) according to the methodology described by Pan et al. (2010).

Chemical analyses were conducted to identify and quantify phytohormones on a Kromasile C18 100-5-C18 4.6 x 250 mm column (Merck Millipore). The mobile phase consisted of two solvents, (A) 0.1 % formic acid in water (mg/g) and (B) 0.1% formic acid in acetonitrile (mg/g), with a flow rate of 0.6 mL min⁻¹. A HITACHI PRIMAIDE HPLC-DAD, equipped with a Photodiode Array Detector (DAD), was used (Merk-Hitachi, Darmstadt, Germany). The chromatograms were recorded at 260 and 280 nm. Abscisic acid at 260 nm, indole acetic acid and indole butyric

acid at 280 nm (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were used as standards (Pan et al., 2010).

2.11. Antioxidant enzyme system as response to biofertilizer

To determine the antioxidant and metabolic responses of plants under water stress, enzymatic activity was performed on 100 mg of frozen leaf and root tissues of *C. avellana*. For antioxidant activity, spectrophotometric measurements of superoxide dismutase (E.C. 1.15.1.1, SOD), glutathione reductase (E.C. 1.6.4.2, GR), ascorbate peroxidase (E.C. 1.11.1.11, APX), dehydroascorbate reductase (E.C. 1.8.5.1, DHAR) and peroxidase (POX) assays were conducted according to the method described by Palma et al. (2014). In summary, 100 mg of frozen tissue was mixed with extraction buffer containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol, and 20% (w/w) PVPP. The resulting extract was used for enzymatic reactions, and enzyme activity was measured as the change in absorbance over time, as previously described (Palma et al., 2014).

2.12. Statistical analysis

The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the R software. Tukey's test was used to determine significant differences between the treatments at a significance level of $P < 0.05$. Principal Component Analysis (PCA) was performed to evaluate the variation and relationships among morphological and physiological parameters in both the aerial and root parts of the plants. The analyses were performed using the R software. Additionally, an analysis of variance (ANOVA) was conducted to assess the effects of irrigation dose (I), biostimulant application (B), and their interaction (I*B) on leaf gas exchange variables. Lowercase letters (within rows) indicate significant differences between irrigation levels (F1, 60I, 30I), while uppercase letters (within columns) indicate significant differences between the biostimulant treatment (B) and the control (C), according to Tukey's test ($p < 0.05$). Principal Component Analysis (PCA) with mean-centered data based on eigenvalues were used to determine the correlation

between variables and to discriminate the effects of each of the formulations applied. These analyses were also conducted using R software through the FactoMineR package and visualized using ggplot2.

3. Results

3.1. Aerial, root and soil characteristics after applying biofertilizer under deficit water

The total dry weight (TDW) of plants was assessed across the control (C) and biostimulant (B) treatments at three distinct soil field capacities: 100% field irrigation (FI), 60% (60I), and 30% (30I) (Figure 1S). The analysis revealed a notable variation in TDW, with plants maintained at full field capacity (100%) exhibiting significantly greater dry weight than those subjected to reduced field capacities (60% and 30%). This finding emphasizes the critical role of adequate soil moisture in promoting plant biomass accumulation. Significant differences were observed in TDW between the C-60I and B-60I treatments compared to the other treatments (Figure 1S.a). A similar assessment of defoliated dry weight (DDW) demonstrated a similar trend, with treated plants showing increased DDW relative to the control plants, particularly under lower soil moisture conditions (60% and 30%) (Figure 1S.b). In terms of foliar dry weight (FDW), significant differences were noted in the B-FI treatment when juxtaposed with both C-FI treatments (Figure 1S.c).

The effects of various water deficit treatments and biostimulant applications on root length in *C. avellana* were illustrated in Figure 2S. The data indicated a decrease in root length across all soil field capacities (100%, 60%, and 30%). However, plants treated with biofertilizer exhibited a greater root length than control plants under conditions of water deficit at 30% irrigation (Figure 2S.a). These results suggest that the evaluated biofertilizer may enhance root elongation, even in scenarios of limited water availability. Additionally, the number

of green roots was higher in plants at full field capacity, indicating superior root health and growth under optimal moisture conditions. Moreover, plants treated with biofertilizer demonstrated a greater quantity of green roots than control plants, particularly under reduced soil moisture levels (60% and 30%) (Figure 2S.b).

In relation to soil microbial characteristics, the application of biofertilizer appeared to have no significant impact on soil microbiology, organic carbon content, or microbial biomass under water deficit conditions. Nevertheless, a positive trend was observed between the biostimulant and control treatments (Figure 3S.a). Regarding dissolved organic carbon (DOC), significant differences were identified in the B-30I treatment when compared to the C-60I and B-FI treatments, whereas no significant differences were observed among the other treatments (Figure 3S.b).

3.2. Evaluation of physiological properties

Related to photosynthetic properties of *C. avellana* plants the effects of different water deficit treatments and the use of the biofertilizer are shown (Table 1). As the field capacity of the soil decreased (from 100% to 30%), the net photosynthetic rate also decreased in all treatments. However, biostimulant treatments tended to maintain a higher net photosynthesis rate than the control, especially under conditions of lower soil field capacity. Nevertheless, no differences were observed in Pn among the treatments.

Table 1. Leaf gas exchange parameters measured in hazelnut plants as affected by deficit irrigation

Irrigation dose	P _n ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		g _s ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		E _{leaf} ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		WUE ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$)		WUI ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$)	
	C	B	C	B	C	B	C	B	C	B
	FI	1.54±0.38 aB	2.28±0.09 aA	53.2±18.09 aB	96.8±7.69 aA	0.80±0.22 abB	1.14±0.23 aA	2.05±0.53 aA	2.05±0.55 bA	0.03±0.01 aA
60I	1.58±0.55 aA	2.10±0.54 aA	55.4±6.60 aA	47.0±2.88 bB	0.93±0.07 aA	0.60±0.27 bB	1.68±1.38 aB	3.60±0.56 aA	0.03±0.02 aA	0.05±0.01 aA
30I	1.28±0.34 aB	1.98±0.41 aA	27.0±10.00 bB	45.0±5.00 bA	0.54±0.14 bA	0.60±0.17 bA	2.53±0.43 aA	3.36±0.95 abA	0.05±0.01 aA	0.05±0.02 abA
ANOVA (P-value)										
I	0.3085		<0.0001		0.0005		0.0596		0.0053	
B	0.0002		<0.0001		0.8533		0.0046		0.5132	
I x B	0.8202		<0.0001		0.0020		0.0435		0.0878	

P_n: net photosynthesis ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); g_s: stomatal conductance ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); E_{leaf}: leaf transpiration rate ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); WUE: instantaneous water use efficiency ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$); WUI: intrinsic water use efficiency ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$); FI: full irrigation (100% water requirement); 60I: irrigation at 60% of water requirement; 30I: irrigation at 30% of water requirement; I: irrigation treatment; B: biostimulant application; C: control without biostimulant. Different letters within each row indicate significant differences among irrigation levels (FI, 60I, 30I), whereas different letters within each column indicate significant differences between biostimulant treatment (B) and control (C), according to Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$) ($n=5$). An analysis of variance (ANOVA) was conducted to assess the effects of irrigation dose (I), biostimulant application (B), and their interaction (IB) on leaf gas exchange variables. Lowercase letters (within rows) indicate significant differences between irrigation levels (FI, 60I, 30I), while uppercase letters (within columns) indicate significant differences between the biostimulant treatment (B) and control (C), according to Tukey's test ($p < 0.05$).

The irrigation dose had a significant effect on g_s, E_{leaf}, and WUI. In addition, the application of biostimulant had a significant effect on P_n, g_s, and WUE. The interaction between the irrigation dose and the biostimulant showed a significant effect on g_s, E_{leaf}, and WUE.

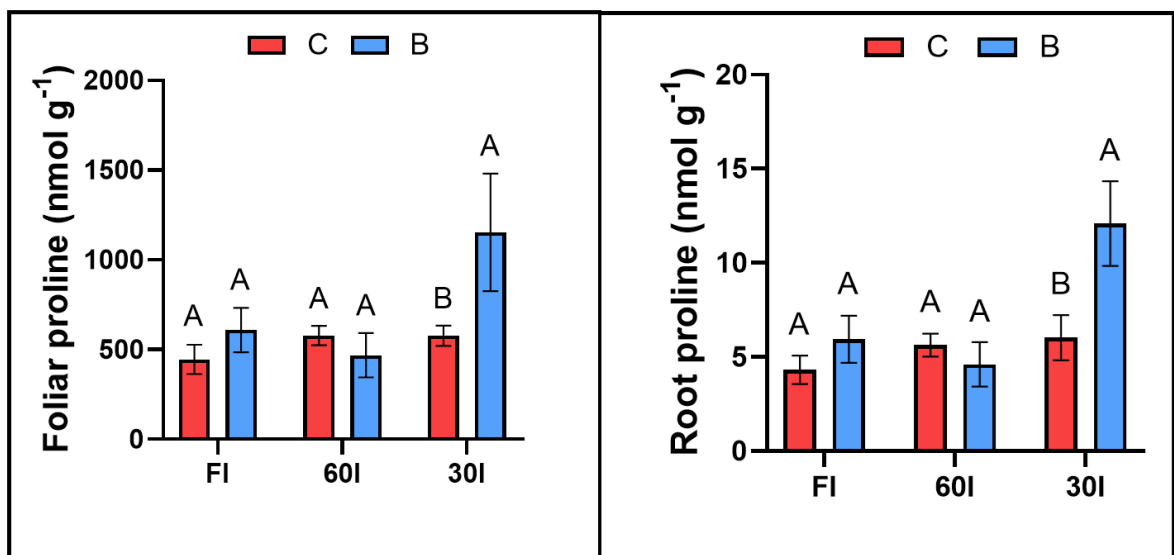
The application of the biostimulant improved P_n and g_s under full irrigation and irrigation at 30% of the water requirement. However, WUE and WUI did not show consistent improvements with biostimulant application. Considering that the leaves were growth under irradiance normally attributed to shading leaves.

3.3. Proline foliar content

As the field capacity decreased (from 100% to 30%), the proline content in the leaves increased (

Figure 1). Plants under the 30% field capacity treatment had significantly higher proline levels than the other treatments and control. This suggests that plants accumulate more proline in their leaves in response to water stress, a common defense mechanism. Similar to the leaves, the proline content in the roots increased as the field capacity decreased. Plants in the 30% field capacity treatment with biostimulant had significantly higher root proline levels compared to the other treatments and the control. Water deficit treatments increased proline content in the leaves and roots of hazelnut plants. This increase was more pronounced under conditions of greater water deficit (30% of field capacity).

Figure 1. Foliar Proline and Root Proline Content (nmol/g) in *Corylus avellana* Plants.

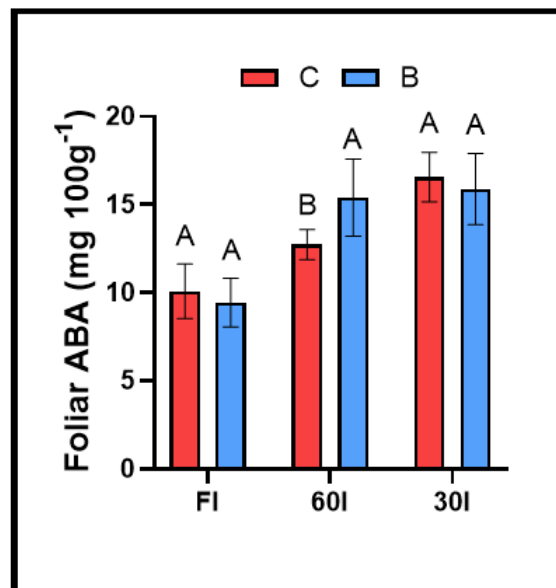


100, 60 and 30 indicate with soil at field capacity; C is control and T is treatment. Different letter means significant differences at $P \leq 0.05$ in treatments for *Corylus avellana* analyzed according to Tukey test.

3.4. Abscisic acid (ABA) foliar content and Evaluation of phytohormones in the roots

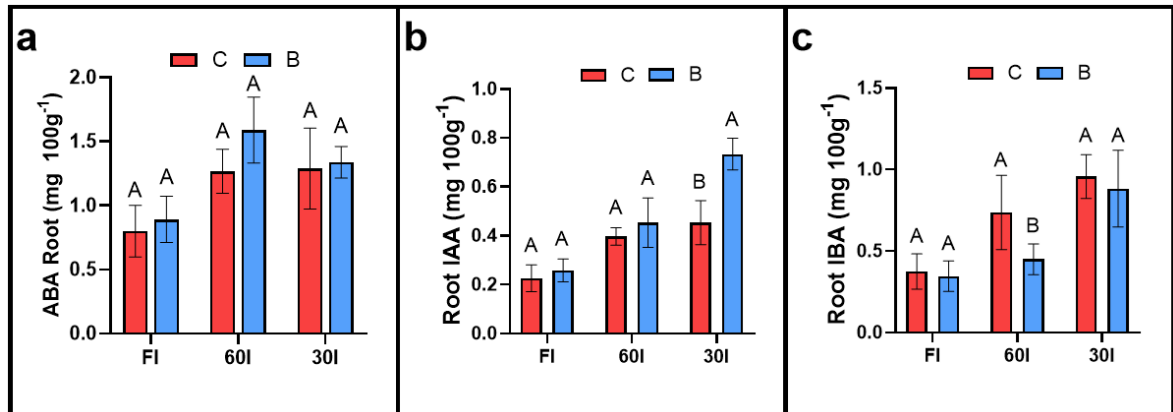
A significant difference in foliar ABA content was observed between the B-60I treatment and the C-60I treatment (**Figure 2**). In contrast, the ABA content in the roots showed no notable differences, although a discernible trend was observed in comparison with all treatments C and B. As the soil field capacity declined (to 60% and 30%), ABA content exhibited an upward trajectory. Plants subjected to 60% and 30% soil field capacity treatments exhibited the highest ABA content, indicating a response to water deficit. This is consistent with the established role of ABA as a hormone associated with water stress response (**Figure 3.a**).

