



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

**EFFECTOS DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO
VEGETAL EN RASGOS FISIOLÓGICOS Y ANATÓMICOS DE *Triticum*
aestivum L. EN RESPUESTA AL DÉFICIT HÍDRICO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Forestales de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de
Ingeniero en Biotecnología Vegetal

POR: Alejandro Javier Olivares Escala

Profesor Guía: Rodrigo Hasbún Zaror

Agosto, 2025

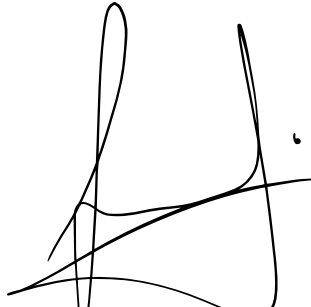
Concepción, Chile

© 2025, Alejandro Javier Olivares Escala

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

EFFECTOS DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO
VEGETAL EN RASGOS FISIOLÓGICOS Y ANATÓMICOS DE *Triticum*
aestivum L. EN RESPUESTA AL DÉFICIT HÍDRICO.

Profesor Guía



Rodrigo Hasbún Zaror

Profesor Asociado

Ingeniero Forestal, Dr.

Profesor Guía



Mauricio Schoebitz Cid

Colaborador Externo

Ingeniero Agrónomo, Dr.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que fueron parte de mi viaje académico. A mi inseparable equipo EntoEnergy, Marcela y Matías: su amistad, su apoyo incondicional, sus ideas brillantes y sus risas constantes hicieron posible cada avance y me recordaron la importancia del trabajo en equipo. A mi querida Catalina, por acompañarme con tu cariño inquebrantable incluso en mis momentos más caóticos; tu presencia fue un remanso de amor, calma y energía.

Mi profundo agradecimiento al profesor Rodrigo Hasbún, por abrirme las puertas de su laboratorio y guiarme con paciencia en disciplinas de la biotecnología que jamás había explorado. Al profesor Mauricio Schoebitz por la guía y ayuda junto a su gran equipo de laboratorio, Solange, Rocío y Carla, muchas gracias. Y al profesor Daniel Aguilera, por las risas compartidas, las tertulias a la hora de comer y su infinita tolerancia en el laboratorio de entomología, gracias. A mi generación 2020, compañeros de aula y de vida, gracias por cada discusión, cada café y cada meta alcanzada juntos, ustedes saben quiénes son.

A mi familia, pilar fundamental de mi vida: gracias por creer en mí cuando los resultados no eran aún visibles y por sostenerme con su cariño y confianza. Los

amo eternamente. También quiero recordar con cariño a las personas que ya no están, pero cuyo recuerdo ilumina este logro.

Y, sobre todo, dedico esta tesis a mí mismo, Alejandro Olivares Escala, por la perseverancia, la fortaleza y la capacidad de disfrutar cada paso de este camino a pesar de las dificultades. Siéntete orgulloso de lo recorrido y de lo que está por venir. Que tu puzzle se arme con calma.

A tod@s ustedes, gracias.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1.2. Hipótesis	7
1.3. Objetivo general.....	7
1.4. Objetivos específicos	8
II. METODOLOGÍA.....	9
2.1. Diseño experimental primer ensayo	9
2.2. Material biológico.....	9
2.3. Objeto de estudio	10
2.4. Establecimiento de ensayo	10
2.5. Tratamientos de estudio	11
2.6. Pretratamiento de semillas.....	12
2.7. Plantación (Ensayo 1).....	12
2.8. Inoculación por macrocápsulas.....	13
2.9. Distribución de macetas	13
2.9. Control de humedad (Ensayo 1)	14
2.9.1. Condiciones iniciales de humedad atmosférica	14
2.9.2. Ajuste de humedad del sustrato a capacidad de campo	14
2.9.3. Aplicación de estrés hídrico.....	15
2.10. Diseño experimental (Ensayo 2).....	16
2.11. Material biológico (Ensayo 2)	17
2.12. Tratamientos de estudio (Ensayo 2)	17
2.13. Inoculación por priming	18
2.13.1. Fase uno.....	19
2.13.2. Fase dos.....	19
2.13.3. Refuerzo de inoculación	20
2.16. Plantación (Ensayo 2)	20

2.17. Control de humedad (Ensayo 2).....	21
2.17.1. Ajuste de humedad del sustrato a capacidad de campo.....	21
2.17.2. Aplicación de déficit hídrico.....	22
2.18. Variables de estudio	22
2.18.1. Crecimiento y desarrollo de parte aérea	23
2.18.2. Crecimiento y desarrollo de raíz.....	24
2.18.3. Características fisiológicas y anatómicas	25
2.18.4. Tolerancia al estrés	27
2.19. Análisis estadístico.....	28
III. RESULTADOS	29
3.1. Biomasa y parámetros radiculares	29
3.2. Crecimiento vegetal y espigado	33
3.3. Biomasa fresca e índice fotosintético.....	36
3.4. Biomasa seca.....	39
3.5. Desarrollo radicular	40
3.6. Contenido de materia seca foliar y radicular (LDMC y RDMC).....	43
IV. DISCUSIÓN	45
4.1. Ensayo 1: inoculación por macrocápsulas	45
4.2. Ensayo 2: inoculación por priming	46
4.3. Respuesta en biomasa	47
4.4. Arquitectura radicular	48
4.5. Partición de materia seca: equilibrio hídrico y reservas carbonadas	49
4.6. Efecto de alginato en plantas	49
4.7. Desarrollo reproductivo y rasgos de tallo.....	50
4.8. Interacción entre origen ecológico y estrategia de inoculación.....	51
V. CONCLUSIONES	53
GLOSARIO.....	54
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

N° Tabla	Página
Tabla 2.1. Tratamientos de estudio en Ensayo 1.....	11
Tabla 2.2. Tratamientos de estudio en Ensayo 2.....	18
Tabla 3.2. Media de parámetros de crecimiento y reproducción en <i>T. aestivum</i> inoculado con diferentes cepas bajo déficit hídrico.....	36

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

N° Figura	Página
Figura 3.1. Comparativa de crecimiento y desarrollo vegetal promedio de <i>T. aestivum</i> inoculado con distintas cepas bajo déficit hídrico. (a) Testigo absoluto; (b) Control; (c) <i>B. pumilus</i> ; (d) <i>S. virginiae</i> ; (e) <i>Rahnella sp.</i> ; (f) <i>P. simplex</i>	30
Figura 3.2. Gráficos boxplot sobre distribución de biomasa seca. (a) Peso seco aéreo; (b) Peso seco de raíz de plántulas de <i>T. aestivum</i> (Ensayo 1) cultivadas bajo déficit hídrico y sometidas a seis tratamientos: T = testigo absoluto; C = control; B = <i>B. pumilus</i> ; S = <i>S. virginiae</i> ; R = <i>Rahnella sp.</i> ; P = <i>P. simplex</i> . Los asteriscos (*) representan outliers. Letras distintas sobre las cajas señalan grupos de medias con diferencias significativas ($p < 0,05$) según ANOVA Welch seguido de la prueba Games-Howell.....	31
Figura 3.3. Gráficos boxplot sobre distribución de parámetros radicales. (a) Área de raíz; (b) Volumen de raíz de plántulas de <i>T. aestivum</i> (Ensayo 1) cultivadas bajo déficit hídrico y sometidas a seis tratamientos: T = testigo absoluto; C = control; B = <i>B. pumilus</i> ; S = <i>S. virginiae</i> ; R = <i>Rahnella sp.</i> ; P = <i>P. simplex</i>	32
Figura 3.4. Comparativa de crecimiento y desarrollo vegetal promedio de <i>T. aestivum</i> inoculado con distintas cepas bajo déficit hídrico. (a) Testigo absoluto; (b) Control; (c) <i>S. virginiae</i> ; (d) <i>Rahnella sp.</i> ; (e) <i>P. simplex</i>	34
Figura 3.5. Comparativa de crecimiento y desarrollo vegetal de <i>T. aestivum</i> inoculado con distintas cepas bajo déficit hídrico, con sus respectivas réplicas. (a) Testigo; (b) Control; (c) <i>Rahnella sp.</i> ; (d) <i>P. simplex</i>	35
Figura 3.6. Gráficos boxplot sobre distribución de la biomasa fresca en plántulas de <i>T. aestivum</i> (Ensayo 2) sometidas a déficit hídrico. (a) Peso fresco aéreo; (b) Peso fresco de raíz. Los tratamientos fueron: T = testigo absoluto; C = control; S = <i>S. virginiae</i> ; R = <i>Rahnella sp.</i> ; P = <i>P. simplex</i> . Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ($p < 0,05$); en el gráfico (a) se asignaron según ANOVA seguido de la prueba de Tukey y en el gráfico (b) según ANOVA Welch seguido de la prueba Games-Howell.....	37
Figura 3.7. Gráfico boxplot sobre la distribución del contenido relativo de clorofila medido por índice SPAD en hojas de <i>T. aestivum</i> inoculado con distintas cepas bajo déficit hídrico. T: testigo absoluto; C: control; S: <i>S. virginiae</i> ; R: <i>Rahnella sp.</i> ; P: <i>P. simplex</i>	38

Figura 3.8. Gráfico boxplot sobre la distribución del Área Foliar Específica (AFE) de *T. aestivum* inoculado con distintas cepas bajo déficit hídrico. T: testigo absoluto; C: control; S: *S. virginiae*; R: *Rahnella sp.*; P: *P. simplex*.....39

Figura 3.9. Gráficos boxplot sobre la distribución de la biomasa seca en plántulas de *T. aestivum* (Ensayo 2) sometidas a déficit hídrico. (a) Peso seco aéreo; (b) Peso seco de raíz. Los tratamientos fueron: T = testigo absoluto; C = control; S = *S. virginiae*; R = *Rahnella sp.*; P = *P. simplex*. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ($p < 0,05$); en el gráfico (a) se asignaron según ANOVA seguido de la prueba de Tukey y en el gráfico (b) según ANOVA Welch seguido de la prueba Games Howell.....40

Figura 3.10. Comparativa de la arquitectura radicular de plántulas de *T. aestivum* escaneadas a través de WinRHIZO tras inoculación con distintas cepas bajo déficit hídrico, con sus respectivas réplicas ($n = 5$). (T) Testigo absoluto; (C) Control; (S) *S. virginiae*; (R) *Rahnella sp.*; (P) *P. simplex*.....42

Figura 3.11. Gráficos boxplot de los parámetros radicales en plántulas de *T. aestivum* (Ensayo 2) cultivadas bajo déficit hídrico. (a) Área de raíz; (b) Volumen de raíz. Los tratamientos fueron: T = testigo absoluto; C = control; S = *S. virginiae*; R = *Rahnella sp.*; P = *P. simplex*.....43

Figura 3.12. Gráficos boxplot del contenido de materia seca en plántulas de *T. aestivum* (Ensayo 2) bajo déficit hídrico. (a) LDMC = Leaf Dry Matter Content; (b) RDMC = Root Dry Matter Content. Tratamientos: T = testigo absoluto; C = control con estrés; S = *S. virginiae*; R = *Rahnella sp.*; P = *P. simplex*. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ($p < 0,05$) según ANOVA Welch seguido de la prueba de Tukey.....44

RESUMEN

La sequía limita crecientemente la productividad del trigo (*Triticum aestivum* L.). En este contexto, los ecosistemas de media montaña andina, cuya flora xerofítica y microbioma están adaptados al déficit hídrico, ofrecen un modelo y reservorio microbiano para enfrentar esta limitación. Con este antecedente, se evaluó el efecto de cuatro cepas rizobacterianas promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) aisladas de *Azorella prolifera*: *Bacillus pumilus* (B), *Streptomyces virginiae* (S), *Rahnella* sp. (R) y *Peribacillus simplex* (P), empleando dos estrategias de inoculación: macroencapsulación de refuerzo en la línea de siembra y priming de semillas, esta última empleada con las tres cepas que mostraron mayor viabilidad (S, R y P).

