UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EVALUACIÓN DE BIOESTIMULANTES CONTRA ESTRÉS HÍDRICO EN LA FISIOLOGÍA DE FRAMBUESA (*Rubus idaeus* L.)

Tesis

Que presenta GERARDO ANASTACIO ANGEL

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Saltillo, Coahuila Junio 2023

EVALUACIÓN DE BIOESTIMULANTES CONTRA ESTRÉS HÍDRICO EN LA FISIOLOGÍA DE FRAMBUESA (Rubus idaeus L.)

Tesis

Elaborada por GERARDO ANASTACIO ANGEL como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Horticultura con la supervisión y aprobación del Comité/de Asesoría

Dr. José Antonio González Fuentes Director de Tesis

Dr. Armando Robledo Olivo

Asesor

Dr. Alejandro Zermeño González

Asesor

Dr. Antonio Flores Naveda Subdirector de postgrado UAAAN

AGRADECIMIENTOS

Con agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por la contribución con la beca, un estímulo muy útil y gratificante durante la formación.

Se agradece al asesor principal de tesis por el apoyo para desarrollar el proyecto, también a los distinguidos miembros del comité de asesoría por su contribución apoyo en equipos y buena disposición para desarrollar el proyecto.

Con agradecimiento al laboratorio de fisiología y al laboratorio de postcosecha del Departamento de Horticultura, además agradecer apoyo del laboratorio del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos por la disposición para llevar a cabo las determinaciones bioquímicas de este trabajo.

A los miembros de núcleo básico académico por su constante actualización, paciencia, creatividad y entusiasmo para enseñar los diferentes temas durante la formación profesional.

Un agradecimiento especial a mi compañera y amiga Eugenia Torres Jardon por confiar e impulsarme en la realización de este proyecto, que me ha ayudado a crecer personal y profesionalmente. Gracias Noah por tu inmensa alegría y energía admirable que siempre puede recargarme de ánimo.

Se agradece a los compañeros de generación por su simpatía, empatía, apoyo, ánimo y buena actitud para el desarrollo de actividades, clases y hacer la estancia en la maestría más agradable.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, una segunda casa muy agradable durante mi formación y a toda la gente relacionada con el campo, esperando que los resultados obtenidos aquí puedan ser aplicados a sus proyectos y tengan mejoras significativas en la productividad necesaria en el campo mexicano.

ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERALv
LISTA DE FIGURASvii
RESUMENviii
ABSTRACTix
INTRODUCCIÓN1
REVISIÓN DE LITERATURA4
Desafíos de la agricultura4
Calentamiento global y el cambio climático4
Estrés ambiental5
Estrés en los sistemas agrícolas5
Metabolismo primario y secundario de las plantas6
Estrés hídrico
Uso de bioestimulantes en la agricultura8
Ceras9
Peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂)
Ácido salicílico
Algaenzims
El cultivo de frambuesa
MATERIALES Y MÉTODOS
Variables agronómicas y vegetativas13
Variables de calidad comercial
Variables fisiológicas14
Área foliar especifica14
Calidad bioquímica14
Análisis estadístico
RESULTADOS Y DISCUSIÓN16
Variables agronómicas y vegetativas16
Número de brotes florales
Variables de calidad comercial
Variables fisiológicas22

Eficiencia instantánea en el uso de agua	25
Área foliar especifica	26
Calidad bioquímica	27
Fenoles totales	28
Antocianinas	29
Vitamina C	30
CONCLUSIONES	31
REFERENCIAS	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 . Influencia de los tratamientos con bioestimulantes en la (a) altura, (b) longitud de raíces, (c) diámetro de tallo y (d) rendimiento de frambuesa bajo estrés hídrico moderado (-0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas p ≤ 0.05
Figura 2 . Influencia de los tratamientos con bioestimulantes en el número de brotes florales en plantas de frambuesa sometida a estrés hídrico moderado (-0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p \le 0.05$
Figura 3 . Efecto de bioestimulantes sobre (a) peso seco de biomasa aérea y (b) peso seco de raíz en frambuesa sometida a estrés hídrico moderado (-0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p \le 0.05$
Figura 4 . Efecto de bioestimulantes sobre (a) solidos solubles totales, (b) pH y (c) acidez titulable en frutos de frambuesa sometida a estrés hídrico moderado (-0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p \le 0.05$
Figura 5 . Efecto de bioestimulantes sobre (a) tasa fotosintética, (b) transpiración y (c) conductancia estomática en plantas de frambuesa sometidas a estrés hídrico moderado (0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p \leq 0.05 \dots 25$
Figura 6 . Efecto de bioestimulantes sobre (a) área foliar específica y (b) eficiencia instantánea en el Uso de Agua (WiUA) en plantas de frambuesa sometidas a estrés hídrico moderado (-0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p \le 0.05$
Figura 7. Efecto de bioestimulantes sobre el contenido (a) fenoles totales, (b) antocianinas y (c) vitamina C en frambuesa sometida a estrés hídrico moderado (-0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p \le 0.05$

RESUMEN

EVALUACIÓN DE BIOESTIMULANTES CONTRA ESTRÉS HÍDRICO EN LA FISIOLOGÍA DE FRAMBUESA (Rubus idaeus L.)

GERARDO ANASTACIO ANGEL MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO DR. JOSE ANTONIO GONZALEZ FUENTES

Director de tesis

En la actualidad la actividad agrícola se ve amenazada constantemente por los efectos del cambio climático y la expresión radical de los factores ambientales, como la irregularidad en la distribución pluvial responsable de la disponibilidad del agua y déficit genera estrés hídrico en los sistemas productivos, afectando aspectos vegetativos, morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. El uso de bioestimulantes es una estrategia para contrarrestar este impacto, por ser capaces de mejorar la eficiencia de los cultivos en el uso de los recursos o generar respuestas de adaptación, como la producción de metabolitos, que mitigan los efectos del estrés oxidativo. Bajo este contexto se planteó el uso de ceras, peróxido de hidrogeno, ácido salicílico y algaenzims, sobre plantas de frambuesa sometidas a estrés hídrico moderado (-0.8 MPa) con el objetivo de evaluar la respuesta en aspectos vegetativos, fisiológicos y calidad bioquímica de frutos, se empleó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Como resultados se obtuvo que las ceras, ácido salicílico y el extracto de algas aumentaron la tasa fotosintética, los cuatro tratamientos incrementaron la longitud de raíces, mientras que las ceras influyeron en la altura, y el H₂O₂ la biomasa de raíz. Por otro lado, respecto al control, se incrementó el contenido de vitamina C y antocianinas en frutos, dos importantes antioxidantes que hacen un producto funcional para el humano. Por lo tanto, el uso de estos productos se puede visualizar como una importante herramienta para el manejo de cultivos en ambientes con restricción de agua.

Palabras clave: cambio climático; fotosíntesis; metabolitos; sistemas productivos

ABSTRACT

EVALUATION OF BIOSTIMULANTS AGAINST HYDRIC STRESS IN THE PHYSIOLOGY OF RASPBERRY (*Rubus idaeus* L.)

GERARDO ANASTACIO ANGEL MASTER OF SCIENCE IN HORTICULTURE UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO DR. JOSE ANTONIO GONZALEZ FUENTES

Thesis supervisor

Currently, agricultural activity is constantly threatened by the effects of climate change and the radical expression of environmental factors, such as irregular rainfall distribution, which is responsible for water availability and deficit and generates water stress in productive systems, affecting vegetative, morphological, physiological and biochemical aspects. The use of biostimulants is a strategy to counteract this impact, as they are able to improve crop efficiency in the use of resources or generate adaptive responses, such as the production of metabolites, which mitigate the effects of oxidative stress. In this context, the use of waxes, hydrogen peroxide, salicylic acid and algaenzims on raspberry plants subjected to moderate water stress (-0.8 MPa) was proposed in order to evaluate the response in vegetative and physiological aspects and biochemical quality of fruits, using a completely randomized design with five treatments and four replicates. The results showed that waxes, salicylic acid and algae extract increased photosynthetic rate, the four treatments increased root length, while waxes influenced height, and H2O2 increased root biomass. On the other hand, with respect to the control, the content of vitamin C and anthocyanins in fruits, two important antioxidants that make a functional product for humans, was increased. Therefore, the use of these products can be visualized as an important tool for crop management in environments with water restriction.

Index words: climatic change; photosynthesis; metabolites; production systems

INTRODUCCIÓN

El cambio climático es un reto para el desarrollo de la agricultura y la seguridad alimentaria, la modificación de los patrones de temperatura y precipitación son elementos que ejercen efectos nocivos en la sostenibilidad agrícola (Cassia *et al.*, 2018; Malhi *et al.*, 2021). La emisión de gases de efecto invernadero se considera clave en la modificación de estos componentes del clima, dentro de los cuales la disponibilidad de agua es el más importante por los efectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que produce en las plantas (Anjum *et al.*, 2011; Boretti y Florentine, 2019; Ozturk *et al.*, 2021). Algunos procesos afectados como expansión celular, síntesis de proteínas, apertura estomática, conductancia y fotosíntesis (metabolismo primario) traen como consecuencia bajos generación de biomasa, además una fuente limitada de energía y poder reductor afecta el metabolismo secundario encargado de generar respuestas de adaptación (Florido y Bao. 2014; Parmesan y Hanley, 2015; Dusenge *et al.*, 2019).

El metabolismo primario de las plantas comprende los procesos fotosíntesis y respiración, la realización de los mismos en tasas estables, es lo que permite a las plantas obtener las sustancias y energía para crecer, desarrollarse y reproducirse. En el proceso fotosintético asociado a la transpiración, las plantas convierten la energía radiante en energía química almacenada en adenosin trifosfato (ATP), nicotinamida adenina di-nucleótido fosfato (NADPH) y carbohidratos, sin embargo, este proceso solo es posible con la presencia de agua y sus propiedades (Holding y Streich, 2013). Por lo tanto, la exposición a estrés hídrico se traduce en última instancia en una disminución de los rendimientos (Hayat *et al.*, 2008).

En la agricultura del futuro a pesar de los avances científicos en el tema de los mecanismos genéticos y moleculares sobre la resistencia a la sequía, las modificaciones de los factores ambientales como la temperatura y la limitante del agua, aumentarán los costos de producción y las pérdidas económicas, disminuirán rendimientos y la oferta de alimentos, lo cual generara dificultades de acceso a los alimentos con las repercusiones sociales relacionadas (Nelson *et al.*, 2014; Fang y Xiong, 2015; Arora, 2019).

El uso de compuestos bioestimulantes de fuentes naturales y artificiales surgen como una propuesta capaz de permitir mejoras en la productividad y calidad de los productos en los sistemas agrícolas bajo condiciones de estrés cada vez más frecuentes (Bulgari *et al.*,

2019; Del Buono, 2021). La complejidad de estos productos, sus componentes y características son capaces de inducir la bioestimulación a nivel celular resultando en modificaciones de los programas de desarrollo de los organismos expuestos (González *et al.*, 2021). Moléculas como ácido salicílico y algas marinas han mostrado efectos positivos contra estrés (Carvalho *et al.*, 2018; *Rai et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2020a; Shukla *et al.*, 2018; Zulfiqar *et al.*, 2021) a través de la regulación de procesos metabólicos, producción de metabolitos secundarios y osmoprotectantes, aumentando la producción de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, e incluso actuando como antioxidante.

Otras moléculas como el peróxido de hidrogeno (H₂O₂), fue empleado bajo el sustento de que esta especie reactiva de oxigeno (ERO) es resultado a la exposición al estrés y que el balance de las mismas es responsable de la activación del sistema de defensa antioxidante benéfico para las plantas (Hasanuzzaman *et al.*, 2021), además se ha demostrado que la aplicación de H₂O₂ es estimulante, cuando se maneja en rango de 0.05 a 2.5 mM en plantas de yuca bajo estrés, afectando positivamente la formación de raíces adventicias y crecimiento de hojas (Deng *et al.*, 2012). Adicionalmente se aplicó un producto a base de ceras naturales cuya posible forma de acción, se basa en mejorar las funciones de la cutícula contra perdida de agua y reflexión de la radiación solar, ambas capaces de proporcionar protección contra factores de estrés (Tafolla, *et al*, 2013, Sharma *et al.*, 2018b).