Figure 2. Foliar Abscisic Acid (ABA) Content ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) in *Corylus avellana* Plants.



100, 60 and 30 indicate with soil at field capacity; C is control and T is treatment. Different letter means significant differences at $P \leq 0.05$ in treatments for *Corylus avellana* analyzed according to Tukey test.

Figure 3. Evaluation of phytohormones in the root net a). Root Abscisic Acid (ABA) Content (mg 100 g⁻¹), b). Root Indole-3-Acetic Acid (IAA) Content (mg 100 g⁻¹), c). Root Indole Butyric Acid (IBA) Content (mg 100 g⁻¹) in *Corylus avellana* Plants.



ABA: Abscisic Acid; IAA: Indole-3-Acetic Acid; IBA: Indole Butyric Acid 100, 60 and 30 indicate with soil at field capacity; C is control and T is treatment. Different letter means significant differences at $P \leq 0.05$ in treatments for *Corylus avellana* analyzed according to Tukey test.

Similarly, IAA content in roots increased in conjunction with a reduction in soil field capacity. Plants subjected to 30% soil field capacity treatment exhibited the highest IAA content, indicating that water stress may have induced the synthesis or accumulation of this hormone, which is associated with root growth and development. The B-30I treatment had the highest IAA content, with a notable difference compared to that of the C-30I treatment (**Figure 3.b**).

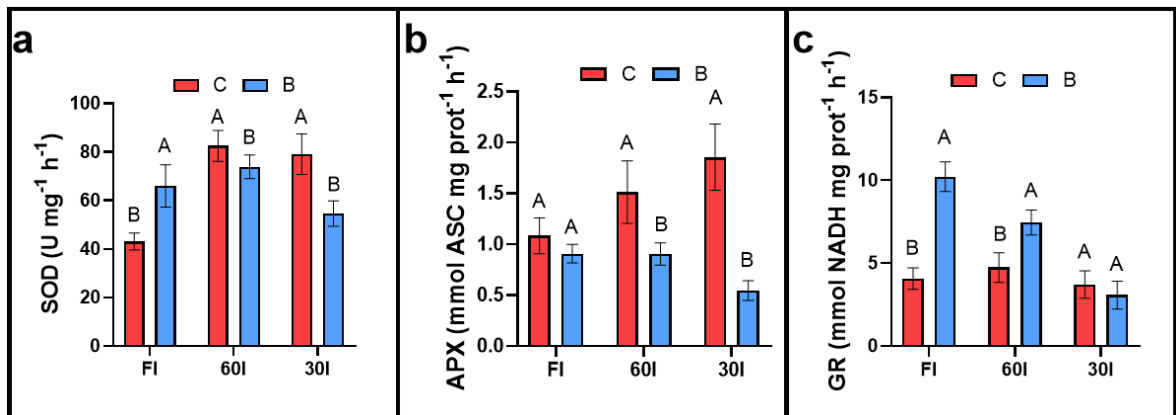
In contrast, plants under the 30% soil field capacity treatment had a high IBA content, whereas the 60I treatments showed significant differences between the control and biostimulant (**Figure 3.c**).

3.5. Antioxidant enzyme system

The activity of SOD increased in conjunction with a reduction in field capacity from 100% to 30%, reaching a maximum at 60% field capacity. However, a slight decrease was observed when the water deficit was more severe (30% of field capacity). Significant differences in SOD content were observed in treatments C-60I and C-30I compared to B-60I and B-30I (

Figure 4.a). SOD activity demonstrated greater sensitivity to changes in water deficit, exhibiting an increase under moderate stress but a decrease under severe stress in the biostimulant treatments compared to controls. This may indicate that SOD plays an important role in the initial antioxidant defense but can be overcome under extreme conditions.

Figure 4. Evaluation of Antioxidant enzyme system net a). Superoxide dismutase (SOD) ($\text{U mg}^{-1} \text{h}^{-1}$) Content, b). Ascorbate peroxidase (APX) ($\text{mmol ASC mg prot}^{-1} \text{h}^{-1}$) Content c). Glutathione reductase GR ($\text{mmol NADH mg prot}^{-1} \text{h}^{-1}$) Content in *Corylus avellana* Plants.



SOD: Superoxide dismutase; APX: Ascorbate peroxidase; GR: Glutathione reductase. 100, 60 and 30 indicate with soil at field capacity; C is control and T is treatment. Different letter means significant differences at $P \leq 0.05$ in treatments for *Corylus avellana* analyzed according to Tukey test.

The activity of APX increased in conjunction with a decline in field capacity from 100% to 30% within the C treatments. This indicates that this level of water stress may elicit a more robust antioxidant response than that observed in the B treatments. A notable disparity in APX concentration was observed between treatments C-60I and C-30I compared to B-60I and B-30I (**Figure 4.b**). The comparatively low APX activity at 60% and 30% of field capacity in treatments B-60I and B-30I, in comparison to treatments C-60I and C-30I,

indicates that biostimulant application is an effective method for inducing an antioxidant response, which may help mitigate oxidative damage.

The GR activity remained relatively stable across the different control treatments (C), although it was observed to be higher at full field capacity (100%) when biostimulant was applied and decreased as field capacity decreased from 100% to 30%. A notable disparity in GR content was discerned between the B-FI and B-60I treatments and the control treatments, C-FI and C-60I, respectively (

Figure 4.c). The observed stability in GR activity suggests that this enzyme may be continuously engaged in maintaining the redox balance within cells, irrespective of the degree of water stress.

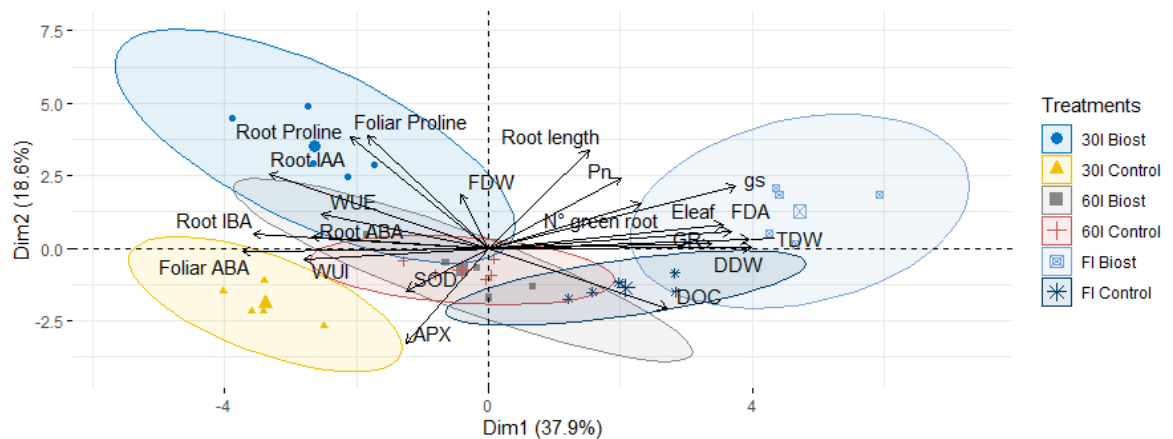
Biofertilizer seems to influence the activity of oxidative enzymes differently under different levels of water deficit, with a pronounced response in GR compared with SOD and APX.

3.6. Multivariate analyses in aerial and root parts

3.6.1. Principal Component Analysis (PCA) summary

The results of the PCA demonstrated that the biofertilizer used under water deficit had a significant impact on the physiological and biochemical variables of hazelnuts. The 60I and 30I treatments induced stress and antioxidant responses, respectively, whereas the full irrigation treatment exhibited healthier growth and reduced stress levels (**Figure 5**). In addition, PCA analysis revealed a negative correlation between root length/green roots and SOD/APX.

Figure 5. PCA analysis of the different water deficit treatments and the physiological and biochemical variables in hazelnut.



Root proline; Foliar proline; Root length; N° green root; FDA: Fluorescein Diacetate Hydrolysis; TOC: Total Organic Carbon; TDW: Total dry weight; DDW: Defoliated Dry Weight; FDW: Foliar Dry Weight; Pn: Net Photosynthesis Rate; gs: Stomatal Conductance; E: Transpiration Rate; WUE: Water Use Efficiency; WUI: Water Use Intrinsic Efficiency; Foliar ABA: Foliar Abscisic Acid; Root ABA: Root Abscisic Acid; Root IAA: Root Indole-3-Acetic Acid; Root IBA: Root Indole Butyric Acid; SOD: Superoxide dismutase; APX: Ascorbate peroxidase; GR: Glutathione reductase.

Principal component analysis (PCA) demonstrated that the primary dimensions accounted for a substantial proportion of the observed variability in the data, with Dim1 and Dim2 collectively explaining 56.6%. Dim1 (37.9%) was predominantly influenced by variables associated with water stress and antioxidant responses, including proline and oxidative enzymes (SOD, APX, and GR), whereas Dim2 (18.6%) was more closely linked to growth and biomass variables such as leaf and root dry weight.

Under control conditions, plants exhibited more robust growth and less stress. The 60I treatment (60% field capacity) exhibited a clustering pattern that was proximate to stress response-related variables such as proline and ABA in the leaves. This suggests that this water deficit level induces a moderate stress response in plants. However, 30I (30% field capacity) was grouped with the variables associated with antioxidant activity (SOD, APX, and GR). This suggests that the treatment induced a more pronounced antioxidant response, potentially offsetting the oxidative damage caused by water stress. B-FI and B-30I treatments were linked to elevated biomass and growth (TDW, DDW, and root length). The C-FI treatment exhibited notable variability in phytohormonal and biochemical responses (root IBA, foliar proline), indicating that biostimulant treatments not only enhance tolerance to water stress but also have the potential to stimulate growth.

4. Discussion

This study on the effects of water deficit on hazelnuts and the application of biofertilizer based on *B. safensis* emphasizes the importance of analyzing a range of physiological and biochemical parameters that are essential for plant resilience. The results highlight the relevance of photosynthetic efficiency, proline accumulation, phytohormonal responses, and antioxidant enzyme activity as key components in the adaptation of hazelnuts to water stress conditions. Despite the water deficit conditions, there were no significant differences in the photosynthetic parameters. This outcome is consistent with previous studies, indicating that certain plants possess mechanisms to maintain photosynthetic efficiency despite stress. Silva (2024) observed that phytohormonal applications can mitigate the effects of abiotic stress and stabilize photosynthetic rates under adverse conditions (da Silva et al. 2024). Additionally, recent research has indicated that specific microbial inoculations, such as *Bacillus pumilus*, can enhance photosynthetic efficiency by preserving RuBisCO integrity, thereby increasing CO₂ assimilation without increasing stomatal conductance (Cui et al., 2024).

Due to the water deficit conditions, an accumulation of proline was observed in roots and leaves in this study. This is consistent with its well-documented role as an osmoprotectant and abiotic stress marker, as evidenced by the findings of Domingo et al. (2023) and Alzate et al. (2022, 2023). The elevated proline levels observed in plants treated with biofertilizer compared to those in untreated plants can be attributed to physiological and biochemical processes that enhance stress tolerance. Proline functions as an osmoprotectant, stabilizing cellular structures and maintaining osmotic balance under stress conditions such as drought and salinity. (Alzate et al., 2022, 2023; Domingo et al., 2023). Biofertilizer, particularly those derived from natural sources, have been shown to modulate the metabolic pathways that lead to enhanced proline synthesis in response to abiotic stressors (Harizanova et al., 2022; Miceli et al., 2021; O. Elansary et al., 2019). For instance, studies have demonstrated that the application of protein hydrolysates and other biostimulants can significantly increase proline levels in plants subjected to water deficits or salinity stress (Bouteraa et al., 2022; Campobenedetto et al., 2021; da Silva et al., 2020). This increase is often linked to the activation of specific biosynthetic pathways that enhance proline accumulation, thereby providing a protective mechanism against oxidative damage and cellular dehydration (Campobenedetto et al., 2021; Repke et al., 2022). Moreover, biofertilizer can stimulate the expression of genes involved in proline metabolism, further contributing to the elevated levels of this amino acid in treated plants (Abou et al., 2021; Francesca et al., 2020). Furthermore, the incorporation of biofertilizer has been demonstrated to enhance the antioxidant potential of plants, thereby attenuating the detrimental effects of reactive oxygen species (ROS) induced by stress. Numerous researchers have extensively documented this phenomenon, including Bulgari et al. (2019), Cristofano et al. (2023) and Shi et al. (2023) corroborate those of previous studies and illustrate the antioxidant capacity of biofertilizer in enhancing the resilience of diverse crops when applied as a natural biostimulant (Bulgari et al., 2019; Cristofano et al.,

2023; Shi et al., 2023). This antioxidant response is essential, as it not only helps in reducing oxidative stress but also supports the accumulation of proline as part of the plant's adaptive response to environmental challenges (Borella et al., 2023; Rouphael et al., 2017). This is evidenced by the observation that plants not treated with biofertilizer exhibited reduced proline levels, which can be attributed to the enhanced metabolic support provided by biofertilizer, as previously documented by Di Mola et al. (2021) and Repke et al. (2022). This renders them more vulnerable to stress-induced damage and consequently to drought epizootics (Di Mola et al., 2021; Repke et al., 2022). These results are consistent with those of studies showing that applying protein hydrolysates and other biofertilizer can significantly increase proline levels in plants subjected to water deficit or salinity stress. (da Silva et al., 2020). In fact, it is important to highlight that the biostimulant developed and applied in this study showed resilience owing to the role of hydrogel and the function of PGPR, *B. safensis*, encapsulated in the formulation.