En una cámara de crecimiento se sometieron las plántulas a riego deficitario (30 % humedad gravimétrica), midiendo biomasa fresca y seca aérea-radicular, área y volumen de raíces, contenido de clorofila (SPAD), área foliar específica (AFE), contenido relativo de agua y proporción de materia seca, así como longitud y diámetro de tallo, número de hojas y porcentaje de espigación. El priming con *P. simplex* destacó: mantuvo biomasa fresca aérea y radicular 27 % y 34 % superiores al testigo, conservó área y volumen radicular, sostuvo índices fisiológicos estables y elevó la espigación al 80 %. Bajo el mismo método, *S. virginiae* mostró efectos intermedios, mientras que *Rahnella* sp. presentó un

establecimiento tardío. En contraste, la macroencapsulación produjo respuestas poco consistentes. Estos resultados indican que el priming con *P. simplex* es la combinación más prometedora para mejorar la tolerancia del trigo al déficit hídrico, abriendo paso a ensayos de campo y a la formulación de bioproductos adaptados a la agricultura en zonas áridas.

ABSTRACT

Drought increasingly limits the productivity of wheat (*Triticum aestivum* L.). In this context, Andean mid-mountain ecosystems, whose xerophytic flora and microbiome are adapted to water shortages, offer a model and microbial reservoir to address this limitation. Against this background, the effect of four plant growth-promoting rhizobacterial (PGPR) strains isolated from *Azorella prolifera*: *Bacillus pumilus* (B), *Streptomyces virginiae* (S), *Rahnella* sp. (R), and *Peribacillus simplex* (P) was evaluated using two inoculation strategies: booster macroencapsulation at the sowing line and seed priming, the latter used with the three strains that showed the highest viability (S, R, and P). In a growth chamber, seedlings were subjected to deficit irrigation (30% gravimetric humidity), and fresh and dry aboveground root biomass, root area and volume, chlorophyll content (SPAD), specific leaf area (SLA), relative water content and dry matter ratio, as well as stem length and diameter, leaf number, and bolting percentage were measured.

Priming with *P. simplex* was notable: it maintained fresh aboveground and root biomass 27% and 34% higher than the control, conserved root area and volume, maintained stable physiological indices, and increased bolting to 80%. Under the same method, *S. virginiae* showed intermediate effects, while *Rahnella* sp. showed delayed establishment. In contrast, macroencapsulation produced inconsistent responses. These results indicate that priming with *P. simplex* is the

most promising combination for improving wheat's tolerance to water stress, paving the way for field trials and the development of bioproducts adapted to agriculture in arid zones.

I. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas andinos de Chile, que se extienden a lo largo de la Cordillera de los Andes desde el norte hasta el sur del país, se caracterizan por su alta altitud, baja disponibilidad de agua y elevada radiación solar. Estas condiciones extremas representan un desafío significativo para las plantas, las cuales deben enfrentar déficit hídrico y alta radiación solar para sobrevivir. Para adaptarse a estos ambientes, las formaciones xerofíticas han desarrollado estrategias como la producción de hojas con cutícula gruesa, el aumento del crecimiento radicular y la reducción de la expansión foliar (Luna-Flores *et al.*, 2023). En particular, estas estrategias de supervivencia están estrechamente relacionadas con los microorganismos (Aguilera-Torres *et al.*, 2023).

En la rizosfera, el entorno inmediato a las raíces de las plantas existe un microbioma, incluyendo hongos, que interactúan con las raíces. Estas interacciones, conocidas como endófitas, asociativas, de vida libre o simbióticas están influenciadas por las especies de plantas y sus etapas de desarrollo. Esta última, denominada simbiosis (mutualismo) radicular, está determinada por los exudados radiculares (Samain *et al.*, 2023). Estos metabolitos secretados por las raíces en la rizosfera son cruciales para varios procesos. Al ajustar la composición de estos exudados, las plantas pueden modificar las propiedades del suelo para adaptarse y sobrevivir frente a condiciones adversas. Entre las

estrategias utilizadas se encuentran: alterar el pH del suelo para hacer los nutrientes (carbono y nitrógeno) más disponibles y atraer microorganismos beneficiosos (Vives-Peris *et al.*, 2019).

De las formaciones xerofíticas de Río Maule y Río Polcura se aislaron de *Azorella prolifera* diversas cepas rizobacterianas: *Streptomyces virginiae*, *Peribacillus simplex* y *Rahnella* sp; y se macroencapsularon para su posterior estudio. Estos microorganismos, conocidos como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés: *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), establecen asociaciones con las raíces, ya sea en la rizosfera o de forma endofítica (Brunetti *et al.*, 2021). Las PGPR pueden favorecer el desarrollo vegetal al incrementar la disponibilidad de nutrientes o mitigar distintos tipos de estrés (Ahmad *et al.*, 2008). Dichos estreses abarcan agentes bióticos como insectos (Jouzani *et al.*, 2017) y patógenos, y abióticos como temperaturas extremas, radiación o sequía (Cui *et al.*, 2022). En particular, la disponibilidad de agua y nutrientes es una de las limitantes más estudiadas: varias PGPR mejoran el desarrollo del sistema radicular, lo que conlleva un aumento en la absorción hídrica durante periodos de déficit hídrico (Curá *et al.*, 2017) y la asimilación de N, P y K en suelos del Chile central (Reyes-Castillo *et al.*, 2019).

Sobre la base de estas ventajas se han desarrollado distintos métodos de inoculación para introducir PGPR al sistema suelo–planta: el priming o imbibición

de semillas en una suspensión bacteriana, que asegura colonización temprana y refuerza la resistencia sistémica inducida (Mashabela *et al.*, 2023); el recubrimiento/peletizado con biopolímeros cargados de PGPR, útil para siembra mecanizada y asociado a mayores rendimientos (Rocha *et al.*, 2019; Simarmata *et al.*, 2021); la aplicación líquida al surco o por riego, idónea para refuerzos durante el cultivo y compatible con fertilización reducida sin pérdida de productividad (Piater *et al.*, 2019); y la macroencapsulación en matrices poliméricas, que protege al inóculo frente a la desecación y libera las bacterias de forma controlada (Hernández-Montiel *et al.*, 2017). Comparar estas estrategias resulta fundamental para elegir la más eficaz en escenarios de estrés hídrico.

Tal decisión cobra especial relevancia en trigo (*Triticum aestivum*), uno de los cultivos base de la seguridad alimentaria mundial. En 2024 la producción global se estimó en 789 millones de toneladas (FAO, 2024) y 173.513 toneladas a nivel nacional con 60.177 ha sembradas, cifra que subraya su importancia económica. Sin embargo, la creciente escasez de agua amenaza su rendimiento, de modo que optimizar la inoculación con PGPR podría ofrecer una vía sostenible para mejorar la tolerancia del trigo a condiciones cada vez más adversas. No obstante, la sequía continúa siendo la principal limitante del rendimiento agrícola (Budak *et al.*, 2013); la falta de precipitaciones ha provocado una aridez persistente en los suelos. En este contexto resulta imprescindible incorporar métodos que refuercen

la capacidad de las plantas para soportar tales presiones ambientales. La productividad depende de complejas interacciones entre el clima y los procesos ecofisiológicos (Ruiz *et al.*, 2008), y el trigo, con su ciclo de desarrollo rápido (de semilla a espigación), se muestra particularmente sensible a estos estímulos estresantes.

Las PGPR han probado su eficacia ante diversos tipos de estrés: sequía (Ansari *et al.*, 2023), salinidad (Neshat *et al.*, 2022) e incluso fitotoxicidad por metales pesados (Rizvi *et al.*, 2020). Por su sensibilidad y relevancia económica, el trigo constituye un modelo ideal para evaluar el impacto de estas bacterias. Además, estudiar la macroencapsulación y otros modos de inoculación de PGPR aisladas de zonas xerofíticas resulta crucial, pues determina cómo el inóculo interactúa con el sustrato y con la planta bajo estrés de calor y frío extremos. Comprender estos efectos aportará información valiosa para optimizar la producción de trigo en Chile y fortalecer su resiliencia frente al escenario climático actual.

En base a lo expuesto anteriormente se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo afecta la aplicación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal a rasgos fisiológicos y anatómicos de *T. aestivum* en respuesta al déficit hídrico?

1.2. Hipótesis

La inoculación de *T. aestivum* con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) aisladas de la especie xerofítica *Azorella prolifera* incrementará el crecimiento radicular, el área foliar específica (AFE), floración y la tolerancia de las plantas al déficit hídrico.

1.3. Objetivo general

Determinar el impacto de la inoculación de *T. aestivum* con PGPR aplicadas sobre los rasgos fisiológicos y anatómicos de las plantas durante un período de déficit hídrico.

1.4. Objetivos específicos

1.4.1. Comparar entre tratamientos el efecto de la inoculación con rizobacterias PGPR en plantas de *Triticum aestivum* sometidas a déficit hídrico, integrando parámetros fisiológicos y las modificaciones morfológicas de la parte aérea y de raíz.

1.4.2. Proponer la cepa de rizobacterias PGPR junto con la estrategia de inoculación más eficaz entre priming de semillas y macroencapsulación, con mayor capacidad de mejorar la respuesta fisiológica y anatómica de *T. aestivum* frente a condiciones de déficit hídrico.

II. METODOLOGÍA

Ensayo 1

2.1. Diseño experimental primer ensayo

Este experimento se realizó en macetas plásticas de cinco litros, rotuladas, utilizando un sustrato compuesto por una mezcla de fibra de coco y corteza de pino compostado en proporción 3:7. En cada maceta, se plantaron cinco semillas germinadas de *T. aestivum* L. inoculadas con macroesferas las cuales contenían diferentes cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).

Se implementaron diferentes tratamientos experimentales y controles para evaluar los efectos de la inoculación con diferentes cepas de interés, en el desarrollo de las plantas bajo condiciones de déficit hídrico.

Cada uno de estos tratamientos será detallado en las subsecciones correspondientes.

2.2. Material biológico

Se utilizaron cepas bacterianas de *Bacillus pumilus*, *Streptomyces virginiae*, *Peribacillus simplex* y *Rhanella sp.*, macroencapsuladas en alginato, diseñadas y formuladas en el laboratorio de Microbiología de Suelos de la facultad de Agronomía y proporcionadas por Benítez *et al.* (2025). Estas fueron aisladas

desde la rizosfera de las formaciones xerofíticas *Azorella prolifera* y *Berberis empetrifolia*, localizadas en la zona de Fumarolas (36°55'15"S, 71°26'25"W), cerca del centro de esquí Nevados de Chillán, a 80 km al este de Chillán.

2.3. Objeto de estudio

Para esta investigación, se utilizaron semillas certificadas de la variedad Pantera-INIA Clearfield de *T. aestivum* L., donadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Quilamapu.

2.4. Establecimiento de ensayo

Los ensayos correspondientes fueron desarrollados en las instalaciones del Laboratorio de Epigenética Vegetal de la Facultad de Ciencias Forestales en colaboración con el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción durante un periodo de dos meses.

2.5. Tratamientos de estudio

Se evaluaron cuatro tratamientos de inoculación mediante el espolvoreo de cepas PGPR específicas macroencapsuladas: *B. pumilus*, *S. virginiae*, *P. simplex* y *Rahnella sp.*. Además, se incluyeron dos controles: un tratamiento con macrocápsulas de alginato sin bacterias y un testigo absoluto, es decir, semillas sembradas en el sustrato sin ningún tipo de inoculación, como se resume en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Tratamientos de estudio en Ensayo 1.

Tratamiento	Cepa	Réplicas
B	<i>Bacillus pumilus</i>	3
S	<i>Streptomyces virginiae</i>	3
P	<i>Peribacillus simplex</i>	3
R	<i>Rahnella sp.</i>	3
C	Control	3
T	Testigo	3

2.6. Pretratamiento de semillas

Las semillas de *T. aestivum* fueron previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio (1,5% v/v) durante cinco minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se dispusieron en placas de Petri selladas con papel aluminio para su germinación en cámara de crecimiento a 24°C por tres días.

2.7. Plantación (Ensayo 1)

Para cada tratamiento, se plantaron superficialmente plantaron semillas germinadas previamente desinfectadas en macetas plásticas de cinco litros. Cada maceta fue llenada con dos kg de un sustrato autoclavado compuesto por una mezcla de fibra de coco y corteza de pino compostado en proporción 3:7, inicialmente a un porcentaje de humedad controlado de 60%. Cada tratamiento contó con tres repeticiones, resultando en un total de 18 macetas (seis tratamientos × tres repeticiones). Las macetas fueron rotuladas para identificar fácilmente el tratamiento y la réplica correspondiente.