Con base a lo expuesto se planteó como objetivo evaluar la respuesta de la frambuesa, sometida a estrés hídrico, a la aplicación de diferentes compuestos: ceras, H₂O₂, AS y Algaenzims[®], para determinar sus efectos en crecimiento, fisiología y características de calidad comercial y bioquímica de los frutos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta del cultivo de frambuesa sometida a estrés hídrico, a la aplicación de bioestimulantes.

HIPÓTESIS

Los estimulantes aplicados induciran mejoras significativas en al menos uno de los componentes fisiológicos, bioquímicos y productivos del cultivo de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) sometida a estrés hídrico.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto en la fisiología.
- Determinar el efecto en aspectos vegetativos y agronómicos.
- Determinar el efecto en los componentes de calidad y bioquímicos de los frutos.

REVISIÓN DE LITERATURA

Desafíos de la agricultura

El principal desafío de la humanidad se comparte con el de la agricultura, que se resume en abastecer con alimentos a la población en constante crecimiento, esta tarea se vuelve cada vez mas difícil debido a la actividad humana, generadora de gases de efecto invernadero que propician el calentamiento global y el cambio climático, generando inestabilidad en los ecosistemas al alterar los factores ambientales, dentro de los cuales la disponibilidad de agua es el mas determinante ya que su deficiencia impacta la productividad agrícola y pone la balanza la seguridad alimentaria (Pereira, 2017).

Calentamiento global y el cambio climático

El calentamiento global es el resultado de la sumatoria de los efectos de los factores naturales y antropogénicos, que elevan la cantidad de gases de efecto invernadero en la atmosfera, principalmente CO₂ y en segundo lugar el metano cuya capacidad de mantener el calor se ha estimado en 20 y 30 veces superior al primero. La mayor fuente de emisiones de carbono antropogénico proviene de la combustión de combustibles fósiles, una actividad inductora de eventos característicos del calentamiento global como la reducción del hielo polar, aumento de la temperatura, aumento de la desertificación y la pérdida de biodiversidad animal y vegetal (Goel y Bhatt, 2012; Warren *et al.*, 2018).

El aumento de la temperatura global del aire está estrechamente vinculado con el aumento de los desastres naturales relacionados con anomalías hidrológicas y meteorológicas, lo cual aumenta el riesgo de la incidencia de eventos extremos que representan el cambio climático (Mokhov, 2022). Los efectos graves ocasionados por el cambio climático son la caída de los niveles freáticos, escases de agua y desertización de tierras de cultivo, cambios de patrones de cultivo y disminución de rendimientos, escases de alimentos y proliferación de enfermedades (Goel y Bhatt, 2012; Malhi *et al.*, 2021; Skendžić *et al.*, 2021).

Estrés ambiental

El crecimiento y desarrollo de una planta depende de la interacción con los factores ambientales y abióticos circundantes, cuando los valores de temperatura, dióxido de carbono, radiación solar, ozono, agua del suelo, salinidad y fertilidad de suelo se expresan fuera del rango en que las plantas son capaces de tolerar, las plantas sufren modificaciones necesarias en estructura, anatomía, fisiología y bioquímica con la finalidad de hacer frente a los efectos nocivos del estrés (Pant *et al.*, 2021). El cambio climático actual somete a los cultivos a múltiples factores de estrés, esto también afecta la diversidad microbiana de las plantas, conduciendo a una disminución severa del crecimiento y supervivencia de las mismas (Zandalinas *et al.*, 2021).

Estrés en los sistemas agrícolas

Las fuentes de estrés como la sequía, calor, salinidad y luz alta modifican el estado redox celular, al aumentar la producción de especies reactivas de oxigeno (ERO), cabe señalar que cada orgánulo celular tendrá distinto nivel de ERO y este se modificará según el tipo de estrés al que el organismo se expone, esto es posible debido a que cada orgánulo posee vías de producción y eliminación, un aspecto indispensable para que esto ultimo ocurra es que las células sean abastecidas por NADPH, una molécula cuya energía sera usada para la desintoxicación de las ERO hasta mantener un nivel que permite la señalización y mejorar sus procesos de adaptación (Choudhury *et al.*, 2017).

Cuando la producción de ERO y especies reactivas de nitrógeno se eleva en los compartimentos celulares ocasiona estrés oxidativo y con ello se altera el estado redox celular, esto es relevante pues esta alteración es la responsable de la regulación de los factores de transcripción y enzimas involucradas en los cambios epigeneticos, controla la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y modifica las proteínas histonas y la remodelación de la cromatina que conduce la expresión génica que ayuda mediar la respuesta al estrés y el crecimiento vegetal (Ramakrishnan *et al.*, 2022).

Con el cambio climático, la oscilación de los factores abióticos son una fuente innegable de estrés en la producción de cultivos, con efectos devastadores en los rendimientos y en el aumento de perdidas que posteriormente afectan el suministro de alimentos. Cuando este estrés se dirige a las vías bioquímicas y de señalización, es cuando surge el efectos sobre los procesos fisiológicos, por lo que es aquí donde el empleo de sustancias busca

generar una respuesta como la activación del sistema antioxidante, el sistema de control de calidad de proteínas, osmoreguladores y ácidos grasos insaturados que propician protección celular (Dúranová *et al.*, 2023)

Aunque las ERO generan varios efectos negativos en proteínas, ADN y membranas, hoy se conoce la esencialidad de las mismas para la comunicación subcelular e intercelular, además de que su señalización requiere sistemas metabolizadores de ERO y transmitir señales oxidativas que también regulan las vías de señalización de fitohormonas indispensables para el desarrollo y defensa al estrés de las plantas (Noctor *et al.*, 2018).

Metabolismo primario y secundario de las plantas

Thirumurugan *et al.* (2018), definen al metabolismo como el total de reacciones químicas llevadas a cabo por un organismo, de las cuales se sintetizan metabolitos intermediarios y otros metabolitos que generalmente son pequeñas moléculas, donde lo que diferencia un metabolito primario del secundario es que el primero está presente en toda célula capaz de dividirse y es una parte estructural, mientras que el segundo puede estar o no presente, sin ser tan imprescindible para el crecimiento del organismo.

Algunos ejemplos de metabolitos primarios son los aminoácidos, lípidos y carbohidratos, de estos es posible que se generen otros secundarios los cuales se asocian con colores, sabores y olores (Ashraf *et al.*, 2018).

El metabolismo secundario de las plantas es el resultado de la interacción con el medio ambiente, y comprende todas las rutas de biosíntesis y acumulación de metabolitos secundarios, cuyas cualidades permiten hacer frente a factores bióticos y abióticos estresantes, además de regular la actividad metabólica de las plantas (Cao *et al.*, 2020; Erb y Kliebenstein, 2020). La alteración de los factores del medio ambiente, influyen en la producción de metabolitos secundarios en las plantas, esto ocurre a través de la activación de mensajeros intermediarios como elicitores y hormonas capaces de estimular la transcripción de determinados genes (Waterman y Mole, 2019).

La fundación de Nutrición Británica agrupa a los metabolitos secundarios en 4 grandes categorías como terpenoides (carotenoides, esteroles, glucósidos cardiacos y volátiles de plantas), fenólicos (ligninas, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, ligninas, estilbenos y flavonoides), compuestos que contienen nitrógeno (aminoácidos no proteicos, glucosidos

cianogenicos y alcaloides) y compuestos que contienen azufre (glutatión: GSH, glucosinolatos: GSL, fitoalexinas tioninas, y lectinas) (Ahmed *et al.*, 2017).

Los metabolitos producto del metabolismo secundario de las plantas son antioxidantes, cuya función principal reside en evitar o retardar la oxidación de diversos sustratos, por lo tanto son encontrados en toda la planta manteniendo la homeóstasis celular, dentro de ellos el grupo más grande son los polifenoles caracterizados por tener anillos aromáticos y grupos hidroxilo que permiten la protección contra estrés de origen biótico y abiótico, mientras que si se encuentran en frutos tienen relevancia en la salud humana (Soto *et al.*, 2017)

El conocimiento de diversos mecanismos que usan las plantas para adaptarse a condiciones ambientales a nivel morfología han sido observables y medibles, por otro lado, aunque la adaptabilidad bioquímica que incluye la producción de determinados metabolitos frente a una tensión ambiental especifica no se ha descrito en forma definitiva, se ha estado aprovechando para obtener productos de interés comercial en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmetiquera y de agro insumos, por lo que la comprensión de compresión de los procesos metabólicos no solo permiten conocimiento para hacer frente al estrés sino que también permiten usar las fuentes de estrés para producir un metabolito determinado con una finalidad económica (Yang *et al.*, 2018).

Estrés hídrico

El estrés hídrico es uno de los efectos negativos más importantes del cambio climático, con repercusiones directas en el proceso fotosintético, lo cual puede generar una elevada concentración de especies reactivas de oxígeno, estas son capaces de dañar orgánulos como los cloroplastos y aquí donde entran en juego las enzimas antioxidantes encargadas de regular la concentración de estas moléculas oxidantes (Hossain, 2021).

Durante un evento de estrés las plantas experimentan efectos como inhibición de crecimiento, mientras que a nivel fisiológico la reducción del intercambio de gases disminuye la tasa fotosintética, además otros efectos ocurren a nivel morfológico, bioquímico y molecular que se traducen al final del ciclo de cultivo en pérdidas en rendimientos y calidad (Sun *et al.*, 2020; Seleiman *et al.*, 2021). Se conoce que el estrés por sequía es capaz de aumentar la actividad no enzimática y enzimática como la producción de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD),

malondialdehido (MDA), ocurriendo en forma gradual a la exposición a esta condición (Liang *et al.*, 2020).

Uso de bioestimulantes en la agricultura

Un bioestimulante se puede definir como un producto formulado de origen biológico que mejora la productividad de las plantas como consecuencia de las propiedades nuevas o emergentes del complejo de constituyentes y no como una única consecuencia de la presencia de nutrientes esenciales, reguladores del crecimiento o compuestos protectores de las plantas (Yakhin *et al.*, 2017).

El modo de acción especifico si se atiende la propia definición es difícil de determinar, sin embargo es más fácil hablar del mecanismo de acción que refiere a un efecto amplio sobre un organismo, esto también permite diferenciar a otros compuestos como fitohormonas y nutrientes que ya tienen determinado su modo de acción específico en las plantas (Yakhin *et al.*, 2017).

La determinación de los mecanismos de acción de los bioestimulantes involucra auxiliarse de herramientas de las ciencias denominadas omicas como la transcriptomica, genómica y metabolomica, la correlación de estas es clave para determinar la forma en que estos compuestos actúan. Esto permite ver las rutas metabólicas activadas cuando son aplicados bajo condiciones sin estrés y con estrés y como alteran los fenotipos, sin embargo, solo cuando se integran estudios de metabolomica se obtienen un enfoque completo y concreto de los mecanismos moleculares regulados o modificado con la aplicación de los biestimulantes en organismos bajo estrés (Nephali et al., 2020).

La clasificación de los mismos se ha visto en constante actualización, sin embargo, una de las clasificaciones más aceptadas fue planteada por Du Jardín (2015), quien los clasifico en 7 grupos: ácidos húmicos y fulvicos, compuestos de nitrógeno y proteína hidrolizada, extractos de botánicos y algas marinas, quitosan y otros biopolímeros, compuestos inorgánicos, hongos benéficos y bacterias benéficas. Otros investigadores como Franzoni *et al.* (2022) los clasifican en 5 grupos parecidos: extractos de algas y plantas, sustancias húmicas, proteínas hidrolizadas y compuestos nitrogenados, microorganismos y compuestos inorgánicos con acción biostimulante.