The phytohormonal responses observed under water-deficit conditions were of equal significance. Phytohormones such as (ABA) and jasmonic acid (JA) play a pivotal role in regulating stress responses, particularly stomatal closure and the metabolic adjustments necessary for adaptation to water stress (Liu et al., 2022; Quintas et al., 2023). Although the results did not show significant levels of ABA (with the exception of foliar ABA with 60% irrigation), they did demonstrate a trend indicating the role of ABA in mediating responses to water deficits by inducing stomatal closure to avoid water loss, a phenomenon that has been widely documented and could explain the observed variations in phytohormone levels (Liu et al., 2022). Furthermore, the interaction between different hormone signalling pathways highlights the complexity of physiological responses to stress (Yao et al., 2023).

Research indicates that ABA acts as a signaling molecule that induces the expression of genes related to proline synthesis, thereby enhancing the ability of plants to cope with osmotic stress (Malécange et al., 2022; Živanović et al., 2020). In the context of biostimulant applications, these substances can further modulate the ABA-proline relationship. For instance, biofertilizer may enhance the ability of plants to synthesize ABA under stress conditions, which, in turn, promotes proline accumulation (Melo et al., 2024). Some studies have shown that biofertilizer can lead to increased proline levels beyond those observed in untreated plants, suggesting a synergistic effect between biofertilizer and ABA signaling pathways (Jiménez et al., 2023). This is particularly relevant under drought conditions, where the combination of biofertilizer and elevated ABA levels can significantly improve water use efficiency and overall plant resilience (Repke et al., 2022). Conversely, certain biofertilizer may also modulate ABA levels, potentially reducing proline accumulation under specific conditions. For example, some studies have reported that biostimulant treatments can lower ABA levels, which may subsequently affect proline synthesis (Bulgari et al., 2019). This indicates that the interaction between ABA and proline in the presence of biofertilizer can be complex and context-dependent, depending on the type of biostimulant used and the specific stress conditions encountered by plants.

In this case, the use of the biostimulant contributed to ABA, and proline content increased as the water availability decreased, presenting an advantage to abiotic stress.

Under deficit irrigation conditions, the application of biofertilizer influences the activities of various antioxidant enzymes, including (SOD), (APX), and GR). Specifically, studies indicate that SOD and APX activities tend to decrease, whereas GR activity increases in response to biostimulant treatments during water stress conditions.

SOD is a necessary enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide radicals into hydrogen peroxide and molecular oxygen, serving as a primary defense

mechanism against oxidative stress (Fernandes et al., 2022; Villa e Vila et al., 2023). However, under deficit irrigation, the reduced activity of SOD suggests a shift in the antioxidant strategy of the plants. This decrease could be attributed to the enhanced efficiency of other antioxidant pathways or the modulation of reactive oxygen species (ROS) levels by biofertilizer, which may reduce the need for SOD activity (Gil et al., 2023; Rady et al., 2021). For instance, the application of biofertilizer, such as *Ascophyllum nodosum*, has been reported to lower oxidative stress markers, leading to a decreased requirement for SOD activity in plants experiencing water deficit (Francesca et al., 2020).

Similarly, APX, which plays a vital role in the detoxification of hydrogen peroxide, also shows decreased activity under deficit irrigation with biostimulant application (Francesca et al., 2020; Peripolli et al., 2021). This reduction may indicate a reallocation of resources or a response to altered oxidative stress levels, as biofertilizer can enhance the overall antioxidant capacity of plants, potentially compensating for the reduced activity of specific enzymes, such as APX (Domingo et al., 2023; Liava et al., 2023).

In contrast, GR activity, which is involved in the regeneration of reduced glutathione from oxidized glutathione, tends to increase under these conditions (Jiménez et al., 2022; Turan et al., 2023). The elevation in GR activity may reflect an adaptive response to maintain redox homeostasis and protect cellular components from oxidative damage. Increased GR activity can facilitate antioxidant recycling, thereby enhancing the ability of plants to cope with stress (Bulgari et al., 2019; Petropoulos et al., 2020). This suggests that while SOD and APX activities may decline, the plant compensates by enhancing GR activity to ensure the effective management of oxidative stress.

It is necessary to highlight the negative correlation between Root length/green roots and SOD/ APX which was observed in PCA analysis. We suggest that bioestimulants induce root growth in 30IB, improving water balance (which is observed by the increased Pn and gs), reducing redox stress (no activation of

APX and SOD activity compared to non-inoculated plants (30I) but retaining GR), and improving root osmotic water potential (proline increased levels). There is known that an increased level of IAA could be related with changes in the redox status and root architecture, as is observed in this work (Cha et al., 2015; Defez et al., 2017; H. Shi et al., 2014)

Hence, this study contributes to a better understanding of how hazelnuts respond to water deficit conditions after biostimulant application, emphasizing the importance of analyzing the interplay between photosynthesis, proline accumulation, phytohormonal regulation, and oxidative stress responses. This knowledge is key to developing strategies to enhance drought tolerance in this economically valuable crop and emphasizes the potential of microbial treatments, such as those involving *B. safensis*, to strengthen plant resilience under adverse climatic conditions.

5. Conclusions

This study on hazelnut plantlets treated with *B. safensis* biofertilizer under varying irrigation levels highlighted significant differences in several plant growth parameters, including total dry weight (TDW), defoliated dry weight (DDW), foliar dry weight (FDW), and root enzyme activity. Treatments with *B. safensis* and different irrigation levels produced notable variations in enzyme activities such as superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), and ascorbate peroxidase (APX), with *B. safensis* showing a pronounced impact on mitigating water deficit stress. These results are in agreement with previous research demonstrating the effectiveness of PGPR in enhancing plant growth and stress resilience.

These results reflect how *B. safensis* enhances plant resilience through improved enzymatic antioxidant defense mechanisms, which are fundamental under drought conditions. Significant differences in root proline content and phytohormone levels among treatments emphasized the role of *B. safensis* in regulating stress responses and optimizing plant growth under limited water

availability. The observed differences in enzyme activity and physiological responses support the existing literature on the beneficial effects of PGPR, and the importance of adjusting irrigation practices to support plant health.

This study showed the importance of integrating microbial treatments with optimized irrigation practices to enhance plant resilience and productivity under challenging environmental conditions. However, further studies are required to achieve more conclusive results and refine our understanding of the underlying mechanisms, ensuring that the application of such treatments is both effective and sustainable across diverse agricultural frameworks.

References

- Abobatta, W., & Khalifa, S. (2024). Influence of hydrogel composite applications and irrigation intervals on the yield and fruit quality of Valencia orange (*Citrus sinensis* L.) trees under semi-arid conditions. *Journal of Horticulture and Postharvest Research*, 7(2), 183–196. <https://doi.org/10.22077/jhpr.2024.7222.1362>
- Abou, A., Azzam, C., Al-Taweel, S., Abdel, R., Belal, H., Rady, M., Abdel, A., Majrashi, A., & Khaled, K. (2021). Natural Biostimulant Attenuates Salinity Stress Effects in Chili Pepper by Remodeling Antioxidant, Ion, and Phytohormone Balances, and Augments Gene Expression. *Plants*, 10(11), 2316. <https://doi.org/10.3390/plants10112316>
- Agaba, H., Orikiriza, L., Obua, J., Kabasa, J., Worbes, M., & Hüttermann, A. (2011). Hydrogel amendment to sandy soil reduces irrigation frequency and improves the biomass of *Agrostis stolonifera*. *Agricultural Sciences*, 02(04), 544–550. <https://doi.org/10.4236/as.2011.24071>
- Ahmad, H., Fiaz, S., Hafeez, S., Zahra, S., Shah, A., Gul, B., Aziz, O., Mahmood-

- Ur-Rahman, Fakhar, A., Rafique, M., Chen, Y., Yang, S. H., & Wang, X. (2022). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Eliminate the Effect of Drought Stress in Plants: A Review. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.875774>
- Alef, K. (1995). Estimation of the hydrolysis of fluorescein diacetate. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*, 19, 232–238.
- Altieri, G., Curcio, D., Groblér, E., Maffia, A., Lepore, A., Siano, F., Sammarco, A. S., Vasca, E., Amato, M., & Celano, G. (2024). Irrigation Effects on Hazelnut (*Corylus Avellana* L.) Yield and Quality. En *SSRN (preprint)* (pp. 1–30). <https://doi.org/10.2139/ssrn.4764303>
- Alvarez, W., Puga, P., & Ayte, G. (2020). Liderazgo y gestión en escuelas públicas de educación básica regular: caso Cusco, Perú. En *Tendencias en la investigación universitaria. Una visión desde Latinoamérica. Volumen XII*. <https://doi.org/10.47212/tendencias2020vol.xii.6>
- Alzate, M., Miras-Moreno, B., Monterisi, S., Roupahel, Y., Colla, G., Lucini, L., Cesco, S., & Pii, Y. (2022). Integrated Metabolomics and Morpho-Biochemical Analyses Reveal a Better Performance of *Azospirillum brasilense* over Plant-Derived Biostimulants in Counteracting Salt Stress in Tomato. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14216. <https://doi.org/10.3390/ijms232214216>
- Alzate, M., Monterisi, S., Roupahel, Y., Colla, G., Lucini, L., Cesco, S., & Pii, Y. (2023). Different vegetal protein hydrolysates distinctively alleviate salinity stress in vegetable crops: A case study on tomato and lettuce. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1077140>
- Benítez, S., Carrasco, R., Giraldo, J., & Schoebitz, M. (2024). Microbeads as carriers for *Bacillus pumilus* : a biofertilizer focus on auxin production. *Journal of Microencapsulation*, 41(3), 170–189.

<https://doi.org/10.1080/02652048.2024.2324812>

Borella, M., Baghdadi, A., Bertoldo, G., Della Lucia, M. C., Chiodi, C., Celletti, S., Deb, S., Baglieri, A., Zegada-Lizarazu, W., Pagani, E., Monti, A., Mangione, F., Magro, F., Hermans, C., Stevanato, P., & Nardi, S. (2023). Transcriptomic and physiological approaches to decipher cold stress mitigation exerted by brown-seaweed extract application in tomato. *Frontiers in Plant Science*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1232421>

Bouterraa, M., Mishra, A., Romdhane, W., Hsouna, A., Siddique, K., & Saad, R. (2022). Bio-Stimulating Effect of Natural Polysaccharides from *Lobularia maritima* on Durum Wheat Seedlings: Improved Plant Growth, Salt Stress Tolerance by Modulating Biochemical Responses and Ion Homeostasis. *Plants*, *11*(15), 1991. <https://doi.org/10.3390/plants11151991>

Bulgari, R., Trivellini, A., & Ferrante, A. (2019). Effects of Two Doses of Organic Extract-Based Biostimulant on Greenhouse Lettuce Grown Under Increasing NaCl Concentrations. *Frontiers in Plant Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01870>

Campobenedetto, C., Agliassa, C., Mannino, G., Vigliante, I., Contartese, V., Secchi, F., & Bertea, C. M. (2021). A Biostimulant Based on Seaweed (*Ascophyllum nodosum* and *Laminaria digitata*) and Yeast Extracts Mitigates Water Stress Effects on Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Agriculture*, *11*(6), 557. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060557>

Carillo, P., & Gibon, Y. (2011). *PROTOCOL: Extraction and determination of proline Effect of abiotic stresses on plant metabolism View project Molecular fingerprinting of crop plants View project PROTOCOL: Extraction and determination of proline* Initiating Author Name. October.