2.8. Inoculación por macrocápsulas

Al momento de la plantación, cada macetero fue inoculado depositando 0,3 g de macrocápsulas de la cepa correspondiente al tratamiento y réplica, directamente sobre la semilla. A continuación, las macrocápsulas se hidrataron con agua destilada para activar los microorganismos y, finalmente, se cubrieron con una capa adicional de sustrato para completar la siembra.

2.9. Distribución de macetas

Las macetas se almacenaron en la cámara de crecimiento vegetal del Laboratorio de Microbiología de Suelos de la facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, donde se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (24 °C) y humedad constante (40%). El periodo de crecimiento fue de un mes y dos semanas.

Para evitar sesgos, garantizar la aleatoriedad en el crecimiento y desarrollo de las plántulas, las macetas se distribuyeron de manera completamente aleatoria dentro de la cámara de crecimiento y estas se alternaron cada semana.

2.9. Control de humedad (Ensayo 1)

2.9.1. Condiciones iniciales de humedad atmosférica

Durante el primer mes, todos los tratamientos se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad relativa al 60%. La estabilidad de estas condiciones se verificó mediante el uso de un sensor de humedad acoplado a un sistema Arduino, con el objetivo de asegurar el adecuado establecimiento de las plántulas en sus respectivos sustratos.

2.9.2. Ajuste de humedad del sustrato a capacidad de campo

Con el fin de estandarizar las condiciones hídricas iniciales del sustrato, se determinó la cantidad de agua necesaria para alcanzar un 60% de humedad gravimétrica en cada unidad experimental, compuesta por dos kg de suelo seco. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se tomó una muestra de dos kg de suelo, la cual fue secada en estufa a 105 °C durante 24 horas hasta alcanzar peso constante, correspondiente al 0% de humedad.
2. La cantidad de agua requerida para alcanzar el 60% de humedad gravimétrica se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{Peso del agua}}{\text{Peso seco del sustrato}} \times 100$$

Despejando:

$$\text{Peso del agua (mL)} = \frac{\text{Humedad (\%)} \times \text{Peso seco del sustrato (g)}}{100}$$

3. Considerando que el peso seco obtenido posterior al secado fue de 1020 g, se adicionaron 612 mL de agua destilada a cada macetero con dos kg de sustrato para alcanzar el 60% de humedad.

2.9.3. Aplicación de estrés hídrico

Finalizado el periodo de establecimiento, la humedad del sustrato se redujo gradualmente hasta alcanzar un 30% de humedad gravimétrica durante un periodo de dos semanas. Este descenso simuló condiciones de déficit hídrico controlado, permitiendo evaluar las respuestas fisiológicas y anatómicas de las plantas frente a la reducción de la disponibilidad hídrica.

Para calcular la cantidad de agua correspondiente al 30% de humedad gravimétrica en dos kg de sustrato, se utilizó la misma fórmula mencionada

anteriormente, obteniéndose una aplicación de 306 mL de agua destilada por macetero. La estabilidad de este nivel hídrico se monitoreó mediante mediciones periódicas de cada unidad experimental a través del uso de un sensor de humedad acoplado a un sistema Arduino. De este modo, se repuso el volumen de agua perdido por evaporación o transpiración, asegurando la constancia de las condiciones de estrés hídrico.

Ensayo 2

Tomando como referencia la metodología previamente detallada, el Ensayo 2 incorpora las siguientes modificaciones y adiciones:

2.10. Diseño experimental (Ensayo 2)

Para este ensayo, el experimento se realizó en macetas plásticas de un litro, rotuladas, utilizando el mismo sustrato compuesto por una mezcla de fibra de coco y corteza de pino compostado en proporción 3:7. En cada maceta, se sembraron semillas germinadas de *T. aestivum* previamente tratadas mediante una metodología de inoculación priming.

De igual manera que en el Ensayo 1, se implementaron diferentes tratamientos experimentales y controles para evaluar los efectos de la inoculación con

diferentes cepas de interés, en el desarrollo de las plantas bajo condiciones de déficit hídrico.

Cada uno de estos tratamientos será detallado en las subsecciones correspondientes.

2.11. Material biológico (Ensayo 2)

A diferencia del primer ensayo, se utilizaron tres de las cuatro cepas bacterianas proporcionadas: *Streptomyces virginiae*, *Peribacillus simplex* y *Rhanella sp.*, macroencapsuladas en alginato.

2.12. Tratamientos de estudio (Ensayo 2)

Se evaluaron tres tratamientos de inoculación mediante la metodología de priming con cepas PGPR específicas macroencapsuladas: *S. virginiae*, *P. simplex* y *Rahnella sp.*. Además, se incluyeron dos controles: un tratamiento con microcápsulas de alginato sin bacterias y un testigo absoluto, es decir, semillas sembradas en el sustrato sin ningún tipo de inoculación, como se resume en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Tratamientos de estudio en Ensayo 2.

Tratamiento	Cepa	Réplicas
S	<i>Streptomyces virginiae</i>	5
P	<i>Peribacillus simplex</i>	5
R	<i>Rahnella sp.</i>	5
C	Control	5
T	Testigo	5

2.13. Inoculación por priming

El priming, según lo define Mitra *et al.* (2021), es un tratamiento de semillas que utiliza agentes biológicos y consiste en la hidratación controlada de las semillas junto con su inoculación con microorganismos beneficiosos para promover su desarrollo. En este estudio, las semillas fueron sometidas a inoculación con cepas PGPR específicas (*S. virginiae*, *Rahnella sp.* y *P. simplex*) posterior a su germinación. Para ello, se adoptó la metodología de priming descrita por Mashabela *et al.* (2022), ajustada según las recomendaciones dadas por el Laboratorio de Suelos de la facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, a fin de garantizar el cumplimiento de los objetivos planteados. Este protocolo de priming comprende dos fases principales y una preparación para una segunda inoculación de refuerzo bacteriano, las cuales serán descritas a continuación.

2.13.1. Fase uno

Para la preparación se utilizó medio de cultivo ISP2 previamente esterilizado. En tubos Falcon de 50 mL separados, se añadieron 0,3 g de microesferas correspondientes a cada cepa (*S. virginiae*, *Rahnella sp.* y *P. simplex*). A cada tubo se le incorporaron 45 mL de medio PBS estéril, y posteriormente fueron sellados con parafilm para evitar derrames de la solución y posibles contaminaciones. Los tubos fueron colocados en un agitador orbital y mantenidos bajo agitación constante durante 24 horas a una temperatura controlada de 28 °C. Este proceso asegura la liberación adecuada de los microorganismos y su homogeneización en el medio.

2.13.2. Fase dos

Una vez transcurridas las 24 horas del proceso anterior, las semillas germinadas de trigo se colocaron en placas de Petri separadas, distribuyendo 15 semillas por placa para cada uno de los cinco tratamientos establecidos. A cada placa se le agregaron 20 mL de la solución priming correspondiente a la cepa asignada.

Las placas fueron selladas con parafilm para evitar la evaporación o contaminación. Las semillas reposaron en la solución bacteriana durante un periodo de dos horas. Finalizado este tiempo, se procedió a la plantación de las semillas tratadas.

2.13.3. Refuerzo de inoculación

A partir de la solución preparada en la Fase uno, se realizó un refuerzo de inoculación utilizando matraces estériles, uno para cada tratamiento. Para ello, se añadieron 100 mL de medio de cultivo ISP2 preparado en la Fase uno a cada matraz, seguido de la incorporación de 1 mL de la solución priming correspondiente. Los matraces fueron debidamente rotulados según su tratamiento, sellados con papel aluminio y parafilm para evitar contaminación y se colocaron en un agitador orbital a 28 °C durante 24 horas. Tras este periodo, las soluciones se reservaron para la segunda inoculación, que se llevó a cabo al momento de la siembra.

2.16. Plantación (Ensayo 2)

Para cada tratamiento, se plantaron cinco semillas germinadas (una semilla germinada por maceta) desinfectadas y previamente tratadas (según lo descrito en las secciones 2.13.1 y 2.13.2) en macetas plásticas de un litro. Cada maceta fue llenada con 400 g de un sustrato autoclavado compuesto por una mezcla de fibra de coco y corteza de pino compostado en proporción 3:7, inicialmente a un porcentaje de humedad controlado de 60%. Cada tratamiento contó con cinco repeticiones, resultando en un total de 25 macetas (cinco tratamientos × cinco repeticiones). Las macetas fueron rotuladas para identificar fácilmente el

tratamiento y la réplica correspondiente. Después de la siembra, se aplicó la solución de refuerzo bacteriano descrita en la sección 2.13.3. Para ello, se inoculó un mL de la solución sobre cada semilla, sumando un total de cinco mL por tratamiento. La aplicación se realizó de manera superficial sobre el sustrato utilizando una micropipeta para garantizar precisión y uniformidad en el tratamiento.

2.17. Control de humedad (Ensayo 2)

2.17.1. Ajuste de humedad del sustrato a capacidad de campo

Siguiendo el procedimiento ya descrito en el Ensayo uno, se estimó la humedad inicial de referencia y se calculó el volumen de agua necesario para llevar cada maceta (400 g de sustrato) al 60 % de humedad gravimétrica. Se tomó una muestra de 400 g, se secó en estufa a 105 °C durante 24 h hasta peso constante (204 g peso seco) y, aplicando las mismas fórmulas previamente presentadas, se determinó que debían añadirse 122,4 mL de agua destilada por maceta. De este modo, se estandarizó la humedad de partida antes de iniciar el ensayo.

2.17.2. Aplicación de déficit hídrico

Tras la fase de establecimiento, se indujo déficit hídrico llevando la humedad gravimétrica al 30 %, al igual que el procedimiento descrito en el Ensayo uno, pero aplicado a los 400 g de sustrato de este ensayo. La fórmula previamente indicada arrojó una necesidad de 61,2 mL de agua destilada por maceta, volumen que se aplicó de manera escalonada a lo largo de dos semanas. El nivel hídrico se supervisó con el mismo sensor capacitivo-Arduino, efectuando reposiciones puntuales para compensar las pérdidas por evapotranspiración y asegurar un estrés controlado y homogéneo.

2.18. Variables de estudio

Para ambos ensayos, transcurrido el tiempo de exposición se midieron las siguientes variables descritas a continuación:

2.18.1. Crecimiento y desarrollo de parte aérea

a) Peso seco de parte aérea

Se recolectó y separó la parte aérea de las raíces de todos los individuos, separados por tratamiento y se limpiaron de ser necesario. Luego, se pesó la parte aérea fresca utilizando una balanza analítica y se registró este valor como peso fresco. Posteriormente, se secó la parte aérea en un horno a 65-80°C durante 24-48 horas o hasta alcanzar un peso constante. Una vez seca y a temperatura ambiente, se pesó nuevamente y se registró como peso seco en gramos (g). El peso seco de la parte aérea se obtuvo directamente del peso medido después del secado.

b) Longitud de tallo

Se midió la altura de la parte aérea de cada planta desde la base del tallo, donde entraba en contacto con el sustrato, hasta la punta más alta de la planta. Para ello, se utilizó una regla y se registraron los resultados en centímetros (cm) para cada planta.

c) Diámetro de tallo

El diámetro del tallo de cada planta se midió utilizando un calibrador o micrómetro. Los valores obtenidos se registraron en milímetros (mm) para cada individuo.

2.18.2. Crecimiento y desarrollo de raíz

a) Peso seco de raíz

Se recolectaron y separaron las raíces de la parte aérea. Estas se limpiaron cuidadosamente, tratando de eliminar el sustrato adherido. Luego, se pesaron las raíces frescas utilizando una balanza analítica y se registró este valor como peso fresco. Posteriormente, se secaron las raíces en un horno a 65-80 °C durante 24-48 horas o hasta alcanzar un peso constante. Una vez secas y a temperatura ambiente, se pesaron nuevamente y se registró el peso seco en gramos (g). El peso seco de las raíces se obtuvo directamente del peso medido después del secado.

b) Estructura de raíz

La estructura de las raíces se evaluó mediante la observación de la densidad, ramificación y formación del sistema radicular. Las raíces fueron escaneadas usando un escáner de alta resolución, y las imágenes obtenidas se analizaron con el software WinRHIZO (Regent, Quebec, Canada). Este análisis proporcionó datos sobre la longitud total, el área superficial y el volumen de las raíces. Estos parámetros se utilizaron para comparar el desarrollo del sistema radicular bajo los diferentes tratamientos.

