

Bioestimulantes promotores del crecimiento vegetal en condiciones de estrés abiótico. La glicina betaína frente al estrés por sequía

Biostimulant plant growth promoters under abiotic stress conditions. Glycine betaine against drought stress



Trabajo de Fin de Grado

AGUSTÍN HERNÁNDEZ CHINEA

Tutorizado por Juan Cristo Luis Jorge y Jaime Puértolas Simón

Grado en Biología. Junio 2023

Índice

Resumen	3
1. Introducción	4
1.1. La demanda alimenticia del S. XXI	4
1.2. Cambio climático y sequía	5
1.3. Frente de batalla: bioestimulantes vegetales	7
1.4. Glicina betaína.....	9
1.4.1. Biosíntesis y transporte de la glicina betaína	9
1.4.2. Glicina betaína y sequía	10
2. Objetivos	11
3. Material y métodos.....	12
3.1. Ensayo I. Efecto de la glicina betaína frente a déficit hídrico en semillero.....	12
3.1.1. Material vegetal y cultivo.....	12
3.1.2. Selección de la dosis de GB en condiciones de semillero.....	12
3.1.1. Pesado de las muestras vegetales	13
3.2. Ensayo II. Efectos de la aplicación de GB en condiciones sequía.....	14
3.2.1. Preparación del sustrato	14
3.2.2. Riego y administración de GB en el material vegetal.....	14
3.2.3. Análisis del crecimiento, fotosíntesis, potencial osmótico y potencial hídrico ...	15
3.4. Análisis estadístico	16
4. Resultados	17
4.1. Ensayo I. Efecto de la glicina betaína frente al déficit hídrico en semillero.....	17
4.1.1. Selección de la dosis de GB en condiciones de semillero.....	17
4.2. Ensayo II. Efecto de la glicina betaína frente a la sequía en maceta.....	18
4.2.1. Análisis del crecimiento	18
4.2.2. Mediciones edáficas	18
4.2.3. Ecofisiología de la planta	20
5. Discusión	21
6. Conclusiones	24
7. Bibliografía.....	25

Resumen

Con los condicionantes actuales de aumento demográfico y cambio climático, es de gran interés encontrar formas de mejorar la resiliencia de las plantas a la sequía. La glicina betaína es uno de los bioestimulantes vegetales más estudiados hasta la fecha y su uso contra la sequía es objeto de estudio en el presente trabajo. La aplicación del bioestimulante se realizó vía radicular a distintas concentraciones y frecuencias. Se cultivaron plantas de tomate en semilleros y macetas, sometidas a riego deficitario y ausencia de riego respectivamente. El peso seco de las plantas no fue significativamente diferente entre plántulas del grupo control y del grupo con estrés; indicando que el producto no aumentó el crecimiento vegetal frente al riego deficitario. La fisiología vegetal durante la sequía se vio significativamente empeorada. El potencial hídrico y el peso del sustrato, la fotosíntesis, el potencial osmótico y hídrico, disminuyeron en plantas sometidas a sequía; demostrando el impacto negativo del estrés abiótico en la plantas. En vistas generales, la glicina betaína aplicada radicularmente no mejora el desarrollo vegetal. Es necesaria más investigación para comprender su rol como bioestimulante vegetal y su efectividad frente a la sequía a través de las raíces.

Palabras clave: bioestimulante vegetal, sequía, cambio climático, glicina betaína, tomate, radicular

Abstract

With the current challenges of population growth and climate change, it is of great interest to find ways to improve the resilience of plants to drought. Glycine betaine is one of the most studied plant biostimulants to date and its use against drought is subject of study in this work. The application of the biostimulant was carried out via root at different concentrations and frequencies. Tomato plants were grown in seedbeds and pots, subjected to deficit irrigation and absence of irrigation respectively. Plant dry weight was not significantly different between seedlings of the control group and the group with stress; indicating that the product did not increase plant growth under deficit irrigation. Plant physiology during the drought was significantly worsened. The water potential and the weight of the substrate, photosynthesis, osmotic and water potential, decreased in plants subjected to drought, demonstrating the negative impact of abiotic stress on plants. In general, radicular applied glycine betaine does not improve plant development. More research is needed to understand its role as a plant biostimulant and its effectiveness against drought through the roots.

Keywords: plant biostimulants, drought, climate change, glycine betaine, tomato, radicular

1. Introducción

La agricultura y la producción agrícola son elementos indispensables en la economía global y el bienestar de la población mundial. Durante el siglo XX, diversos avances en esta disciplina, apoyados por el desarrollo tecnológico y científico de la época, permitieron el correcto ajuste a la demanda de la población (Liu et al., 2021). Actualmente, este modelo de agricultura no cumple con la relación producción-demanda, y la incertidumbre frente a este hecho aumenta cada vez más. Por un lado, la población mundial acaba de superar la cifra de los 8 mil millones de habitantes en el planeta, según el último informe presentado por las Naciones Unidas (Naciones Unidas, 2022). Y por la otra parte, se encuentra la emergencia climática actual, cada vez más crítica y que se establece como el principal reto a superar por la humanidad en lo que resta de siglo (Anamika et al., 2021).

1.1. La demanda alimenticia del S. XXI

El pensamiento general sobre el hambre en el mundo considera que ha tendido a reducirse e incluso desaparecer (van Dijk et al., 2021). Sin embargo, se ha vuelto a valores de décadas pasadas. Cada vez son más las personas que no tienen acceso a una alimentación de calidad (FAO, 2018). Las necesidades de una población cuyas cifras exceden la capacidad de producción dificultan la tarea, y la presencia de un condicionante climático, no hace más que empeorar la situación y crear más desigualdad entre grupos sociales y geográficos (European Commission, 2018).

La demanda actual, sumada al abandono y/o deterioro de los terrenos agrícolas, han conllevado a la masificación y concentración de superficies productoras que no serán capaz de paliar el problema (Prishchepov et al., 2021). Además, la disponibilidad y acceso a alimentos que constituyan una dieta variada ha mermado para aquellos cuya agricultura se ha visto desestabilizada por la afección climática. La gravedad de la situación pone en jaque la seguridad alimentaria y perjudica la producción agrícola (Leisner, 2020).

El ritmo de crecimiento poblacional mundial se sitúa alrededor de un 1,1 % por año. Se predice que, manteniéndose esta tendencia, la población total del planeta llegará a 9,7 mil millones en 2050 (Gerland et al., 2014). Asimismo, son aquellas regiones con un mayor aumento demográfico, las que presentan limitaciones para acceder a tecnologías de sostenibilidad y producción alimentaria competentes. A este hecho se suman la reducida inversión económica y la pobre situación climática en estos territorios; pudiendo conllevar a la aparición de

hambrunas o el abandono de estas regiones junto a grandes migraciones poblacionales (Adam, 2021).

1.2. Cambio climático y sequía

La predicción de varios autores estima que el problema del crecimiento demográfico no va a ser tan devastador en la agricultura. El principal foco al que los científicos señalan, en relación con el daño agrícola, es el cambio climático, y en específico, los fenómenos de sequía y altas temperaturas (Gupta et al., 2020).

El cambio climático altera de forma sistemática, la probabilidad de periodos de lluvia y calor, así como su gravedad y magnitud. La sucesión espaciotemporal de estas alteraciones conduce a daños ecológicos y socioeconómicos de gran importancia (Mohammad et al., 2020). Este hecho queda respaldado por el aumento, en las últimas décadas, de las olas de calor y procesos de sequía en muchas regiones del planeta; contribuyendo a la mortalidad vegetal y animal, incendios forestales y pérdidas de cosechas (He et al., 2022).

Durante el crecimiento y desarrollo vegetal, las plantas son altamente sensibles a las variaciones climáticas. Una menor disponibilidad de agua sumado al posible estrés térmico y de radiación, limitan la capacidad de desarrollo y productividad de los cultivos (Vogel et al., 2019). Por otro lado, la fisiología y bioquímica también se ven modificadas, limitando procesos esenciales como la fotosíntesis y estimulando otros como la respiración (Sharma et al., 2020). Sin embargo, las plantas presentan estrategias para evitar la pérdida de agua, establecer un suministro óptimo de la misma y mantener el contenido hídrico celular durante los periodos de sequía. Esta capacidad para detectar la señal de déficit hídrico e iniciar estrategias de adaptación se define como resistencia a la sequía (Bandurska, 2022). Algunas de las respuestas de las plantas frente a la sequía son:

Cambios en la concentración de fitohormonas → las plantas producen fitohormonas como giberelinas, citoquininas, auxinas y ácido abscísico para su crecimiento y desarrollo. El estrés abiótico, como la sequía, provoca alteraciones en los niveles de estas fitohormonas (Anamika et al., 2021). El ácido abscísico (ABA), es la principal fitohormona que regula la respuesta de las plantas a la deshidratación y optimiza el uso del agua (Gupta et al., 2020). Las señales de pérdida de agua desembocan la producción e incremento local de ABA en diferentes órganos de la planta, siendo su producción más eficiente en las células mesófilas foliares que en los tejidos radiculares (McAdam y Brodribb, 2018). Además de la regulación en la apertura estomática, el aumento de la concentración de ABA, interfiere en procesos como la senescencia

de las hojas, latencia de las yemas, germinación de las semillas, regulación osmótica e inhibición del crecimiento, entre otras muchas (Mukherjee et al., 2023).

