

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Posgrados

**Caracterización de la respuesta fisiológica y cambios en el microbioma
durante estrés de sequía en dos variedades de maíz (*Zea mays*)**

**Tesis en torno a una hipótesis o problema de investigación y su
contrastación**

MANOELLA ALEJANDRA SÁNCHEZ GARNICA

Antonio León-Reyes, Ph.D.

Director de Trabajo de Titulación

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito para la obtención del título de
Magister en Microbiología

Quito, mayo de 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE POSGRADOS

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Caracterización de la respuesta fisiológica y cambios en el microbioma durante estrés de sequía en dos variedades de maíz (*Zea mays*)

Manoella Alejandra Sánchez Garnica

Nombre del Director del Trabajo de Titulación:	Antonio León-Reyes
Título académico:	Ph.D.
Nombre del Director del Programa:	Patricio Rojas
Título académico:	Ph.D.
Director del programa de:	Microbiología
Nombre del Decano del Colegio Académico:	Carlos A. Valle
Título académico:	Ph.D.
Decano del Colegio:	Ciencias Biológicas y Ambientales
Nombre del Decano del Colegio de Posgrados:	Hugo Burgos
Título académico:	Ph.D

Quito, mayo 2022

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombre del estudiante: Manoella Alejandra Sánchez Garnica

Código de estudiante: 00215200

C.I.: 0604079871

Lugar y fecha: Quito, 18 de mayo de 2022

DEDICATORIA

A mis padres, a mi esposo, a mi hermana y mis pequeños sobrinos.

A ustedes que siempre creen en mí.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, gracias a la Universidad San Francisco de Quito y al Instituto de Microbiología, por hacer posible el programa de postgrado en Microbiología. Gracias al Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos por financiar y hacer lo posible para que se ejecute mi trabajo de titulación.

A Antonio y Darío, por enseñarme y guiarme en todo momento, por su confianza y apoyo. A Noe y Sol por ser una grata compañía en el laboratorio y estar siempre dispuestas a ayudarme durante largas horas de trabajo.

Al Dr. Eduardo Morillo, Director del Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, por su colaboración en el procesamiento de las muestras.

Al Ing. Luis Felipe Urresta, por su generosa contribución al proyecto con la secuenciación del material genético.

Al Dr. Héctor Andrade & Ing. Silvia Núñez, por facilitarnos las instalaciones de los invernaderos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central, donde se llevaron a cabo los distintos ensayos de invernadero.

A mis compañeros de la cohorte 2020, gracias por su amistad y por ser un apoyo constante durante estos dos años.

RESUMEN

El incremento de la frecuencia de sequías y el consiguiente déficit hídrico en la agricultura pone en peligro la seguridad alimentaria de más de mil millones de personas. Varios estudios científicos han demostrado las estrechas relaciones entre las plantas y los microorganismos coexistentes y cómo estos pueden estimular rutas de defensa temprana y preparar a las plantas para enfrentar el estrés. Se han observado que existen cambios en la diversidad del microbioma radicular cuando una planta se encuentra bajo estrés abiótico. Por tal motivo, comprender los cambios en el microbioma que se dan bajo el estrés de sequía, permitirá identificar microorganismos o genes específicos que pueden ser usados para aumentar la capacidad de tolerancia de la planta. El cultivo de maíz tiene gran importancia para la economía mundial, lamentablemente está amenazado por sembrarse en lugares sin riego constante y a expensas de las lluvias. Este estudio busca identificar cambios específicos en el microbioma de la raíz en dos variedades de maíz en Malchinguí, en el cantón Pedro Moncayo (Provincia de Pichincha-Ecuador). Las dos variedades de maíz fueron sometidas a estrés por sequía durante 7 días, cultivadas en suelo agrícola estéril y no estéril. Diariamente se evaluaron los siguientes parámetros fisiológicos: fluorescencia, conductancia estomática y potencial hídrico. Los resultados de la medición de los parámetros fisiológicos demostraron que las plantas cultivadas en el suelo estéril son menos tolerantes a la sequía, con valores de conductancia estomática inferiores a $100 \text{ mmol/m}^2\text{s}$ a partir del segundo día. Las muestras para el análisis del microbioma se tomaron bajo riego y sequía. El análisis del microbioma muestra la presencia de taxones reportados en la literatura con la capacidad de inducir tolerancia a la sequía como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Rugamonas* y *Pseudomonas*. Se identificaron enriquecimiento y reducción de taxones microbianos bajo sequía. Al obtener una respuesta fisiológica diferencial entre tipos de suelo y las variedades, se puede proponer que el microbioma original del suelo contribuyó a la tolerancia a la sequía en conjunto con la genética de la planta. Identificar microorganismos específicos que resulten ser claves en la red de interacciones microbio-planta, dentro de la respuesta al estrés de sequía, puede permitir el desarrollo de productos más amigables con el ambiente y el reemplazo de agroquímicos.