2.18.3. Características fisiológicas y anatómicas

a) Área foliar

El área foliar total se midió capturando imágenes digitales de cada hoja mediante una cámara. Las hojas se colocaron sobre un fondo contrastante para facilitar el análisis. Las imágenes obtenidas se importaron al software ImageJ, donde se calibró la escala de la imagen para asegurar la precisión de las mediciones. Cada hoja fue seleccionada individualmente en la imagen y el software calculó automáticamente el área foliar, registrando los resultados en centímetros

cuadrados (cm²). Este proceso se repitió para todas las hojas de las plantas en los diferentes tratamientos.

b) Área foliar específica (AFE)

El área foliar específica se calculó dividiendo el área foliar total entre el peso seco de la parte aérea de la planta. El área foliar total se midió utilizando el software ImageJ, mientras que el peso seco se determinó tras secar las muestras en un horno a 65 °C hasta alcanzar un peso constante. La fórmula utilizada fue:

$$AFE = \frac{\text{Área Foliar}}{\text{Peso seco de la parte aérea}}$$

Los resultados fueron registrados en cm²/g.

c) Contenido de materia seca foliar (LDMC)

La determinación del contenido de materia seca foliar o Leaf Dry Matter Content (LDMC) se realizó recolectando hojas desarrolladas de cada planta y midiendo su peso fresco. Luego, las hojas se secaron a 65 °C hasta alcanzar un peso constante. Finalmente, se midió el peso seco de las hojas. El LDMC se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{Contenido de materia seca foliar} = \frac{\text{Peso seco de las hojas}}{\text{Peso fresco de las hojas}} \times 100$$

d) Contenido de materia seca de raíz (RDMC)

La determinación del contenido de materia seca de las raíces o Root Dry Matter Content (RDMC) se realizó recolectando raíces lavadas de cada planta con agua destilada y midiendo inicialmente su peso fresco. Posteriormente, las raíces se secaron a 65 °C hasta alcanzar un peso constante. Finalmente, se midió su peso seco. El RDMC se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{Contenido de materia seca de raíz} = \frac{\text{Peso seco de las raíces}}{\text{Peso fresco de las raíces}} \times 100$$

2.18.4. Tolerancia al estrés

a) Evaluación de clorofila foliar mediante SPAD

Al término del periodo de restricción hídrica, se evaluó el impacto del déficit de agua sobre el estado fisiológico de las plantas mediante la medición del contenido relativo de clorofila utilizando un medidor SPAD (SPAD-502 Plus, Minolta®). Para ello:

- Se seleccionó una hoja completamente expandida por planta, evitando tejido senescente o dañado.
- Se tomaron tres lecturas por hoja en diferentes puntos del limbo, evitando la nervadura central. Las lecturas fueron promediadas para obtener un valor representativo por planta.
- Las mediciones se realizaron en horario matutino, bajo condiciones constantes de luz natural.

2.19. Análisis estadístico

Para ambos ensayos, las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante un ANOVA de una vía. Previo al análisis, se comprobó la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas con Levene. Cuando Levene resultó no significativa, se aplicó la prueba post-hoc de Tukey-Kramer; en los casos con varianzas desiguales, se utilizó el post-hoc de Games-Howell, robusto frente a heterocedasticidad y a tamaños muestrales pequeños ($n = 5$). Todos los cálculos se realizaron en IBM SPSS Statistics 25.0 y se consideró significativa cualquier diferencia con $p \leq 0,05$.

III. RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados de los ensayos realizados y de los análisis obtenidos a partir del análisis unidireccional (ANOVA) y las pruebas post-hoc (Tukey-Kramer y Games-Howell) para las cepas inoculadas y controles evaluados bajo condiciones de déficit hídrico: T (testigo absoluto), C (control), B (*Bacillus pumilus*), S (*Streptomyces virginiae*), R (*Rahnella sp.*) y P (*Peribacillus simplex*).

Ensayo 1

3.1. Biomasa y parámetros radiculares

Bajo déficit hídrico, los tratamientos afectaron principalmente el peso seco de la parte aérea: S lo incrementó de forma significativa frente a C (Games-Howell, $p = 0,012$) y a cepas como B ($p = 0,003$) y P ($p = 0,036$), mientras que B presentó el rendimiento más bajo entre los tratamientos (Figura 3.2a). Para el peso seco de raíz se detectaron leves diferencias entre las cepas S y P (Games-Howell, $p = 0,040$), pero las comparaciones par-a-par con otros tratamientos no fueron significativas (Figura 3.2b), mostrando solo la tendencia de mayor biomasa con S y menor con B (Figura 3.1).



Figura 3.1. Comparativa de crecimiento y desarrollo vegetal promedio de *T. aestivum* inoculado con distintas cepas bajo déficit hídrico. (a) Testigo absoluto; (b) Control; (c) *B. pumilus*; (d) *S. virginiae*; (e) *Rahnella* sp.; (f) *P. simplex*.

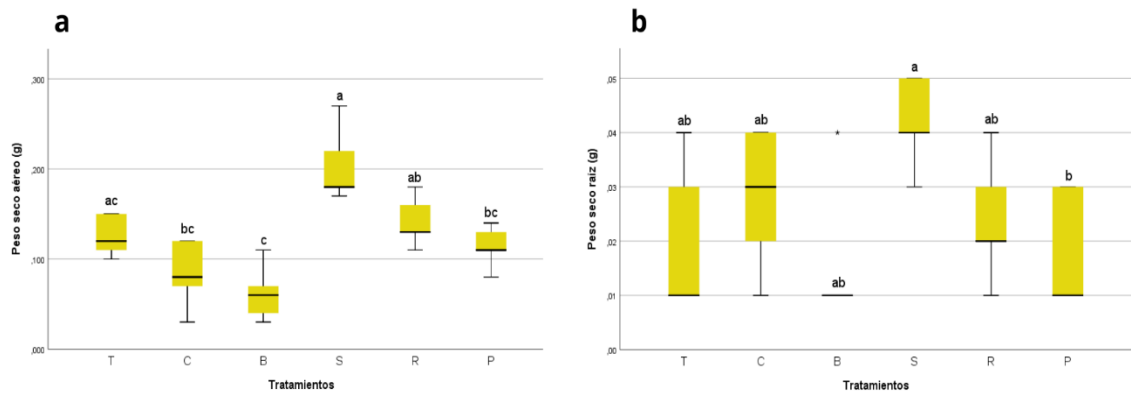


Figura 3.2. Gráficos boxplot sobre distribución de biomasa seca. (a) Peso seco aéreo; (b) Peso seco de raíz de plántulas de *T. aestivum* (Ensayo 1) cultivadas bajo déficit hídrico y sometidas a seis tratamientos: T = testigo absoluto; C = control; B = *B. pumilus*; S = *S. virginiae*; R = *Rahnella* sp.; P = *P. simplex*. Los asteriscos (*) representan outliers. Letras distintas sobre las cajas señalan grupos de medias con diferencias significativas ($p < 0,05$) según ANOVA Welch seguido de la prueba Games-Howell.

El área y el volumen radicular no presentaron diferencias significativas, aunque siguieron el mismo patrón: leve aumento con S y descenso con B. Evidenciando un rendimiento superior de esta cepa y el impacto negativo de B en las plántulas, mientras que R y P se ubicaron en niveles intermedios sin diferencias estadísticas claras (Figura 3.3).

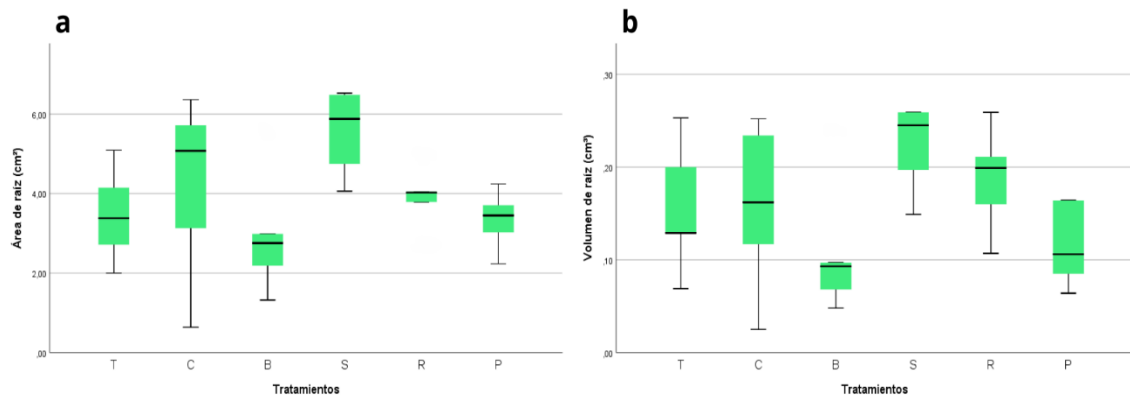


Figura 3.3. Gráficos boxplot sobre distribución de parámetros radiculares. (a) Área de raíz; (b) Volumen de raíz de plántulas de *T. aestivum* (Ensayo 1) cultivadas bajo déficit hídrico y sometidas a seis tratamientos: T = testigo absoluto; C = control; B = *B. pumilus*; S = *S. virginiae*; R = *Rahnella* sp.; P = *P. simplex*.

Debido a imprecisiones de medición originadas por dificultades en la manipulación de los tratamientos al cierre del ensayo, las variables afectadas no se incluyeron en el análisis de resultados. Además, la baja compatibilidad y desempeño de la cepa B en *T. aestivum*, junto con la falta de homogeneidad lumínica en la cámara de crecimiento, motivaron un ajuste metodológico para el segundo ensayo, en el cual B fue excluida. Los resultados con la nueva metodología aplicada se presentan a continuación.

Ensayo 2

3.2. Crecimiento vegetal y espigado

La capacidad reproductiva bajo periodos de sequía es crucial. Para este ensayo, en primer lugar, se evaluó mediante la formación de espigas. Como se resume en la Tabla 3.2, los tratamientos T y C mostraron un 60 % de espigación (3 de 5 plantas), mientras que S alcanzó un 40 % y R no produjo espigas. Por otro lado, P logró un 80% de espigación (4 de 5 plantas), por sobre todos los tratamientos. Que esta cepa supere a T en este parámetro confirma su eficacia para completar la fase reproductiva. Además de las variables reproductivas, se evaluaron la longitud y el diámetro del tallo. El ANOVA mostró que ambos rasgos variaron según la cepa inoculada. En la prueba de Tukey, la longitud de tallo difirió significativamente entre P y R ($p = 0,005$). R promedió 10,6 cm de longitud y 0,24 cm de diámetro, mientras que P alcanzó 32,0 cm de longitud y 0,44 cm de diámetro, sin diferencias estadísticas en este último parámetro. Por su parte, R generó tallos más cortos y S produjo tallos de menor grosor. El conteo de hojas reflejó una tendencia similar, donde T tuvo un promedio de 10 hojas por planta y P de 18, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tukey, $p = 0,256$) si fue evidente frente a los tratamientos C y S que presentaron valores intermedios (13 y 9 hojas, respectivamente) y R obtuvo el menor número (7 hojas) bordeando la significancia con P (Tukey, $p = 0,053$). En conjunto, estos

parámetros evidenciaron el rendimiento inferior de R frente a los demás tratamientos (Figura 3.4 y 3.5).