Sistema antioxidante → la respuesta inmediata en plantas frente a la sequía es el cierre estomático para minimizar la pérdida de agua debida a la transpiración (Gong et al., 2020). Debido a que la fotosíntesis sigue en curso en condiciones de luz, se produce el agotamiento de la concentración intercelular de dióxido de carbono (CO_2), estimulando la oxigenación de la ribulosa-1,5-bisfosfato y, por tanto, la producción fotorrespiratoria de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en los peroxisomas (Gupta et al., 2021). La menor disponibilidad de CO_2 como aceptor de electrones frena la oxidación del NADPH en el ciclo de Calvin. Se produce una acumulación de electrones y una disminución en su transporte fotosintético, lo que a su vez aumenta la tasa de reducción del oxígeno como aceptor alternativo de electrones en el fotosistema I (PSI) y una mayor liberación de anión superóxido (Laxa et al., 2019). Las plantas mantienen las ROS (especies reactivas de oxígeno) y su toxicidad bajo control mediante un sistema de eliminación eficaz y versátil. La defensa antioxidante comprende compuestos de bajo peso molecular como glutatión (GSH), ascorbato (ASC), carotenoides y enzimas como la catalasa (CAT) y la Superóxido dismutasa (SOD) (Gan et al., 2018).

Osmorregulación → los osmolitos son moléculas de pequeño peso molecular, carga eléctrica neutra, no tóxicas y que protegen las membranas y las proteínas frente a procesos de desnaturalización; son acumuladas en los compartimentos citoplasmáticos y cruciales en la preservación de la turgencia celular (Ozturk et al., 2021). Una de las respuestas inmediatas de las plantas es el ajuste osmótico mediante la producción y almacenamiento de estos compuestos (Jiménez-Arias et al., 2020). Algunos ejemplos son los carbohidratos, proteínas solubles, aminoácidos libres como la prolina o las betaínas; todos capaces de incrementar el potencial osmótico. (Farooq et al., 2020)

Descenso en la tasa de transpiración → la fotosíntesis es muy sensible al estrés por sequía. La respuesta inmediata en las plantas es la disminución de la transpiración (Hatfield y Dold, 2019). Se limita la pérdida de agua, pero también se reduce la absorción de CO_2 . De esta forma, el ATP/NADPH y la reserva local de carbohidratos, utilizados para mitigar los efectos inducidos por la sequía, están en menor disponibilidad para otros procesos fisiológicos esenciales como la fotosíntesis (Sharma et al., 2020). El suministro de CO_2 ha de mantenerse constante para evitar la inhibición fotosintética completa, retrasos en el crecimiento o aumentar en la respiración celular (Bandurska, 2022).

Alteraciones en el crecimiento → a medida que las condiciones de sequía empeoran, el agotamiento gradual del agua en el suelo provoca un desequilibrio en el crecimiento de la planta, estimulando el sistema radicular y disminuyendo el desarrollo de brotes (Ahluwalia et al., 2021). Las raíces son las primeras en percibir las condiciones de sequía que se avecinan y ponen en marcha la respuesta primaria de la planta adaptándose a maximizar la absorción de agua y nutrientes (Zhang et al., 2019). No sólo se limitan al aumento en tamaño radicular, sino a procesos de expresión de acuaporinas, concentración de fitohormonas como el ABA o la asociación con micorrizas (Gupta et al., 2020).

1.3. Frente de batalla: bioestimulantes vegetales

Existen diversas herramientas para combatir la sequía; los sistemas de riego, que regulan no sólo el suministro de agua, sino la periodicidad con la que se abastecen los cultivos. Otras, que involucran el uso de agentes químicos como los fertilizantes o abonos; presentan ciertos riesgos de cara a preservar la calidad del suelo. Y, por último, técnicas más avanzadas como la edición genética para la obtención de plantas transgénicas resistentes a la sequía. Sin embargo, existe un campo emergente de productos que no presentan inconvenientes bioéticos y/o medioambientales, son los denominados bioestimulantes vegetales (Yakhin et al., 2017).

Alrededor de 1500 artículos científicos han sido publicados desde 2018 bajo el término de “bioestimulantes vegetales” (Web of Science, 2023) (**Figura 1**). Los bioestimulantes (BS) no son nutrientes en sí, sino mediadores en la fisiología de las plantas que, facilitan la absorción de nutrientes, promueven el crecimiento, la resistencia frente estreses, entre otros procesos (García-García et al., 2020). Su mercado global no para de crecer, con estimas de en torno a 4,14 mil millones de dólares para 2025; encontrándose en el punto de mira dentro de la industria agroquímica y la agricultura moderna (Jiménez-Arias et al., 2021).

La definición del bioestimulante ha variado numerosas ocasiones. En la literatura científica no se mencionan por primera vez hasta el año 2007, y en la actualidad se definen según la (UE, 2019) como: “producto que estimula los procesos de nutrición de las plantas independientemente de su contenido en nutrientes, con el único objetivo de mejorar una o más de las siguientes características de la planta o de la rizosfera: (a) eficiencia en el uso de nutrientes; (b) tolerancia al estrés abiótico; (c) rasgos de calidad; o (d) disponibilidad de nutrientes confinados en el suelo o la rizosfera”. Clasificar estos productos siempre ha sido difícil debido a su naturaleza variada, sin embargo, una de las clasificaciones más aceptadas es la elaborada por (du Jardin, 2015), estableciendo siete categorías: Húmicos/Fúlvicos, Extractos

de algas/botánicos, Hidrolizados de proteínas, Biopolímeros, Minerales beneficiosos, Bacterias y Hongos beneficiosos. Mientras que otros autores como (Bulgari et al., 2019) complementan la anterior con otra categoría y que incluiría extractos de residuos industriales o alimentarios, agrupando a su vez a los nanomateriales y nanopartículas en la categoría de biopolímeros.

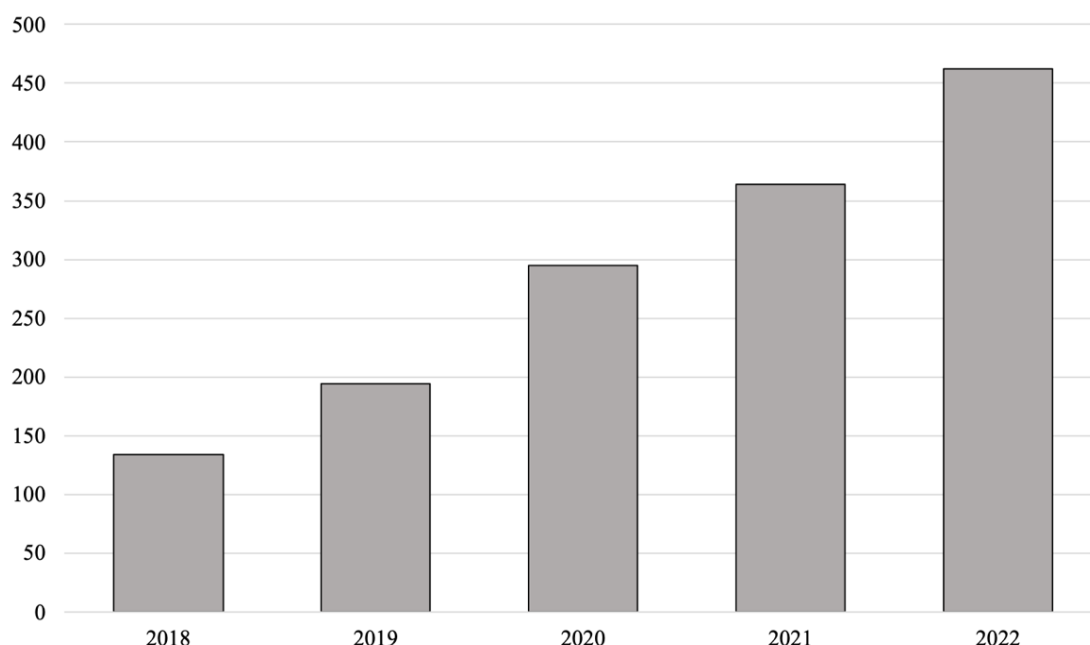


Figura 1 Gráfica comparativa del número de búsquedas bajo el término "bioestimulantes vegetales" en los últimos cuatro años (Web of Science, 2023). Cada columna corresponde al número de artículos científicos publicados por años

El estrés abiótico en plantas, propiciado por la interacción de estas con un entorno adverso es uno de los pilares fundamentales en la relación de estos organismos con el medioambiente (Gong et al., 2020). Es necesario recalcar que los bioestimulantes en plantas únicamente actúan como detonantes en procesos naturales propios, y que la concentración a la que actúan es relativamente pequeña, consiguiendo aumentar la tolerancia de las plantas frente a estos estímulos (García-García et al., 2020). Su aplicación, ya sea como tratamiento para semillas, spray foliar o inoculación radicular, supone el paso inicial para desembocar la respuesta en la planta (Yakhin et al., 2017).

Tabla 1. Bioestimulantes: aplicación, respuestas y beneficios en plantas.