Palabras clave: sequía, microbioma, maíz, fisiología vegetal

ABSTRACT

The increase in the frequency of droughts and the consequent water deficit in agriculture endangers the food security of more than one billion people. Several scientific studies have shown the close relationships between plants and coexisting microorganisms and how these can stimulate early defense pathways and prepare plants to face stress. It has been observed that there are changes in the diversity of the root microbiome when a plant is under abiotic stress. For this reason, understanding the changes in the microbiome that occur under drought stress will allow the identification of specific microorganisms or genes that can be used to increase the tolerance capacity of the plant. The cultivation of corn is great for the world economy, unfortunately it is threatened by being planted in places without constant irrigation and at the expense of rain. This study seeks to identify specific changes in the root microbiome in two maize varieties in Malchinguí, in the Pedro Moncayo canton (Pichincha Province-Ecuador). The two maize varieties were subjected to drought stress for 7 days, grown in sterile and non-sterile agricultural soil. The following physiological parameters were evaluated daily: fluorescence, stomatal conductance and water potential. The results of the measurement of the physiological parameters showed that the plants grown in the sterile soil are less tolerant to drought, with stomatal conductance values lower than 100 mmol/m²s from the second day. The samples for the microbiome analysis were taken on well-watered and drought. The microbiome analysis shows the presence of taxa reported in the literature with the ability to induce drought tolerance, such as *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Rugamonas* and *Pseudomonas*. Enrichment and reduction of microbial taxa under drought were identified. Obtaining a differential physiological response among soil types and varieties, it can be proposed that the original soil microbiome contributed to drought tolerance in conjunction with plant genetics. Identifying specific microorganisms that turn out to be key in the network of microbe-plant interactions, within the response to drought stress, can allow the development of more environmentally friendly products and the replacement of agrochemicals.

Keywords: drought, microbiome, corn, plant physiology

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN.....	10
La sequía y sus implicaciones.	10
Respuesta de la planta a estrés hídrico.	11
El microbioma vegetal.....	12
Las bacterias y la sequía.	14
Rol del microbioma en la tolerancia de planta a la sequía.	15
OBJETIVOS.....	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Diseño experimental.	17
Material vegetal y condiciones de crecimiento.	18
Germinación de semillas y crecimiento de las plantas.	18
Tratamiento de sequía.....	18
Ensayo de respuesta fisiológica a sequía.	18
Análisis estadístico parámetros fisiológicos.....	19
Análisis de microbioma.	19
Toma de muestra y procesamiento.	19
Extracción de ADN y secuenciación.	19
Análisis de diversidad.....	20
RESULTADOS.	21
Biomasa vegetal antes y después de la sequía.	21
Análisis del microbioma asociado a estrés de sequía.....	26
DISCUSIÓN.....	33
Respuesta fisiológica de la planta a estrés de sequía.....	33
Microbioma asociado a sequía	34
CONCLUSIONES.....	37
LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biomasa de las variedades bajo riego y sequía.....	21
Figura 2. Fotografías de las plantas del experimento.....	22
Figura 3. Conductancia estomática.....	23
Figura 4. Fluorescencia de la clorofila.....	24
Figura 5. Potencial hídrico.....	25
Figura 6. Análisis de PCoA para el genotipo, tratamiento y compartimiento.....	26
Figura 7. Abundancia relativa.....	27
Figura 8. PCoA para los tratamientos riego y sequía.....	29
Figura 9. Diagrama de Venn para los ASV del microbioma central.....	32

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Índices de alfa diversidad	28
Tabla 2. ASV con abundancia diferencial variedad PEPA.....	30
Tabla 3. ASV con abundancia diferencial variedad INIAP-122.....	31
Tabla 4. ASV con abundancia diferencial en suelo sin plantar.....	31

INTRODUCCIÓN

La sequía y sus implicaciones.