El objetivo básico de emplear bioestimulantes es aumentar la eficiencia en el uso de nutrientes y agua, aumentar la tolerancia contra estrés abiótico y mejorar los rendimientos y calidad de los productos comerciales obtenidos (Bulgari *et al.*, 2019: Du Jardin *et al.*, 2020). Por lo tanto, la respuesta de las plantas se puede basar en ver los efectos en aspectos fisiológicos (fotosíntesis, concentración de clorofila, transpiración), agronómicos (rendimiento, acumulación de biomasa, calidad del producto), bioquímicos (actividad enzimática, sistemas de defensa antioxidante, asimilación de nutrientes) (Franzoni *et al.*, 2022).

La implementación de estas sustancias puede realizarse mediante aspersiones foliares o vía riego, en cualquier caso el compuesto tiene que disolverse y esto indica su bajo tamaño por lo que puede fácilmente absorberse y traslocarse por los tejidos de las plantas (Yakhin *et al.*, 2017).

Ceras

La división del entorno y el interior de las plantas se encuentra dividido por el tejido superficial de las plantas conocido como cutícula, las funciones que cumple en ellas es vital para las mismas, ya que es un tejido no vivo multifuncional. Dentro de las funciones que son atribuidas se encuentran el control de la transpiración, control de la perdida y asimilación de solutos polares, control del intercambio de gases y vapor, transporte de sustancias lipofilicas, repeler partículas y agua, atenuación de radiación fotosintéticamente activa y UV, contención mecánica, y ser interface para interacciones bióticas (Riederer y Muller, 2008). Estas funciones permiten aumentar la protección contra deshidratación, radiación UV, vientos, además de evitar daños de insectos y microorganismos (Domínguez et al., 2017).

Este biopolímero está compuesto principalmente de cutina y ceras, donde esta última determina las relaciones fisiológicas y ecológicas en la interacción de las plantas con el medio biótico y abiótico (Jetter *et al.*, 2006). La composición de las ceras es muy compleja se integrada por ácidos grasos de cadena larga y sus derivados, como aldehídos, alcanos, alcoholes, cetonas y esteres, la polaridad de estos regula la perdida de agua no estomática y el intercambio de gases (Lee y Suh, 2015).

Aun cuando la aplicación de las ceras es limitada en la agricultura, demostraron que la aplicación de melatonina logro restringir la perdida de agua en plantas de tomate bajo

estrés hídrico, esto fue a través del aumento de la deposición de ceras cuticulares en hojas, cuyo resultado fue la reducción de la permeabilidad de hojas (Ding *et al.*, 2018).

Otra forma en que las ceras resultan benéficas para tolerar factores estresantes es mediante la refracción de radiación, que se considera proporcional a la cantidad de cera producida, esto también puede disminuir la temperatura de hojas mejorando la actividad metabólica (Cossani y Reinolds, 2012). Estas son las principales razones por las que las ceras pueden ser una herramienta, en medio de entornos estresantes.

Peróxido de hidrogeno (H2O2)

El peróxido de hidrogeno es una ERO, estas moléculas juegan un palel clave en la señalización celular, regulando procesos metabólicos (Minibayeva *et al.*, 2022).

A nivel celular las plantas producen peróxido de hidrogeno y lo hacen a través del superóxido y la superoxido dismutasa, por transporte de electrones en cloroplastos en mitocondrias y cloroplastos, NADPH oxidasas de las membranas plasmáticas y oxidasas peroximales entre otras, el movimiento intracelular de esta molécula es por acuapurinas, mientras que la desintoxicación es mediante la catalasa, peroxirredoxina, glutatión y ascorbato peroxidasa. Esta molécula juega una función clave en la expansión, desarrollo y defensa celular, en exceso puede desencadenar la autofagia del cloroplasto y el peroxisoma, y muerte celular programada (Smirnoff y Arnaud, 2019).

El uso externo de peróxido de hidrogeno ha sido documentando en varias especies. En un experimento de estrés hídrico en el cultivo de arroz en sistema hidropónico y suelo, las aplicaciones de 5 mmol/L H₂O₂ y 0.5 a 1 mmol de ácido salicílico fueron capaces de proteger la planta. Mientras que la sequía afecto la germinación, crecimiento de plántulas, pigmentos fotosintéticos y contenido de agua, se elevaban los contenidos de prolina, la peroxidación de lípidos; como resultado de la aplicación de ácido salicílico y peróxido de hidrógeno se activo la produccion enzimas antioxidantes y la protección de pigmentos fotosintéticos manteniendo fotosíntesis a niveles normales (Sohag *et al.*, 2020).

Ácido salicílico

El ácido salicílico y sus derivados denominados salicilatos son metabolitos secundarios producidos por plantas, hongos y bacterias, en plantas se produce por la vía del shikimato o ácido shikimico. Esta hormona miembro de los compuestos fenólicos, está implicada en

la regulación del crecimiento vegetal, respuesta al estrés biótico y abiótico (Mishra y Baek, 2021).

Además de ser el ácido salicílico el responsable de regular la expresión génica relacionada con la patogénesis y síntesis de compuestos defensivos implicados en la resistencia local y la resistencia sistémica adquirida de plantas, esta hormona de señalización ha permitido mejorar la adaptabilidad de plantas al estrés estimulando la fotosíntesis, crecimiento y otras características bioquímicas, por lo que se considera que puede actuar directamente como antioxidante neutralizando ERO y también a través de la activación del sistema antioxidante de plantas (Wani *et al.*, 2017).

En un experimento llevado a cabo en cucúrbita pepo bajos estrés hídrico los niveles de malondialdehido, peróxido de hidrogeno y fuga de iones fueron elevados lo que represento daños severos en las membranas, mientras que con la aplicación de ácido salicílico se vieron disminuidos debido al aumento de las enzimas SOD y POX que mitigan el efecto del peróxido de hidrogeno y por lo tanto se reflejaron el crecimiento del cultivo (Biareh *et al.*, 2022).

Algaenzims

Las algas y sus productos se han estado empleando en la industria farmacéutica, la alimentación de animales y humanos, además de la agricultura, esto último es posible gracias a que su compleja constitución que provee de hormonas, polisacáridos, minerales y diversos metabolitos que mejoran diversos procesos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en las plantas, aumentando su productividad, además se ha demostrado que son capaces de mejorar propiedades físicas y químicas del suelo, por lo que representan un herramienta útil en la búsqueda de un agricultura sustentable (Perez *et al.*, 2020).

La aplicación de algas tiene diversas facilidades ya que la producción de extractos es viable, puesto que pueden generar volumen en corto tiempo, un ejemplo es el uso de alga verde mezclada con café: peatmos 12 y 87.5% (v:v) como sustrato, que permitio influir positivamente en la altura, área foliar, emergencia, biomasa de raíz fresca y seca de plántulas de albahaca, además de incrementar el contenido de clorofila (Espinoza *et al.*, 2016).

La aplicación de extractos de algas es una actividad muy extendida en la agricultura ya que usar este tipo de productos ha demostrado diversos resultados en plantas desde

procesos como la germinación, crecimiento, el aumento de la productividad, funcionalidad de productos y aumentar la tolerancia a estrés abiótico (Colla y Rouphael, 2020)

Un producto ampliamente probado en diversas plantas y hortalizas es el Algaenzims, donde actuó de diversas formas como mejorar la absorción de micronutrientes, incrementos de rendimientos, aumentos en solidos solubles totales, mejorando vida de anaquel entre otras respuestas útiles en diferentes productos agrícolas (Canales, 1999).

El cultivo de frambuesa

La planta de frambuesa es un arbusto leñoso, caduficolio, de este se forman nuevos tallos de forma anual también llamado primocañas cuando son vegetativos y floricañas cuando son productivos, se considera que existen variedades que producen en un mismo ciclo y otros que lo hacen en dos. El fruto se considera agregado de drupas por lo que se denomina polidrupa (SIAP, 2022).

Como resultado del calentamiento global, el aumento de la temperatura del ambiente provoca en el cultivo de frambuesa una excesiva evapotranspiración y mayor demanda de agua, además de afectar la tasa fotosintética cuyo optimo se alcanza a temperaturas menores a 25°C (Saqib *et al.*, 2022). Este contexto genera la necesidad de buscar alternativas para contrarrestar los efectos que tenga el déficit hídrico en este cultivo y mantener la productividad, particularmente en este trabajo se aborda una solución desde la óptica de la bioestimulación.

La producción de frambuesa en México es una actividad económica muy importante en el país, aun cuando el principal comprador de este producto es Estados Unidos también tiene como destino a 33 países de América, Europa, Asia y Oceanía, con un valor en con un valor en exportaciones de 1,104 millones de dólares en el 2020. Son los estados de Jalisco, Michoacán y Baja California el referente de producción en el país, sin embargo, la producción conjunta de los diferentes estados de la república mexicana consiguió el segundo lugar en producción mundial para el 2019 (SADER, 2021).

La derrama económica generada por la frambuesa coloca a este fruto en el segundo lugar de importancia económica dentro de la berries, alcanzando en el año 2021 un valor de 1,217 millones de dólares (SIAP, 2022).

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se estableció en un macrotunel con paredes de fibra de vidrio, techo de polietileno, pared húmeda y extractores de aire, del departamento de Horticultura, en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México. El material vegetal utilizado fue plantas de frambuesa XE25 de segundo ciclo, establecida en macetas de 11 L, con sustrato de crecimiento compuesto por fibra de coco-peat moss 60:40 (v/v) con los valores de propiedades físicas: 88% de porosidad total, 25% aireación y 63% de retención de humedad. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con 5 tratamientos y 4 repeticiones con 2 plantas por unidad experimental, dispuestas en doble hilera.

La aplicación de tratamientos se inició cuando las plantas alcanzaron 60 cm de altura induciendo el primer episodio de estrés hídrico que consistió en detener el riego a las plantas hasta obtener un potencial de hídrico de (-0.8 MPa) para posteriormente continuar con riegos normales repitiendo el estrés en un periodo de 15 días, misma frecuencia que tuvieron las aplicaciones de tratamientos.

Los tratamientos consistieron en dosis recomendadas de greencover as $\$ (cera natural: 5 mL L $^{-1}$), peróxido de hidrogeno (10^{-4} M), ácido salicílico (0.27 mM), algaenzims $\$ (7.5 mL L $^{-1}$) y el control con recuperación del 50% del volumen transpirado con solucion nutritiva Steiner (Steiner, 1961)

Cuatro días posteriores a la tercera aplicación se iniciaron las evaluaciones.

Variables agronómicas y vegetativas

Para determinar efectos físicos que tuvieron los estimulantes sobre las plantas de frambuesa se determinó diámetro de tallos con un vernier MYTUTOYO, la altura de plantas y longitud de raíces con un flexómetro Truper, peso seco de raíz, peso seco de biomasa aérea y rendimiento con una báscula electrónica RHINO, y se conto el número de brotes florales por planta.

Variables de calidad comercial

Las características de calidad que demanda el mercado como solidos solubles totales se determinararon con un refractómetro ATAGO (MASTER-alfa), pH con el uso de un potenciómetro marca Hanna (HI 98107) y acidez titulable, se obtuvo por titulación con hidróxido de sodio (AOAC, 2000).

Variables fisiológicas

Las variables de respuesta fisiológica como la tasa de fotosintética μ mol CO_2 m⁻² s⁻¹, transpiración mmol H_2O m⁻² s⁻¹, conductancia estomática mol H_2O m⁻² s⁻¹, fueron medidas en hojas maduras orientadas al este empleando el equipo de fotosíntesis portátil LI-6800 (LI-COR, Nebraska USA). Con los datos se obtuvo la eficiencia instantánea del uso de agua (EiUA). La radicación con la que trabajo el equipo LI-COR fue de 850 μ mol CO_2 m⁻² s⁻¹.

Área foliar especifica

El área foliar especifica (AFE), una variable morfológica se obtuvo mediante muestras de láminas foliares con área conocida, y su división entre su propio peso seco, para obtener cm⁻² g.

Calidad bioquímica

Las variables de respuesta bioquímica como la vitamina C se determinó mediante la metodología reportada por Padayatt *et al.*, (2001). El procedimiento consiste en pesar 10 g de fruto, triturar en mortero, con 10 mL de ácido clorhídrico al 2% (v/v), el resultado se homogeniza en 40 ml de agua destilada, se filtra y recoge en un matraz. 10 mL del sobrenadante se titulan con 2,6-diclorofenol (1 x 10 -3 N) hasta alcanzar el color rosa.