	Respuesta fisiológica	Beneficios
Crecimiento y producción	<ul style="list-style-type: none"> - Incremento de la actividad fotosintética - Mejora en la eficiencia nutricional - Estimulación del metabolismo secundario - Incremento de la actividad radicular (Rizobacterias y micorrizas) 	<ul style="list-style-type: none"> Incremento en la biomasa Floración temprana Aumento del poder antioxidante

	<p>Acumulación de osmolitos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prolina - Sorbitol - Glicina betaína <p>Mejora en la eficiencia del uso del agua:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Reducción de la transpiración - Mejora en el intercambio gaseoso estomático - Cambios en el ratio de crecimiento en tallos y raíces - Incremento de los compuestos antioxidantes y protección frente radicales libres 	<p>Tolerancia a:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estrés salino - Estrés hídrico - Estrés térmico - Deficiencias nutricionales - Sustancias tóxicas - Anoxia - Defensa frente patógenos
Estrés abiótico		
Nutricional	<p>Aumento en la asimilación del nitrógeno</p> <p>Activación de metabolismo secundario</p>	<p>Aumento de pigmentos</p> <p>Concentración de fenoles</p> <p>Descenso en nitratos</p>

1.4. Glicina betaína

La glicina betaína es aparte de la prolina, el principal osmolito compatible natural en plantas y se relaciona con la tolerancia al estrés salino y estrés hídrico (Husen, 2021). Químicamente, denominada N,N,N-trimetilglicina (GB), es un N-metil derivado de la glicina. De carácter dipolar, pero eléctricamente neutro a pH fisiológico (Rhodes y Hanson, 1993). Son varias las especies halófitas y especies agrícolas como poáceas, las capacitadas de sintetizar y acumular GB en condiciones de estrés. De esta forma, puede establecerse una clasificación en función de su habilidad para sintetizar y almacenar este metabolito (Hamani et al., 2021).

1.4.1. Biosíntesis y transporte de la glicina betaína

En las plantas, la síntesis de GB (**Figura 3**) comienza a partir de la colina, que, a su vez, se sintetiza a través de tres metilaciones secuenciales dependientes de la adenosil-metionina de la fosfoetanolamina (PE), catalizadas por la enzima citosólica fosfoetanolamina N-metiltransferasa. La colina se oxida a betaína aldehído por una ferredoxina dependiente de la colina monooxigenasa (CMO) que luego se convierte en GB por la actividad de la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) (Annunziata et al., 2019).

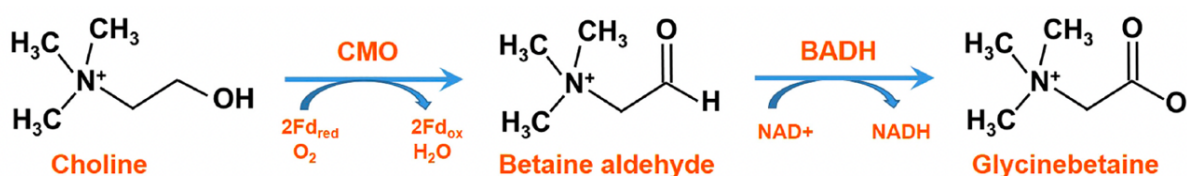


Figura 3. Catabolismo de la glicina betaína en plantas (Annunziata et al., 2019).

A nivel celular, la acumulación de GB es superior en los cloroplastos en comparación con otros compartimentos celulares de las plantas; protegiendo frente a la salinidad y el estrés oxidativo (Ali et al., 2020). La translocación de GB se produce en gran medida a través del floema desde las hojas, el principal lugar de producción; las raíces muestran una síntesis sustancialmente menor. Los tejidos donde se acumula la GB suelen ser jóvenes (Annunziata et al., 2019), donde su acumulación desencadena diversas respuestas:

- La mejora en la tasa de germinación de las semillas sumadas a un crecimiento mayor del grano (Zhang et al., 2019).
- Facilita a la planta la asimilación del nitrógeno debido al incremento en el crecimiento de las raíces y un desarrollo adelantado de las mismas (Ali et al., 2020).
- Protección de la eficiencia del PSII (Fotosistema II) en condiciones de estrés hídrico y térmico (de Oliveira et al., 2020).
- Desencadena la actividad de diversas enzimas antioxidantes como la peroxidasa (POX), la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), que en última instancia protegen a la planta del daño oxidativo (Gan et al., 2018).
- Incrementa el potencial osmótico sin disminución de turgencia celular frente al estrés hídrico y estrés salino (Nawaz y Wang, 2020).

En muchas especies, la acumulación natural de GB no es suficiente para mejorar los efectos nocivos causados por estrés abiótico. De este modo, resulta de gran interés la aplicación exógena de GB a plantas acumuladoras y no acumuladoras para ayudar a disminuir el impacto del estrés ambiental (Hamani et al., 2021). No obstante, gran porcentaje de la literatura científica estudia el uso del producto enfocado a la aplicación vía foliar, dejando de lado la comprensión de su transporte y eficacia en las raíces.

1.4.2. Glicina betaína y sequía

Debido a la gran afinidad de la GB con el metabolismo de las plantas, numerosos trabajos de investigación se han centrado en comprender su papel en procesos fisiológicos bajo estrés por sequía (Gupta et al., 2021; Khalid et al., 2019; Hernández y Valenzuela, 2022). La mejoría puede proceder de la disminución del potencial osmótico gracias a la acumulación neta de solutos, lo que podría ayudar a: preservar los procesos metabólicos y contribuir al crecimiento de las plantas mediante el mantenimiento de la turgencia en las células y, en última instancia, favorecer la tolerancia a la sequía (Nawaz y Wang, 2020). Algunos de los resultados

obtenidos en diferentes especies vegetales mediante la aplicación de GB exógena se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Trabajos de investigación usando glicina betaína como bioestimulante frente a la sequía en diferentes especies de plantas.

Especie	Efecto de GB	Referencia
Caña de azúcar	Mejora el crecimiento, mayor eficiencia del PSII y de la carboxilación de la asimilación de CO ₂ , y mejor fotosíntesis.	de Oliveira et al., 2020
Maíz	Aumento en el peso seco, la tasa de crecimiento relativo y la eficiencia del uso del agua	Jiménez-Arias et al., 2020
Pimiento	Aumento del peso seco de los brotes, el área foliar, la tasa fotosintética y la tasa de transpiración.	Ali et al. 2020
Lino	Acumulación de antioxidantes eliminadores de ROS, proteínas solubles totales	Gupta et al., 2021

2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es analizar la eficacia de la glicina betaína como bioestimulante vegetal bajo condiciones de estrés abiótico por sequía. Para ello, se realizaron diversos experimentos en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con aplicaciones vía radicular de glicina betaína y se evaluó su respuesta en cuanto a crecimiento y fisiología frente al estrés hídrico en condiciones de riego deficitario y sequía. Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Evaluar el efecto de la aplicación radicular de GB en el crecimiento de la especie *Solanum lycopersicum* L. var. Robin en condiciones de semillero.
- Analizar los efectos sobre el crecimiento y desarrollo de la dosis máxima de GB bajo condiciones de óptimas de riego y de sequía.
- Evaluar si existen diferencias entre plantas tratadas y no tratadas con GB en los parámetros como el potencial hídrico y osmótico, asimilación de CO₂ y transpiración.

3. Material y métodos

3.1. Ensayo I. Efecto de la glicina betaína frente a déficit hídrico en semillero

3.1.1. Material vegetal y cultivo

La especie utilizada en todos los ensayos fue *Solanum lycopersicum* L., variedad Robin. Las plántulas se obtuvieron de la empresa Viveros Guamasa (Tacoronte), en semilleros de 150 plántulas, con dos semanas de germinación y en estadio de primera hoja verdadera. Los semilleros se trasladaron a una cámara de crecimiento, con temperatura, fotoperiodo y humedad controladas (23-25°C; 16/8 horas de luz-oscuridad; 60-70% humedad y 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; QB288-Quantum Board, Samsung, Corea del Sur). En estas condiciones permanecieron durante una semana, hasta ser utilizados en los diferentes experimentos.

3.1.2. Selección de la dosis de GB en condiciones de semillero

El material vegetal fue sometido a una dinámica de riego más tratamiento. Este diseño consistía en el riego diario de las plántulas con 10mL de solución nutritiva $\frac{1}{2}$ Hoagland (Hoagland, 1933) durante 7 días, hasta alcanzar un tamaño de planta suficiente como para comenzar la aplicación del bioestimulante. El material vegetal creció en cámara con un fotoperiodo de 8 horas de luz y 16 de oscuridad, una intensidad de luz de 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mediante un panel led (QB288-Quantum Board, Samsung, Corea del Sur) y una temperatura de 23-25°C y 60-70% humedad. Además, se procuró rotar la posición de los semilleros en cámara para que todo el material vegetal estuviera en las mismas condiciones ambientales a lo largo del experimento. En ambos semilleros se distinguieron varios grupos según el tratamiento y condiciones, siguiendo la siguiente disposición:

En la **Figura 4**, se encontraban aquellos individuos que serían sometidos a una condición de riego deficitario (5 mL/planta), mientras que en la **Figura 5**, se encontraban aquellos con una pauta de riego completa (10 mL/planta). A su vez, en cada uno de los semilleros, existieron subdivisiones que dividían a las plantas, en función del número de dosis de glicina betaína, así como su concentración. Las dosis, administradas vía radicular con pipeta (1 mL), se aplicaron una, dos o tres veces cada 48 horas desde inicio del experimento (APL). En cuanto a las concentraciones (0,1 mM o 10 mM), se comprobó si la diferencia de

3.2. Ensayo II. Efectos de la aplicación de GB en condiciones sequía

3.2.1. Preparación del sustrato

Las plántulas procedentes de semilleros (**Figura 6**) fueron trasplantadas a macetas con un sustrato compuesto por una mezcla en proporción 2:1 de sustrato universal (COMPO SANA, Alemania) y arena (Arena de sílice, FLOWER, España). El sustrato fue esterilizado en una autoclave (AES-75, RAYPA, España) durante 1 hora a 121°C. En cuanto a las macetas se mantuvo la homogeneidad tanto en dimensiones, forma y cantidad de sustrato. A cada maceta con volumen de 1,2 L, se le añadieron 800 gramos del sustrato estéril.