Cavalcante, A. G., Cavalcante, L. F., Cavalcante, A. C. P., Souto, A. G. de L., Santos, C. E. M. dos, & Araújo, D. L. de. (2018). Variation of Thermal Time,

- Phyllochron and Plastochron in Passion Fruit Plants With Irrigation Depth and Hydrogel. *Journal of Agricultural Science*, 10(5), 229.
<https://doi.org/10.5539/jas.v10n5p229>
- Cha, J.-Y., Kim, W.-Y., Kang, S. Bin, Kim, J. I., Baek, D., Jung, I. J., Kim, M. R., Li, N., Kim, H.-J., Nakajima, M., Asami, T., Sabir, J. S. M., Park, H. C., Lee, S. Y., Bohnert, H. J., Bressan, R. A., Pardo, J. M., & Yun, D.-J. (2015). A novel thiol-reductase activity of Arabidopsis YUC6 confers drought tolerance independently of auxin biosynthesis. *Nature Communications*, 6(1), 8041.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9041>
- Cincera, I., Frioni, T., Ughini, V., Poni, S., Farinelli, D., & Tombesi, S. (2019). Intra-specific variability of stomatal sensitivity to vapour pressure deficit in *Corylus avellana* L.: A candidate factor influencing different adaptability to different climates? *Journal of Plant Physiology*, 232(November 2018), 241–247.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.11.019>
- Cristofano, F., El-Nakhel, C., Colla, G., Cardarelli, M., Pii, Y., Lucini, L., & Rouphael, Y. (2023). Modulation of Morpho-Physiological and Metabolic Profiles of Lettuce Subjected to Salt Stress and Treated with Two Vegetal-Derived Biostimulants. *Plants*, 12(4), 709.
<https://doi.org/10.3390/plants12040709>
- Cui, G., Ma, X., Lang, D., Zhou, L., Bai, Q., Zhang, W., & Zhang, X. (2024). Mechanism of *Bacillus pumilus* cooperating with silicon to restore carbon metabolism of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. seedlings exposed to drought stress. *Industrial Crops and Products*, 221, 119422.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119422>
- da Silva, M. ., Cavalcante, Í. ., Mudo, L. ., de Paiva, V., Amariz, R., & da Cunha, J. (2020). Biostimulant alleviates abiotic stress of mango grown in semiarid environment. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 24(7),

457–464. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v24n7p457-464>

da Silva, M., Cavalcante, Í., Mudo, L., de Paiva, V., Amariz, R., & da Cunha, J. (2020). Biostimulant alleviates abiotic stress of mango grown in semiarid environment. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 24(7), 457–464. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v24n7p457-464>

da Silva, T., Dias, M., Lannes, S., Domingues, P., Sales, G., Nóbrega, J., Ribeiro, J., da Costa, F., Soares, L., & Lima, G. (2024). Phytohormones mitigate salt stress damage in radish. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 28(7). <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v28n7e279042>

Defez, R., Andreozzi, A., Dickinson, M., Charlton, A., Tadini, L., Pesaresi, P., & Bianco, C. (2017). Improved Drought Stress Response in Alfalfa Plants Nodulated by an IAA Over-producing Rhizobium Strain. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02466>

Di Mola, I., Conti, S., Cozzolino, E., Melchionna, G., Ottaiano, L., Testa, A., Sabatino, L., Roupheal, Y., & Mori, M. (2021). Plant-Based Protein Hydrolysate Improves Salinity Tolerance in Hemp: Agronomical and Physiological Aspects. *Agronomy*, 11(2), 342. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020342>

Domingo, G., Marsoni, M., Álvarez-Viñas, M., Torres, M. D., Domínguez, H., & Vannini, C. (2023). The Role of Protein-Rich Extracts from *Chondrus crispus* as Biostimulant and in Enhancing Tolerance to Drought Stress in Tomato Plants. *Plants*, 12(4), 845. <https://doi.org/10.3390/plants12040845>

Elsheery, N., Helaly, M., El-Hoseiny, H., & Alam, S. (2020). Zinc oxide and silicone nanoparticles to improve the resistance mechanism and annual productivity of salt-stressed mango trees. *Agronomy*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/agronomy10040558>

- Essalimi, B., Esserti, S., Rifai, L. A., Koussa, T., Makroum, K., Belfaiza, M., Rifai, S., Venisse, J. S., Faize, L., Albuquerque, N., Burgos, L., Jadoumi, S. El, & Faize, M. (2022). Enhancement of plant growth, acclimatization, salt stress tolerance and verticillium wilt disease resistance using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) associated with plum trees (*Prunus domestica*). *Scientia Horticulturae*, 291, 110621. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110621>
- Fernandes, Â., Chaski, C., Pereira, C., Kostić, M., Rouphael, Y., Soković, M., Barros, L., & Petropoulos, S. A. (2022). Water Stress Alleviation Effects of Biostimulants on Greenhouse-Grown Tomato Fruit. *Horticulturae*, 8(7), 645. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070645>
- Francesca, S., Raimondi, G., Cirillo, V., Maggio, A., Barone, A., & Rigano, M. M. (2020). A Novel Plant-Based Biostimulant Improves Plant Performances under Drought Stress in Tomato. *The 1st International Electronic Conference on Plant Science*, 52. <https://doi.org/10.3390/IECPS2020-08883>
- Fresno, D., & Munné, S. (2023). Organ-specific responses during acclimation of mycorrhizal and non-mycorrhizal tomato plants to a mild water stress reveal differential local and systemic hormonal and nutritional adjustments. *Planta*, 258(2), 32. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04192-2>
- Gil, R., Naranjo, M., Atares, S., & Vicente, O. (2023). Antioxidant Responses of Water-Stressed Cherry Tomato Plants to Natural Biostimulants. *Agronomy*, 13(9), 2314. <https://doi.org/10.3390/agronomy13092314>
- Hamdy, A., Khalifa, S., & AbdEl, H. (2020). Hydrogel as a soil conditioner affecting the growth, yield, and fruit quality of 'Murcott' mandarin trees under arid and semi-arid lands. *Al-Azhar Journal of Agricultural Research*, 45(2), 76–85. <https://doi.org/10.21608/ajar.2020.148791>
- Harizanova, A., Koleva-Valkova, L., & Vassilev, A. (2022). Effects of the Protein

Hydrolysate Pretreatment on Cucumber Plants Exposed to Chilling Stress. *Acta Agrobotanica*, 75. <https://doi.org/10.5586/aa.756>

Hassan, I., Ajaj, R., Gaballah, M., Ogbaga, C., Kalaji, H., Hatterman, H., & Alam, S. (2022). Foliar Application of Nano-Silicon Improves the Physiological and Biochemical Characteristics of 'Kalamata' Olive Subjected to Deficit Irrigation in a Semi-Arid Climate. En *Plants* (Vol. 11, Número 12). <https://doi.org/10.3390/plants11121561>

Hernandez-Santana, V., Fernández, J. E., Cuevas, M. V., Perez-Martin, A., & Diaz-Espejo, A. (2017). Photosynthetic limitations by water deficit: Effect on fruit and olive oil yield, leaf area and trunk diameter and its potential use to control vegetative growth of super-high density olive orchards. *Agricultural Water Management*, 184, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.12.016>

Jiménez, D., Hernández, A., Morales, S., García, A. L., García, F., Luis, J., & Borges, A. (2022). Applying Biostimulants to Combat Water Deficit in Crop Plants: Research and Debate. *Agronomy*, 12(3), 571. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030571>

Jiménez, D., Morales, S., Suárez, E., Lozano, J., Coego, A., Estevez, J., Borges, A., & Rodriguez, P. (2023). Abscisic acid mimic-fluorine derivative 4 alleviates water deficit stress by regulating ABA-responsive genes, proline accumulation, CO₂ assimilation, water use efficiency and better nutrient uptake in tomato plants. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1191967>

Klein, A., Hendrix, S., Clough, Y., Scofield, A., & Kremen, C. (2014). Interacting effects of pollination, water and nutrients on fruit tree performance. *Plant Biology*, 17(1), 201–208. <https://doi.org/10.1111/plb.12180>

Lang, S., Dong, B., Liu, X., Gu, Y., Kim, K., Xie, Q., Wang, Z., & Song, X. (2024). The key pathways for drought tolerance in *Cerasus humilis* were unveiled

- through transcriptome analysis. *Physiologia Plantarum*, 176(3).
<https://doi.org/10.1111/ppl.14350>
- Li, J., Yang, Y., Sun, K., Chen, Y., Chen, X., & Li, X. (2019). Exogenous melatonin enhances cold, salt and drought stress tolerance by improving antioxidant defense in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Molecules*, 24(9).
<https://doi.org/10.3390/molecules24091826>
- Li, Y., Shi, H., Zhang, H., & Chen, S. (2019). Amelioration of drought effects in wheat and cucumber by the combined application of super absorbent polymer and potential biofertilizer. *PeerJ*, 2019(1).
<https://doi.org/10.7717/peerj.6073>
- Liava, V., Chaski, C., Añibarro-Ortega, M., Pereira, A., Pinela, J., Barros, L., & Petropoulos, S. A. (2023). The Effect of Biostimulants on Fruit Quality of Processing Tomato Grown under Deficit Irrigation. *Horticulturae*, 9(11), 1184.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae9111184>
- Liu, F., Ma, H., Liu, B., Du, Z., Ma, B., & Jing, D. (2023). Effects of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on the Physioecological Characteristics and Growth of Walnut Seedlings under Drought Stress. *Agronomy*, 13(2), 290.
<https://doi.org/10.3390/agronomy13020290>
- Liu, X., Wang, X., Liu, P., Bao, X., Hou, X., Yang, M., & Zhen, W. (2022). Rehydration Compensation of Winter Wheat Is Mediated by Hormone Metabolism and De-Peroxidative Activities Under Field Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.823846>
- Lotfi, N., Soleimani, A., Çakmakçı, R., Vahdati, K., & Mohammadi, P. (2022). Characterization of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in Persian walnut associated with drought stress tolerance. *Scientific Reports*, 12(1), 12725. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16852-6>

- Luciani, E., Palliotti, A., Frioni, T., Tombesi, S., Villa, F., Zadra, C., & Farinelli, D. (2020). Kaolin treatments on Tonda Giffoni hazelnut (*Corylus avellana* L.) for the control of heat stress damages. *Scientia Horticulturae*, 263, 109097. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2019.109097>
- Mahgoub, N. (2020). Effectiveness of Hydrogel Application on Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Growth and some Sandy Soil Chemical Properties under Drip Irrigation System. *Journal of Soil and Water Sciences*, 5(1), 49–54. <https://doi.org/10.21608/jsws.2020.178512>
- Malécange, M., Pérez-García, M.-D., Citerne, S., Sergheraert, R., Lalande, J., Teulat, B., Mounier, E., Sakr, S., & Lothier, J. (2022). Leafamine®, a Free Amino Acid-Rich Biostimulant, Promotes Growth Performance of Deficit-Irrigated Lettuce. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7338. <https://doi.org/10.3390/ijms23137338>
- Melo, G., da Silva, A., da Costa, A., Alves, A., Rosa, M., Bessa, L., Rodrigues, C., Castoldi, G., & Vitorino, L. (2024). Foliar Application of Biostimulant Mitigates Water Stress Effects on Soybean. *Agronomy*, 14(3), 414. <https://doi.org/10.3390/agronomy14030414>
- Miceli, A., Moncada, A., & Vetrano, F. (2021). Use of Microbial Biostimulants to Increase the Salinity Tolerance of Vegetable Transplants. *Agronomy*, 11(6), 1143. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061143>
- Murdock, L., Burke, T., Coumoundouros, C., Culham, D. E., Deutch, C. E., Ellinger, J., Kerr, C. H., Plater, S. M., To, E., Wright, G., & Wood, J. M. (2014). Analysis of strains lacking known osmolyte accumulation mechanisms reveals contributions of osmolytes and transporters to protection against abiotic stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5366–5378. <https://doi.org/10.1128/AEM.01138-14>
- O. Elansary, H., Mahmoud, E. A., El-Ansary, D. O., & Mattar, M. A. (2019). Effects

of Water Stress and Modern Biostimulants on Growth and Quality Characteristics of Mint. *Agronomy*, 10(1), 6. <https://doi.org/10.3390/agronomy10010006>

Orikiriza, L., Agaba, H., Eilu, G., Kabasa, J., Worbes, M., & Hüttermann, A. (2013). Effects of Hydrogels on Tree Seedling Performance in Temperate Soils before and after Water Stress. *Journal of Environmental Protection*, 04(07), 713–721. <https://doi.org/10.4236/jep.2013.47082>

Palma, F., López, M., Tejera, N., & Lluch, C. (2014). Involvement of abscisic acid in the response of *Medicago sativa* plants in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* to salinity. *Plant Science*, 223, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.02.005>

Pan, X., Welti, R., & Wang, X. (2010). Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Nature Protocols*, 5(6), 986–992. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.37>

Peripolli, M., Dornelles, S., Lopes, S., Tabaldi, L., Trivisoli, V., & Rubert, J. (2021). Application of biostimulants in tomato subjected to water deficit: Physiological, enzymatic and production responses. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 25(2), 90–95. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v25n2p90-95>

Petropoulos, S., Fernandes, Â., Plexida, S., Chrysargyris, A., Tzortzakis, N., Barreira, J., Barros, L., & Ferreira, I. (2020). Biostimulants Application Alleviates Water Stress Effects on Yield and Chemical Composition of Greenhouse Green Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomy*, 10(2), 181. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020181>

Quintas, F., Brandão, P. ., Barreto, M. ., Glick, B. ., & Nascimento, F. . (2023). Plant Growth Promotion, Phytohormone Production and Genomics of the