Uno de los principales problemas de la agricultura moderna es la sequía, siendo su definición compleja de establecer, esto debido a que la sequía puede ser definida bajo diferentes factores (Van Loon et al., 2015). Sin embargo, se considera a la sequía como un periodo largo de tiempo en el cual las precipitaciones son inferiores a la media normal anual (Mishra & Singh, 2010).

La conjugación de diferentes variables hidrometeorológicas, como las anomalías en la temperatura y en la cantidad de precipitación, además de una demanda diferencial de agua en distintas regiones del mundo, hacen que el agua sea cada vez menos disponible para una agricultura sostenible (Mishra & Singh, 2010).

En relación con esto, existen varios ambientes naturales, como los desiertos o zonas áridas, en donde es completamente normal la ausencia de precipitaciones. Sin embargo, en los últimos años, los suelos cultivables o destinados para la agricultura, están viéndose afectados por la ausencia de lluvias, amenazando así, la seguridad alimentaria (Ekundayo et al., 2022).

Según el informe del Estado de la Alimentación y la Agricultura, de la FAO del 2019 (FAO, 2019), la sequía es la segunda causa principal de la pérdida precosecha de cultivos básicos como el maíz, papá, trigo y frijoles. En el mismo informe del año 2020 (FAO, 2021), el eje central es el agua y cómo mitigar los problemas asociados a las sequías e inundaciones, principalmente se ha evidenciado la afectación de la sequía en cultivos de secano como el maíz; la productividad económica del agua es más baja en países en desarrollo en América Latina y África, mientras que países de Europa y Estados Unidos tiene la productividad económica del agua más alta (FAO, 2021). El déficit hídrico o sequía producen plantas de menor tamaño, porcentajes de germinación bajos, madurez precoz y senescencia de flores y hojas; afectando directamente la productividad y el rendimiento de los cultivos (Singh & Prasad, 2021). Como

países en desarrollo es importante generar estrategias para aumentar la rentabilidad de las cosechas y aumentar la productividad para así garantizar la seguridad alimentaria.

Respuesta de la planta a estrés hídrico.

Las plantas poseen estrategias adaptadas para sobrevivir a los ambientes secos, ya sean estas genéticas, morfológicas o fisiológicas (Seleiman et al., 2021). A nivel genético, se prioriza la expresión de genes relacionados a la producción de proteínas osmoreguladoras, enzimas y metabolitos relacionados a la fitohormona ácido abscísico (Singh & Prasad, 2021). El ácido abscísico es la principal hormona involucrada en la tolerancia a la sequía, debido a que es la encargada del cierre estomático, evitando la transpiración excesiva y acumulando agua en los tejidos (Fang & Xiong, 2015).

Bajo estrés hídrico, la planta manifiesta cambios en su fisiología, principalmente se producen especies reactivas de oxígeno (ROS), alteraciones en la fotosíntesis, cierre estomático, pérdida de potencial hídrico, deficiencias en la toma de minerales del suelo (Bacete et al., 2022), cambios en la integridad de la pared y membrana celular, producción de metabolitos secundarios y activación de vías de señalización hormonal (Singh & Prasad, 2021).

A nivel morfológico, se ha visto que las plantas bajo estrés de sequía aumentan la biomasa de la raíz, esto para incrementar la búsqueda de agua (Mukarram et al., 2021). Adicionalmente, se han observado sintomatologías asociadas al estrés hídrico, como el enrollamiento de hojas y la generación de plantas pequeñas (Grange et al., 2021). Adicionalmente, las plantas sometidas a estrés hídrico y que han sido rehidratadas tienen la ventaja de generar una memoria que les permite tolerar la sequía en un futuro (Kinoshita, & Seki, 2014).

Una de las respuestas al estrés por sequía que se ha evidenciado, es el aumento en la capacidad de captar agua y de mantenerla en sus tejidos, así como también una optimización del uso del agua para distintas funciones esenciales en la planta (Chaimala et al., 2021). Ciertas

plantas han adaptado el metabolismo C4 y CAM, como las crasuláceas, que les permite adaptarse a suelos más áridos (Tongerlo et al., 2021).