La vitamina C se calcula con la formula mg/100 g PF= (ML 2.6 diclorofenol x 0.0088 x volumen total x 100) / (volumen de alícuota por peso de muestra)

La determinación del contenido de antocianinas involucro la metodología de Atanacković *et al.*, (2012), consiste en tomar 100 mg de fruto de frambuesa, adicionar 2 ml de solución extractora etanol/agua/HCl concentrado en proporción (70:29:1), se homogeniza con vortex y se coloca en baño de ultrasonido por 5 minutos, para posteriormente centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos. Se lee el sobrenadante a 540 nm en espectrofotómetro UV-Vis y se calcula la concentración en equivalentes de malvidin-3.glucósido.

Los fenoles totales se obtuvieron usando la metodología de Ainsworth & Gillespie, (2007) mediante espectrofotometría utilizando reactivo Folin-Ciocalteu 1M. La técnica consiste en colocar 50 uL de extracto de biomoléculas más 200 uL de reactivo Folin-Ciocalteu 1M, 500 uL Na₂ CO₃ al 20% (m/v) y 5 mL de agua destilada. Esto se reposa a 45° durante 20 minutos, para generar la reacción y se lee la muestra en espectrofotómetro UV-Vis a

longitud de onda de 750 nm, los resultados se interpolaron en la curva de calibración trazada con ácido gálico.

Análisis estadístico

El experimento se estableció mediante un diseño completamente al azar, con 5 tratamientos y 4 repeticiones. Los datos obtenidos se analizaron en el programa Infostat 2018, obteniendo un ANVA y se usó LSD Fisher ($p \le 0.05$) como prueba de comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables agronómicas y vegetativas

Los valores de los componentes vegetativos de la planta como son altura y longitud de raíz muestran diferencias estadísticas significativas, mientras que no se reflejaron en el diámetro del tallo y en el peso del fruto (Figura 1). Las plantas tratadas con el producto a base de ceras naturales aumentaron su altura en 10.48% en comparación con plantas control, mientras que el resto de tratamientos no mostraron diferencias significativas (Figura 1, a). El comportamiento de las plantas sometidas a una condición de estrés hídrico, tienden a reducir aspectos como el área foliar, contenido relativo de agua, potencial hídrico y contenido de clorofila (Ahmad *et al.*, 2021), de esta manera se produce menor cantidad de biomasa afectando el crecimiento. La aplicación de los bioestimulantes: H₂O₂, algas marinas y ácido salicílico, no generaron diferencias estadísticas significativas en los valores de altura comparados con el control.

La longitud de las raíces de las plantas incremento con el uso de ceras, H₂O₂, ácido salicílico (AS) y algas marinas, superando al control en 104.47, 107.46, 182.08 y 76.11% respectivamente (Figura 1, c). El uso de ceras puede favorecer el crecimiento de raíces evitando la pérdida de agua como lo enuncia Patwari et al. (2019) y mediante la protección de la excesiva radiación solar (Xue et al., 2017), que permiten sintetizar complejos de carbono que permitirán el crecimiento de raíces para tener mayor superficie de exploración en la búsqueda de agua. Con respecto a las aplicaciones de H₂O₂ a concentración de 600 µmol se ha reportado que es capaz de promover el enraizamiento, esto ocurre a través de la protección de la estructura mesofilica, que trae mejoras en el aparato fotosintético permitiendo la producción de carbohidratos y nitrógeno que puede emplearse para zonas en crecimiento como la raíz (Liao et al., 2012), también se ha encontrado que el H₂O₂ al 2% incrementa el crecimiento en plantas al estimular la división y alargamiento celular (Farouk y Qados, 2018). El ácido salicílico también es capaz de incrementar la longitud de raíces como demuestra Hussein et al. (2007), coincidiendo con los resultados encontrados en este trabajo, además de demostrar el efecto en la formación de raíces adventicias. El uso de algas es capaz de regular genes que codifican para aumentar el crecimiento de raíz y a la promoción de la resistencia al estrés abiótico (Kumar et al., 2020a; Battacharyya et al., 2015).

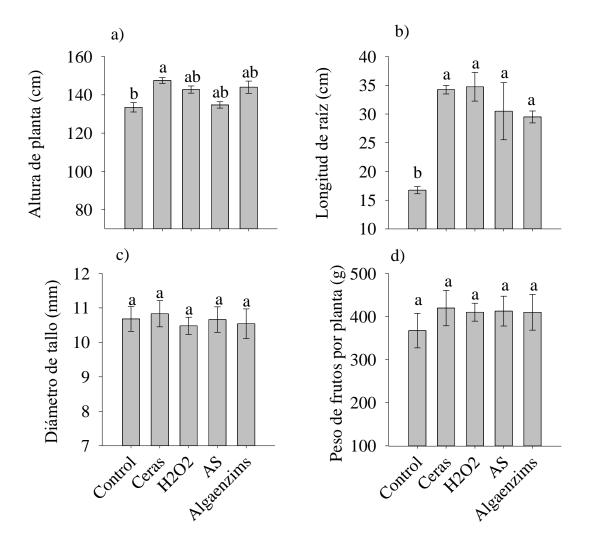


Figura 1. Influencia de los tratamientos con bioestimulantes en la (a) altura, (b) longitud de raíces, (c) diámetro de tallo y (d) rendimiento de frambuesa bajo estrés hídrico moderado (-0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p \le 0.05$.

El diámetro del tallo de las plantas y el rendimiento expresado como peso de fruto por planta (Figura1 c y d), no se vieron afectados por la aplicación de los tratamientos, sin embargo, se aprecia una tendencia numérica a incrementar en esta última variable, lo que sugiere que al incrementar el número de aplicaciones pudiera lograrse expresar diferencias estadísticas significativas. Investigadores como Orabi *et al.* (2015) con dosis más altas lograron obtener incrementos en el rendimiento de dos cultivares de tomate con la

aplicación de H_2O_2 y ácido salicílico en dosis de 0.5 y 1.0 mM respectivamente, sin embargo, la condición de estrés estudiada fue causada por baja temperatura, que no involucra la disminución del agua en tejidos como lo hace el estrés hídrico, pero si impide su uso por las plantas.

Número de brotes florales

La aplicación del tratamiento algaenzims permitió aumentar con 16.3% la producción de brotes florales (cargadores), estos brotes son el lugar donde emergen las flores que se convertirán en frutos, por lo que el aumento de los mismos puede tener un efecto positivo en el rendimiento. En el cultivo de avena la generación de brotes en medio de la sequía es debida a la expresión de genes que regulan esta característica, por lo que solo cuando son parte del genoma de la planta estos pueden ser estimulados (Hura *et al.*, 2022), se sabe que los genes de la familia MADS-Box, un dominio estrctural de ADN altamente conservado codifica un gran número de reguladores de trascripción y controla la transición a la floración en arabidopsis (Fang *et al.*, 2018). Por otro lado, los polisacáridos como carbohidratos, sulfatos y acidos uronicos de los que se componen los extractos de algas pueden estimular aumentando el contenido de ácido indol acético (IAA) y Giberelinas (AG) favoreciendo la división celular, expansión y diferenciación de tejidos (Rachidi *et al.*, 2020).

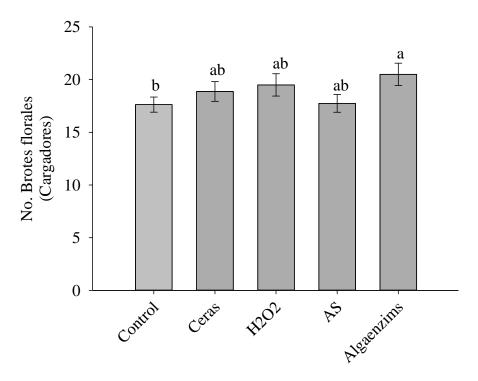


Figura 2. Influencia de los tratamientos con bioestimulantes en el número de brotes florales en plantas de frambuesa sometida a estrés hídrico moderado (-0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p \le 0.05$

La cuantificación de biomasa seca de raíz y biomasa seca aérea mostraron diferencias estadísticas significativas, para ambos componentes el efecto del ácido salicílico produjo valores iguales al control (Figura 2). La biomasa seca aérea supero en peso al control con 69.78 y 64.68% cuando se aplicaron, ceras y algas respectivamente (Figura 2 a), la posible explicación de esto es que las ceras son un rasgo natural de las plantas que puede reflejar y proteger a las plantas de la radiación excesiva, permitiendo generar un mejores condiciones para desarrollar las funciones metabólicas, que eventualmente permiten la acumulación de biomasa Xue *et al.* (2017), mientras que los extractos de algas ejercen efectos gracias a la complejidad de sus constitución que alberga polisacáridos, macro y micro elementos, vitaminas y fitohormonas, que sirven como sustratos del metabolismo, induciendo rápidas respuestas fisiológicas que promueven el crecimiento y desarrollo (Mutale-Joan *et al.*, 2020). Estos resultados concuerdan con El-Dayem, (2018) quien tras aplicar de 4 mL/L de extracto de algas aumento significativamente la biomasa seca aérea de alcachofa. Por otro lado los resultados de biomasa seca de raíz donde el H₂O₂ superó al control con un 100% más de peso seco (Figura 2, b), son congruentes con el incremento

de biomasa seca de raíz observado en el cultivo de tomate en condiciones de baja temperatura cuando se aplicó una dosis de 1.0 mM de H₂O₂ (Orabi *et al.*, 2015). En el trabajo de Sun *et al.* (2016) la aplicación de H₂O₂ a 1.5 mM en plantas de pepino bajo estrés hídrico, produjo un aumento significativo de la biomasa total de planta respecto a plantas no tratadas. Por lo que el potencial del peróxido de hidrogeno para regular el metabolismo de especies vegetales, puede inducir mayores rendimientos en condiciones óptimas como estresantes (Rodríguez *et al.*, 2019; Sohag *et al.*, 2020).

El uso de algas también ha mostrado efectos positivos aumentando el peso seco de plantas de fresa, además de obtener mejores resultados cuando se combinaron con la aplicación con 100 mg del producto Iodine, sugiriendo que el efecto es producido por el contenido de polisacáridos en los extractos de algas, cuya función es mejorar la homeostasis hormonal y permitir el crecimiento (Consentino *et al.*, 2023).

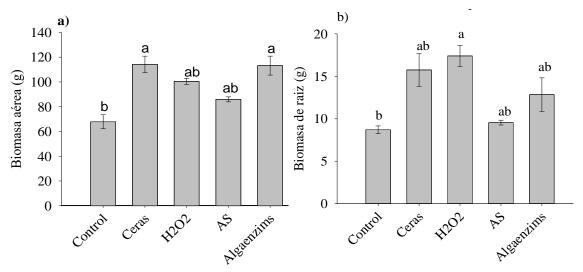


Figura 3. Efecto de bioestimulantes sobre (a) peso seco de biomasa aérea y (b) peso seco de raíz en frambuesa sometida a estrés hídrico moderado (-0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p \le 0.05$

Variables de calidad comercial

Los valores de SST medidos en °Brix en los frutos muestran diferencias estadísticas significativas (Figura 3), el estándar que se maneja en México y California para su

distribución en Estados Unidos, empleando atmosferas modificadas es un valor mínimo de 9 °Brix (Madrid y Beaudry, 2020), en el presente estudio en todos los tratamientos superaron este nivel, no obstante el peróxido de hidrogeno, generó el mayor incremento permitiendo valores sobre 11 °Brix (Figura 3,a), siendo esto un incremento del 14.74% al comparar con los frutos de las plantas control. Por otro lado en los niveles de acidez titulable, un parámetro útil en la percepción del sabor, los mismos tratamientos se mantuvieron estadísticamente igual al control, mientras que se apreció una disminución del 38.5% con la aplicación del producto a base de algas marinas, por lo que se podría aseverar que solo este tratamiento se encuentra dentro del estándar de calidad que usualmente no debe rebasar 0.7%, sin embargo esto está relacionado con la madurez del fruto y este aspecto se puede manejar durante la cosecha (Jayasena y Cameron, 2008)

Los valores de pH obtenidos se encuentran en un rango de 2.5 a 3, no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas con la aplicación de tratamientos y son característicos de la calidad de estos frutos.