- Rhizosphere-Associated Microalga, *Micractinium rhizosphaerae* sp. nov. *Plants*, 12(3), 651. <https://doi.org/10.3390/plants12030651>
- Rady, M. M., Boriek, S. H. K., Abd El-Mageed, T. A., Seif El-Yazal, M. A., Ali, E. F., Hassan, F. A. S., & Abdelkhalik, A. (2021). Exogenous Gibberellic Acid or Dilute Bee Honey Boosts Drought Stress Tolerance in *Vicia faba* by Rebalancing Osmoprotectants, Antioxidants, Nutrients, and Phytohormones. *Plants*, 10(4), 748. <https://doi.org/10.3390/plants10040748>
- Rahmati, M., Davarynejad, G., Génard, M., Bannayan, M., Azizi, M., & Vercambre, G. (2015). Peach water relations, gas exchange, growth and shoot mortality under water deficit in semi-arid weather conditions. *PLoS ONE*, 10(4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120246>
- Rahmati, M., Mirás-Avalos, J. ., Valsesia, P., Lescourret, F., Génard, M., Davarynejad, G. H., Bannayan, M., Azizi, M., & Vercambre, G. (2018). Disentangling the effects of water stress on carbon acquisition, vegetative growth, and fruit quality of peach trees by means of the qualitree model. *Frontiers in Plant Science*, 9(January). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00003>
- Rao, S., Tian, Y., Zhang, C., Qin, Y., Liu, M., Niu, S., Li, Y., & Chen, J. (2022). The JASMONATE ZIM-domain–OPEN STOMATA1 cascade integrates jasmonic acid and abscisic acid signaling to regulate drought tolerance by mediating stomatal closure in poplar. *Journal of Experimental Botany*, 74(1), 443–457. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac418>
- Rattan, B., Dhobale, K. V., Saha, A., Garg, A., Sahoo, L., & Sreedeeep, S. (2022). Influence of inorganic and organic fertilizers on the performance of water-absorbing polymer amended soils from the perspective of sustainable water use efficiency. *Soil and Tillage Research*, 223(June), 105449. <https://doi.org/10.1016/j.still.2022.105449>

- Repke, R., Silva, D., dos Santos, J., & de Almeida, M. (2022). Alleviation of Drought Stress in Soybean by Applying a Biostimulant Based on Amino Acids and Macro- and Micronutrients. *Agronomy*, 12(10), 2244. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102244>
- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., & Colla, G. (2017). Synergistic Action of a Microbial-based Biostimulant and a Plant Derived-Protein Hydrolysate Enhances Lettuce Tolerance to Alkalinity and Salinity. *Frontiers in Plant Science*, 08. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00131>
- Salazar-Canales, F., Bastías, R. M., Calderón-Orellana, A., Wilckens, R., & González, E. (2021). Photo-selective nets differentially affect microclimatic conditions, leaf physiological characteristics, and yield in hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Horticulture Environment and Biotechnology*, 62(6), 845–858. <https://doi.org/10.1007/s13580-021-00365-8>
- Sayer, E. J., Crawford, J. A., Edgerley, J., Askew, A. P., Hahn, C. Z., Whitlock, R., & Dodd, I. C. (2021). Adaptation to chronic drought modifies soil microbial community responses to phytohormones. *Communications Biology*, 4(1), 516. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02037-w>
- Shi, H., Chen, L., Ye, T., Liu, X., Ding, K., & Chan, Z. (2014). Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.06.008>
- Shi, J., Zhao, L., Yue, E., Luo, L., Yu, B., Yu, X., & Zhao, B. (2023). Physiological, Metabolic, and Transcriptomic Analyses Reveal the Effect of Sweet Corn Plants Treated with a New Biostimulant on the Growth Enhancement, Focusing on Enhancing Gibberellin Synthesis and Signal Transduction. *ACS Agricultural Science & Technology*, 3(11), 973–986. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.3c00177>

- Takahashi, F., Suzuki, T., Osakabe, Y., Betsuyaku, S., Kondo, Y., Dohmae, N., Fukuda, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2018). A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signalling. *Nature*, *556*(7700), 235–238. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0009-2>
- Tate, R. L. (1991). Microbial Biomass Measurement in Acidic Soil. En *Soil Science* (Vol. 152, Número 3, pp. 220–225). <https://doi.org/10.1097/00010694-199109000-00009>
- Tomášková, I., Resnerová, K., Trombik, J., Bláha, J., Pastierovič, F., & Macků, J. (2023). Potential of hydrogel treatment in forest regeneration: impact on growth and vitality of Central European tree species. *Frontiers in Forests and Global Change*, *6*(November), 1–10. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2023.1251041>
- Turan, M., Ekinci, M., Argin, S., Brinza, M., & Yildirim, E. (2023). Drought stress amelioration in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings by biostimulant as regenerative agent. *Frontiers in Plant Science*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1211210>
- Vance, E. D., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1987). Microbial biomass measurements in forest soils: The use of the chloroform fumigation-incubation method in strongly acid soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *19*(6), 697–702. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90051-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90051-4)
- Villa e Vila, V., Marques, P. A. A., Rezende, R., Wenneck, G. S., Terassi, D. de S., Andrean, A. F. B. A., Nocchi, R. C. de F., & Matumoto-Pintro, P. T. (2023). Deficit Irrigation with *Ascophyllum nodosum* Extract Application as a Strategy to Increase Tomato Yield and Quality. *Agronomy*, *13*(7), 1853. <https://doi.org/10.3390/agronomy13071853>
- Wang, Y., Feng, Y., Yan, M., Yu, J., Zhou, X., Bao, J., Zhang, Q., & Wu, C. (2022).

- Effect of Saline–Alkali Stress on Sugar Metabolism of Jujube Fruit. En *Horticulturae* (Vol. 8, Número 6). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8060474>
- Xie, Z., Chu, Y., Zhang, W., Lang, D., & Zhang, X. (2019). *Bacillus pumilus* alleviates drought stress and increases metabolite accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Environmental and Experimental Botany*, 158(November 2018), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.021>
- Yao, P., Zhang, C., Qin, T., Liu, Y., Liu, Z., Xie, X., Bai, J., Sun, C., & Bi, Z. (2023). Comprehensive Analysis of GH3 Gene Family in Potato and Functional Characterization of StGH3.3 under Drought Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15122. <https://doi.org/10.3390/ijms242015122>
- Yu, W., Kong, G., Ya, H., He, L., Wu, Y., & Zhang, H. (2024). Comprehensive Analysis of the Catalase (CAT) Gene Family and Expression Patterns in Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) under Various Abiotic Stresses and Multiple Hormone Treatments. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Número 1). <https://doi.org/10.3390/ijms25010070>
- Zhang, B., Chen, L., Alshallash, K. S., Sharaf, M., Hmdy, A. E., Khalifa, S. M., Abdel-Aziz, H. F., Sharaf, A., Ibrahim, M. T. S., Alharbi, K., & Elkelish, A. (2022). *Hydrogel Improved Growth and Productive Performance of Mango Trees under Semi-Arid Condition*. <https://doi.org/10.3390/gels8100602>
- Živanović, B., Milić Komić, S., Tosti, T., Vidović, M., Prokić, L., & Veljović Jovanović, S. (2020). Leaf Soluble Sugars and Free Amino Acids as Important Components of Abscisic Acid—Mediated Drought Response in Tomato. *Plants*, 9(9), 1147. <https://doi.org/10.3390/plants9091147>

CAPITULO III

Microencapsulados de *Bacillus safensis* en una matriz de alginato y su impacto en el contenido de compuestos fenólicos en albahaca morada

1. INTRODUCCIÓN

La germinación de semillas es un proceso esencial para la productividad y calidad de los cultivos, siendo la capacidad de la semilla quien determinara el vigor de cultivos y la posterior calidad de estos (Cardwell, 1984). Para ellos la agricultura ha integrado una serie de tratamientos antes, durante y después de la siembra. Estos abarcan varias modalidades, incluida la aplicación de agentes físicos, químicos y biológicos como el peletizado y el biopriming (Sharma et al., 2015). El peletizado consiste en encapsular las semillas para facilitar su manipulación, mejorar la siembra y proporcionar un entorno favorable para la germinación. Por otro lado, el biopriming es una técnica que, mediante el recubrimiento de las semillas con agentes biológicos como bacterias (Miljaković et al., 2022), pretende mejorar la germinación, la vitalidad y el rendimiento de los cultivos.

El biopriming es una técnica de tratamiento de semillas que integra aspectos biológicos (inoculación de la semilla con organismos beneficiosos para protegerla) y fisiológicos (hidratación de la semilla) del control de enfermedades (Reddy, 2012). La aplicación de rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) ha desempeñado un papel crucial en la mejor de los cultivos hoy en día siendo clave para la utilización de estas en los biopriming (Chakraborti et al., 2022).

El género *Bacillus*, junto con otras rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), ha demostrado ser valioso tanto en técnicas de bioestimulación como de biocebado. Estos microorganismos demuestran la capacidad de generar

auxinas, promoviendo el crecimiento de las plantas, al tiempo que ofrecen protección a los cultivos mediante el aumento de la producción de metabolitos secundarios (Dutta et al., 2023; Tsoetsi et al., 2022).

La albahaca morada (*Ocimum basilicum* var. *Purpurascens*) es una especie que se distingue por su alto contenido de antocianos y por poseer propiedades antioxidantes y aromas mayores que la albahaca común (Fernandes et al., 2019). Es por esto que en este capítulo se presentara los ensayos realizados con el género *Bacillus*, en particular, *Bacillus safensis*. con el fin de potenciar la capacidad antioxidante de albahaca morada.

2. MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron semillas desinfectadas de *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* y se sembraron en un sustrato esterilizado dentro de una cámara de ambiente controlado. Se aplicó un diseño completamente aleatorio con tres tratamientos. Los hidrogeles se prepararon utilizando la técnica JetCutter, descrita por Almeida et al. (2023). Donde fueron utilizados 3 tratamientos y 1 control con 4 repeticiones cada una, el primero solo contaba con hidrogel, el segundo con un medio de *B. safensis* y el tercero con una inmovilización de *B. safensis* en un matriz de alginato, todos al momento de la siembra de manera similar a un bio-priming (Rafiee et al., 2016). Se registraron los días desde la siembra hasta la germinación, y después de 20 días desde la siembra, se evaluaron el peso total y la altura de los brotes, junto con la actividad de las enzimas antioxidantes según Harborne et al., (1990) y la concentración de antocianinas según Ferreres et al., (2009). Se realizaron pruebas estadísticas, incluyendo pruebas de normalidad, homogeneidad y la prueba de Tukey, utilizando el software R para analizar las diferencias entre tratamientos (Almeida et al., 2023; Ferreres et al., 2009; Harborne et al., 1990).

3. RESULTADOS

Se observaron diferencias notables entre los tratamientos debido a la influencia de estos biofertilizantes, al observar los días de germinación posterior a la siembra, se pudo apreciar que para todos los casos hubo un retraso debido a la influencia de los tratamientos, apreciándose una diferencia significativa entre el control y los tratamientos con el medio de *B. safensis* y los hidrogeles con *B. safensis*, tal como se puede apreciar en la Tabla 1.

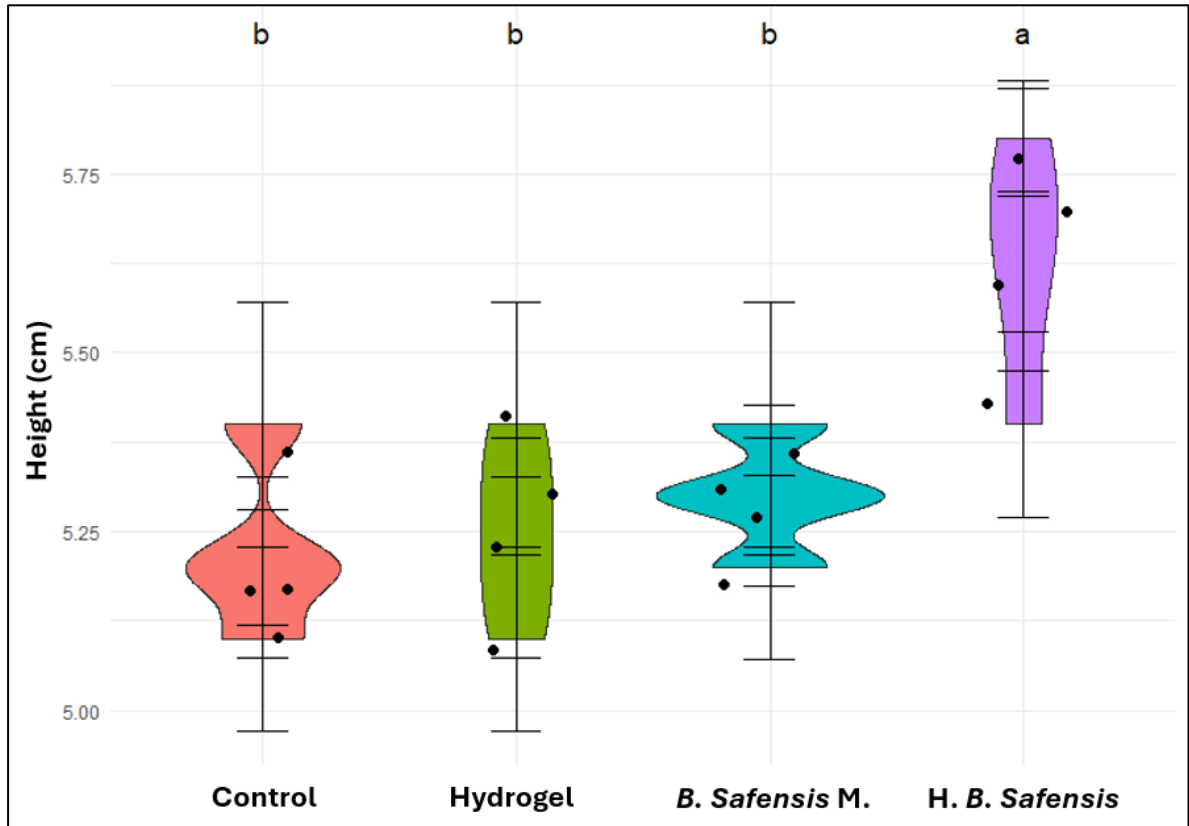
Tabla 1. Días de germinación post siembra e inoculación

	Control	Hidrogel	<i>B. safensis</i> M.	H. <i>B. safensis</i>
Días	4±1b	5±1ab	7±1a	7±1a

Distintas letras significa diferencias significativas a $P \leq 0,05$ en los tratamientos para *Ocimum basilicum* var. *Purpurascens* analizados según la prueba de Tukey.