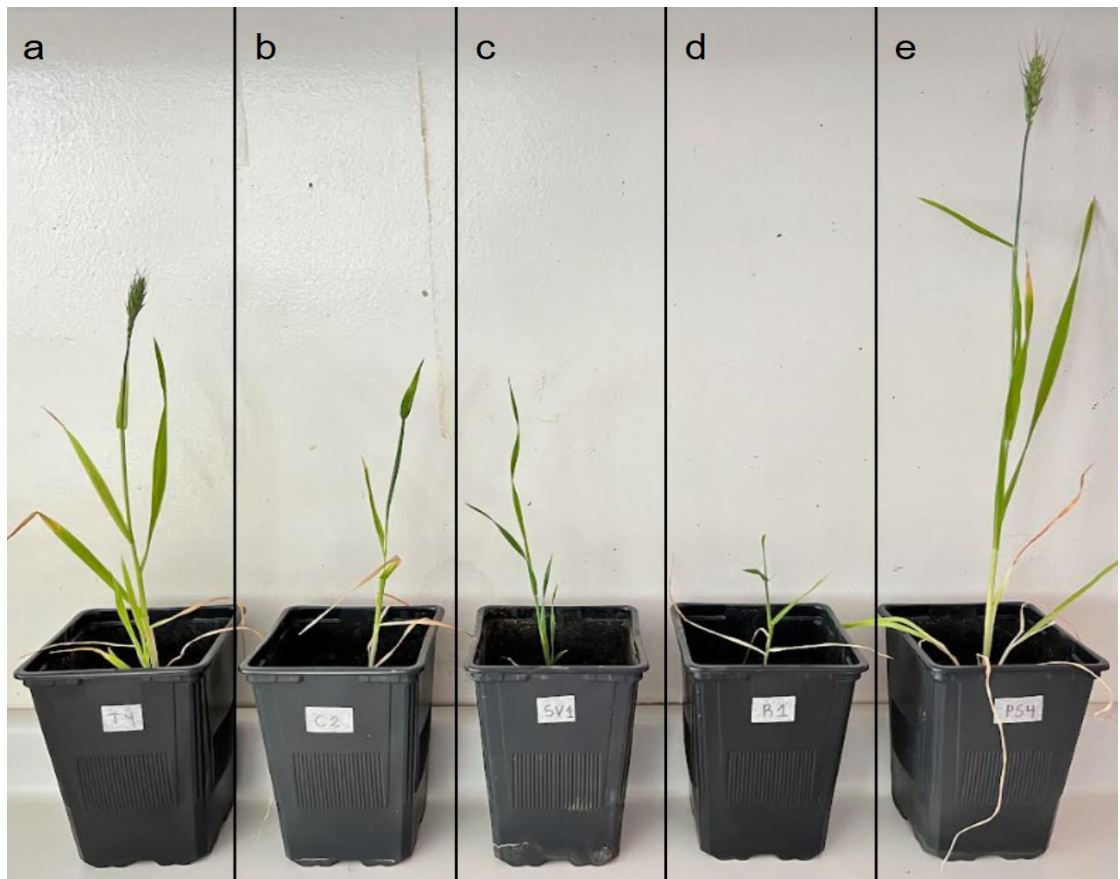


Figura 3.4. Comparativa de crecimiento y desarrollo vegetal promedio de *T. aestivum* inoculado con distintas cepas bajo déficit hídrico. (a) Testigo absoluto; (b) Control; (c) *S. virginiae*; (d) *Rahnella* sp.; (e) *P. simplex*.

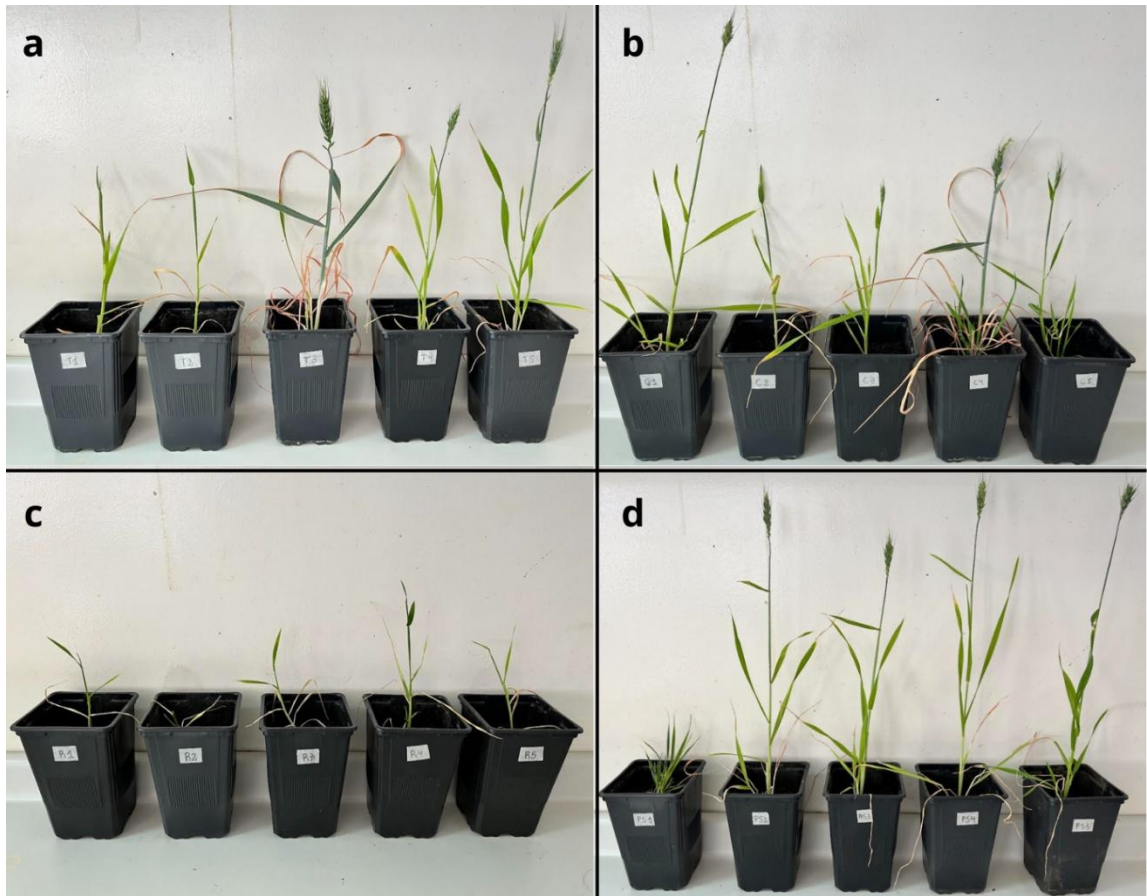


Figura 3.5. Comparativa de crecimiento y desarrollo vegetal de *T. aestivum* inoculado con distintas cepas bajo déficit hídrico, con sus respectivas réplicas. (a) Testigo; (b) Control; (c) *Rahnella* sp.; (d) *P. simplex*.

Tabla 3.1. Media de parámetros de crecimiento y reproducción en *T. aestivum* inoculado con diferentes cepas bajo déficit hídrico.

Tratamiento	Largo de tallo (cm)	Diámetro de tallo (cm)	Nº Hojas	Formación de espiga (%)
T	22 (ab)	0,38	10	60%
C	24,6 (ab)	0,36	13	60%
S	17,6 (ab)	0,28	9	40%
R	10,6 (a)	0,24	7	0%
P	32 (b)	0,44	18	80%

* Letras diferentes representan diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0,05$).

3.3. Biomasa fresca e índice fotosintético

El déficit hídrico impactó de manera variable la biomasa fresca y la capacidad fotosintética, evaluada mediante SPAD y el área foliar específica (AFE), según la cepa inoculante. En la parte aérea, este ensayo reveló diferencias significativas entre los tratamientos T - R (Tukey, $p = 0,019$) y R - P (Tukey, $p = 0,003$); los tratamientos C y S quedaron en un rango intermedio sin diferencias significativas respecto de los grupos extremos (Figura 3.6a). Para el peso fresco de raíz no se detectaron diferencias, aunque la distribución de los valores reflejó la misma tendencia: T y P mantuvieron los valores más altos, C y S ocuparon posiciones intermedias y R se ubicó al extremo inferior (Figura 3.6b).

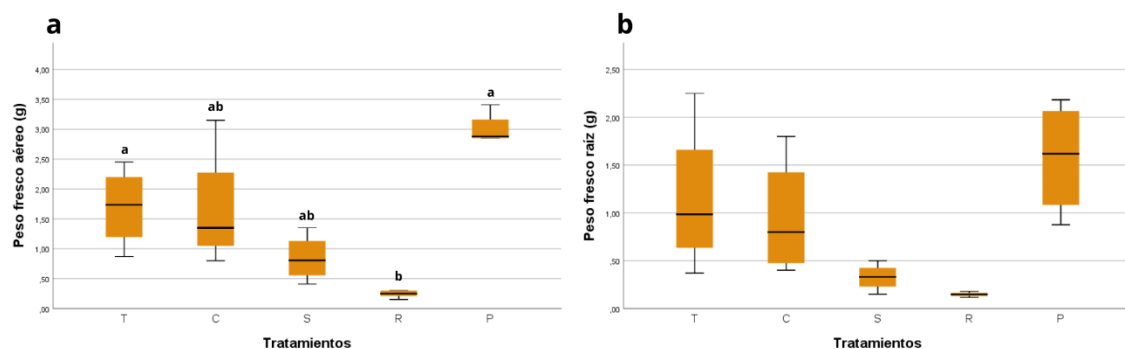


Figura 3.6. Gráficos boxplot sobre distribución de la biomasa fresca en plántulas de *T. aestivum* (Ensayo 2) sometidas a déficit hídrico. (a) Peso fresco aéreo; (b) Peso fresco de raíz. Los tratamientos fueron: T = testigo absoluto; C = control; S = *S. virginiae*; R = *Rahnella sp.*; P = *P. simplex*. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ($p < 0,05$); en el gráfico (a) se asignaron según ANOVA seguido de la prueba de Tukey y en el gráfico (b) según ANOVA Welch seguido de la prueba Games-Howell.

Para profundizar en la función fotosintética, se midieron SPAD y AFE. Ninguna variable presentó diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, P registró la lectura más alta de SPAD (31,6 vs 25,0 en T) (Figura 3.6) y un AFE muy cercano al control y testigo (Figura 3.7), lo que sugiere que esta cepa preserva tanto los niveles de pigmento como la eficiencia área-masa durante la sequía.

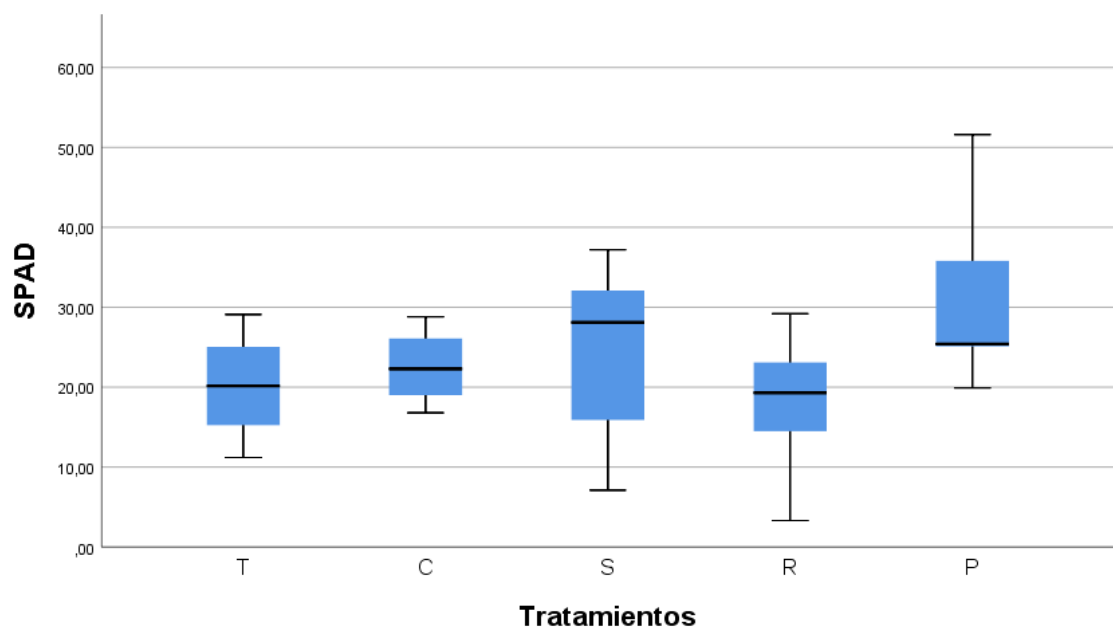


Figura 3.7. Gráfico boxplot sobre la distribución del contenido relativo de clorofila medido por índice SPAD en hojas de *T. aestivum* inoculado con distintas cepas bajo déficit hídrico. T: testigo absoluto; C: control; S: *S. virginiae*; R: *Rahnella sp.*; P: *P. simplex*.