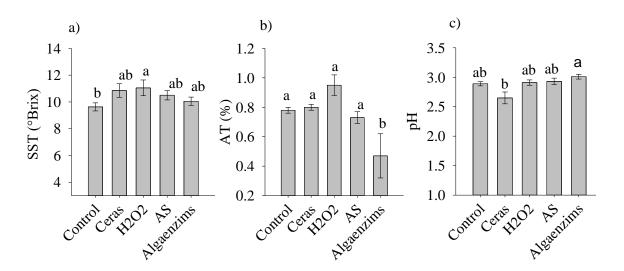


Figura 4. Efecto de bioestimulantes sobre (a) solidos solubles totales, (b) pH y (c) acidez titulable en frutos de frambuesa sometida a estrés hídrico moderado (-0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p \le 0.05$

Variables fisiológicas

La aplicación de biestimulantes resulto benéfico para las plantas de frambuesa bajo estrés hídrico moderado incrementando la tasa fotosintética y conductancia estomática (Figura 4). Por otro lado, la tasa de transpiración no mostro diferencias estadísticas significativas, pero se pudo observar valores que tienen la misma tendencia que las dos variables anteriores.

Los tratamientos con ceras, ácido salicílico y algas marinas superan con 48.1, 39.5 y 32.6% la tasa fotosintética de las plantas control, mientras que en conductancia estomática son superiores con 100, 50 y 10 %. Los resultados obtenidos son relevantes ya que se ha documentado que bajo condiciones de estrés hídrico la fotosíntesis se afecta por varias vías, una de ellas es el cierre estomático que impide el ingreso de CO₂ para carboxilación de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), lo que induce a la fotorespiración, además es capaz de afectar la actividad enzimática, metabolitos secundarios, producción de pigmentos, como también se afecta la cadena cíclica y no cíclica de transporte de electrones que disminuye la producción de ATP y reducción de NADP a NADPH (Lisar *et al.*, 2012). En el caso del tratamiento control se observa una baja tasa fotosintetica y conductancia estomatica, que puede deverse al eumento de la temperatura en hojas y al déficit hídrico que incrementan la producción de ácido abscísico cuya acumulación anula la carboxilación de la ribulosa bifosfato (RuBP) (Qiu *et al.*, 2017).

El rango de los valores de la tasa fotosintética, en la presente investigación fue de 8 a 13 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ (Figura 4, a). Uno de los aspectos relevantes a presentar como responsables de la mejora significativa de la actividad fotosintética, es el mantenimiento de la actividad de RuBisCO, la cual se mantiene funcionando en plantas de girasol tolerantes a estrés hídrico y calor debido a características morfológicas de las plantas (Killi *et al.*, 2017). Bajo esta premisa la aplicación del tratamiento con ceras naturales sobre las plantas de frambuesa sugiere que estas ejercieron influencia en la refracción y absorción de la radiación espectral (Barthlott *et al.*, 2017), lo cual impidió la elevación de la temperatura de hojas, evitando desnaturalización de enzimas y de esta manera fue posible una mayor fijación de CO₂ en comparación con el control. Además, en forma natural la

cutícula de las hojas como polímero, compuesto principalmente de cutina y ceras, tienen la función conjunta de evitar la pérdida excesiva de agua por transpiración gracias a su naturaleza hidrófoba que brinda cierta impermeabilidad (Eichert y Fernández., 2023; Xue *et al.*, 2017)

En condiciones de estrés hídrico se ha visto que la función de las ceras, se correlacionan en forma negativa con algunos aspectos fisiológicos, por lo tanto, mayor nivel de estas produce menor transpiración, impidiendo que el potencial hídrico sea menos negativo y esto permite aumentar el proceso fotosintético (Ahmad *et al.*, 2021). Esto es fundamental en plantas sometidas a estrés hídrico, ya que al regular la radiación incidente se evita el calentamiento excesivo de la hoja que conduce al cierre estomático con efectos fisiológicos negativos. Por otro lado, al impedir el flujo excesivo del agua desde el interior al exterior de la hoja se puede utilizar y optimizar en procesos que implican el uso de esta molécula.

En referencia a el AS a nivel celular es una hormona cuyo efecto se centra en el núcleo donde regula la actividad de genes, el aumento de esta hormona es proporcional a la exposición al estrés, que en coordinación con el ácido abscísico y el etileno, fomentan la acumulación de glicina betaína, cuyo efecto osmoprotector puede proteger a las enzimas relacionadas al aparato fotosintético, mejorando el desempeño de este último (Monteiro *et al.*, 2022). Referente a la aplicación de AS Aires *et al.* (2022) reportaron que su aplicación en concentraciones de 1.2 y 1.4 mM en plantas de tomate, incrementaron los valores de todas las variables de intercambio gaseoso, como fotosíntesis, transpiración, conductancia estomática, concentración interna de CO₂ y la eficiencia en el uso de agua, incluso superando a testigo sin déficit hídrico, lo que no ocurrió en nuestro experimento pudiendo ser por las diferentes concentraciones aplicadas

Por otra parte en referencia a la aplicación de extractos de algas se ha reportado que estas mejoran la actividad fotosintética, a través del aumento en la producción de pigmentos fotosintéticos como clorofila a, b y carotenoides, además de reducir el daño en membranas reduciendo la producción de malondialdehido mitigando los efectos del estrés hídrico (Kusvuran, 2021) coincidiendo con los resultados obtenidos en fotosíntesis de este trabajo en frambuesa.

Aun cuando el tratamiento con H₂O₂ no genero diferencias significativas en la tasa fotosintética respecto al control, Shan y Ou, (2018) mencionan que esta molécula señal es activada bajo estrés hídrico, lo que desencadena la actividad de enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión elevando la tolerancia al déficit hídrico. Sun *et al.* (2016) demostraron que la aplicación de 1.5 mM de H₂O₂, puede aumentar la tasa fotosintética en plantas de pepino bajo condición de estrés hídrico, estimulando el sistema de defensa antioxidante y ajuste osmótico que disminuye la peroxidación lipídica de las membranas, para mantener la turgencia celular.

La facilidad con la que se mueven el dióxido de carbono desde la superficie de la hoja hasta el interior del mesófilo, para ser fijado finalmente en el estroma se denomina conductancia del mesófilo (gm) que determina con la fórmula de Fick Gm= An/(Ci-Cc) donde An es la tasa fotosíntesis, Ci es a concentración intercelular de CO₂ y Cc es la concentración del CO₂ en cloroplasto, por lo tanto se considera esta ecuación como el punto central del intercambio de gases en plantas, lo cual en conjunto con la conductancia estomática y la conductancia de la capa limite determinaran la actividad fotosintética que se considera flujo primario del carbono (Knauer *et al.*, 2020). Bajo este sustento se puede apreciar que cuando los valores de la conductancia estomática fueron numéricamente más altos, también se mejora la tasa fotosintética (Figura 4).

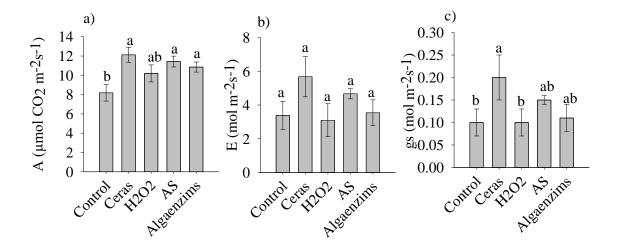


Figura 5. Efecto de bioestimulantes sobre (a) tasa fotosintética, (b) transpiración y (c) conductancia estomática en plantas de frambuesa sometidas a estrés hídrico moderado (-0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p \le 0.05$

Eficiencia instantánea en el uso de agua

Escobar *et al.* (2018) hace una distinción en la eficiencia intrínseca del uso de agua en A/gs (EIUA) y la eficiencia instantánea del uso de agua (EiUA) A/E, para ambos casos el resultado muestra relación de la cantidad de agua requerida para fijar CO₂. Aun cuando la fotosíntesis está más influenciada por la disponibilidad hídrica que la conductancia estomática, modificar esta última variable acarrearía mejoras al (EiUA). Flexas *et al.* (2016), sin embargo, en un medio con otras fuentes de estrés, como la alta temperatura, el cierre estomático es determinante para la tasa fotosintética realizada por las plantas.

Pese a la validez de la eficiencia intrínseca en el uso de agua a nivel de las hojas (EIUA), cabe mencionar que este puede no siempre relacionarse con el uso eficiente del agua a nivel de planta, además de que estos valores siempre tienden a fluctuar a lo largo del día, a lo largo de una estación del año y etapa fenológica de las plantas debido a las condiciones ambientales externas (Medrano *et al.*, 2015; Escobar *et al.*, 2018).

Las plantas de frambuesa asperjadas con diversos bioestimulantes no presentaron diferencia significativa en EiUA, sin embargo, se aprecian diferencias numéricas indicando que con el uso de H₂O₂, las plantas son menos eficientes, puesto que necesitan

más cantidad de agua para fijar CO₂ (Figura 6). Considerando que la hora de toma de lecturas fue a medio día, es importante destacar que esta condición soleada y su impacto negativo en las plantas se puede disminuir con la presencia de las ceras aplicadas en forma foliar por su efecto refractivo, ya que la EiUA también se es afactado por la radicación interceptada (Medrano *et al.*, 2015)

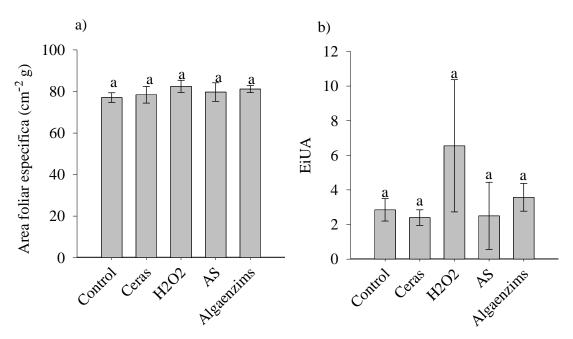


Figura 6. Efecto de bioestimulantes sobre (a) área foliar específica y (b) eficiencia instantánea en el Uso de Agua (WiUA) en plantas de frambuesa sometidas a estrés hídrico moderado (-0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p \le 0.05$

Área foliar especifica

En las plantas de frambuesa tratadas, el área foliar especifica (AFE) como variable de respuesta morfológica no mostro diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, se puede apreciar un aumento en los valores obtenidos cuando se aplican los bioestimulantes respecto al control.

Según Lawrence *et al.* (2019) el área foliar especifica es un valor resultado de la división del área foliar entre la masa seca foliar, que determina el grosor o densidad de la hoja, valores bajos presentan células empalizadas adicionales, o más largas y por lo tanto con

mayores cantidades de cloroplastos, enzimas fotosintéticas y mejor desempeño fotosintético. No obstante, los cloroplastos presentes en algunos casos pueden ser menos eficientes en el aprovechamiento de la radiación respecto a otros que se encuentran en hojas con menor grosor.

Este indicador morfológico es regulado a través de la disponibilidad hídrica y la temperatura, tendiendo a bajar cuando estas condiciones limitantes se incrementan, esto ocurre gracias a la modificación de área foliar y grosor de la hoja cuya principal finalidad es aumentar la eficiencia de los recursos del entorno principalmente CO₂, agua y luz (Zhou *et al.*, 2020).

Otros estudios aclaran que la configuración de la AFE puede variar en diferentes especies, en respuestas a los cambios ambientales en el espacio y tiempo, por lo tanto, las situaciones de origen antropogénico como la escorrentía de fertilizantes o las estaciones del año con la fluctuación de la humedad ambiental modifican el AFE con la finalidad de adaptarse y aprovechar recursos como el agua (Dwyer *et al.*, 2014)

Calidad bioquímica

Los frutos de frambuesa analizados mostraron diferencias estadísticas significativas en el contenido de antocianinas y vitamina C, por otro lado, no se observaron diferencias en el contendido de fenoles totales. En conjunto con los metabolitos primarios y hormonas, los metabolitos secundarios regulan los procesos metabólicos de los organismos, aunque a estos últimos se les atribuye la mediación de las relaciones entre planta ambiente, actualmente se justifica su multifuncionalidad pudiendo funcionar como reguladores de crecimiento, y actuar como mecanismos de defensa de plantas, señalización, almacenamiento y reciclaje (Erb y Kliebenstein, 2020).