3.2.2. Riego y administración de GB en el material vegetal

Tras el trasplante se establecieron 4 categorías en las plantas que se corresponden con 4 tratamientos diferentes. En base a los resultados obtenidos durante el **Ensayo I**, el volumen de GB aplicado pasaría de 1 mL a 5 mL y la concentración pasaría a ser única, 10 mM. Las plantas en maceta quedaron agrupadas en bandejas según los requisitos de riego y administración de glicina betaína (**Figura 7**). De esta forma, y al igual que en los semilleros, se establecieron dos agrupaciones principales: la primera, tuvo unas condiciones de riego sin modificaciones (grupo 100%), con la adición de la solución nutritiva diariamente. El regadío se estableció en base a unas condiciones capacidad de campo de la planta en maceta; siendo este de 150 mL. La segunda agrupación, fue sometida a condiciones de sequía (grupo 0%); para ello, se cesó el riego en su totalidad desde el inicio del experimento.



Figura 7. Disposición de las macetas con los trasplantes del semillero.

Por otro lado, la aplicación de glicina betaína dividió en dos cada agrupación (grupo 100% con o sin GB y grupo 0% con o sin GB). El tratamiento consistió en una administración vía radicular cada 48h. Al igual que en el **Ensayo I**, el crecimiento de las plantas sucedió en cámara con temperatura, fotoperiodo y humedad controladas (23-25°C; 16/8 horas de luz-oscuridad; 60-70% humedad y $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; QB288-Quantum Board, Samsung, Corea del Sur).

3.2.3. Análisis del crecimiento, fotosíntesis, potencial osmótico y potencial hídrico

Análisis del crecimiento

Posterior al experimento de sequía, se llevó a cabo el secado de las plantas. Para ello, se descartó el sustrato y se recolectaron las partes aéreas de las plantas; se prensaron en papel de filtro y se introdujeron en la secadora de circulación de aire (UT 12P, Heraeus, Alemania). El tiempo de duración de secado fue superior al del semillero, elevándose a la semana y media con el mismo protocolo de 60°C y 8 horas. Posteriormente, y en una balanza analítica (BCE622-1S, Satorius Lab Instruments, Alemania), se midieron los pesos secos de los individuos de cada grupo.

A su vez, para controlar el transcurso de la sequía, y poder estimar posibles diferencias significativas en la fisiología entre plantas, se llevaron a cabo una serie de medidas edáficas y ecofisiológicas. Durante el desarrollo del experimento, se estableció un punto de inicio (t_0) y otro de finalización (t_1), además de una serie de medidas intermedias ($t_{1/2}$) de apoyo. En este aspecto, hay que distinguir dos tipos de sub-ensayos; el primero centrado en el análisis del porcentaje de humedad del sustrato y potencial hídrico, y otro basado en parámetros ecofisiológicos foliares elementales (asimilación de CO_2 , potencial osmótico, potencial hídrico y transpiración).

Análisis del porcentaje de humedad del sustrato y potencial hídrico

El porcentaje de humedad del sustrato se estudió utilizando cuatro muestras de sustrato de 800 g, dispuestas en macetas como las utilizadas en el experimento, regadas a capacidad de campo y posteriormente introducidas en la secadora de circulación de aire (UT 12P, Heraeus, Alemania) a 60°C. El peso de las macetas se registró diariamente hasta que este se mantuvo constante. Con estos valores se calculó el porcentaje de humedad, comparando el pesado seco en cada momento con el peso al finalizar el experimento.

Paralelamente, se estimó el potencial hídrico del suelo correspondiente a los diferentes niveles humedad del sustrato observados durante el experimento, y se realizó una curva de liberación de humedad. Para ello, y mediante el uso de un psicrómetro de termopar (WP4C Dewpoint PotentialMeter, METER Group, Estados Unidos) se midieron en discos metálicos diversas muestras dentro del periodo de desecación (cada 15 min) con aproximadamente 10 g de suelo cada una. Se pesaron a posteriori, y mediante una estima gravimétrica se obtuvo el porcentaje de humedad aproximado para cada medida de potencial (**Figura 11**).

$$\text{Humedad gravimétrica (\%)} = \frac{\text{Peso del suelo húmedo (g)} - \text{Peso del suelo seco (g)}}{\text{Peso del suelo seco (g)}} \times 100$$

Figura 11. Ecuación de la humedad gravimétrica (%) a partir de pesos (g)

Donde el peso del suelo húmedo corresponde a los diferentes valores de peso registrados dentro del periodo de desecación y el peso del suelo seco, el valor final de la última muestra secada. Las muestras de sustrato fueron pesadas en cada momento teniendo en cuenta la masa de los discos metálicos que la contenían.

Ecofisiología de la planta

Para valorar el efecto de la sequía en las plantas y la presencia de diferencias significativas en la fisiología, se midieron diversos parámetros ecofisiológicos. Mediciones de intercambio gaseoso y conductancia estomática para estimar la variación de la fotosíntesis mediante el sistema portátil de fotosíntesis (LI-6800, LI-COR Biosciences, Estados Unidos). Complementando a lo anterior, se midió también el potencial osmótico de hojas, al principio y final del experimento, mediante un psicrómetro de termopar (WP4C Dewpoint Potential Meter, METER Group, Estados Unidos). Las muestras fueron previamente almacenadas en un congelador a -80°C (Sanyo MDF-U73V, Sanyo, Japón). El potencial hídrico de los tejidos se analizó mediante el uso de la cámara de presión de Scholander (PMS-600, PMS Instruments, Estados Unidos) al inicio y finalización del experimento.

3.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de este trabajo se utilizó el software IBM SPSS Statistics 25.0 para Windows (SPSS INC., Nueva York, Estados Unidos). Antes de realizar cualquier análisis, se evaluó la normalidad y homogeneidad de cada conjunto de datos mediante la prueba de Kolmogórov-Smirnov y la de Levene, respectivamente. Cuando los datos cumplían los anteriores supuestos, las diferencias estadísticas en el experimento en semillero (riego, número de aplicaciones y dosis de bioestimulante) se determinaron mediante un ANOVA de 3 vías, seguido de la prueba post-hoc de Tukey. En el experimento de maceta, se llevó a cabo el mismo procedimiento anterior, pero con un ANOVA de 2 vías. Para los parámetros fisiológicos, las posibles diferencias entre tratamientos con y sin glicina betaína durante la sequía, se determinaron mediante un ANOVA unidireccional. En todos los casos, la significación estadística se consideró con un valor p inferior a 0,05.

4. Resultados

4.1. Ensayo I. Efecto de la glicina betaína frente al déficit hídrico en semillero

4.1.1. Selección de la dosis de GB en condiciones de semillero

La elección de la dosis de GB se realizó en dos experimentos consecutivos utilizando plántulas de semillero (**Tabla 3**). No se encontraron diferencias significativas entre las plántulas tratadas y sin tratar con GB en condiciones de capacidad de campo con independencia de la dosis de GB empleada. De hecho, a dosis altas de esta sustancia (10 mM) no se observa una disminución significativa en el crecimiento de las plántulas, aunque tampoco un incremento significativo en el mismo en comparación con el control no tratado con GB. Cuando las plántulas fueron sometidas a un déficit hídrico del 50% de la capacidad de campo, su crecimiento se redujo aproximadamente en un 30%, en comparación con las plantas regadas a capacidad de campo. Esta reducción en crecimiento se observa también entre las plántulas tratadas con GB regadas a 50% de capacidad de campo. Existe una ligera diferencia en comparación con las plántulas no tratadas con GB al 50% de capacidad de campo (apenas un 7%) aunque esta no es significativa. De nuevo a dosis altas no se observan diferencias significativas entre tratamientos y el número de aplicaciones.

(mM)	Aplicaciones			Significancia $p < 0,05$			
	1	2	3	C ₁₀₀ /GB ₁₀₀	C ₅₀ /GB ₅₀	Ap/ GB ₁₀₀	Ap/ GB ₅₀
- GB							
C ₁₀₀	320 ± 38	340 ± 25	330 ± 26				
C ₅₀	260 ± 31	240 ± 52	250 ± 40				
+ GB₁₀₀							
0,1	340 ± 34	330 ± 25	330 ± 30	n.s		n.s	
10	345 ± 45	336 ± 27	350 ± 50	n.s		n.s	
+ GB₅₀							
0,1	260 ± 36	280 ± 44	270 ± 48		n.s		n.s
10	255 ± 40	267 ± 49	259 ± 61		n.s		n.s

Tabla 3. Evolución del peso seco (mg) en plántulas de semillero sometidas a diferentes concentraciones de GB, regadas a capacidad de campo (C₁₀₀ y GB₁₀₀) y a un déficit hídrico del 50% de la capacidad de campo (C₅₀ y GB₅₀). La GB se aplicó al sustrato del semillero en las diferentes concentraciones 1, 2 o 3 veces a lo largo del experimento. Los datos representan la media ± desviación estándar para un n=30. Las siglas n.s (no significativo, $p > 0,05$)

4.2. Ensayo II. Efecto de la glicina betaína frente a la sequía en maceta

4.2.1. Análisis del crecimiento

No se observó un efecto significativo de la glicina betaína frente al estrés por sequía en el grupo tratado ($p > 0,05$) (**Figura 12**). El tratamiento con bioestimulante tampoco supuso una diferenciación en las plantas libres del estrés abiótico, presentando un porcentaje mayor (apenas 8%) de peso seco el grupo sin glicina betaína ($p > 0,05$).