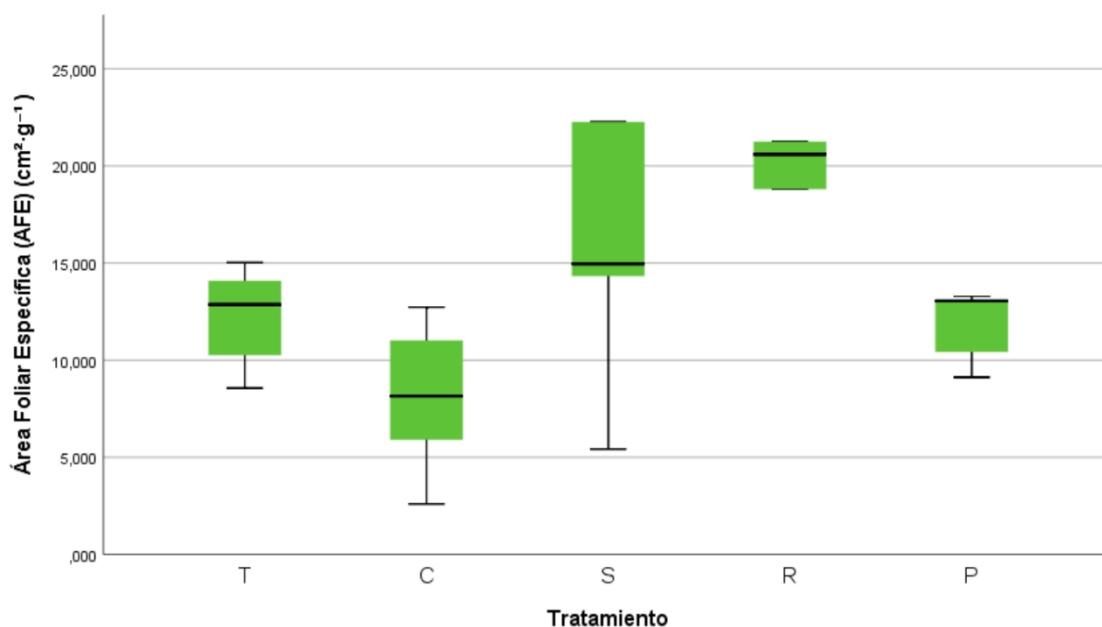


Figura 3.8. Gráfico boxplot sobre la distribución del Área Foliar Específica (AFE) de *T. aestivum* inoculado con distintas cepas bajo déficit hídrico. T: testigo absoluto; C: control; S: *S. virginiae*; R: *Rahnella sp.*; P: *P. simplex*.

3.4. Biomasa seca

La conversión de biomasa fresca a seca también evidenció diferencias entre cepas. En el peso seco aéreo, Tukey registró un efecto significativo en donde los tratamientos R y P lograron diferenciarse ($p = 0,019$), en donde P mostró una tendencia positiva (Figura 3.9a), sugiriendo que, incluso bajo sequía, esta cepa favorece la acumulación de materia seca aérea. Para el peso seco radicular (Figura 3.9b), Tukey señaló un contraste relevante entre P y R: P promedió 0,219 g, similar a T (0,153 g) y C (0,130 g), mientras que R se mantuvo en el valor más bajo con 0,018 g. Los datos evidencian el desempeño positivo de P sobre la

biomasa total y refuerzan la limitada capacidad de R para sostener el desarrollo vegetal.

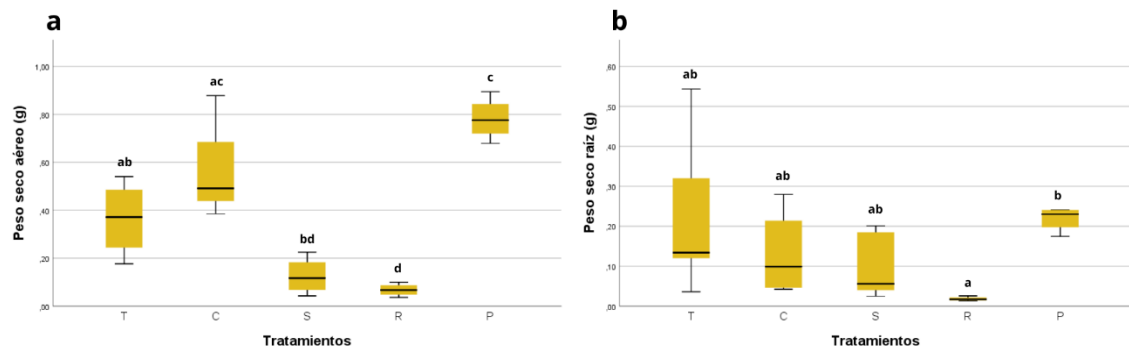


Figura 3.9. Gráficos boxplot sobre la distribución de la biomasa seca en plántulas de *T. aestivum* (Ensayo 2) sometidas a déficit hídrico. (a) Peso seco aéreo; (b) Peso seco de raíz. Los tratamientos fueron: T = testigo absoluto; C = control; S = *S. virginiae*; R = *Rahnella sp.*; P = *P. simplex*. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ($p < 0,05$); en el gráfico (a) se asignaron según ANOVA seguido de la prueba de Tukey y en el gráfico (b) según ANOVA Welch seguido de la prueba Games-Howell.

3.5. Desarrollo radicular

Las fotografías obtenidas con WinRHIZO (Figura 3.10) ofrecen una primera impresión cualitativa de la arquitectura radical. Tanto T como P muestran sistemas densos, voluminosos y muy ramificados: en la mayoría de las réplicas se aprecian raíces primarias gruesas y abundantes laterales finas que ocupan gran parte del campo visual. C mantiene una biomasa intermedia, con raíces menos compactas y algo más cortas. En contraste, S revela entramados finos y alargados con escasas bifurcaciones, mientras que R exhibe el patrón más

limitado: raíces cortas, poco ramificadas y una evidente reducción de masa radical.

El análisis cuantitativo de esas imágenes corrobora la impresión visual. Para el área de raíz (Figura 3.11a) el ANOVA indicó un efecto significativo de tratamiento. P alcanzó la mediana más alta con 62 cm^2 , mientras que R mostró la menor extensión (10 cm^2), difiriendo significativamente entre tratamientos ($p = 0,020$). T, C y S quedaron intermedios, de modo que estadísticamente no difieren de P ni de R. En el volumen de raíz (Figura 3.11b) el efecto global no alcanzó significancia, pero las medianas reproducen el mismo orden: P ($2,8 \text{ cm}^3$) y T ($1,9 \text{ cm}^3$) encabezan la serie, C y S se sitúan en torno a $1,1 \text{ cm}^3$ y $0,6 \text{ cm}^3$, respectivamente, y R permanece en el mínimo ($0,1 \text{ cm}^3$).

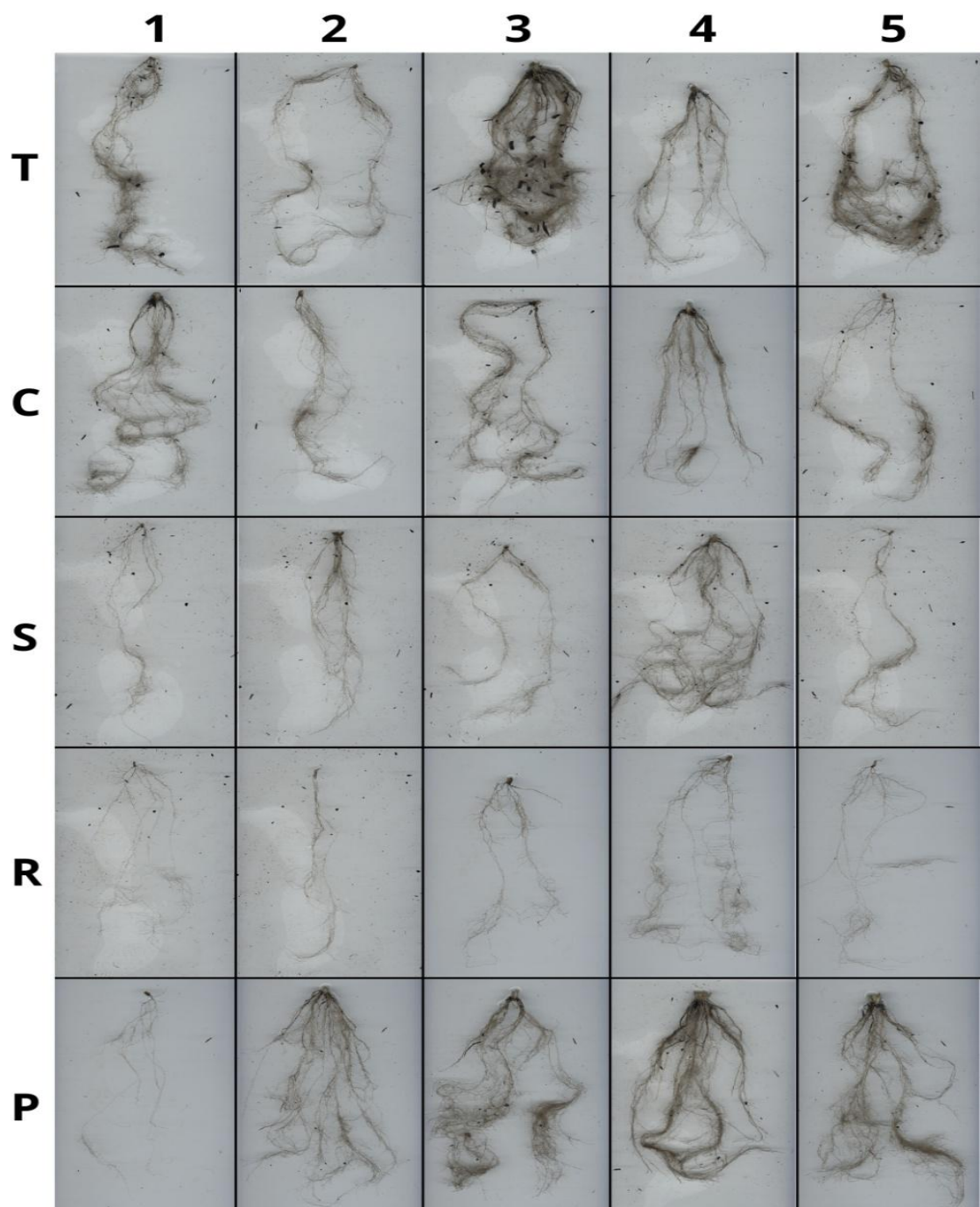


Figura 3.10. Comparativa de la arquitectura radicular de plántulas de *T. aestivum* escaneadas a través de WinRHIZO tras inoculación con distintas cepas bajo déficit hídrico, con sus respectivas réplicas (n = 5). (T) Testigo absoluto; (C) Control; (S) *S. virginiae*; (R) *Rahnella* sp.; (P) *P. simplex*.

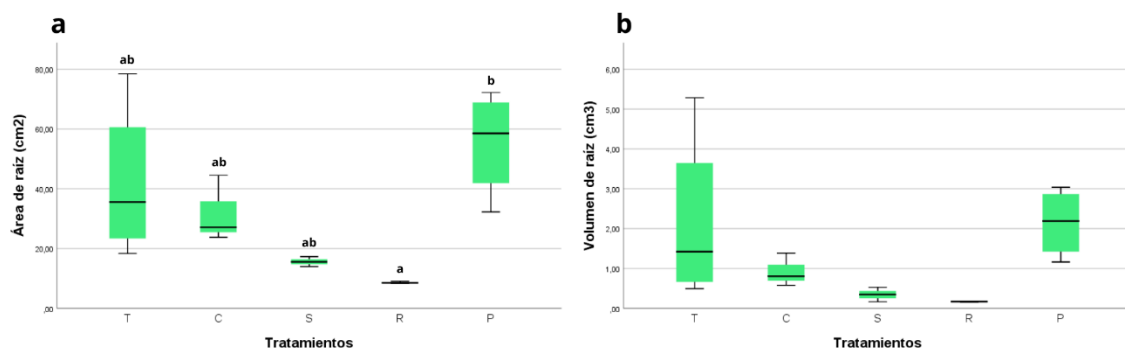


Figura 3.11. Gráficos boxplot de los parámetros radiculares en plántulas de *T. aestivum* (Ensayo 2) cultivadas bajo déficit hídrico. (a) Área de raíz; (b) Volumen de raíz. Los tratamientos fueron: T = testigo absoluto; C = control; S = *S. virginiae*; R = *Rahnella sp.*; P = *P. simplex*.