Los osmolitos, o metabolitos secundarios de bajo peso molecular, como la Glycine betaine, desempeñan una función muy importante en el ajuste osmótico y protegen a las células de las ROS (KILINÇOĞLU et al., 2021). En ciertas plantas, se ha evidenciado la sobre-expresión de aminoácidos asociados a la producción de osmolitos, como la prolina; la acumulación de esta, induce ajuste osmótico, protege membranas y proteínas de la deshidratación y actúa como desintoxicador de radicales libres (Ghosh et al., 2022).

Diferentes metodologías han facilitado la identificación de genes y rutas asociadas inducidas por el estrés al déficit hídrico. Si bien, todavía son muchos los vacíos involucrados en la respuesta al estrés por sequía, en los últimos años se han descifrado las bases moleculares de estas respuestas en las plantas (Mathur & Roy, 2021).

Debido al constante cambio climático y los procesos de desertización, en un futuro, será muy probable que la agricultura se desarrolle en déficit hídrico permanente. Para esto será necesario contar con variedades con la capacidad de tolerar la sequía (FAO, 2019). La mayoría de las plantas con capacidades naturales de tolerar la sequía, no son de interés comercial. Sin embargo, pueden ser mejoradas mediante ingeniería genética y se pueden transferir genes claves para la tolerancia a la sequía (Seleiman et al., 2021)

El microbioma vegetal.

Las plantas no pueden ser consideradas como organismos completamente autónomos, debido a que están en una relación constante con microorganismos como las bacterias y hongos (Vandenkoornhuysen et al., 2015). El microbioma puede estar presente en los tejidos tanto internos como externos y en cada lugar de la planta está asociado a diferentes funciones (Rebolleda-Gómez et al., 2019) (Leveau, 2019). El microbioma vegetal modula el impacto de

los estreses bióticos y abióticos (ASLAM et al., 2022), también promueve el crecimiento y estimula el sistema inmune de la planta (Trivedi et al., 2022).

El microbioma está en constante relación con la planta gracias a la comunicación química, la planta tiene la capacidad de exudar compuestos para fomentar esta comunicación (Stringlis et al., 2018). La selección de microorganismos o el ensamblaje de comunidades es diferente, en gran parte, debido a la diferencia de condiciones ambientales en los hábitats de las plantas y a los compuestos derivados de ellas (Rüger et al., 2021). Cada zona de la planta tiene propiedades físicas, químicas y estructurales que permite un ensamblaje diferencial de las comunidades microbianas (Fitzpatrick et al., 2020), por ejemplo, el microbioma presente en la hoja (filósfera) (Leveau, 2019) diferirá del microbioma de la flor (antósfera) (Rebolleda-Gómez et al., 2019).

Después del hábitat de la planta, las condiciones ambientales y climáticas, modulan fuertemente el microbioma de la planta de manera indirecta y directa (D'Alò et al., 2022). El clima impulsa de manera directa los cambios en el microbioma, mientras que como factores abióticos y bióticos modulan indirectamente, ya que se ve involucrada la respuesta de la planta (Graham et al., 2018). Sin embargo, la genética de la planta tiene una baja influencia en el ensamblaje del microbioma, este suele cambiar en respuesta a condiciones metabólicas y ambientales específicas, tales como la falta de nutrientes (Finkel et al., 2019), la sequía (Santos-Medellín et al., 2021) y la presencia de patógenos (Berendsen et al., 2018).

Finalmente, las interacciones que ocurren entre los microorganismos tienen efecto sobre la composición de la microbiota, e incluso un solo taxon puede modificar el microbioma mediante interacciones antagónicas o beneficiosas (Durán et al., 2018). Gracias a todos estos factores que modulan el microbioma vegetal, los microorganismos se han adaptado a todos los hábitats de las plantas y se ha evidenciado que, las interacciones plantas-microbio han jugado un rol importantísimo en la evolución de las plantas terrestres (Thiergart et al., 2020).

Las bacterias y la sequía.