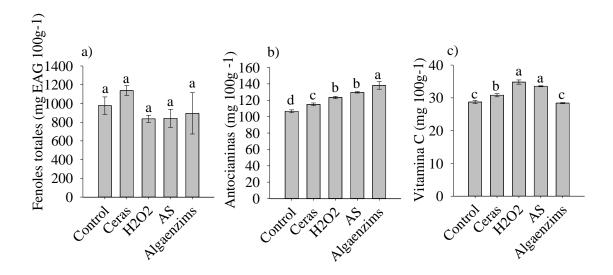


Figura 7. Efecto de bioestimulantes sobre el contenido (a) fenoles totales, (b) antocianinas y (c) vitamina C en frambuesa sometida a estrés hídrico moderado (-0.8 MPa). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas $p \le 0.05$

Fenoles totales

En las plantas los compuestos fenólicos son parte importante del grupo de los metabolitos secundarios, los cuales son fundamentales en procesos de crecimiento vegetal y en la generación de las respuestas al estrés ambiental (Chalker y Fuchigami, 2018; Erb y Kliebenstein, 2020). Además de que estas moléculas pueden estar presentes en forma libre, también pueden unirse a macromoléculas y matrices alimentarias, esto permite generar alimentos funcionales con efectos antioxidantes, probióticos, anticancerígenos, antiinflamatorios, entre otras actividades biológicas que están involucradas en la salud humana ((Soto *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020).

En los frutos de frambuesa analizados no se encontraron diferencias estadísticas significativas en el contenido de fenoles totales sin embargo se encontraron valores en un rango que oscilo de 835±37.6 hasta 1,137±52.5 mg GAE /100g. Estos valores superan los resultados de Bobinaité *et al.* (2012) que encontraron niveles en el rango de 278.6 a 714.7 mg/100g cuando analizaron 17 variedades de frambuesa roja. Por otro lado, Pantelidis *et al.* (2007) al analizar frutos de plantas hibridas de frambuesa encontraron valores que

oscilan entre 1040.95±15.91 a 2494±77 expresados en mg GAE /100g, dentro de este rango se encuentran los valores de los frutos analizados en la presente investigación.

Investigaciones como Latif *et al.* (2016) la de demostraron efectos benéficos, cuando aplicaron AS a una concentración de 10⁻⁵ M L⁻¹ en plantas de maíz bajo sequía, aumentando en contenido de compuestos fenólicos, y proteína total, además de mejorar es peso fresco del brote, el peso seco del brote, el peso fresco de raíz, el peso seco de raíz, la longitud de raíz y el área radicular. Investigadores como Kumar *et al.* (2020b) aseveran que la acumulación de los compuestos fenólicos es una respuesta normal de las plantas sometidas a estrés por sequía, esto con la finalidad de proteger a la planta contra el daño oxidativo ocasionado por las ERO, por lo tanto, la elevada tasa de síntesis de estos antioxidantes puede conducirse a los frutos y esto puede justificar los niveles encontrados la presente investigación.

Antocianinas

Las antocianinas son uno de los fitoquimicos antioxidantes más importantes en los frutos de frambuesa (Rao y Synder., 2010). Estos compuestos orgánicos clasificados dentro del grupo de flavonoides son los responsables del color de hojas, flores y frutos, su síntesis es por medio de la derivación de la vía fenil propanoide, cuyo precursor es el aminoácido fenilalanina y de donde pueden sintetizarse todos los compuestos fenólicos (Mannino *et al.*, 2021).

Los frutos de frambuesa analizados mostraron diferencias estadísticas significativas en el contenido de antocianinas, las plantas tratadas con los bioestimulantes: ceras, H₂O₂, AS y algas, superaron los niveles del tratamiento control con 7.86, 15.78. 15.78 y 29.56% respectivamente.

Considerando a Mannino *et al.*, (2021) quien menciona que una de las funciones es la protección contra altas intensidades de radiación y luz UV-B, el tratamiento que promovió la menor concentración excluyendo al control fueron las ceras, esto se puede atribuir al carácter refractivo de radiación que cumplen las mismas, lo cual disminuyó la cantidad de radiación a la que estaban sometidas las plantas, impidiendo la producción al alza de estos antioxidantes.

Moléculas como H_2O_2 se encuentran implicadas en diversos procesos regulando el metabolismo, por lo que al ser aplicadas de manera exógena permite incrementar el desempeño fotosintético, crecimiento y el sistema de defensa antioxidante donde las antocianinas juegan un papel muy importante (khan *et al.*, 2018).

Pantelidis *et al.* (2007) reportan valores en el rango 35.1±2.6 hasta 49.1±7.8 mg equivalentes a cianidin-3-glucosido por 100g, estos valores fueron superados por los obtenidos en esta investigación logrando obtener 106.6 hasta 138.13 mg equivalentes a cianidin-3-glucosido por 100 g de fruto (Figura 6). También se han obtenido valores que van de 24.1±0.4 a 24.8± 0.3 mg equivalentes a cianidin-3-glucosido por 100g cuando se usó metanol como solución extractora, mientras que los valores determinados se elevaban cuando se usaban agua como extractor (Sariburun *et al.*, 2010).

Vitamina C

Las vitaminas son compuestos orgánicos con alta capacidad antioxidante, los resultados de esta investigación demostraron que la aplicación de los bioestimulantes: ceras, H₂O₂ y ácido salicílico, aumentaron el contenido de vitamina C 7.2, 21.14 y 16.73%, con referencia al control, mientras que no se demostró ningún aumento con la aplicación del producto a base de algas marinas.

Los niveles de esta vitamina se han encontrado en rangos de 31±0.8 a 32.4±2.1 mg / 100g en frambuesas de color rojo (Pantelidis *et al.*, 2007), estos valores coinciden con los encontrados en los frutos de frambuesa analizados (Figura 6). Además, se conoce que la exposición a condiciones ambientales adversas y hormonas vegetales como el ácido salicílico es capaz de generar aumentos en los niveles del ácido ascórbico en frutos (Zheng *et al.*, 2022). Por otro lado, las moléculas como el peróxido de hidrogeno pueden aumentar los niveles de ácido ascórbico mediante la inducción de la defensa antioxidante (Ahmad *et al.*, 2013).

La importancia de la vitamina C en la salud humana reside en su papel como cofactor de enzimas, además de la capacidad antioxidante que permite hacer frente a procesos inflamatorios relacionados con enfermedades crónicas y estimular el sistema inmune (Sorice *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

La aplicación de bioestimulantes como ceras naturales y algas marinas aumento la tasa de fotosíntesis foliar de las hojas de las plantas y en consecuencia la generación de biomasa que se aprecia en los resultados presentados. El peróxido de hidrógeno incrementó la longitud de raíz, biomasa de raíz y la biomasa completa de planta. Con respecto a la calidad de los frutos se incrementó el contenido de antocianinas y vitamina C con la aplicación de peróxido de hidrogeno y ácido salicílico. Por lo tanto, el uso de ceras, peróxido de hidrogeno, ácido salicílico y extracto de algas marinas, representan una alternativa útil para hacer frente a los efectos del estrés hídrico moderado en el cultivo de frambuesa.

REFERENCIAS

- Ahmad, H. M., Wang, X., Fiaz, S., Azeem, F., & Shaheen, T. (2021). Morphological and physiological response of Helianthus annuus L. to drought stress and correlation of wax contents for drought tolerance traits. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 1-15. https://doi.org/10.1007/s13369-021-06098-1.
- Ahmad, I., Basra, S. M., Afzal, I., Farooq, M., & Wahid, A. (2013). Growth improvement in spring maize through exogenous application of ascorbic acid, salicylic acid and hydrogen peroxide. Int. J. *Agric. Biol*, 15, 95-100.
- Ahmed, E., Arshad, M., Khan, M. Z., Amjad, M. S., Sadaf, H. M., Riaz, I., ... & Ahmad, N. (2017). Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(2), 205-214.
- Aires, E. S., Ferraz, A. K. L., Carvalho, B. L., Teixeira, F. P., Putti, F. F., de Souza, E. P., ... & Ono, E. O. (2022). Foliar application of salicylic acid to mitigate water stress in tomato. *Plants*, 11(13), 1775. https://doi.org/10.3390/plants11131775.
- Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African journal of agricultural research*, 6(9), 2026-2032. DOI: 10.5897/AJAR10.027
- AOAC (2000). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods, Assoc. Off. Anal. Chem. Int. (AOAC), Arlington, VA, USA
- Arora, N. K. (2019). Impact of climate change on agriculture production and its sustainable solutions. *Environmental Sustainability*, 2(2), 95-96. https://doi.org/10.1007/s42398-019-00078-w.
- Ashraf, M. A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., & Arif, M. S. (2018). Environmental stress and secondary metabolites in plants: an overview. *Plant metabolites and regulation under environmental stress*, 153-167. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00008-X
- Atanacković, M., Cvejić, J., Gojković-Bukarica, L., Veljović, M., Despotović, S., Pecić, S., ... & Leskošek-Čukalović, I. (2012). Quantitative determination of total anthocyanins and flavonoids in natural products obtained from grapes and malt. In CEFood 2012-Proceedings of 6th Central European Congress on Food (pp. 183-188).
- Barthlott, W., Mail, M., Bhushan, B., & Koch, K. (2017). Plant Surfaces: Structures and Functions for Biomimetic Innovations. *Nano-Micro Letters*, 9(2), 23. https://doi.org/10.1007/s40820-016-0125-1.

- Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., & Prithiviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 39-48. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012.
- Biareh, V., Shekari, F., Sayfzadeh, S., Zakerin, H., Hadidi, E., Beltrão, J. G. T., & Mastinu, A. (2022). Physiological and qualitative response of Cucurbita pepo L. to salicylic acid under controlled water stress conditions. *Horticulturae*, 8(1), 79. https://doi.org/10.3390/horticulturae8010079
- Bobinaitė, R., Viškelis, P., & Venskutonis, P. R. (2012). Variation of total phenolics, anthocyanins, ellagic acid and radical scavenging capacity in various raspberry (Rubus spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 132(3), 1495-1501. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.137.
- Boretti, A., & Florentine, S. (2019). Atmospheric CO2 concentration and other limiting factors in the growth of C3 and C4 plants. *Plants*, 8(4), 92.
- Bulgari, R., Franzoni, G., & Ferrante, A. (2019). Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy*, 9(6), 306. https://doi.org/10.3390/plants8040092.
- Canales, L. B. (1999). Enzimas-algas: posibilidades de su uso para estimular la producción agrícola y mejorar los suelos. *Terra Latinoamericana*, 17(3), 271-276.
- Cao, Y., Li, K., Li, Y., Zhao, X., & Wang, L. (2020). MYB transcription factors as regulators of secondary metabolism in plants. *Biology*, 9(3), article 3. https://doi.org/10.3390/biology9030061
- Carvalho, M. E. A., de Camargo, P. R., Gaziola, S. A., & Azevedo, R. A. (2018). Is seaweed extract an elicitor compound? Changing proline content in drought-stressed bean plants. *Comunicata Scientiae*, 9(2), 292-297.
- Cassia, R., Nocioni, M., Correa-Aragunde, N., & Lamattina, L. (2018). Climate change and the impact of greenhouse gasses: CO2 and NO, friends and foes of plant oxidative stress. *Frontiers* in plant science, 9, 273. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00273
- Chalker-Scott, L., & Fuchigami, L. H. (2018). The role of phenolic compounds in plant stress responses. In *Low temperature stress physiology in crops* (pp. 67-80). CRC press.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867. https://doi.org/10.1111/tpj.13299
- Colla, G., & Rouphael, Y. (2020). Microalgae: new source of plant biostimulants. *Agronomy*, 10(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/agronomy10091240
- Consentino, B. B., Vultaggio, L., Iacuzzi, N., La Bella, S., De Pasquale, C., Rouphael, Y., ... & Sabatino, L. (2023). Iodine Biofortification and Seaweed Extract-Based Biostimulant