3.6. Contenido de materia seca foliar y radicular (LDMC y RDMC)

Para cuantificar el contenido de materia seca se midieron el Leaf Dry Matter Content (LDMC) y el Root Dry Matter Content (RDMC). En LDMC (Figura 3.12a) el ANOVA indicó diferencias entre tratamientos con S (Tukey, $p < 0,05$). Las medianas más altas correspondieron a R (310 mg g^{-1} ; $p = 0,003$), C (300 mg g^{-1} ; $p = 0,004$) y P (260 mg g^{-1} ; $p = 0,021$). En el extremo inferior quedó S (155 mg g^{-1}), mientras que el testigo T (220 mg g^{-1}) ocupó una posición intermedia sin diferir de los grupos superior ni inferior. Para RDMC (Figura 3.12b) el efecto de tratamiento no fue significativo. Aun así, se observa la misma tendencia entre tratamientos: P mostró la mediana más alta (140 mg g^{-1}) y R la más baja (115 mg g^{-1}), con T, C y S situados en un rango intermedio ($100\text{--}125 \text{ mg g}^{-1}$).

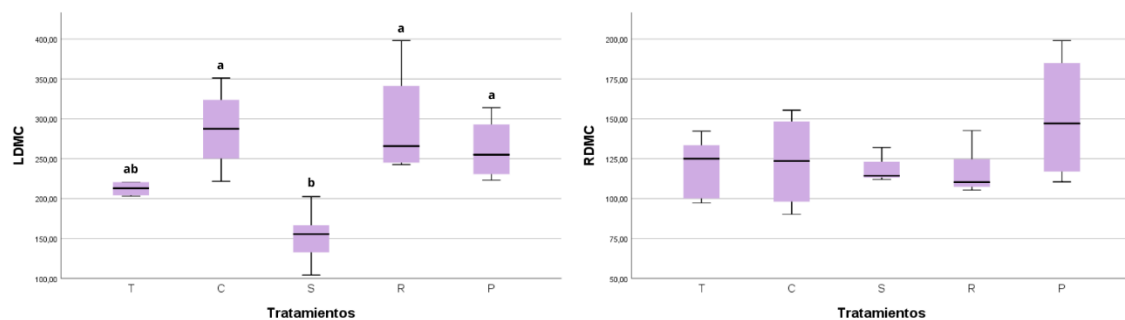


Figura 3.12. Gráficos boxplot del contenido de materia seca en plántulas de *T. aestivum* (Ensayo 2) bajo déficit hídrico. (a) LDMC = Leaf Dry Matter Content; (b) RDMC = Root Dry Matter Content. Tratamientos: T = testigo absoluto; C = control con estrés; S = *S. virginiae*; R = *Rahnella* sp.; P = *P. simplex*. Letras distintas indican diferencias significativas entre medias ($p < 0,05$) según ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

IV. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se propuso evaluar el potencial de cuatro rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR): *Bacillus pumilus* (B) *Streptomyces virginiae* (S), *Rahnella* sp. (R) y *Peribacillus simplex* (P); para mitigar el déficit hídrico en plántulas de *Triticum aestivum*, así como evidenciar el impacto que tiene la forma de inoculación sobre la eficacia real de cada cepa. Para ello se implementaron dos aproximaciones secuenciales: (i) la aplicación directa de PGPR macroencapsuladas en alginato sobre la raíz (Ensayo 1) y (ii) una inoculación bajo la metodología de priming (Ensayo 2).

4.1. Ensayo 1: inoculación por macrocápsulas

La aplicación directa de macrocápsulas sobre la raíz protegió la viabilidad bacteriana, pero generó dos sesgos críticos. Primero, la distribución resultó altamente variable; las macrocápsulas de alginato, al depositarse manualmente, crearon micro-zonas con carga bacteriana excesiva y otras sin colonización, lo que elevó los coeficientes de variación por encima de 40 % en área y volumen radicular. En segundo lugar, un poco homogeneidad lumínica directamente hacia el tratamiento S, hizo que el resultado fuera un rendimiento errático: aunque duplicó el peso seco aéreo respecto al testigo, no mejoró los parámetros

radiculares ni la estabilidad hídrica, lo que puso en duda la solidez de aquella ventaja inicial.

Estos inconvenientes muestran que un error metodológico puede distorsionar la percepción del efecto biológico. La alta dispersión de los datos y la interferencia lumínica posiblemente enmascararon tanto los beneficios potenciales de P como las limitaciones reales de R. Lo que sugiere que parte de la aparente superioridad de S fue producto de un crecimiento vegetal acelerado por luces externas al sistema desarrollado y no de una colonización bacteriana homogénea.

4.2. Ensayo 2: inoculación por priming

Para resolver los problemas metodológicos observados en el primer ensayo, se rediseñó por completo el protocolo de inoculación. Se eliminó la aplicación directa de las macrocápsulas y se adoptó una estrategia basada en priming bacteriano. El priming de semillas es una técnica pregerminativa que mejora la tolerancia al estrés hídrico al inducir una germinación más rápida y sincronizada mediante la regulación temprana de procesos metabólicos críticos (Hussain *et al.*, 2017). Esta práctica ha demostrado aumentar la uniformidad de emergencia al reducir el tiempo necesario para la imbibición (Brocklehurst *et al.*, 1983), potenciar la activación de enzimas clave en la germinación, favorecer la acumulación de metabolitos funcionales (Hussain *et al.*, 2016) y modular el equilibrio osmótico de los tejidos. Esta metodología aseguró una concentración bacteriana homogénea

(10^8 UFC mL⁻¹); adicionalmente, se aplicó una segunda inoculación a lo largo de la línea de siembra, garantizando un suministro sostenido. Esta modificación redujo radicalmente la variabilidad interna, aseguró que cada semilla germinada recibiese una carga equivalente y evitó los puntos de colonización excesiva. Al mismo tiempo, B fue descartada por su posible toxicidad debido la liberación bacteriana prolongada no estandarizada y el bajo rendimiento expuesto para el Ensayo 1.

4.3. Respuesta en biomasa

Con la metodología mejorada, P emergió como la cepa más robusta. Mantener 2,65 g de biomasa fresca y 0,67 g de biomasa seca, revela su habilidad para amortiguar la deshidratación sin generar penalizaciones en crecimiento. Este rendimiento puede atribuirse a (i) su rápido establecimiento en la rizosfera tras el priming, (ii) la producción de osmoprotectores (prolina, glicina-betaína) que reducen el potencial hídrico celular (Ansari *et al.*, 2023) y (iii) la inducción de enzimas antioxidantes que limitan la peroxidación lipídica (Li *et al.*, 2002). R en contraste, promedió solo 0,40 g de biomasa fresca, sugiriendo que su colonización tardía no satisfizo los picos de demanda osmótica. S mostró ganancias discretas, lo que confirma que su mejor momento ocurrió en el primer ensayo y dependió de la metodología de inoculación sumado a los estímulos lumínicos externos.

4.4. Arquitectura radicular

Las fotografías de WinRHIZO y las métricas de área–volumen se refuerzan mutuamente. En el Ensayo 2, el esquema de priming permitió que P colonizara la cofia y los pelos radiculares en las primeras 48 horas; las imágenes muestran un entramado denso y muy ramificado que se tradujo en las mayores medianas cuantificadas (62 cm² de área y 2,8 cm³ de volumen), superando incluso a T (40 cm²; 1,9 cm³). C presentó raíces algo menos compactas y valores intermedios (32 cm²; 1,1 cm³), mientras que S y, sobre todo, R exhibieron entramados finos y poco ramificados acordes con sus bajas cifras (S: 18 cm²; 0,6 cm³ > R: 10 cm²; 0,1 cm³). Este gradiente confirma que el acceso al agua está directamente ligado tanto a la superficie proyectada como al volumen radicular. Por contraste, en el Ensayo 1, donde S y el resto de las cepas se liberaban gradualmente desde macrocápsulas, la colonización tardía impidió alcanzar semejante expansión radicular, subrayando que liberar las bacterias durante la germinación (priming) es decisivo para consolidar un sistema de raíces capaz de explorar el sustrato bajo déficit hídrico prolongado. La superioridad de P concuerda con el aumento del 38 % en área radicular reportado para esta especie en maíz (Li *et al.*, 2024), apuntando a un mecanismo conservado que se activa plenamente solo cuando la bacteria está presente desde el inicio del ciclo de vida de la planta.

4.5. Partición de materia seca: equilibrio hídrico y reservas carbonadas

El análisis conjunto de LDMC y RDMC evidencia cómo cada cepa balancea la retención hídrica foliar y las reservas subterráneas. R y C registraron los LDMC más altos (310 y 300 mg g⁻¹, respectivamente), generando hojas densas que limitan la pérdida de agua; sin embargo, ambos mantuvieron los RDMC más bajos (115 mg g⁻¹), de modo que la mayor protección foliar se obtuvo a costa de una raíz con escasas reservas. En el extremo opuesto, S mostró el LDMC más bajo (155 mg g⁻¹) y un RDMC intermedio, revelando tejidos foliares livianos, pero con limitada capacidad de almacenamiento. Destacó P, que combinó un LDMC moderado (260 mg g⁻¹) con el RDMC más alto (140 mg g⁻¹), rasgos consistentes con una estrategia de “ahorro flexible” capaz de equilibrar disipación de agua en la hoja y reservas carbonadas en la raíz (Cenzano *et al.*, 2018). Esta configuración, junto con su producción reportada de osmólitos y exopolisacáridos protectores (Umrao *et al.*, 2024), explica la resiliencia de P al déficit hídrico, en contraste con la vulnerabilidad de *Rahnella* sp., que concentra masa seca en la lámina foliar sin respaldarla con reservas radiculares suficientes.

4.6. Efecto de alginato en plantas

Además del efecto de las PGPR, un hallazgo consistente fue el desempeño del tratamiento C (macrocápsulas sin bacterias), que superó a T y a cepas como R y

S en pruebas de LDMC y datos de longitud, diámetro de tallo, número de hojas y volumen radicular. La gelificación de las macrocápsulas con CaCl_2 produce una red de Ca-alginato que funciona como hidrogel (retiene y libera agua de forma gradual) y puede aportar Ca^{2+} a nivel local, favoreciendo la integridad de la pared celular, regular el desarrollo de la planta y la señalización bajo estrés. Estos efectos físico-químicos del alginato, aun sin bacterias, podrían explicar que el Control superara al testigo y a tratamientos con cepas menos compatibles.

4.7. Desarrollo reproductivo y rasgos de tallo

El desempeño reproductivo es el mejor predictor de utilidad agronómica. Sólo bajo el protocolo de priming se alcanzó 80 % de espigación con P, frente a la nula floración de R y la modesta de S. P prolongó la fase vegetativa, produjo tallos de 32 cm (10 cm más que el testigo), diámetros de 0,44 cm y mayor número de hojas, lo que respalda que la cepa modula auxinas y citocininas para retrasar la senescencia y asegurar la transición a la fase reproductiva (Bhattacharyya & Jha, 2012). Este hallazgo confirma que los beneficios de una PGPR no se limitan a la biomasa temprana, sino que influyen en etapas determinantes para el rendimiento final.

4.8. Interacción entre origen ecológico y estrategia de inoculación

La comparación entre ensayos demuestra que la eficacia de una PGPR no es un atributo fijo, sino la suma de su nicho de origen, la interacción con la planta y la tecnología de inoculación utilizada. El priming, que libera las bacterias en las primeras 48 h de germinación, redujo la variabilidad experimental y evidenció la superioridad de P. Esta cepa, aislada de la ladera norte de Nevados de Chillán, está acostumbrada a suelos pedregosos, alta radiación y grandes oscilaciones térmicas; condiciones muy similares al trigo de secano. No sorprende, entonces, que P mantuviera la mayor biomasa, la arquitectura radical más robusta y un 80% de espigación, reforzando la idea de que su origen confiere una resiliencia innata a la sequía prolongada. Por contraste, S proviene de Polcura, también en ladera norte, pero a menor altitud y con una humedad estacional más marcada. Su desempeño fue sobresaliente únicamente bajo la liberación tardía de macrocápsulas del Ensayo 1 y con un estímulo lumínico adicional, lo que sugiere que esta cepa prospera cuando la sequía es moderada y la fluctuación de luz y temperatura es más suave. Al pasar al priming, su ventaja se diluyó, evidenciando que la sincronía entre liberación bacteriana y condiciones ambientales es crítica para expresar su potencial.