En el caso de la altura de los brotes, sin bien no se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos de hidrogel y el medio de *B. safensis* versus el control, si se puede apreciar una diferencia significativa en el tratamiento con hidrogeles con *B. safensis* en comparación con los demás tratamientos y el control como se puede apreciar en la Figura 1.

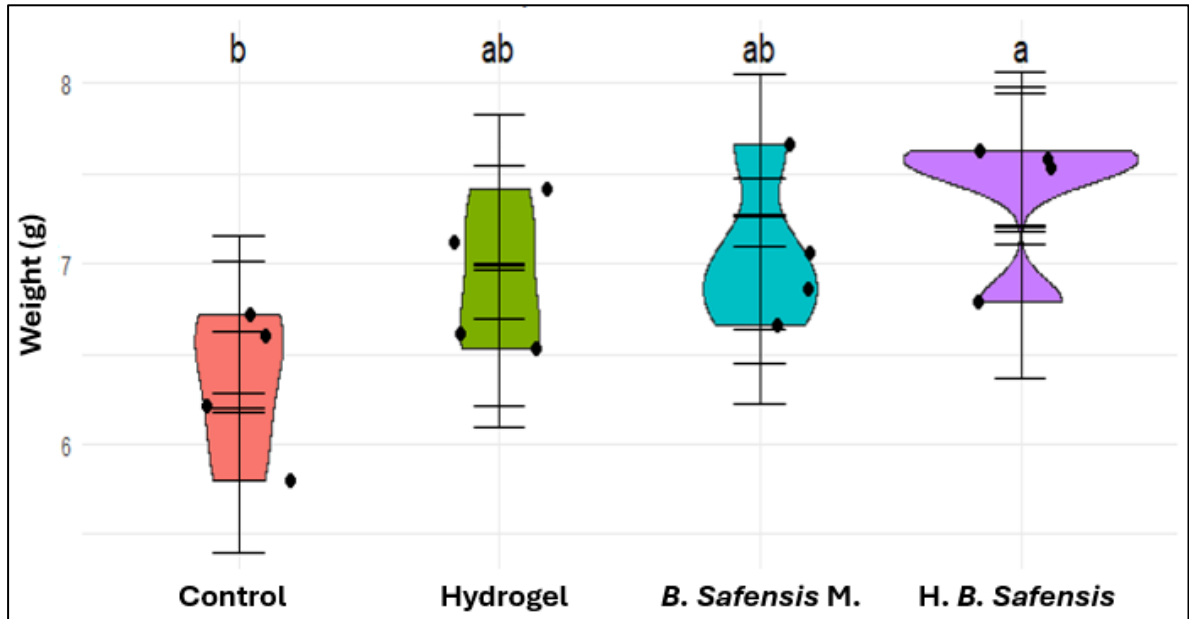
Figura 1. Altura de los brotes transcurrido 20 días



Height es altura medida en cm. Distintas letras significa diferencias significativas a $P \leq 0,05$ en los tratamientos para *Ocimum basilicum* var. *Purpurascens* analizados según la prueba de Tukey.

En el caso del peso total de los brotes por repetición en cada tratamiento, sin bien no se apreciaron diferencias significativas entre los tratamientos de hidrogel y el medio de *B. safensis* versus el control, si se puede apreciar una diferencia significativa en el tratamiento con hidrogeles con *B. safensis* en comparación con los demás tratamientos y el control como se puede apreciar en la Figura 2

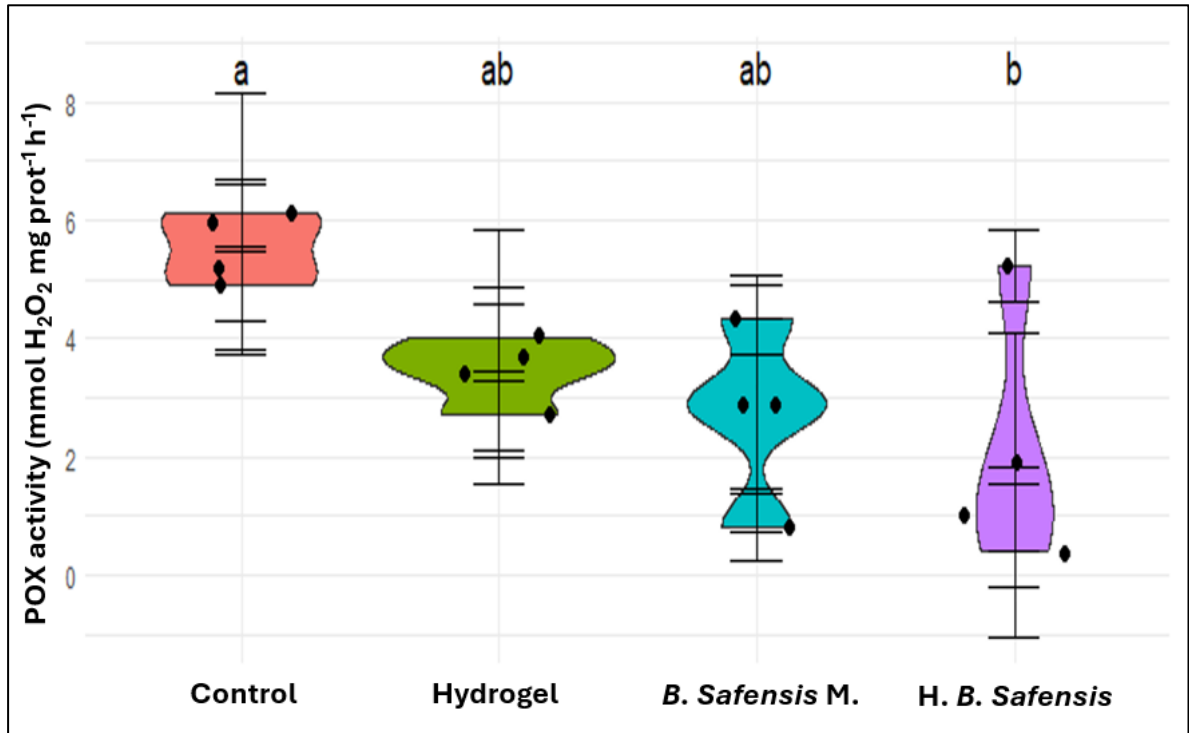
Figura 2. Peso total de los brotes por repetición de cada tratamiento



Weight es peso medido en g. Distintas letras significa diferencias significativas a $P \leq 0,05$ en los tratamientos para *Ocimum basilicum var. Purpurascens* analizados según la prueba de Tukey.

Para el caso de las enzimas antioxidantes como lo son las peroxidasas (POX), se puede apreciar una tendencia a la disminución de la actividad de a medida que se fueron aplicando tratamientos, donde se pudo apreciar como el tratamiento con hidrogeles con *B. safensis* fueron los que tuvieron una menor actividad y una diferencia significativa en comparación con el control tal como se puede apreciar en la Figura 3.

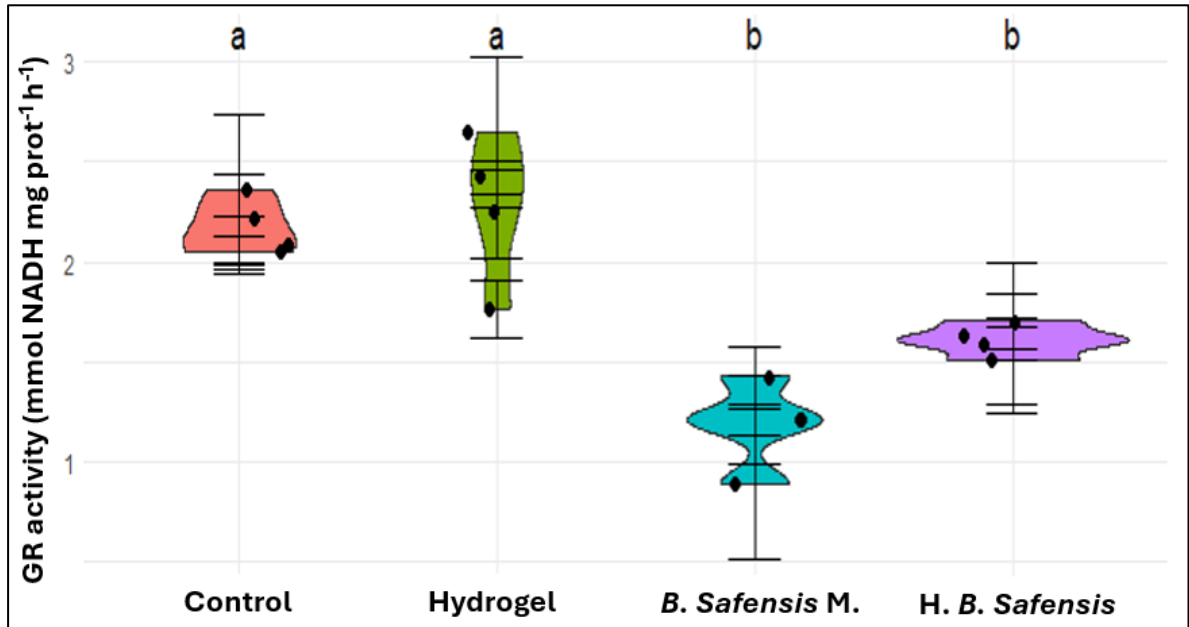
Figura 3. Actividad de la peroxidasa (POX)



POX es peroxidasa, medida por su actividad en mmol de H₂O₂ mg prot⁻¹ h⁻¹. Distintas letras significa diferencias significativas a P≤0,05 en los tratamientos para *Ocimum basilicum var. Purpurascens* analizados según la prueba de Tukey.

Para el caso de la enzima antioxidante glutatión reductasa (GR) se pudo notar que tanto el control como el hidrogel tuvieron una mayor actividad de GR sin embargo el medio de *B. safensis* como el hidrogel de *B. safensis* tuvieron una menor actividad, y así de parte de ambos teniendo una diferencia significativa de en comparación con el control y el hidrogel tal como se puede apreciar en la Figura 4

Figura 4. Actividad de la Glutación reductasa (GR)



GR es glutación reductasa, medida por su actividad en mmol de H₂O₂ mg prot⁻¹ h⁻¹. Distintas letras significa diferencias significativas a P≤0,05 en los tratamientos para *Ocimum basilicum* var. *Purpurascens* analizados según la prueba de Tukey.

En el caso de los antocianos totales, se pudo apreciar una diferencia significativa de todos los tratamientos en comparación con el control, además de una diferencia significativa del hidrogel en comparación con el hidrogel con *B. safensis*, sin bien no se pudo apreciar una diferencia significativa entre el medio de *B. safensis* versus el hidrogel de *B. safensis*, si se puede apreciar una tendencia al aumento en cada tratamiento, tal como se puede apreciar en Tabla 2.