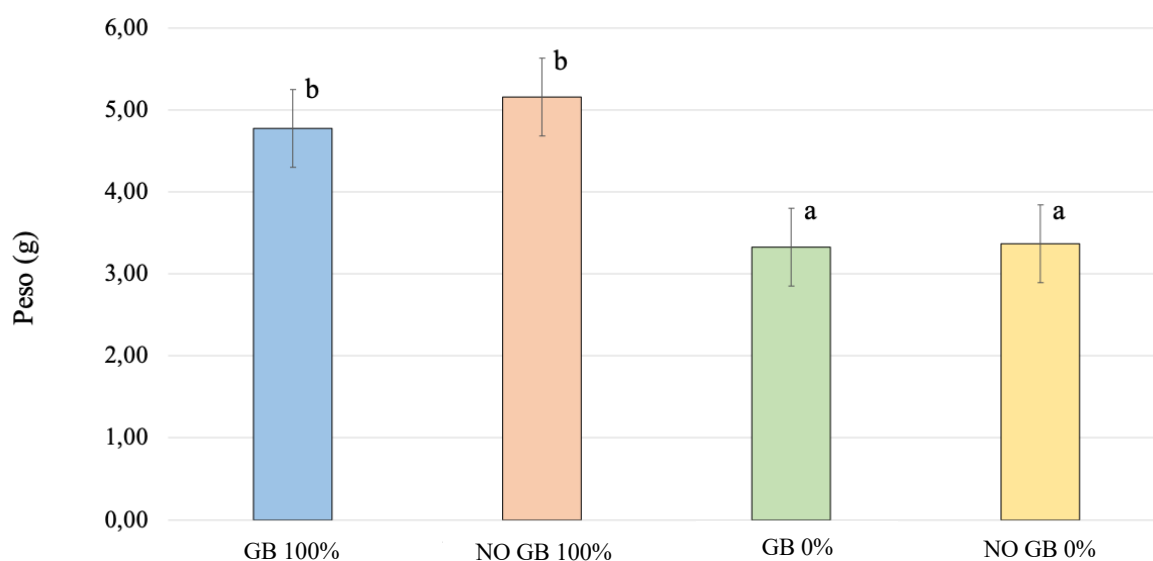


Figura 12. Efecto de la glicina betaína (10 mM) en el peso seco de plantas de tomates en maceta sometidas a estrés por sequía y condiciones control. Cada barra muestra el valor medio \pm error estándar ($n=20$). En el eje se incluyen los grupos de plantas con el tipo de tratamiento con o sin bioestimulante (GB con glicina betaína y NO GB sin glicina betaína) y la condiciones de aporte hídrico (0% sequía y 100% control).

4.2.2. Mediciones edáficas

Durante la simulación de sequía se aseguró que el comportamiento del suelo se adecuara a dichas condiciones. Para ello, se registraron los valores de potencial hídrico y peso seco del sustrato frente a la situación de desecación (**Figura 13** y **Figura 14**). Ambas gráficas sirvieron como demostración de la efectividad de la sequía en el sustrato; afectando tanto en el contenido hídrico como en el potencial hídrico que alcanzó al finalizar las mediciones.

Basándose en el experimento de potencial hídrico del sustrato, se pudo extrapolar el valor de potencial asociado a cada porcentaje de humedad del suelo y relacionarlo con el transcurso de la sequía. De esta forma, cuando el experimento alcanzó aproximadamente los 5-6 días de duración, se llegó a un punto de marchitez; el agua que permanece en el suelo no está disponible para la planta. El valor de potencial hídrico correspondiente al punto de marchitez

fue de -1,60 MPa. En este punto los efectos de la sequía son graves y continuar con la misma supondría la imposibilidad de recuperación en la planta.

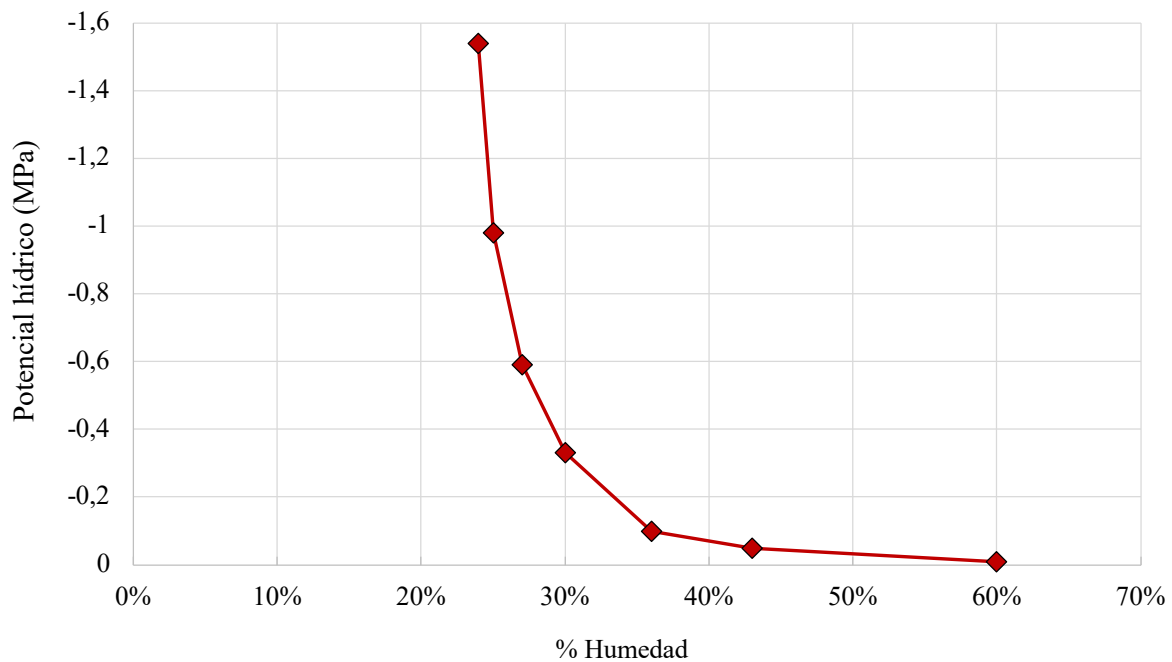


Figura 13. Dinámica del potencial hídrico del suelo en condiciones de desecación por sequía. Cada punto muestra el valor medio entre dos réplicas. La estima de humedad en las muestras de suelo se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado *Análisis del porcentaje de humedad del sustrato y potencial hídrico*

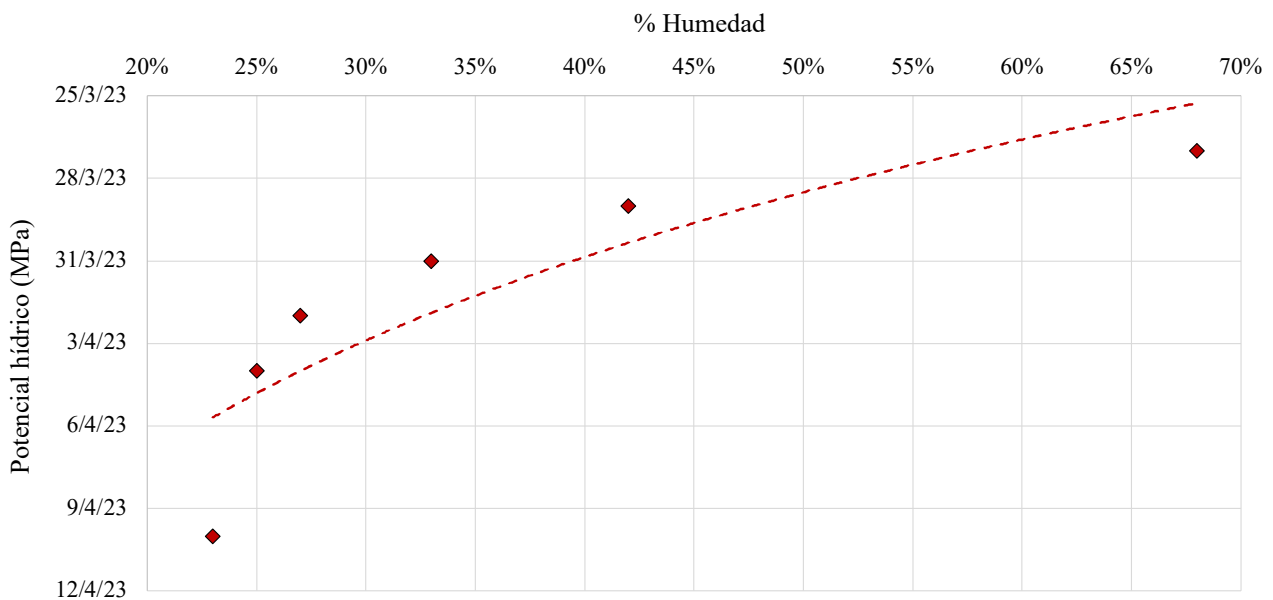


Figura 14. Descenso en el peso del sustrato con relación al porcentaje de humedad durante la realización del experimento de sequía. Cada punto muestra el valor medio de 4 macetas pesadas. El cálculo del porcentaje de humedad se estimó mediante pesado gravimétrico; teniendo en cuenta el peso que alcanzó el sustrato al final del experimento.

4.2.3. Ecofisiología de la planta

En primer lugar, se encuentran la variación del potencial hídrico y osmótico en la planta medido en hojas (**Figura 15**). En ambos ensayos, las diferencias entre grupos no fueron significativas ($p>0,05$). El potencial hídrico en condiciones de sequía de las plantas tratadas fue un 4% menos respecto a las plantas sin bioestimulante; en los controles, las plantas con bioestimulante presentaron 6% menos en su valor de potencial. En el caso del potencial osmótico, las plantas sin producto sometidas a sequía presentaban un menor potencial comparadas con las tratadas (alrededor de un 3%). En los grupos control, eran las plantas con glicina betaína las de inferior valor de potencial (sobre 4%).