El fracaso de B, aislado de la ladera sur de los Nevados, fresca y sombreada, resalta la misma premisa. Su metabolismo, adaptado a suelos húmedos y fríos,

liberó compuestos volátiles fitotóxicos en el régimen cálido-seco del experimento, perjudicando a los individuos; de ahí su exclusión. Del mismo modo, R, procedente de la ladera oeste (expuesta a vientos húmedos), concentró masa seca en hojas densas (LDMC 310 mg g⁻¹) pero exhibió raíces poco reservantes (RDMC115 mg g⁻¹), estrategia útil en ambientes con alta humedad atmosférica pero ineficiente en el trigo seco, donde la captación hídrica subterránea es esencial.

Estos hallazgos subrayan que antes de recomendar un inoculante se deben auditar tanto el protocolo de aplicación como el lugar de aislamiento de la cepa: aislados de laderas áridas y soleadas, como P, muestran mayor compatibilidad con cultivos de seco, mientras que cepas de microhábitats húmedos pueden fracasar si no se ajustan las condiciones de uso.

V. CONCLUSIONES

La capacidad de las PGPR para atenuar la sequía en *T. aestivum* depende ante todo de la interacción cepa-planta y de colonizar tempranamente la rizosfera. Bajo un esquema de inoculación que favoreció esa colonización inicial (priming), el potencial de cada cepa se expresó con claridad. Destacó *Peribacillus simplex*, que sostuvo la biomasa fresca y seca, conservó un sistema radicular denso y un perfil hídrico-estructural equilibrado, y alcanzó 80 % de espigación con tallos más largos y robustos. En comparación, *Rahnella* sp. evidenció establecimiento más tardío y desarrollo radicular limitado, mientras *Streptomyces virginiae* mostró ganancias discretas cuando la inoculación se estandarizó.

Formulado para priming, *P. simplex* se proyecta como un bioinoculante valioso para viveros y siembras de trigo en zonas semiáridas; no obstante, su aporte debe validarse en ensayos multisitio que contemplen distintos microbiomas, suelos y regímenes de riego. Además, resulta crucial evaluar la viabilidad y el vigor de las semillas de la generación siguiente para determinar si la resiliencia hídrica inducida se hereda. Solo así se confirmará el verdadero potencial de *P. simplex* como herramienta sostenible frente a la escasez hídrica que desafía a la agricultura chilena.

GLOSARIO

- AFE (Área Foliar Específica): Relación entre el área de la hoja y su masa seca, expresada en $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, indicador de la eficiencia fotosintética y el uso de recursos.
- Espiga: Estructura reproductiva del trigo donde se desarrollan los granos; conjunto de flores (espiguillas) alineadas en el raquis.
- ISP2 (Inoculum Selective Plate 2): Medio sólido de cultivo rico en nutrientes (peptona, extracto de levadura, glucosa) usado para aislar y cuantificar bacterias PGPR.
- LDMC (Leaf Dry Matter Content): Proporción de materia seca en la hoja, calculada como $\text{peso seco} \cdot 100 / \text{peso fresco}$, medida en $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; refleja la inversión de carbono y la resistencia al estrés.
- PBS (Phosphate-Buffered Saline): Solución tamponada de fosfatos ($\text{pH} \approx 7,4$) utilizada para resuspender y lavar células sin alterar su fisiología.
- PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria): Bacterias rizosféricas que, mediante mecanismos directos (fijación de nitrógeno, producción de

fitohormonas) o indirectos (competencia con patógenos), mejoran el crecimiento vegetal.

- Priming: Estado de “preparación” inducido en la planta por estímulos (microbianos o químicos) que fortalece respuestas defensivas y de tolerancia a futuros estreses.

- RDMC (Root Dry Matter Content): Proporción de materia seca en la raíz, calculada como $\text{peso seco} \cdot 100 / \text{peso fresco}$, expresada en $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$; indica dureza celular y reserva de carbohidratos.

- SPAD: Índice de clorofila medido con un medidor SPAD (Unidad SPAD), correlaciona la absorbancia de la hoja con su concentración de clorofila y el estado nutricional.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera-Torres, C., Riveros, G., Morales, L. V., Sierra-Almeida, A., Schoebitz, M., & Hasbún, R. (2023, 2023-January-18). Relieving your stress: PGPB associated with Andean xerophytic plants are most abundant and active on the most extreme slopes [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, Volume 13 - 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1062414>
- Ahmad Ansari, F., Ahmad, I., & Pichtel, J. (2023, 2023/06/01/). Synergistic effects of biofilm-producing PGPR strains on wheat plant colonization, growth and soil resilience under drought stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(6), 103664. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103664>
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008, 2008/03/15/). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
- Benítez, S. V., Carrasco, R., Bucarey, B., Noriega, F., López-Belchi, M. D., Hasbún, R., Giraldo, J. D., & Schoebitz, M. (2025, 2025/08/01/). Solid inoculants: Bacterial immobilization routes on the degradation in the soil of alginate-starch-based biofertilizers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 320, 145909. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.145909>
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012, 2012/04/01). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- BROCKLEHURST, P. A., & DEARMAN, J. (1983). Interactions between seed priming treatments and nine seed lots of carrot, celery and onion. II.

Seedling emergence and plant growth. *Annals of Applied Biology*, 102(3), 585-593. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1983.tb02730.x>

Brunetti, C., Saleem, A. R., Della Rocca, G., Emiliani, G., De Carlo, A., Balestrini, R., Khalid, A., Mahmood, T., & Centritto, M. (2021, 2021/04/10/). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria strains producing ACC deaminase on photosynthesis, isoprene emission, ethylene formation and growth of *Mucuna pruriens* (L.) DC. in response to water deficit. *Journal of Biotechnology*, 331, 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.03.008>

Budak, H., Kantar, M., & Yucebilgili Kurtoglu, K. (2013). Drought Tolerance in Modern and Wild Wheat. *The Scientific World Journal*, 2013(1), 548246. <https://doi.org/10.1155/2013/548246>

Cenzano, A. M., Reginato, M., Varela, M. C., & Luna, M. V. (2018). Absciscic acid and its metabolites are involved in drought tolerance in four native species of Patagonian semiarid shrublands (Argentina). *Australian Journal of Botany*, 66(8), 589-600. <https://doi.org/10.1071/BT18049>

Cui, Y., Ouyang, S., Zhao, Y., Tie, L., Shao, C., & Duan, H. (2022). Plant responses to high temperature and drought: A bibliometrics analysis. *Front Plant Sci*, 13, 1052660. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1052660>

Curá, J. A., Franz, D. R., Filosofía, J. E., Balestrasse, K. B., & Burgueño, L. E. (2017). Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria Increases the Tolerance of Maize to Drought Stress. *Microorganisms*, 5(3), 41. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030041>

Hernández-Montiel, L. G., Chiquito Contreras, C. J., Murillo Amador, B., Vidal Hernández, L., Quiñones Aguilar, E. E., & Chiquito Contreras, R. G. (2017). Efficiency of two inoculation methods of *Pseudomonas putida* on growth

and yield of tomato plants. *Journal of soil science and plant nutrition*, 17, 1003-1012. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000400012>

Hussain, M., Farooq, M., & Lee, D.-J. (2017). Evaluating the role of seed priming in improving drought tolerance of pigmented and non-pigmented rice. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 203(4), 269-276. <https://doi.org/10.1111/jac.12195>

Hussain, S., Khan, F., Hussain, H. A., & Nie, L. (2016, 2016-February-09). Physiological and Biochemical Mechanisms of Seed Priming-Induced Chilling Tolerance in Rice Cultivars [Original Research]. *Frontiers in Plant Science*, Volume 7 - 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00116>

Jouzani, G. S., Valijanlian, E., & Sharafi, R. (2017, 2017/04/01). *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(7), 2691-2711. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8175-y>

Li, G., Shi, M., Wan, W., Wang, Z., Ji, S., Yang, F., Jin, S., & Zhang, J. (2024, Oct 10). Maize Endophytic Plant Growth-Promoting Bacteria *Peribacillus simplex* Can Alleviate Plant Saline and Alkaline Stress. *Int J Mol Sci*, 25(20). <https://doi.org/10.3390/ijms252010870>

Li, M., & Wang, G. (2002). Effect of Drought Stress on Activities of Cell Defense Enzymes and Lipid Peroxidation in *Glycyrrhiza uralensis* Seedlings. *Acta Ecologica Sinica*, 22, 503-507. <https://doi.org/10.1134/S1021443718020127>

Luna-Flores, W., Estrada-Medina, H., Morales-Maldonado, E., & Álvarez Rivera, O. (2023, 03/31). ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO EN PLANTAS: UNA REVISIÓN. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 31(1), 61-69. <https://revistas.udec.cl/index.php/chjaas/article/view/10498>

- Mashabela, M. D., Tugizimana, F., Steenkamp, P. A., Piater, L. A., Dubery, I. A., & Mhlongo, M. I. (2022, 2022-August-25). Untargeted metabolite profiling to elucidate rhizosphere and leaf metabolome changes of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) treated with the plant growth-promoting rhizobacteria *Paenibacillus alvei* (T22) and *Bacillus subtilis* [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, Volume 13 - 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.971836>
- Mitra, D., Mondal, R., Khoshru, B., Shadangi, S., Das Mohapatra, P. K., & Panneerselvam, P. (2021, 2021/12/01/). Rhizobacteria mediated seed bio-priming triggers the resistance and plant growth for sustainable crop production. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100071. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100071>
- Nations, F. a. A. O. o. t. U. (2024). *Nota informativa de la FAO sobre la oferta y demanda de cereales. Situación Alimentaria Mundial*. <https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>
- Neshat, M., Abbasi, A., Hosseinzadeh, A., Sarikhani, M. R., Dadashi Chavan, D., & Rasoulnia, A. (2022, Feb). Plant growth promoting bacteria (PGPR) induce antioxidant tolerance against salinity stress through biochemical and physiological mechanisms. *Physiol Mol Biol Plants*, 28(2), 347-361. <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01128-0>
- Reyes-Castillo, A., Gerding, M., Oyarzúa, P., Zagal, E., Gerding, J., & Fischer, S. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria able to improve NPK availability: selection, identification and effects on tomato growth. *Chilean journal of agricultural research*, 79, 473-485. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392019000300473>
- Rizvi, A., Zaidi, A., Ameen, F., Ahmed, B., AlKahtani, M. D. F., & Khan, M. S. (2020). Heavy metal induced stress on wheat: phytotoxicity and microbiological management. *RSC Advances*, 10(63), 38379-38403. <https://doi.org/10.1039/D0RA05610C>

- Rocha, I., Souza-Alonso, P., Pereira, G., Ma, Y., Vosátka, M., Freitas, H., & Oliveira, R. S. (2020). Using microbial seed coating for improving cowpea productivity under a low-input agricultural system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(3), 1092-1098. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.10117>
- Ruiz Espinoza, F. H., Marrero Labrador, P., Cruz La Paz, O., Murillo Amador, B., & García Hernández, J. L. (2008). Influencia de los factores agroclimáticos en la productividad de albahaca (*Ocimum basilicum* L .) en una zona árida de Baja California Sur, México. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 17(1), 44-47. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93217109>
- Samain, E., Duclercq, J., Ait Barka, E., Eickermann, M., Ernenwein, C., Mazoyon, C., Sarazin, V., Dubois, F., Aussenac, T., & Selim, S. (2023). PGPR-Soil Microbial Communities' Interactions and Their Influence on Wheat Growth Promotion and Resistance Induction against *Mycosphaerella graminicola*. *Biology*, 12(11), 1416. <https://doi.org/10.3390/biology12111416>
- Simarmata, R., Ngadiman, & Rohman, M. S. (2021, 2021/08/12). Bacterial Coating on Seeds as a Potential Application of Bio-inoculants. Proceedings of the 10th International Seminar and 12th Congress of Indonesian Society for Microbiology (ISISM 2019). <https://doi.org/10.2991/absr.k.210810.032>
- Tugizimana, F., Steenkamp, P. A., Piater, L. A., Labuschagne, N., & Dubery, I. A. (2019). Unravelling the Metabolic Reconfiguration of the Post-Challenge Primed State in *Sorghum bicolor* Responding to *Colletotrichum sublineolum* Infection. *Metabolites*, 9(10), 194. <https://doi.org/10.3390/metabo9100194>

Umrao, V., Yadav, S., Semwal, P., Misra, S., Mishra, S. K., Chauhan, P. S., & Shirke, P. A. (2024, 2024/10/01). Endophytic bacilli from *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. induces plant growth and drought tolerance. *International Microbiology*, 27(5), 1541-1556. <https://doi.org/10.1007/s10123-024-00499-6>

Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2020, Jan). Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Rep*, 39(1), 3-17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>