Tabla 2. Identificación y cuantificación total de antocianos

Control	<i>B. safensis</i>		<i>H. B. safensis</i>		R_t (min)	λ_{max} (nm)	Identificación
	Hidrogel	M.					
	Cuantificación mg 100g ⁻¹						
1,404	2,085	3,639	2,856	19,9	520	Cyanidin-3-(pC-6'-Caf)Sph isomer 1 ^e	
3,000	3,944	6,411	5,066	23,6	520	Cyanidin-3-(pC-6'-Caf)Sph isomer 2 ^e	
0,780	1,595	1,136	1,971	28,6	520	Cyanidin-3-(6-pC)Sph-5-(6-Mal)Glc ^e	
3,602	9,380	9,612	13,317	28,9	520	Cyanidin-3-(6pC)Glc-5-Glc ^e	
1,271	2,048	2,330	2,674	30,2	520	Cyanidin-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-Glc isomer 1 ^e Cyanidin-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-(6-Mal)Glc isomer 1 ^e	
1,062	1,726	1,776	2,136	31,7	520	Cyanidin-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-(6-Mal)Glc isomer 2 ^e	
4,843	9,655	10,304	13,978	32,0	520	Cyanidin-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-Glc isomer 2 ^e	
22,350	33,103	35,210	45,311	32,6	520	Cyanidin-3-(6-pC-6'-Caf)Sph-5-Glc isomer 2 ^e	
0,264	0,495	0,521	0,601	33,1	520	Cyanidin-3-(6,6'-dipC)Sph-5-Glc ^e	
4,416	5,096	6,446	6,910	33,7	520	Cyanidin-3-(6,6'-dipC)Sph-5-(6-Mal)Glc ^e	
2,899	3,872	4,008	4,962	35,2	520	Pelargonidin-3-(6,6'-dipC)Sph-5-Glc ^f	
22,530	32,715	38,695	46,910	35,6	520	Cyanidin-3-(6-pC-X-Mal-6'-Caf)Sph-5-Glc ^e	
0,299	0,420	0,456	0,592	35,8	520	Cyanidin-3-(6-pC-X-Mal-6'-pC)Sph-5-Glc ^e	
68,7±1c	106,1±11,0b	120,5±14,9ab	147,2±15,8a			Total Anthocyanin Content	

Distintas letras significa diferencias significativas a $P \leq 0,05$ en los tratamientos para *Ocimum basilicum* var. *Purpurascens* analizados según la prueba de Tukey.

4. CONCLUSIONES

En este estudio se pudieron apreciar disintos matices este hidrogel con *B. safensis* en albahaca morada demostró tener un alto potencial como biofertilizante en la etapas tempranas, si bien retrasó la germinación significativamente de 4 días a 7 días aproximadamente. Esto se vio rápidamente opacado por su gran potencial de estimulación del crecimiento al ser efectivo en aumentar el desarrollo de los brotes, ya sea por la altura y peso, siendo positivo para la utilización de esta bacteria e especifica junto a este cultivo en el momento de la siembra.

Por otro lado algunos estudios utilizando *Bacillus safensis* para para mitigar el estrés por temperatura o salino demostraron que esta rizobacteria tiene el potencial de aumentar el contenido de enzimas antioxidantes para disminuir el estrés en cultivos (Khan et al., 2017; Sarkar et al., 2021). Si bien son resultados contrarios a los obtenidos en este estudio, esto puede deberse al alto contenido de antocianos propios de esta variedad, los cuales fueron potenciado de manera significativa por los distintos tratamientos, sobre todo aquellos que involucraron la utilización de *B. safensis*, abriendo nuevas opciones de investigación y de esta manera seguir utilizando este *Bacillus* con el fin de aumentar y potenciar la viabilidad de los cultivos.

Es importante entender que la utilización de PGPR es algo relativamente novedoso que ha demostrado tener un impacto positivo en el momento de proteger y potenciar los distintos cultivos, es importante seguir investigando más al respecto para poder tener una idea más clara y acertada de cómo *Bacillus safensis* nos puede ayudar a tener cultivos en situaciones adversas si no que también aumentar la síntesis de compuesto bioactivos que esperamos tener al momento de ingerir alimentos, como lo son los compuesto fenólicos.

REFERENCIAS

- Almeida, F. L. C., Silveira, M. P., Alvim, I. D., da Costa, T. B., da Silva, T. L., Vieira, M. G. A., Prata, A. S., & Forte, M. B. S. (2023). Jet cutter technique as a tool to achieve high lipase hydrolytic activity. *Food and Bioproducts Processing*, 137, 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.12.001>
- Cardwell, V. B. (1984). Seed Germination and Crop Production. In *Physiological Basis of Crop Growth and Development* (pp. 53–92). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America. <https://doi.org/10.2135/1984.physiologicalbasis.c3>
- Chakraborti, S., Bera, K., Sadhukhan, S., & Dutta, P. (2022). Bio-priming of seeds: Plant stress management and its underlying cellular, biochemical and

- molecular mechanisms. *Plant Stress*, 3, 100052.
<https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100052>
- Dutta, B., Datta, A., Dey, A., Ghosh, A. K., & Bandopadhyay, R. (2023). Establishment of seed biopriming in salt stress mitigation of rice plants by mangrove derived *Bacillus* sp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 48(September 2022), 102626. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102626>
- Fernandes, F., Pereira, E., Čirić, A., Soković, M., Calhelha, R. C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* leaves (red rubin basil): a source of bioactive compounds and natural pigments for the food industry. *Food & Function*, 10(6), 3161–3171. <https://doi.org/10.1039/C9FO00578A>
- Ferreres, F., Gomes, D., Valentão, P., Gonçalves, R., Pio, R., Chagas, E. A., Seabra, R. M., & Andrade, P. B. (2009). Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: Variation of phenolics and antioxidative potential. *Food Chemistry*, 114(3), 1019–1027. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.065>
- Harborne, J. B., Dey, P. M., Lea, P. J., & Bowyer, J. R. (1990). *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-461013-2.50001-0>
- Khan, M. H. U., Khattak, J. Z. K., Jamil, M., Malook, I., Khan, S. U., Jan, M., Din, I., Saud, S., Kamran, M., Alharby, H., & Fahad, S. (2017). *Bacillus safensis* with plant-derived smoke stimulates rice growth under saline conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(30), 23850–23863. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0026-y>
- Miljaković, D., Marinković, J., Tamindžić, G., Đorđević, V., Tintor, B., Milošević, D., Ignjatov, M., & Nikolić, Z. (2022). Bio-Priming of Soybean with *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus megaterium*: Strategy to Improve Seed Germination and the Initial Seedling Growth. *Plants*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/plants11151927>

- Rafiee, H., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., Qaderi, A., Zarinpanjeh, N., Sekara, A., & Zand, E. (2016). Application of plant biostimulants as new approach to improve the biological responses of medicinal plants - A critical review. *Journal of Medicinal Plants*, 15(59), 6–39.
- Reddy, P. P. (2012). Bio-priming of Seeds. In *Recent advances in crop protection* (pp. 83–90). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-0723-8_6
- Sarkar, J., Chakraborty, U., & Chakraborty, B. (2021). High-temperature resilience in *Bacillus safensis* primed wheat plants: A study of dynamic response associated with modulation of antioxidant machinery, differential expression of HSPs and osmolyte biosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, 182, 104315. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104315>
- Sharma, K. K., Singh, U. S., Sharma, P., Kumar, A., & Sharma, L. (2015). Seed treatments for sustainable agriculture-A review. *Journal of Applied and Natural Science*, 7(1), 521–539. <https://doi.org/10.31018/jans.v7i1.641>
- Tsotetsi, T., Nephali, L., Malebe, M., & Tugizimana, F. (2022). *Bacillus* for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: What Have We Learned? *Plants*, 11(19). <https://doi.org/10.3390/plants11192482>

CONCLUSIONES GENERALES

Este estudio ha demostrado que la aplicación de biofertilizantes a base de alginato con *Bacillus safensis* inmovilizado tiene un efecto positivo en la tolerancia al estrés hídrico en plantines de avellano europeo (*Corylus avellana* L.) bajo diferentes niveles de riego. Los resultados evidenciaron mejoras significativas en parámetros fisiológicos, como mayor eficiencia fotosintética, apertura estomática y tasa de respiración fotosintética en los tratamientos con el biofertilizante. Asimismo, se observó un incremento en la producción de prolina, enzimas antioxidantes y fitohormonas, lo que refuerza la capacidad de las plantas para enfrentar condiciones de déficit hídrico.

Además, se demostró que la aplicación de este biofertilizante en albahaca morada (*Ocimum basilicum* var. *Purpurascens*), desde el momento de la siembra, incrementó significativamente el contenido de compuestos fenólicos en todos los tratamientos, siendo el efecto más pronunciado en aquellos con el biofertilizante. Este incremento fortaleció tanto la capacidad nutricional como nutracéutica de la planta, destacando especialmente el aumento en el contenido de antocianos.

Estos hallazgos son cruciales para seguir promoviendo el desarrollo y uso de bioinsumos como herramientas clave para mitigar el estrés hídrico y aumentar la resiliencia de cultivos como el avellano europeo frente a los efectos del cambio climático. Además, subrayan la importancia de continuar investigando y desarrollando tecnologías agrícolas más sostenibles, que no solo sean amigables con el medio ambiente, sino que también fortalezcan la calidad y productividad de los cultivos, contribuyendo a una agricultura más resiliente y eficiente frente a los desafíos presentes y futuros.

PRODUCTIVIDAD

Publicaciones

Jorge Baeza-Aranzáez, Francisca Martin-Díaz, José Ortiz, Luisa Bascuñán-Godoy, Mauricio Schoebitz, Richard M. Bastías, Juan David Giraldo, Juan Gabriel Pérez-Pérez, María Dolores López-Belchí Effective Method for Immobilizing Rhizobacteria to Enhance Soil Properties and Improve the Physiological and Enzyme-Antioxidant Characteristics of Hazelnut under Deficit Irrigation Conditions. 2024. Environmental and Experimental Botany (under review).

Francisca Martin-Díaz, **Jorge Baeza-Aranzaez**, Juan David Giraldo, Mauricio Schoebitz, Homero Urrutia, María Dolores López-Belchí. Innovative JetCutter technology to scale the production of a solid Bacillus pumilus biofertilizer to transit to sustainable agriculture. 2024. Journal of agriculture and food chemistry (under review).

Participación en proyectos de investigación

Título del proyecto: Hidrobac: formulación de hidrogeles a base de biopolímeros y bacterias benéficas para mitigar el estrés hídrico en plantas. (ID21110050, FONDEF IDEA 2022. ANID, Chile). Investigador principal: Mauricio Schoebitz Cid.

Título del proyecto: Interactions of food bioactives from Brassica sprouts and gut microbiota ("SPROUTS4HEALTHYGUT) (1201950, FONDECYT REGULAR 2020. ANID, Chile). Investigador principal: María Dolores López Belchí.

Título del proyecto: Aplicación De Tecnologías Limpias Para La Obtención De Ingredientes Bioactivos, Seguros Y Sostenibles, Procedentes De Subproductos Vitivinícolas (FOVI230048, Fomento de Vinculación Internacional para

Instituciones de Investigación, ANID). Investigador principal: María Dolores López Belchí

Asistencia a congresos:

J.E.C. Baeza, F. Martin, M.Schoebitz, R. Bastías, J.G. Pérez-Pérez, M.D. López. Respuestas agronómicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas de *Corylus avellana* L. frente a déficit hídrico. III Workshop de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agronómicas. Termas de Chillán, Chile, enero 2023.

F. Martin, **J.E.C. Baeza**, M.Schoebitz, J.D. Giraldo, H. Urrutia, M.D. López. Microencapsulación de bioestimulantes por hidrogeles como estrategias novedosas para mitigar el efecto del estrés abiótico. III Workshop de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agronómicas. Termas de Chillán, Chile, enero 2023.

Baeza Aranzáez, Jorge Ernesto Claudio; Martin Diaz, Francisca Belén; Schoebitz Cid, Mauricio Ivan Antonio; Bastías Ibarra, Richard Mauricio; Pérez-Pérez, Juan Gabriel y López Belchí, María Dolores. Respuestas agronómicas, fisiológicas y bioquímicas de *Corylus avellana* L. frente a déficit hídrico. VIII Jornadas de Ciencia y Tecnología 2023 y II Reunión Argentina – Chile de Ciencias Agrarias, Rosario (Argentina)/Chillán (Chile)-Híbrido, junio 2023.

Martin Diaz, Francisca Belén; **Baeza Aranzáez, Jorge Ernesto Claudio**; Schoebitz Cid, Mauricio Iván Antonio; Giraldo Pedraza, Juan David y López Belchí, María Dolores. Microencapsulación de rizobacterias en hidrogeles utilizando nuevas herramientas. VIII Jornadas de Ciencia y Tecnología 2023 y II Reunión Argentina – Chile de Ciencias Agrarias, Rosario (Argentina)/Chillán (Chile)-Híbrido, junio 2023.

Jorge Baeza Aranzáez, Francisca Martin-Díaz, Rocío Carrasco Fernández, María Dolores López Belchí. Microencapsulados de *Bacillus pumilus* en una matriz de alginato y su impacto sobre la germinación y el contenido de antioxidantes en albahaca morada. 72º Congreso Agronómico de Chile, Iquique, Chile, 22-24 Noviembre 2023.

Francisca Martin-Díaz, **Jorge Baeza Aranzáez**, Rocío Carrasco Fernández, María Dolores López Belchí. Tecnología jetcutter para la formación de hidrogeles agrícolas. 72º Congreso Agronómico de Chile, Iquique, Chile, 22-24 Noviembre 2023.

Jorge Baeza Aranzáez, Francisca Martin-Díaz, María Dolores López Belchí, Rocío Carrasco Fernández, Mauricio Schoebitz Cid, Richard Bastías Ibarra, Juan Gabriel Pérez-Pérez. Germination and antioxidant activity in purple basil. XVI Reunión de Biología Vegetal, Talcahuano, Chile, 28-30 Noviembre 2023.