Los microorganismos presentes en el suelo también se ven afectados por el déficit hídrico, resultando en la salida de agua de las células y provocando estrés bioquímico, metabólico, físico y fisiológico (Lebre et al., 2017). Las bacterias no pueden reproducirse activamente cuando la actividad de agua es inferior a 0.9 (Koňuchová & Valík, 2021) y los hongos, por su parte, no están metabólicamente activos por debajo de 0.7 (Groot et al., 2022). No obstante, se han reportado microorganismos que toleran niveles inferiores a los anteriores y se los ha denominado Xerófilos. Sin embargo, el término xerotolerante es más apropiado utilizar para referirse a microorganismos que resistan el estrés pero que no requieren una actividad de agua baja para prosperar (Lebre et al., 2017).

Una respuesta común de las bacterias a diferentes tipos de estrés abiótico es manifestar una forma reversible de latencia, en la que pasan de una actividad metabólica inactiva a reanudar su metabolismo cuando las condiciones sean óptimas (Lebre et al., 2017). En ciertos géneros de bacterias como *Bacillus* y *Clostridium*, latencia implica la generación de esporas altamente resistentes a factores ambientales extremos por largos periodos de tiempo (Rittershaus et al., 2013).

Las bacterias que viven bajo cambios constantes de humedad en el ambiente suelen presentar modificaciones en la composición de fosfolípidos de membrana y ácidos grasos, así como también un aumento en la conversión de ácidos grasos monoenoicos a ácidos grasos de ciclopropano (Mutnuri et al., 2005). Una mayor proporción de ácidos grasos con un empaquetamiento estricto mantiene la membrana en fase cristalina líquida durante un nivel moderado de desecación (Halverson & Firestone, 2000). La permeabilidad de la membrana a los protones se ve disminuida gracias al alto contenido de ácidos grasos de ciclopropano, por lo tanto, equilibra el pH celular, lo que es importante para estabilizar proteínas y garantizar su funcionalidad (Kocharunchitt et al., 2014).

Las adaptaciones moleculares se caracterizan por una expresión diferencial de genes, es decir, se prioriza la síntesis de proteínas con capacidades de osmoprotección. En plantas, se ha evidenciado una acumulación de las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) durante la última fase de maduración de la semilla bajo estrés hídrico, y lo mismo se ha observado en microorganismos como *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Garay-Arroyo et al., 2000). Se ha reportado que de las 6 familias de las proteínas LEA, 3 y sus homólogos están presentes en la mayoría de los organismos con características de tolerancia a la desecación, por ejemplo, en *Deinococcus radiodurans* y *Haemophilus influenzae* (Battaglia et al., 2008) (Slade & Radman, 2011).

Rol del microbioma en la tolerancia de planta a la sequía.

Varios estudios demuestran cómo el microbioma otorga beneficios a las plantas para responder de manera eficiente ante un estrés, ya sea produciendo compuestos que necesita la planta, inhibiendo directamente patógenos o aumentando la disponibilidad de nutrientes (Mathur & Roy, 2021).

Durante el estrés de sequía, la planta experimenta varios cambios genéticos, fisiológicos y morfológicos que impactan su microbioma (Compant et al., 2019). Dichos cambios son percibidos por el microbioma y como consecuencia el microbioma de la rizosfera beneficia a la planta promoviendo la asimilación de nutrientes como nitrógeno y fósforo (Finkel et al., 2019) y colabora en la modificación de la arquitectura de la raíz (Singh & Prasad, 2021). Esta modificación radicular es influenciada por la secreción de fitohormonas por parte de las bacterias, por ejemplo, ácido indol acético, giberelinas y citoquininas (Zhang et al., 2022). Adicionalmente, se ha evidenciado que la producción de la enzima ACC deaminasa (controla los niveles de etileno) por parte del microbioma de la raíz, previene la senescencia de hojas durante el estrés hídrico (No et al., 2022).

Estudios han reportado que la planta selecciona ciertos taxones, como *Streptomyces*, que le confieren cierta tolerancia a la sequía (Fitzpatrick et al., 2018). Existen múltiples taxones reportados con capacidad de inducir la expresión de genes y generar cambios a nivel fisiológicos de la planta (Lata et al., 2018). La mayoría de estos taxones aumenta su abundancia durante la sequía evidenciando que son reclutados para contribuir momentáneamente a la defensa de la planta y por otro lado, una sequía prolongada reduce dicha abundancia (Santos-Medellín et al., 2021).