- Supply Interactively Drive the Yield, Quality, and Functional Traits in Strawberry Fruits. *Plants*, 12(2), 245. Article 2. https://doi.org/10.3390/plants12020245
- Cossani, C. M., & Reynolds, M. P. (2012). Physiological traits for improving heat tolerance in wheat. *Plant physiology*, 160(4), 1710-1718.
- Del Buono, D. (2021). Can biostimulants be used to mitigate the effect of anthropogenic climate change on agriculture? It is time to respond. *Science of the Total Environment*, 751, 141763. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141763
- Deng, X.-P., Cheng, Y.-J., Wu, X.-B., Kwak, S. -S., Chen, W., & Eneji, A. (2012). Exogenous hydrogen peroxide positively influences root growth and exogenous hydrogen peroxide positively influences root growth and metabolism in leaves of sweet potato seedlings. *Australian Journal of Crop Science*, 6(11), 1572-1578.
- Ding, F., Wang, G., Wang, M., & Zhang, S. (2018). Exogenous melatonin improves tolerance to water deficit by promoting cuticle formation in tomato plants. *Molecules*, 23(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/molecules23071605
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J. A., & Heredia, A. (2017). The plant cuticle: old challenges, new perspectives. *Journal of Experimental Botany*, 68(19), 5251-5255. https://doi.org/10.1093/jxb/erx38
- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia horticulturae*, 196, 3-14. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021
- Du Jardin, P., Xu, L., & Geelen, D. (2020). Agricultural Functions and Action Mechanisms of Plant Biostimulants (PBs) an Introduction. *The chemical biology of plant biostimulants*, (pp. 1-30). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/9781119357254.ch1
- Ďúranová, H., Šimora, V., Ďurišová, Ľ., Olexiková, L., Kovár, M., & Požgajová, M. (2023). Modifications in Ultrastructural Characteristics and Redox Status of Plants under Environmental Stress: A Review. *Plants*, 12(8), 1666.
- Dusenge, M. E., Duarte, A. G., & Way, D. A. (2019). Plant carbon metabolism and climate change: elevated CO2 and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration. *New Phytologist*, 221(1), 32-49. https://doi.org/10.1111/nph.15283.
- Dwyer, J. M., Hobbs, R. J., & Mayfield, M. M. (2014). Specific leaf area responses to environmental gradients through space and time. *Ecology*, 95(2), 399-410. https://doi.org/10.1890/13-0412.1.
- Eichert, T., & Fernández, V. (2023). Chapter 4 Uptake and release of elements by leaves and other aerial plant parts. This chaper is a revision of the thrd edition chapter by T. Eichert and V. Fernandez, pp.71-84. DOI: https://doi.org/10.1016/b978 0 12 3849052.0004 2. Elservier Ltd. En Z. Rangel, I. Cakmak, & P.J. White (Eds.). Marschner's mineral

- nutrition of higher plants (Four edition) (pp. 105-129-). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819773-8.00014-9.
- El-Dayem, A. (2018). Effect of silicon and algae extract foliar application on growth and early yield of globe artichoke plants. Annals of Agricultural Science, Moshtohor, 56(4th ICBAA), 207-214. https://doi.org/10.21608/assjm.2018.65139
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. *Plant physiology*, 184(1), 39-52. https://doi.org/10.1104/pp.20.00433.
- Escobar, H., de Ovando, L. S., Contreras, D., Baginsky, C., Arenas, J., & Silva, H. (2018). Efecto de la disponibilidad de agua de riego en el intercambio gaseoso, rendimiento de semillas, biomasa y eficiencia del uso del agua en dos fenotipos de Chía establecidos en el valle de Azapa, Arica, Chile. *Interciencia*, 43(1), 55-61.
- Espinoza, F. H. R., Hernández, E. R., Morales, F. A. B., Salgado, S. Z., Ramírez, J. G. L., & Ortega, J. G. L. (2016). Macroalgas como componente en el sustrato para producción de plántula de albahaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (17), 3543-3555.
- Fang, S., Gao, K., Hu, W., Snider, J. L., Wang, S., Chen, B., & Zhou, Z. (2018). Chemical priming of seed alters cotton floral bud differentiation by inducing changes in hormones, metabolites and gene expression. *Plant physiology and biochemistry*, 130, 633-640.
- Fang, Y., & Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and molecular life sciences*, 72(4), 673-689. https://doi.org/10.1007/s00018-014-1767-0.
- Farouk, S., & Qados, A. M. A. (2018). Enhancing seed quality and productivity as well as physio-anatomical responses of pea plants by folic acid and/or hydrogen peroxide application. *Scientia Horticulturae*, 240, 29-https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.049.
- Flexas, J., Díaz-Espejo, A., Conesa, M. A., Coopman, R. E., Douthe, C., Gago, J., ... & Niinemets, Ü. (2016). Mesophyll conductance to CO2 and Rubisco as targets for improving intrinsic water use efficiency in C3 plants. *Plant, Cell & Environment*, 39(5), 965-982. https://doi.org/10.1111/pce.12622.
- Florido-Bacallao, M., & Bao-Fundora, L. (2014). Tolerancia a estrés por déficit hídrico en tomate (Solanum lycopersicum L.). *Cultivos tropicales*, 35(3), 70-88.
- Franzoni, G., Cocetta, G., Prinsi, B., Ferrante, A., & Espen, L. (2022). Biostimulants on crops: Their impact under abiotic stress conditions. *Horticulturae*, 8(3), 189. https://doi.org/10.3390/horticulturae8030189
- Goel, A., & Bhatt, R. (2012). Causes and consequences of global warming. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 1(1), 27-31.

- González-Morales, S., Solís-Gaona, S., Valdés-Caballero, M. V., Juárez-Maldonado, A., Loredo-Treviño, A., & Benavides-Mendoza, A. (2021). Transcriptomics of biostimulation of plants under abiotic stress. *Frontiers in Genetics*, 12, 583888. https://doi.org/10.3389/fgene.2021.583888.
- Hasanuzzaman, M., Parvin, K., Bardhan, K., Nahar, K., Anee, T. I., Masud, A. A. C., & Fotopoulos, V. (2021). Biostimulants for the regulation of reactive oxygen species metabolism in plants under abiotic stress. *Cells*, 10(10), 2537. https://doi.org/10.3390/cells10102537.
- Hayat, S., Hasan, S. A., Fariduddin, Q., & Ahmad, A. (2008). Growth of tomato (Lycopersicon esculentum) in response to salicylic acid under water stress. *Journal of Plant Interactions*, 3(4), 297-304. DOI: 10.1080/17429140802320797.
- Holding, D. R., & Streich, A. M. (2013). Plant growth processes: transpiration, photosynthesis, and respiration. *The Board of Reagents of the University of Nebraska*, 1-10. https://doi.org/10.1111/tpj.14587.
- Hossain, A. (2021). Heat and drought stresses in wheat (Triticum aestivum L.): Substantial yield losses, practical achievements, improvement approaches, and adaptive mecanisms. *In Plant Stress Physiology. Ayub Agricultural Research Intitute Faisalabad. Pakistan.* 2021, pp: 3-18. https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.92378
- Hura, T., Hura, K., Ostrowska, A., & Urban, K. (2022). Non-rolling flag leaves use an effective mechanism to reduce water loss and light-induced damage under drought stress. *Annals of Botany*, *130*(3), 393-408. https://doi.org/10.1093/aob/mcac035
- Hussein, M. M., Balbaa, L. K., & Gaballah, M. S. (2007). Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3(4), 321-328.
- Jayasena, V., & Cameron, I. (2008). Brix/acid ratio as a predictor of consumer acceptability of Crimson Seedless table grapes. *Journal of food Quality*, 31(6), 736-750. https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2008.00231.x
- Jetter, R., Kunst, L., & Samuels, A. L. (2006). Composition of plant cuticular waxes. Annual plant reviews volume 23: *Biology of the plant cuticle*, 145-181.
- Khan, T. A., Yusuf, M., & Fariduddin, Q. (2018). Hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism: Signalling and its effect under abiotic stress. *Photosynthetica*, 56(4), 1237-1248. https://doi.org/10.1007/s11099-018-0830-8.
- Killi, D., Bussotti, F., Raschi, A., & Haworth, M. (2017). Adaptation to high temperature mitigates the impact of water deficit during combined heat and drought stress in C3 sunflower and C4 maize varieties with contrasting drought tolerance. *Physiologia plantarum*, 159(2), 130-147. https://doi.org/10.1111/ppl.12490.

- Knauer, J., Zaehle, S., De Kauwe, M. G., Haverd, V., Reichstein, M., & Sun, Y. (2020). Mesophyll conductance in land surface models: effects on photosynthesis and transpiration. *The Plant Journal*, 101(4), 858-873.
- Kumar, R., Trivedi, K., Anand, K. V., & Ghosh, A. (2020a). Science behind biostimulant action of seaweed extract on growth and crop yield: Insights into transcriptional changes in roots of maize treated with Kappaphycus alvarezii seaweed extract under soil moisture stressed conditions. *Journal of Applied Phycology*, 32, 599-613. https://doi.org/10.1007/s10811-019-01938-y.
- Kumar, S., Bhushan, B., Wakchaure, G. C., Meena, K. K., Kumar, M., Meena, N. L., & Rane, J. (2020b). Plant phenolics under water-deficit conditions: biosynthesis, accumulation, and physiological roles in water stress alleviation. *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture: Volume 1*, 451-465.
- Kusvuran, S. (2021). Microalgae (Chlorella vulgaris Beijerinck) alleviates drought stress of broccoli plants by improving nutrient uptake, secondary metabolites, and antioxidative defense system. *Horticultural Plant Journal*, 7(3), 221-231. https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.03.007.
- Latif, F., Ullah, F., Mehmood, S., Khattak, A., Khan, A. U., Khan, S., & Husain, I. (2016). Effects of salicylic acid on growth and accumulation of phenolics in Zea mays L. under drought stress. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*, 66(4), 325-332. https://doi.org/10.1080/09064710.2015.1117133
- Lawrence, E. H., Stinziano, J. R., & Hanson, D. T. (2019). Using the rapid A-Ci response (RACiR) in the Li-Cor 6400 to measure developmental gradients of photosynthetic capacity in poplar (Vol. 42, No. 2, pp. 740-750). https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.06.012
- Lee, S. B., & Suh, M. C. (2015). Advances in the understanding of cuticular waxes in Arabidopsis thaliana and crop species. *Plant cell reports*, 34, 557-572.
- Liang, G., Liu, J., Zhang, J., & Guo, J. (2020). Effects of drought stress on photosynthetic and physiological parameters of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 145(1), 12-17. https://doi.org/10.21273/JASHS04725-19
- Liao, W. B., Huang, G. B., Yu, J. H., & Zhang, M. L. (2012). Nitric oxide and hydrogen peroxide alleviate drought stress in marigold explants and promote its adventitious root development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58, 6-15. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.06.012.
- Lisar, S. Y., Motafakkerazad, R., Hossain, M. M., & Rahman, I. M. (2012). Causes, effects and responses. Water stress, 25(1), 33.
- Madrid, M., & Beaudry, R. (2020). Small fruits: Raspberries, blackberries, blueberries. In Controlled and Modified Atmospheres for Fresh and Fresh-Cut Produce (pp. 335-346). *Academic Press.* https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804599-2.00020-X