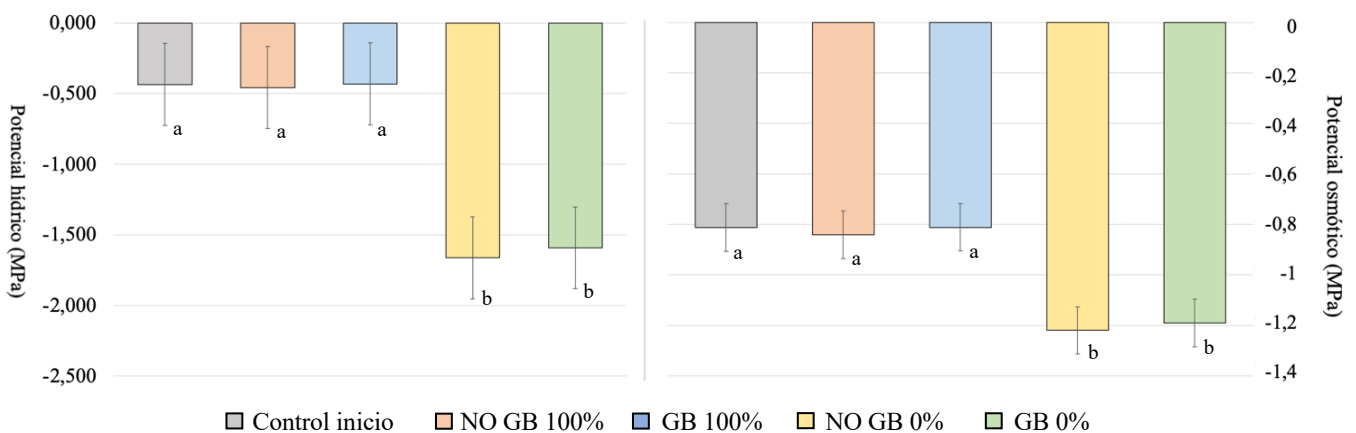


Figura 15. Variaciones del potencial hídrico y osmótico durante el experimento de sequía. Cada barra muestra el valor medio \pm error estándar ($n=12$). En la leyenda “Control” corresponde a las mediciones de potencial en las plantas al inicio del experimento. El resto de los grupos corresponden a los grupos analizados al final del experimento de sequía con o sin bioestimulante (GB 0% y NO GB 0%) y a los controles con riego completo con o sin bioestimulante (GB 100% y NO GB 100%).

En cuanto a parámetros relacionados con la fotosíntesis, encontramos la asimilación de CO_2 y la transpiración (**Figura 16**). Ambas mediciones mostraron un descenso con respecto al transcurso del experimento de sequía; tanto en grupos con estrés como en grupos sin este. El nulo riego del material vegetal supuso una reducción en la asimilación de carbono de aproximadamente 91% en el tratamiento GB 0% y de 94% en NO GB 0%. Y en aquellos que sí fueron regados, un 68% en GB 100% y un 60% en NO GB 100%. Del mismo modo en la transpiración, el descenso en los valores, siguiendo el orden anterior, fue de 96% (GB 0%), 97% (NO GB 0%), 81% (GB 100%) y 78% (NO GB 100%). Esta anomalía en los grupos control se tratará posteriormente en el apartado de **Discusión**.

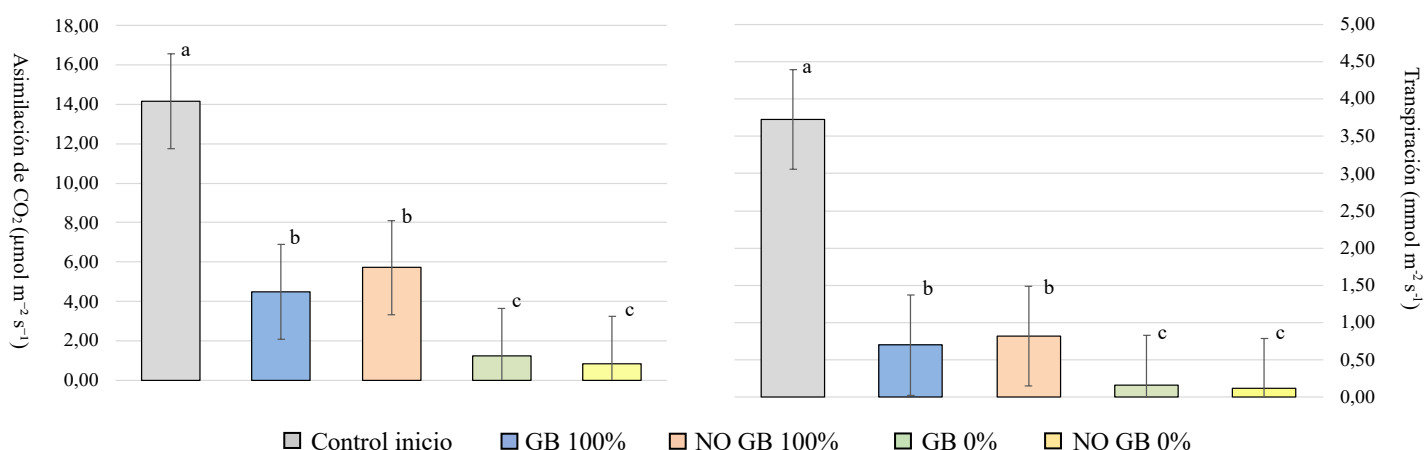


Figura 16. Variaciones de la asimilación de CO₂ y transpiración de las plantas. Cada barra muestra el valor medio ± error estándar (n=12). En la leyenda “Control inicio” corresponde a las mediciones realizadas al inicio del experimento de sequía. El resto de los grupos corresponden a los grupos analizados al final del experimento con o sin bioestimulante (GB 0% y NO GB 0%) y a los controles con riego completo con o sin bioestimulante (GB 100% y NO GB 100%).

5. Discusión

Con este TFG se pretende evaluar si la glicina betaína aplicada radicularmente presenta efectos frente a la sequía. De esta forma, se complementarían la bibliografía presente sobre el bioestimulante, que frecuentemente centra su atención en la administración vía foliar. Teniendo en cuenta los resultados citados anteriormente, encontrar una metodología para la aplicación del producto en raíz facilitaría mucho su paso a gran escala en cultivos. En este aspecto, son numerosos los elementos del protocolo experimental que se pueden discutir: la concentración del bioestimulante, el número de aplicaciones, la diferenciación entre aplicación foliar y radicular, el tamaño de maceta, las condiciones de sequía y el tipo de sustrato.

El modo de aplicación es un factor determinante en la eficacia del bioestimulante. El 85% de los estudios en este campo son con tratamientos foliares, aunque el método con mayor índice de rendimiento lo presenta el tratamiento en el suelo (Li et al., 2022). Este hecho, estimula el interés por probar vías intermedias como puede ser la aplicación a través de las raíces mediante la adición del bioestimulante líquido o junto a la solución nutritiva. La glicina betaína es un compuesto natural y compatible que ha demostrado tener efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas y la tolerancia al estrés. Existen investigaciones en curso para determinar la forma más efectiva de internalizar este compuesto en la planta y que tenga repercusión; la vía de aplicación condiciona aspectos como su absorción y distribución. El uso de glicina betaína foliarmente, puede suponer una vía de entrada más directa que

radicularmente, pudiendo influir en la repercusión del producto. Sin embargo, el dilema en la aplicación en bioestimulantes vegetales presenta dificultades debido a la compleja naturaleza de sus componentes. La investigación actual se esfuerza por determinar el modo o mecanismo de acción, con la ayuda de la genómica, la biología de sistemas y las tecnologías de fenotipado más avanzadas (Yakhin et al., 2017). Una herramienta para facilitar el trabajo es la generación de grandes conjuntos de datos. Los enfoques ómicos, que implican tecnologías de alto rendimiento, son capaces de medir cambios globales en la abundancia de transcritos de ARNm (transcriptoma), proteoma y metaboloma en sistemas biológicos complejos como resultado de la estimulación o perturbación bioquímica. (Raza, 2022). Este hecho podría arrojar más información acerca de la internalización del bioestimulante en la planta y poder discernir el protocolo de actuación dependiendo del producto y la especie.

Otro elemento para considerar es la concentración efectiva de glicina betaína y el número de aplicaciones necesarias para lograr el efecto deseado. Suelen ser las concentraciones elevadas de bioestimulante las de mayor efectividad frente a dosis poco concentradas (Li et al., 2022). La concentración óptima de glicina betaína puede variar dependiendo de la especie de planta, la etapa de crecimiento y las condiciones ambientales. En nuestro experimento, se observó cómo a pesar de emplear dosis con grandes diferencias en la concentración de GB, los resultados no se distanciaron respecto a los controles (**Tabla 3**). Además, manteniendo la dosis más alta en maceta, y con un tamaño de planta superior, no se observó tampoco desdiferenciación en los pesos respecto a los controles. Consultando la bibliografía existente, la dosis de glicina betaína suele estar relacionada con la manera de administrarla; aplicada en las hojas suele ser menos concentrada que vía radicular. (Ahmed et al., 2021; Gupta et al., 2021). Existen estudios en el campo de los bioestimulantes vegetales que emplean concentraciones elevadas frente a concentraciones bajas para obtener resultados efectivos (Schütz et al., 2018). En este caso, la naturaleza del producto determina la dosis. Bioestimulantes basados en el uso de microorganismos presentan mayor rendimiento cuanto más elevada es su concentración. Otros autores, evitan lo anterior relacionando la alta concentración con una posible toxicidad (Juárez-Maldonado et al., 2019; Khan et al., 2009). Lo que está claro es la relevancia de la caracterización del compuesto y su posible interacción con el medio en base a su naturaleza.