Francisca Martin Díaz, **Jorge Baeza Aranzáez**, Juan Giraldo Pedraza, Mauricio Schoebitz Cid, Homero Urrutia Briones, María Dolores López Belchí. Jetcutter technology for the formulation of agricultural hydrogels and their effects on water deficit tolerance. XVI Reunión de Biología Vegetal, Talcahuano, Chile, 28-30 Noviembre 2023.

F. Martin, **J. Baeza**, JG. Giraldo, M. Schoebitz, H. Urrutia, M.D. López. Tecnología JetCutter para la formulación de hidrogeles agrícolas y sus potenciales efectos en la tolerancia al déficit hídrico. IV Workshop de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agronómicas. Termas de Chillán, Chile, enero 2024.

JEC. Baeza, FB Martin, R. Carrasco, M. Schoebitz, R. Bastías, JG Pérez-Pérez, M.D. López Belchí. Mejora de las propiedades antioxidantes en albahaca morada mediante el uso de *Bacillus pumilus* microencapsulado en una matriz de alginato. IV Workshop de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agronómicas. Termas de Chillán, Chile, enero 2024.

Estadías de investigación

Centro de Edafología y Biología del Segura (CEBAS-CSIC), Murcia, España. Desde el 21 de octubre de 2024 hasta el 5 de noviembre 2024.

Cursos y eventos

- Seminario de inocuidad Alimentaria
- Curso de Biopolímeros (ANID)
- Curso de Programación en R
- Primer Congreso de Salud Alimentaria

DATOS SUPLEMENTARIOS

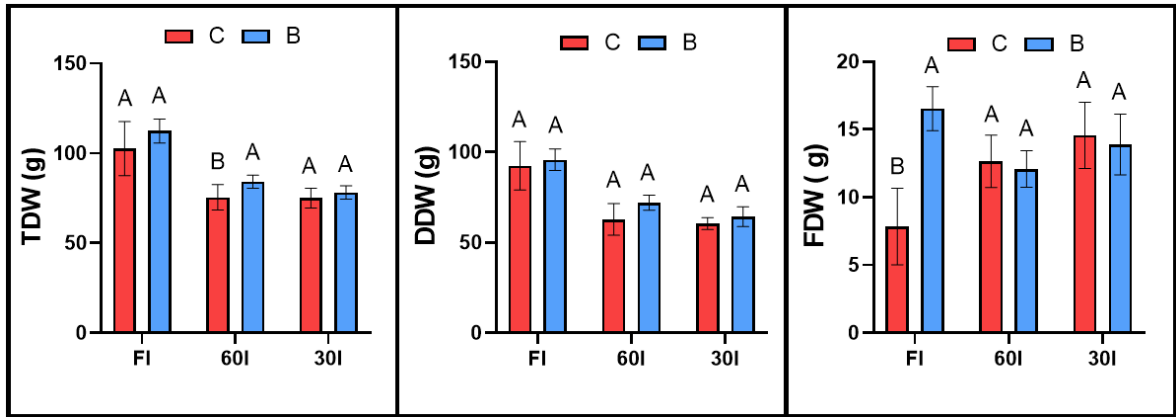
Table 1S. Characterization of beads developed through JetCutter technology.

Microparticles parameters	Data
Matrix formulation	2.5 % (w/w) MGA + 1 % (w/w) starch
Cross-linking time (min)	30 min
WRC (% w/w)	66.80 ± 0.89 % w/w
Diameter (mm)	0.75 ± 0.06 mm
Roundness	0.912 ± 0.04
Bacterial viability (CFU g ⁻¹)	2.14 x 10 ¹⁰ ± 5.18 x 10 ⁹ CFU g ⁻¹

Table 2S. Changes in Soil characteristics for the trial

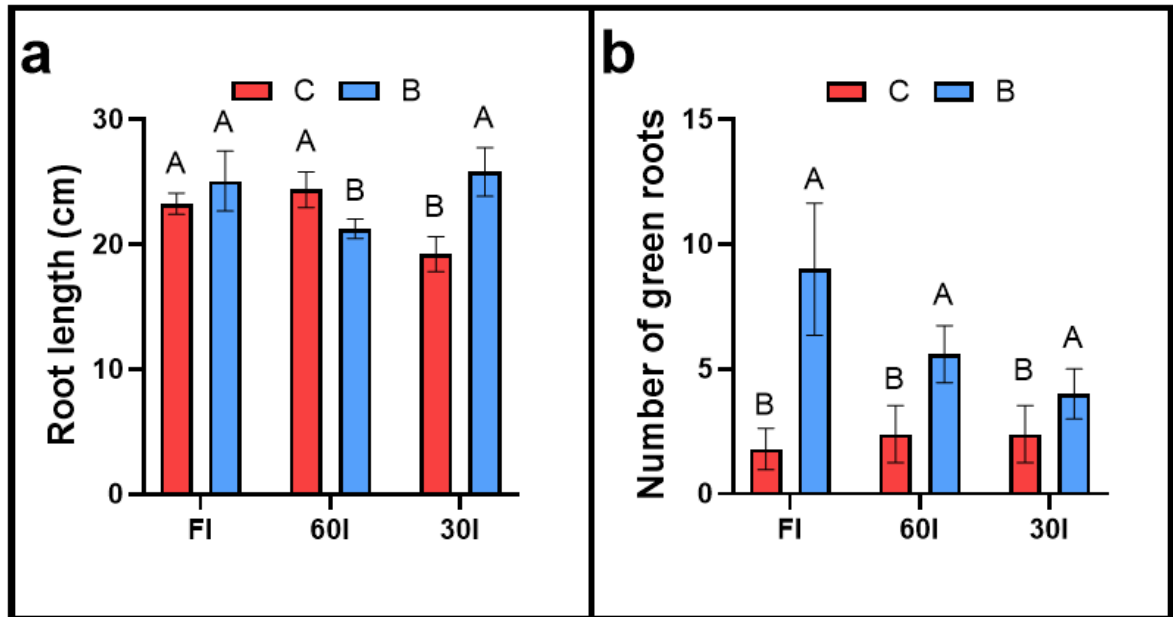
		100				60				30			
		C		B		C		B		C		B	
		Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
pH in water		5,9	5,8	5,87	6,12	5,84	5,83	5,92	5,99	5,83	5,77	5,84	5,90
Organic Matter	%	8,1	8,5	6,70	6,38	7,18	7,82	6,46	7,20	6,29	8,70	7,56	7,14
Nitrates (N-NO3)	mg/Kg	2,3	54,3	3,10	7,30	2,90	8,15	2,05	9,30	2,35	15,20	6,45	18,40
Ammonium (N-NH4)	mg/Kg	21,7	3,3	4,75	18,60	5,90	2,65	4,30	2,40	3,95	2,75	4,05	3,50
Available Nitrogen	mg/Kg	7,4	57,5	7,80	25,90	8,80	10,80	6,35	11,60	6,30	17,85	10,40	21,85
Olsen Phosphorus	mg/Kg	38,0	35,7	36,25	31,35	39,10	34,40	37,80	35,95	37,05	34,50	38,80	37,95
Available K	mg/Kg	57,7	535,1	440,3	426,8	498,70	417,35	429,30	435,30	424,80	412,30	521,20	490,20
Exchangeable K	cmol/Kg	1,3	1,37	1,13	1,10	1,28	1,07	1,11	1,12	1,09	1,06	1,34	1,26
Exchangeable Ca	cmol/Kg	8,9	10,91	8,31	9,50	8,48	8,93	7,72	10,43	7,88	9,78	8,59	9,94
Exchangeable Mg	cmol/Kg	1,9	2,49	1,73	2,06	1,77	2,03	1,40	1,82	1,67	2,47	1,71	1,94
Exchangeable Na	cmol/Kg	0,5	0,45	0,44	0,63	0,52	0,33	0,32	0,49	0,41	0,40	0,53	0,54
Sum of Bases	cmol/Kg	12,7	15,22	11,61	13,27	12,05	12,34	10,53	13,85	11,04	13,70	12,17	13,68
Exchangeable Al	cmol/Kg	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
CEC	cmol/Kg	12,7	15,22	11,63	13,29	12,06	12,36	10,54	13,86	11,06	13,71	12,19	13,69
Al Saturation	%	0,1	0,07	0,13	0,11	0,12	0,12	0,14	0,11	0,13	0,11	0,12	0,11
K Saturation	%	10,2	9,02	9,72	8,24	10,61	8,69	10,45	7,92	9,86	7,72	10,97	9,19
Ca Saturation	%	69,7	71,67	71,48	71,51	70,31	72,22	73,16	75,20	71,30	71,32	70,53	72,61
Mg Saturation	%	15,5	16,33	14,89	15,46	14,69	16,37	13,25	13,12	15,02	17,97	14,03	14,18
Available S	mg/Kg	74,4	57,05	60,95	28,45	75,90	27,15	40,20	23,80	52,00	36,10	76,90	22,10
Fe	mg/Kg	60,0	86,60	60,70	255,6	62,20	88,20	64,70	73,00	63,00	83,00	60,00	73,40
Mn	mg/Kg	7,3	7,60	5,85	166,6	4,40	6,20	3,75	5,50	4,25	8,60	4,10	9,60
Zn	mg/Kg	1,6	2,05	1,00	0,60	1,05	1,55	0,75	1,05	1,30	1,40	1,20	1,15
Cu	mg/Kg	1,9	2,35	1,70	2,95	1,75	2,20	1,50	2,05	1,65	2,15	1,65	2,00

Figure 1S. Evaluation of aerial part in *Corylus avellana* plants, a) Total dry weight (g); b) Defoliated Dry Weight (g); c) Foliar Dry Weight (g).



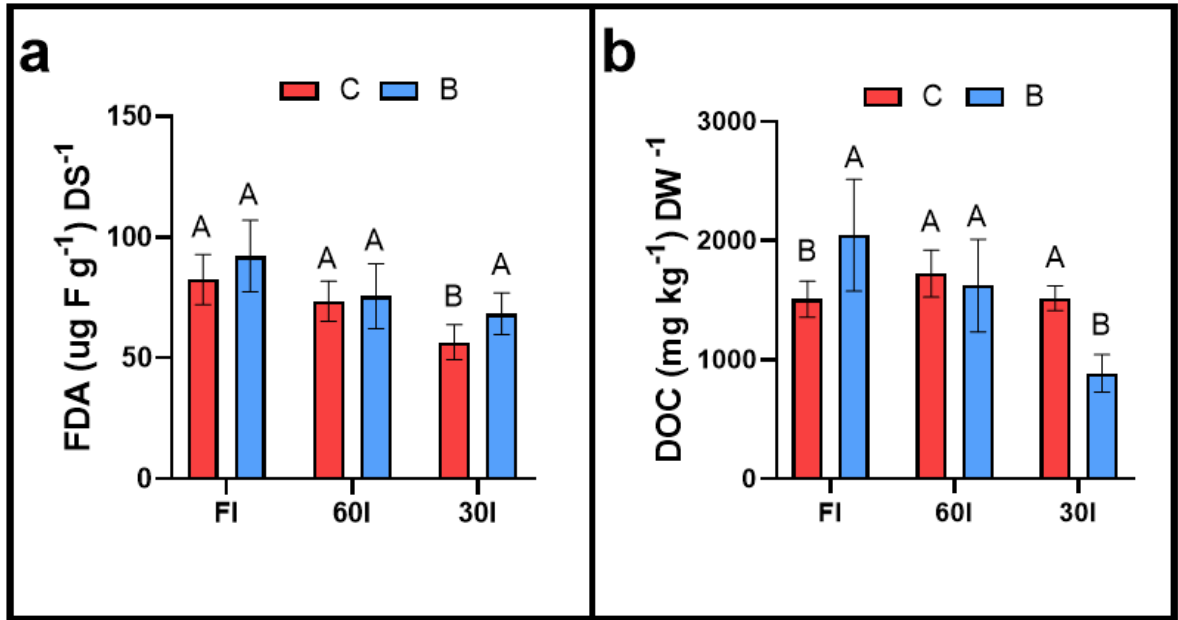
TDW: total dry weight; DDW: defoliated dry weight; FDW: foliar dry weight; FI is full irrigation, 60I is 60% irrigation and 30I is 30% irrigation; C is control and B is biost. Different letter means significant differences at $P \leq 0.05$ in treatments for *Corylus avellana* analyzed according to Tukey test.

Figure 2S. Evaluation of root part in *Corylus avellana* plants a) Root Length (cm), b) Number of Green Roots in *Corylus avellana* Plants.



FI is full irrigation, 60I is 60% irrigation and 30I is 30% irrigation; C is control and B is biost. Different letter means significant differences at $P \leq 0.05$ in treatments for *Corylus avellana* analyzed according to Tukey test.

Figure 3S. Evaluation of the soil in *Corylus avellana* Plants, a). Fluorescein Diacetate Hydrolysis (FDA) ($\mu\text{g F g}^{-1}$ dry soil), b). Total Organic Carbon (TOC) Microbial Biomass (MB) (mg kg^{-1} DW).



FDA: fluorescein diacetate hydrolysis; DOC: dissolved organic carbon; FI is full irrigation, 60I is 60% irrigation and 30I is 30% irrigation; C is control and B is biost. Different letter means significant differences at $P \leq 0.05$ in treatments for *Corylus avellana* analyzed according to Tukey test.