- Malhi, G. S., Kaur, M., & Kaushik, P. (2021). Impact of climate change on agriculture and its mitigation strategies: A review. *Sustainability*, 13(3), 1318. https://doi.org/10.3390/su13031318.
- Mannino, G., Gentile, C., Ertani, A., Serio, G., & Bertea, C. M. (2021). Anthocyanins: Biosynthesis, distribution, ecological role, and use of biostimulants to increase their content in plant foods—A review. *Agriculture*, 11(3), 212. https://doi.org/10.3390/agriculture11030212.
- Medrano, H., Tomás, M., Martorell, S., Flexas, J., Hernández, E., Rosselló, J., ... & Bota, J. (2015). From leaf to whole-plant water use efficiency (WUE) in complex canopies: Limitations of leaf WUE as a selection target. *The Crop Journal*, 3(3), 220-228. https://doi.org/10.1016/j.cj.2015.04.002.
- Minibayeva, F., Beckett, R. P., & Strzałka, K. (2022). Molecular aspects of plant redox metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44(12), 136. https://doi.org/10.1007/s11738-022-03473-9
- Mishra, A. K., & Baek, K. H. (2021). Salicylic acid biosynthesis and metabolism: A divergent pathway for plants and bacteria. *Biomolecules*, 11(5), 705.
- Mokhov, I. I. (2022). Climate change: Causes, risks, consequences, and problems of adaptation and regulation. *Herald of the Russian Academy of Sciences*, 92(1), 1-11.
- Monteiro, E., Gonçalves, B., Cortez, I., & Castro, I. (2022). The Role of Biostimulants as Alleviators of Biotic and Abiotic Stresses in Grapevine: A Review. *Plants*, 11(3), 396. https://doi.org/10.3390/plants11030396.
- Mutale-Joan, C., Redouane, B., Najib, E., Yassine, K., Lyamlouli, K., Laila, S., ... & Hicham, E. A. (2020). Screening of microalgae liquid extracts for their bio stimulant properties on plant growth, nutrient uptake and metabolite profile of Solanum lycopersicum L. *Scientific reports*, 10(1), 1-12. https://doi.org/10.1038/s41598-020-59840-4
- Nelson, G. C., Valin, H., Sands, R. D., Havlík, P., Ahammad, H., Deryng, D., ... & Willenbockel, D. (2014). Climate change effects on agriculture: Economic responses to biophysical shocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(9), 3274-3279. https://doi.org/10.1073/pnas.1222465110.
- Nephali, L., Piater, L. A., Dubery, I. A., Patterson, V., Huyser, J., Burgess, K., & Tugizimana, F. (2020). Biostimulants for plant growth and mitigation of abiotic stresses: A metabolomics perspective. *Metabolites*, 10(12), 505.
- Noctor, G., Reichheld, J. P., & Foyer, C. H. (2018, August). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *In Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 80, pp. 3-12). Academic Press.

- Orabi, S. A., Dawood, M. G., & Salman, S. R. (2015). Comparative study between the physiological role of hydrogen peroxide and salicylic acid in alleviating the harmful effect of low temperature on tomato plants grown under sand-ponic culture. *Sci Agric*, 9(1), 49-59.
- Ozturk, M., Turkyilmaz Unal, B., García-Caparrós, P., Khursheed, A., Gul, A., & Hasanuzzaman, M. (2021). Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Physiologia plantarum*, 172(2), 1321-1335. https://doi.org/10.1111/ppl.13297.
- Padayatt, S. J.; Daruwala, R.; Wang, Y.; Eck, P. K.; Song, J.; Koh, W. S. and Levine, M. 2001. Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. In: handbook of antioxidants. Cadenzas, E.; Packer, l. (Eds). Second edition. CRC press. Washington DC, USA. 117-145 pp
- Pant, P., Pandey, S., & Dall'Acqua, S. (2021). The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. *Chemistry & Biodiversity*, 18(11), e2100345. https://doi.org/10.1002/cbdv.202100345
- Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., & Diamantidis, G. R. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food chemistry*, 102(3), 777-783. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.021.
- Parmesan, C, and M. E. Hanley. "Plants and climate change: complexities and surprises." Annals of botany 116.6 (2015): 849-864. plants. *Plant, Cell & Environment*, 39(5), 965-982. https://doi.org/10.1093/aob/mcv169.
- Patwari, P., Salewski, V., Gutbrod, K., Kreszies, T., Dresen-Scholz, B., Peisker, H., ... & Dörmann, P. (2019). Surface wax esters contribute to drought tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 98(4), 727-744. https://doi.org/10.1111/tpj.14269
- Pereira, L. S. (2017). Water, agriculture and food: challenges and issues. *Water Resources Management*, 31(10), 2985-2999.
- Perez-Madruga, Y., Lopez-Padron, I., Reyes-Guerrero, Y., Postal, G., & San José de las Lajas, M. (2020). Algae as a natural alternative for the production of different crops. *Cultivos Tropicales*, 41(2), NA-NA.
- Qiu, C., Ethier, G., Pepin, S., Dubé, P., Desjardins, Y., & Gosselin, A. (2017). Persistent negative temperature response of mesophyll conductance in red raspberry (Rubus idaeus L.) leaves under both high and low vapour pressure deficits: a role for abscisic acid?. *Plant, Cell & Environment*, 40(9), 1940-1959.
- Rachidi, F., Benhima, R., Sbabou, L., & El Arroussi, H. (2020). Microalgae polysaccharides biostimulating effect on tomato plants: Growth and metabolic distribution. *Biotechnology reports*, 25, e00426.

- Rai, K. K., Pandey, N., & Rai, S. P. (2020). Salicylic acid and nitric oxide signaling in plant heat stress. *Physiologia plantarum*, 168(2), 241-255. https://doi.org/10.1111/ppl.12958.
- Ramakrishnan, M., Papolu, P. K., Satish, L., Vinod, K. K., Wei, Q., Sharma, A., ... & Zhou, M. (2022). Redox status of the plant cell determines epigenetic modifications under abiotic stress conditions and during developmental processes. *Journal of Advanced Research*, 42, 99-116.
- Rao, A. V., & Snyder, D. M. (2010). Raspberries and human health: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3871-3883. https://doi.org/10.1021/jf903484g.
- Riederer, M., & Muller, C. (Eds.). (2008). *Annual plant reviews, biology of the plant cuticle*. John Wiley & Sons.
- Rodríguez-Ruiz, M., Zuccarelli, R., Palma, J. M., Corpas, F. J., & Freschi, L. (2019). Biotechnological application of nitric oxide and hydrogen peroxide in plants. *Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Signaling in Higher Plants*, 245-270.
- SADER. (2021). Crecen a doble dígito producción y exportación de frambuesas mexicanas | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gob.mx (www.gob.mx).
- Saqib, M., Anjum, M. A., Ali, M., Ahmad, R., Sohail, M., Zakir, I., ... & Hussain, S. (2022). Horticultural Crops as Affected by Climate Change. *Building Climate Resilience in Agriculture: Theory, Practice and Future Perspective*, 95-109.
- Sariburun, E., Şahin, S., Demir, C., Türkben, C., & Uylaşer, V. (2010). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Raspberry and Blackberry Cultivars. *Journal of Food Science*, 75(4), C328–C335.. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01571.x
- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., ... & Battaglia, M. L. (2021). Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, 10(2), 259.
- Shan, C., & Ou, X. (2018). Hydrogen peroxide is involved in the regulation of ascorbate and glutathione metabolism in wheat leaves under water stress. *Cereal Research Communications*, 46(1), 21-30. https://doi.org/10.1556/0806.45.2017.053.
- Sharma, A., Sidhu, G. P. S., Araniti, F., Bali, A. S., Shahzad, B., Tripathi, D. K., ... & Landi, M. (2020a). The role of salicylic acid in plants exposed to heavy metals. *Molecules*, 25(3), 540. https://doi.org/10.3390/molecules25030540.
- Sharma, P., Kothari, S. L., RATHORE, M., & GOUR, V. (2018b). Properties, variations, roles, and potential applications of epicuticular wax: a review. *Turkish Journal of Botany*, 42(2), 135-149. DOI: 10.3906/bot-1702-25
- Shukla, P. S., Shotton, K., Norman, E., Neily, W., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2018). Seaweed extract improve drought tolerance of soybean by regulating stress-response genes. *AoB Plants*, 10(1), plx051. https://doi.org/10.1093/aobpla/plx051.

- SIAP. (2022). Panorama Agroalimentario 2022. Panorama Agroalimentario | Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera | Gobierno gob.mx (www.gob.mx).
- Skendžić, S., Zovko, M., Živković, I. P., Lešić, V., & Lemić, D. (2021). The impact of climate change on agricultural insect pests. *Insects*, 12(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/insects12050440
- Smirnoff, N., & Arnaud, D. (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 221(3), 1197-1214. https://doi.org/10.1111/nph.15488
- Sohag, A. A. M., Tahjib-Ul-Arif, M., Brestic, M., Afrin, S., Sakil, M. A., Hossain, M. T., ... & Hossain, M. A. (2020). Exogenous salicylic acid and hydrogen peroxide attenuate drought stress in rice. *Plant, Soil and Environment*, 66 (2020) (No. 1), 7-13. https://doi.org/10.17221/472/2019-PSE
- Sorice, A., Guerriero, E., Capone, F., Colonna, G., Castello, G., & Costantini, S. (2014). Ascorbic Acid: Its Roole in Immune System and Chronic Inflammation Diseases. *Mini reviews in Medicinal Chemistry*, 14(5), 444-452.
- Soto-Hernández, M., Tenango, M. P., & García-Mateos, R. (Eds.). (2017). *Phenolic compounds: biological activity*. BoD–Books on Demand.
- Steiner, A. A., A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil15*, 134–154 (1961).
- Sun, Y., Wang, H., Liu, S., & Pengi, X. (2016). Exogenous application of hydrogen peroxide alleviates drought stress in cucumber seedlings. *South African Journal of Botany*, 106, 23-28. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.05.008.
- Sun, Y., Wang, C., Chen, H. Y., & Ruan, H. (2020). Response of plants to water stress: a meta-analysis. *Frontiers* in plant science, 11, 978. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00978
- Tafolla-Arellano, J. C., González-León, A., Tiznado-Hernández, M. E., Zacarías García, L., & Báez-Sañudo, R. (2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(1), 3-12.
- Wang, Z., Li, S., Ge, S., & Lin, S. (2020). Review of distribution, extraction methods, and health benefits of bound phenolics in food plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(11), 3330-3343. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06574.
- Wani, A. B., Chadar, H., Wani, A. H., Singh, S., & Upadhyay, N. (2017). Salicylic acid to decrease plant stress. *Environmental Chemistry Letters*, 15, 101-123. https://doi.org/10.1007/s10311-016-0584-0
- Warren, R., Price, J., Graham, E., Forstenhaeusler, N., & VanDerWal, J. (2018). The projected effect on insects, vertebrates, and plants of limiting global warming to 1.5 C rather than 2 C. *Science*, 360(6390), 791-795. https://doi.org/10.1126/science.aar3646

- Waterman, P. G., & Mole, S. (2019). Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plants. In *Insect-plant interactions* (pp. 107-134). CRC press.
- Xue, D., Zhang, X., Lu, X., Chen, G., & Chen, Z. H. (2017). Molecular and evolutionary mechanisms of cuticular wax for plant drought tolerance. *Frontiers in plant science*, 8, 621. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00621
- Yakhin, O. I., Lubyanov, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in plant science*, 7, 2049. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/molecules23040762
- Zandalinas, S. I., Fritschi, F. B., & Mittler, R. (2021). Global warming, climate change, and environmental pollution: recipe for a multifactorial stress combination disaster. *Trends in Plant Science*, 26(6), 588-599. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.02.011
- Zheng, X., Gong, M., Zhang, Q., Tan, H., Li, L., Tang, Y., ... & Deng, W. (2022). Metabolism and regulation of ascorbic acid in fruits. *Plants*, 11(12), Article 12. https://doi.org/10.3390/plants11121602.
- Zhou, H., Zhou, G., He, Q., Zhou, L., Ji, Y., & Zhou, M. (2020). Environmental explanation of maize specific leaf area under varying water stress regimes. *Environmental and Experimental Botany*, 171, 103932. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103932.
- Zulfiqar, F., Chen, J., Finnegan, P. M., Younis, A., Nafees, M., Zorrig, W., & Hamed, K. B. (2021). Application of trehalose and salicylic acid mitigates drought stress in sweet basil and improves plant growth. *Plants*, Article 6. https://doi.org/10.3390/plants10061078.