La tolerancia a la sequía es una característica compleja, que no está controlada por un solo factor, en este sentido, el microbioma es uno que puede contribuir a la tolerancia (ABUAUF et al., 2022). Las investigaciones en el campo de las interacciones planta-microbio va incrementando con el objetivo de identificar taxones que confieran tolerancia al estrés por sequía o a su vez, poder generar consorcios microbianos que puedan ser aplicados en campo directamente (Yadav et al., 2022).

Debido a la importancia comercial mundial del maíz, en este trabajo se analizará la respuesta fisiológica de dos variedades de maíz y sus cambios en el microbioma durante el estrés de sequía. Para describir la respuesta de estas variedades se medirán tres parámetros fisiológicos claves: conductancia estomática, fluorescencia de la clorofila y potencial hídrico de la planta. El análisis del microbioma se realizará a partir de la endosfera radicular, la rizósfera y suelo sin plantar.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar la respuesta fisiológica y los cambios en el microbioma durante estrés de sequía en dos variedades de maíz (*Zea mays*)

Objetivos específicos

- Cultivar dos variedades de maíz en un sustrato que conserve su microbioma natural y otro sustrato esterilizado.
- Medir la respuesta fenotípica y fisiológica usando la conductancia estomática, fluorescencia de la clorofila y potencial hídrico de dos variedades de maíz durante el estrés de sequía.
- Analizar la diversidad y abundancia del microbioma asociado a rizósfera, endósfera radicular y suelo sin plantar de dos variedades de maíz bajo estrés de sequía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental.

El experimento se organizó siguiendo un diseño de parcelas divididas con subparcelas factoriales en las que el régimen de riego se asignó a las parcelas principales (Riego y Sequía) y las variedades de maíz (Pepa e INIAP-122) y tipo de suelo (estéril y normal) a las subparcelas.

Se designó un espacio para cada parcela en un área compartida. Las macetas tenían una capacidad de 16 onzas. 5 réplicas biológicas en total para cada tratamiento (Anexo 1).

Material vegetal y condiciones de crecimiento.

El suelo utilizado para este ensayo fue suelo agrícola proveniente de la parroquia Malchinguí, Cantón Pedro Moncayo (0°01'56.7"N 78°20'47.3"W). Esta zona geográfica presenta precipitaciones anuales de máximo 500mm (Fundación Cimas del Ecuador, 2015). Se recolectó y se trasladó al invernadero de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central. Se tamizó el suelo y se homogeneizó. El suelo para los tratamientos de suelo estéril se autoclavó durante una hora a 121 grados centígrados dos veces (suelo E). Los suelos correspondientes se colocaron en vasos plásticos de 16 onzas. Antes de colocar la semilla se agregó agua a capacidad de campo. Se aplicó el bioestimulante *Newponia* de Microtech (Microtech Services Cia. Ltda, 2019) desde el día de la siembra de la semilla durante cuatro semanas, 3 veces a la semana.

Germinación de semillas y crecimiento de las plantas.

Las variedades de maíz utilizadas fueron PEPA e INIAP-122. Se eligió trabajar con estas variedades debió a sus capacidades agronómicas obtenidas en un ensayo paralelo (Lozano, 2022). Para cada variedad, las semillas fueron esterilizadas con hipoclorito de sodio al 2%. Se colocaron las semillas en las macetas plásticas bajo condiciones de invernadero y se regaron cada dos días con solución nutritiva.

Tratamiento de sequía.

Después de cuatro semanas de la siembra en el invernadero, a las plantas se suspendió el riego totalmente en las macetas correspondientes a sequía durante 7 días. Para el tratamiento control (riego continuo) las macetas se mantuvieron bajo riego normal cada dos días.

Ensayo de respuesta fisiológica a sequía.

Se realizó mediciones a los 0, 1, 2, 4, 5, 6 y 7 días de sequía. Los parámetros fisiológicos evaluados fueron conductancia estomática (Decagon Devices, 2005), fluorescencia de la

clorofila (Shama, 2015) y potencial hídrico (Lottie Fallas-Cedeño, et al., 2010) Adicionalmente se evaluó la biomasa de cada tratamiento y la altura de la planta.