El número de aplicaciones de bioestimulante, supone otro reto a la hora de desarrollar un protocolo efectivo. Existen numerosas combinaciones, ya sea con incrementos en la concentración por cada aplicación (Jiménez-Arias et al., 2022), o acortando/alargando los

momentos de aplicación de bioestimulante paralelamente al crecimiento de la planta (Park et al., 2006). Otra posibilidad es el denominado *priming*, una forma de "memoria" inmunológica vegetal en la que un estímulo externo es percibido por la planta como una señal de advertencia; conduciendo a una activación menor de los mecanismos de defensa inducidos. Esta reacción se memoriza y conduce a una respuesta de defensa más rápida y/o más fuerte en caso de ataque posterior por parte de un factor biótico o abiótico (Desmedt et al., 2021). El modelo anterior podría solventar los posibles inconvenientes de toxicidad con la glicina betaína; tratando a la planta desde estadios jóvenes y permitiendo incrementar la concentración y/o número de aplicaciones a la par del desarrollo de esta.

Entre otros aspectos a tener en cuenta para futuros estudios es el establecimiento de unas condiciones de sequía óptimas. La mejor manera de simular el estrés natural por sequía en experimentos en macetas no es obvia. La simple retención de agua suele ser insatisfactoria, porque los déficits hídricos pueden desarrollarse más rápidamente en contenedores que en condiciones de campo. Esto es clave, porque la velocidad a la que se desarrolla el estrés puede determinar los tipos de respuestas fisiológicas observadas (Munns et al., 2010). Durante los experimentos de ecofisiología de las plantas (**Figura 15**), se observa como los individuos control, a pesar de no estar bajo estrés hídrico, ven afectada su fotosíntesis. Una de las posibles explicaciones es el tamaño de la maceta, siendo fundamental en el crecimiento y desarrollo de las plantas, especialmente en los estudios de sequía (Turner, 2019). El tamaño de la maceta determina la cantidad de suelo disponible para que la planta crezca y obtenga nutrientes y agua. En los estudios de sequía, el tamaño del recipiente puede influir en la gravedad del estrés hídrico experimentado por la planta, los efectos resultantes en la fisiología y el rendimiento de la especie vegetal. Los tamaños de maceta más pequeños limitan la cantidad de suelo disponible para que la planta crezca, con especial atención al crecimiento radicular (Poorter et al., 2012). Esto puede resultar en cambios en la fisiología de la planta, como una reducción en el área foliar, el cierre estomático y la reducción de la fotosíntesis, traduciéndose en ocasiones en una reducción en el crecimiento y el rendimiento de la planta (Sinclair et al., 2017).

En nuestro caso, una posible hipótesis puede ser la mala coordinación entre el inicio de la sequía y el tamaño de planta, obviando el aspecto de las dimensiones de la maceta. Es importante determinar un punto en el crecimiento adecuado de la planta para poder comprobar la gravedad del estrés hídrico. Otros factores, como el volumen y momento de riego, el tipo de suelo y la especie de planta, también pueden desempeñar un papel en la determinación de la severidad de la sequía. Al realizar experimentos con macetas, es importante tener en cuenta

cómo interactúan el tamaño y la forma de la maceta con el sustrato. Los suelos de textura fina se compactan fácilmente, limitando el avance el agua y pudiendo afectar al crecimiento radicular cuando se riegan (Liu et al. 2014). Por el contrario, los suelos de textura gruesa y porosos tienen poca capacidad de retención de agua y drenan rápidamente. Esto puede hacer que las plantas agoten rápidamente la limitada agua disponible, lo que provoca déficits hídricos importantes (Sinclair et al., 2017). En este experimento, una relación 2:1 de tierra y arena pudo suponer demasiada percolación del agua que, sumado el insuficiente tamaño de maceta y el elevado crecimiento radical, perjudican la fisiología de la planta adelantando los efectos de la sequía.

En definitiva, el correcto diseño de un protocolo usando glicina betaína como bioestimulante, y centrando la atención en su administración radicular, pondría en manifiesto sus efectos en plantas bajo estrés por sequía. De esta manera, se podría ampliar la información sobre el compuesto empleado como bioestimulante y complementar los datos existentes; facilitando así, aspectos aún sin clara comprensión como su transporte y translocación en la planta. Asimismo, esclarecería un factible punto de partida a la hora de pasar el modelo de laboratorio, a campo para su aplicación a gran escala en cultivos. Mediante su implementación en el riego, por ejemplo, se sumaría una herramienta nueva en la lucha contra los efectos del cambio climático en la producción agrícola.

6. Conclusiones

- La glicina betaína aplicada vía radicular no tuvo efectos sobre las plantas maduras sometidas a sequía. Tampoco, fue efectiva en condiciones de riego deficitario en plántulas de tomate. Por otro lado, no existieron diferencias significativas en los grupos control sin estrés abiótico y la aplicación del bioestimulante.
- El número de aplicaciones y la dosis de GB no presentó diferencias significativas entre grupos. Las plantas tratadas en estadios jóvenes con GB 10 mM presentaron un rendimiento similar que las control y las GB 0,1 mM. Este hecho se trasladó a plantas adultas, donde la concentración de 10 mM tampoco se diferenció del control.
- La simulación de estrés por sequía resultó efectiva, viéndose acentuada en aquellos grupos con un riego nulo. Demostrado queda en el aumento de la fotorrespiración y el descenso del rendimiento fotosintético y de los potenciales hídrico y osmótico.

Conclusions

- Glycine betaine applied via root had no effect on mature plants subjected to drought. Neither was it effective under deficit irrigation in tomato seedlings. On the other hand, there were no significant differences in the control groups without abiotic stress and the application of the biostimulant.
- The number of applications and the dose of WBC did not show significant differences between groups. The plants treated in young stages with GB 10 mM presented a similar performance as the control and the GB 0.1 mM. This fact was transferred to adult plants, where the concentration of 10 mM was also not different from the control.
- The simulation of drought stress was effective, being accentuated in those groups with zero irrigation. It was demonstrated by the increase in photorespiration and the decrease in photosynthetic yield, water potential and osmotic potential.

7. Bibliografía

- Adam, D. (2021). How far will global population rise? researchers can't agree. *Nature*, 597(7877), 462-465. doi:10.1038/d41586-021-02522-6
- Ahluwalia, O., Singh, P. C. y Bhatia, R. (2021). A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resources, Environment and Sustainability*, 5, 100032. doi:10.1016/j.resenv.2021.100032
- Ahmed, N., Zhu, M., Li, Q., Wang, X., Wan, J. y Zhang, Y. (2021). Glycine betaine-mediated root priming improves water stress tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agriculture*, 11(11) doi:10.3390/agriculture11111127
- Ali, S., Abbas, Z., Seleiman, M. F., Rizwan, M., Yavaş, İ, Alhammad, B. A., et al., (2020). Glycine betaine accumulation, significance, and interests for heavy metal tolerance in plants. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(7), 896. doi:10.3390/plants9070896.
- Anamika D., Ashwani K., Muneer A. M., Kanika C., Garima S., Gudasalamani R., et al. (2021). *Approaches for the amelioration of adverse effects of drought stress on crop plants*. doi:10.52586/4998
- Annunziata, M. G., Ciarmiello, L. F., Woodrow, P., Dell'Aversana, E., y Carillo, P. (2019). Spatial and temporal profile of glycine betaine accumulation in plants under abiotic stresses. *Frontiers in Plants Science*. doi:10.3389/fpls.2019.00230
- Bandurska, H. (2022). Drought stress responses: Coping strategy and resistance. *Plants*, 11(7) doi:10.3390/plants11070922

- Bulgari, R., Franzoni, G. y Ferrante, A. (2019). Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy*, 9(6) doi:10.3390/agronomy9060306
- de Oliveira Maia Júnior, S., de Andrade, J. R., dos Santos, C. M., Santos, J. V., dos Santos Silva, L., et al. (2020). Foliar-applied glycine betaine minimizes drought stress-related impact to gas exchange and the photochemical efficiency of PSII in sugarcane. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 32(4), 315-329. doi:10.1007/s40626-020-00188-5
- Desmedt, W., Vanholme, B., y Kyndt, T. (2021). Chapter 5 - plant defense priming in the field: A review. In P. Maienfisch y S. Mangelinckx (Eds.), *Recent highlights in the discovery and optimization of crop protection products* (pp. 87-124) Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-821035-2.00045-0
- European Commission, Joint Research Centre, Lutz, W., Stilianakis, N. y Stonawski, M. (2018). *Demographic and human capital scenarios for the 21st century: 2018 assessment for 201 countries*, Publications Office. doi:10.2760/835878
- FAO et al (2018). The State of Food Security and Nutrition in the World 2018. Building climate resilience for food security and nutrition, Rome, FAO.
- Farooq, A., Bukhari, S., Akram, N., Ashraf, M., Wijaya, L., Alyemeni, M. y Ahmad, P. (2020). Exogenously applied ascorbic acid-mediated changes in osmoprotection and oxidative defense system enhanced water stress tolerance in different cultivars of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Plants*, 9(1), 104. doi: 10.3390/plants9010104.
- Franzoni, G., Cocetta, G., Prinsi, B., Ferrante, A. y Espen, L. (2022). Biostimulants on crops: Their *Horticulturae*, 8(3) doi:10.3390/horticulturae8030189
- Gan, L., Zhang, X., Liu, S., y Yin, S. (2018). Mitigating effect of glycinebetaine pretreatment on drought stress responses of creeping bentgrass. *HortScience*, 53(12), 1842-1848. doi:10.21273/HORTSCI13429-18
- García-García, A. L., García-Machado, F. J., Borges, A. A., Morales-Sierra, S., Boto, A., y Jiménez-Arias, D. (2020). Pure organic active compounds against abiotic stress: A biostimulant overview. *Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.575829
- Gerland, P., Raftery, A. E., Sevčiková, H., Li, N., Gu, D., Spoorenberg, T., Alkema, L., Fosdick, B. K., Chunn, J., Lalic, N., Bay, G., Buettner, T., Heilig, G. K., & Wilmoth, J. (2014). World population stabilization unlikely this century. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6206), 234–237. doi:10.1126/science.1257469
- Gong, Z., Xiong, L., Shi, H., Yang, S., Herrera-Estrella, L., Xu, G. y Zhu, J. (2020). Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Science China Life Sciences*, 63(5), 635-674. doi:10.1007/s11427-020-1683-x
- Gupta, A., Rico-Medina, A., y Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368(6488), 266–269. doi:10.1126/science.aaz7614