Se utilizaron los siguientes equipos de medición:

Conductancia estomática: Porómetro de hoja de *Decagon Device USA*.

Fluorescencia: fluorómetro OS30p+ de *Opti-Sciences Inc, New Hampshire USA*

Potencial Hídrico: Bomba de Scholander M1515D de *Mosler Tech Suppor USA*.

Análisis estadístico parámetros fisiológicos

Los datos fueron analizados en el software estadístico R studio (R Core Team, 2018).

Se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA) con una prueba post-hoc de Tukey.

Análisis de microbioma.

Toma de muestra y procesamiento.

Luego de realizar las mediciones de los parámetros fisiológicos, se separó la raíz de la parte aérea, se sacudió para quitar el exceso de suelo y se almacenó en fundas ziploc. Se recolectó tubos de 1.8ml con la rizósfera y suelo sin plantar. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Biotecnología Agrícola y Alimentos-USFQ y se congelaron a -20 grados centígrados hasta su procesamiento.

Las raíces fueron lavadas con sulfato de magnesio 1mM hasta retirar todo el suelo, luego fueron congeladas y liofilizadas. Las raíces fueron llevadas al Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias -INIAP, donde fueron trituradas en el equipo *Tissuelyser II de Qiagen* (Qiagen, 2022).

Extracción de ADN y secuenciación.

El ADN de rizósfera, suelo sin plantar y endosfera radicular fue extraído con el kit comercial *DNeasy® PowerSoil® Pro* de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, 2021). La secuenciación fue realizada por la empresa BIOSEQUENCE S.A.S. (Quito, Ecuador) mediante la plataforma de Illumina Miseq (Albany, NY, USA). Se amplificó el gen

16S para bacterias, con 70000R y primers 341F-805R. Después de eliminar las secuencias de los cebadores, las secuencias resultantes se colapsaron en variantes de secuencia de amplicón (ASV) utilizando el paquete R DADA2 versión 1.8.1 (R Core Team, 2018)(Callahan et al., 2016). La asignación taxonómica de cada ASV fue realizada usando el método Naïve Bayes k-mer implementado en el paquete MOTHUR (Schloss et al., 2009). Todas las muestras se enrarecieron a 69000 lecturas por muestra antes del análisis.

Análisis de diversidad.

El análisis estadístico fue realizado en el software informático R studio (R Core Team, 2018). Las métricas de diversidad alfa y el índice de disimilitud de Bray-Curtis se calculó utilizando el paquete Vegan versión 2.5-3 (Oksanen J, et al., 2015). Se utilizó cinco medidas para la diversidad y riqueza: índice de Shannon (índice de diversidad), índice inverso de Simpson (para cuantificar la abundancia proporcional promedio de especies en una muestra), riqueza (recuento de especies únicas), Chao1 (abundancia de índice basado en especies) y evenness (cuán igualmente abundantes son las especies) (Kim et al., 2017). El análisis de diversidad beta (análisis de coordenadas principales) se basó en la disimilitud de Bray-Curtis calculada a partir de las tablas de abundancia enrarecidas (Jost, L., Chao, A., & Chazdon, 2011). Para visualizar la composición de las comunidades microbianas se realizó un gráfico de barras apiladas. Adicionalmente se analizó las abundancias diferenciales mediante el paquete DESeq2, para identificar los taxones que aumenten o disminuyan con la sequía (Anders & Huber, 2010). Todos los gráficos fueron realizados con el paquete ggplot2 (Wickham, 2011).

RESULTADOS.

Biomasa vegetal antes y después de la sequía.

La pérdida de biomasa o reducción en el crecimiento de las plantas es una consecuencia notoria en las plantas estresadas por sequía (ASLAM et al., 2022). En este estudio, se evidenció que las plantas de las dos variedades en ausencia de agua fueron más pequeñas (biomasa foliar) que las están bajo riego normal, además se observa que las dos variedades sembradas en el suelo que conserva su microbioma (suelo C) tienen un peso similar (Figura 1). Por otro lado, los hallazgos mostrados indican que las plantas cultivadas en el suelo E son más altas que aquellas cultivadas en el suelo C (Anexo 2).