- Gupta, P., Rai, R., Vasudev, S., Yadava, D. K., y Dash, P. K. (2021). Ex-foliar application of glycine betaine and its impact on protein, carbohydrates, and induction of ROS scavenging system during drought stress in flax (*Linum usitatissimum*). *Journal of Biotechnology*, 337, 80-89. doi: 10.1016/j.jbiotec.2021.06.012
- Hamani, A. K. M., Li, S., Chen, J., Amin, A. S., Wang, G., Xiaojun, S. y Gao, Y. (2021). Linking exogenous foliar application of glycine betaine and stomatal characteristics with salinity stress tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings. *BMC Plant Biology*, 21(1), 146. doi:10.1186/s12870-021-02892-z
- Hatfield, J. L., y Dold, C. (2019). Water-use efficiency: Advances and challenges in a changing climate. *Frontiers in Plant Science*, 10. doi:10.3389/fpls.2019.00103
- He, Y., Fang, J., Xu, W. y Shi, P. (2022). Substantial increase of compound droughts and heatwaves in wheat growing seasons worldwide. *International Journal of Climatology*, 42(10), 5038-5054. doi:10.1002/joc.7518
- Hernandez, S. y Valenzuela, E. (2022). Glycine betaine is a phytohormone-like plant growth and development regulator under stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, doi:10.1007/s00344-022-10855-3
- Hoagland, D. R. (1933). The water-culture method for growing plants without soil. Circular, California Agricultural Experiment Station, 347, 1-32.
- Jander, G., Kolukisaoglu, U., Stahl, M. y Yoon, G. M. (2020). Editorial: Physiological aspects of non-proteinogenic amino acids in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.519464
- Jiménez-Arias, D., García-Machado, F. J., Morales-Sierra, S., García-García, A. L., Herrera, A. J., Valdés, F. y Borges, A. A. (2021). A beginner's guide to osmoprotection by biostimulants. *Plants*, 10(2) doi:10.3390/plants10020363
- Jiménez-Arias, D., Hernández, A. E., Morales-Sierra, S., García-García, A. L., García-Machado, F. J., Luis, J. C. y Borges, A. A. (2022). Applying biostimulants to combat water deficit in crop plants: Research and debate. *Agronomy*, 12(3) doi:10.3390/agronomy12030571
- Juárez-Maldonado, A., Ortega-Ortíz, H., Morales-Díaz, A. B., González-Morales, S., Morelos-Moreno, Á., Cabrera-De la Fuente, M. y Benavides-Mendoza, A. (2019). Nanoparticles and nanomaterials as plant biostimulants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1) doi:10.3390/ijms20010162
- Khalid, M., Rehman, H. M., Ahmed, N., Nawaz, S., Saleem, F., Ahmad, S. y Lam, H. (2022). Using exogenous melatonin, glutathione, proline, and glycine betaine treatments to combat abiotic stresses in crops. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21) doi:10.3390/ijms232112913
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M. y Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386-399. doi:10.1007/s00344-009-9103-x
- Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K. y Dietz, K. (2019). The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(4), 94. doi:10.3390/antiox8040094.

- Leisner, C. P. (2020). Review: Climate change impacts on food security- focus on perennial cropping systems and nutritional value. *Plant Science*, 293, 110412. doi:10.1016/j.plantsci.2020.110412
- Li, J., Van Gerrewey, T., y Geelen, D. (2022). A meta-analysis of biostimulant yield effectiveness in field trials. *Frontiers in Plant Science*, 13. doi:10.3389/fpls.2022.836702
- Liu, Q., Yasufuku, N., Miao, J. y Ren, J. (2014). An approach for quick estimation of maximum height of capillary rise. *Soils and Foundations*, 54(6), 1241-1245. doi:10.1016/j.sandf.2014.11.017
- Liu, Y., Ma, X., Shu, L., Hancke, G. P., y Abu-Mahfouz, A. M. (2021). From industry 4.0 to agriculture 4.0: Current status, enabling technologies, and research challenges. *IEEE Transactions on Industrial Informatics*, 17(6), 4322-4334. doi:10.1109/TII.2020.3003910
- McAdam, S. A. M. y Brodribb, T. J. (2018). Mesophyll cells are the main site of abscisic acid biosynthesis in water-stressed leaves. *Plant Physiology*, 177(3), 911-917. doi:10.1104/pp.17.01829
- Mohammad, R. A., Adamowski, J., Mohammad, R. N., AghaKouchak, A., Dennison, P. y Sadegh, M. (2020). A century of observations reveals increasing likelihood of continental-scale compound dry-hot extremes. *Science Advances*, 6(39) doi:10.1126/sciadv. aaz4571
- Mukherjee, A., Dwivedi, S., Bhagavatula, L. y Datta, S. (2023). Integration of light and ABA signaling pathways to combat drought stress in plants. *Plant cell reports*, 42(5), 829–841. doi:10.1007/s00299-023-02999-7
- Munns, R., James, R. A., Sirault, X. R. R., Furbank, R. T. y Jones, H. G. (2010). New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, 61(13), 3499-3507. doi:10.1093/jxb/erq199
- Nawaz, M. y Wang, Z. (2020). Abscisic acid and glycine betaine mediated tolerance mechanisms under drought stress and recovery in *Axonopus compressus*: A new insight. *Scientific Reports*, 10(1), 6942. doi:10.1038/s41598-020-63447-0
- Ozturk, M., Turkyilmaz Unal, B., García-Caparrós, P., Khursheed, A., Gul, A. y Hasanuzzaman, M. (2021). Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1321-1335. doi:10.1111/ppl.13297
- Park, E., Jeknic, Z. y Chen, T. H. H. (2006). Exogenous application of glycinebetaine increases chilling tolerance in tomato plants. *Plant and Cell Physiology*, 47(6), 706-714. doi:10.1093/pcp/pcj041
- Poorter, H., Bühler, J., van Dusschoten, D., Climent, J. y Postma, J. A. (2012). Pot size matters: A meta-analysis of the effects of rooting volume on plant growth. *Functional Plant Biology*, 39(11), 839-850. doi:10.1071/FP12049
- Pichyangkura, R. y Chadchawan, S. (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae; Biostimulants in Horticulture*, 196, 49-65. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.031.
- Prishchepov, A. V., Schierhorn, F. y Löw, F. (2021). Unraveling the diversity of trajectories and drivers of global agricultural land abandonment. *Land*, 10(2) doi:10.3390/land10020097
- Raza, A. (2022). Metabolomics: A systems biology approach for enhancing heat stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 41(3), 741-763. doi:10.1007/s00299-020-02635-8

- Rhodes, D., & Hanson, A. D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44(1), 357-384. doi:10.1146/annurev.pp.44.060193.002041
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Ramakrishnan, M., Singh Sidhu, G. P., Bali, A. S. y Zheng, B. (2020). Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: A review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(2), 509-531. doi:10.1007/s00344-019-10018-x
- Schütz, L., Gattinger, A., Meier, M., Müller, A., Boller, T., Mäder, P. y Mathimaran, N. (2018). Improving crop yield and nutrient use efficiency via Biofertilization—A global meta-analysis. *Frontiers in Plant Science*, 8. doi:10.3389/fpls.2017.02204
- Sinclair, T. R., Manandhar, A., Shekoofa, A., Rosas-Anderson, P., Bagherzadi, L., Schoppach, R. y Rufty, T. W. (2017). Pot binding as a variable confounding plant phenotype: Theoretical derivation and experimental observations. *Planta*, 245(4), 729-735. doi:10.1007/s00425-016-2641-0
- Turner, N. C. (2019). Imposing and maintaining soil water deficits in drought studies in pots. *Plant and Soil*, 439(1), 45-55. doi:10.1007/s11104-018-3893-1
- van Dijk, M., Morley, T., Rau, M. L. y Saghai, Y. (2021). A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. *Nature Food*, 2(7), 494-501. doi:10.1038/s43016-021-00322-9
- Vogel, E., Donat, M. G., Alexander, L. V., Meinshausen, M., Ray, D. K., Karoly, D. y Frieler, K. (2019). The effects of climate extremes on global agricultural yields. *Environmental Research Letters*, 14(5), 054010. doi:10.1088/1748-9326/ab154b
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A. y Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: A global perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7. doi:10.3389/fpls.2016.02049
- Zhang, Z., Cao, B., Gao, S. y Xu, K. (2019). Grafting improves tomato drought tolerance through enhancing photosynthetic capacity and reducing ROS accumulation. *Protoplasma*, 256(4), 1013-1024. doi:10.1007/s00709