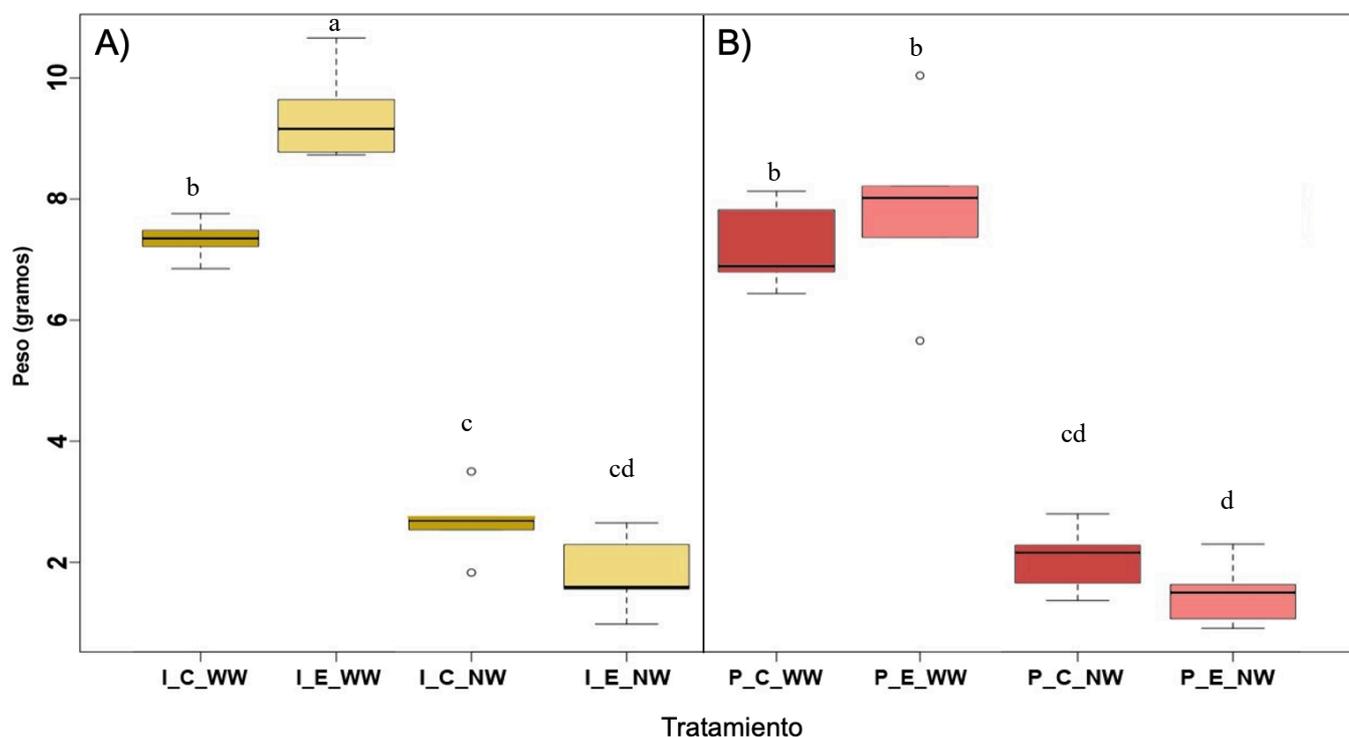


Figura 1. Peso fresco de dos variedades de maíz: **A)** INIAP (amarillo) y **B)** Pepa (rojo), sembradas en suelo estéril (_E) y en suelo que conserva su microbioma (_C), bajo riego completo (_WW) y bajo sequía (_NW). Datos tomados a los 7 días de sequía. Se encontraron diferencias significativas entre variedades sembradas en el suelo E bajo riego completo y entre variedades sembradas en el suelo C bajo sequía. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (Tukey's HSD $p < 0.05$).

Las diferencias en crecimiento de los distintos tratamientos podemos observarlas en las siguientes fotografías (Figura 2). Se evidencian las diferencias de altura y de biomasa. Se observan también sintomatología de estrés a sequía más severa en las plantas cultivadas en el

suelo tipo E. Las plantas de la variedad INIAP cultivadas en el suelo C muestran la mayor tolerancia a la sequía. Se puede sugerir, entonces, que hay un impacto en el crecimiento de las plantas por parte del suelo y de la genética de las variedades.

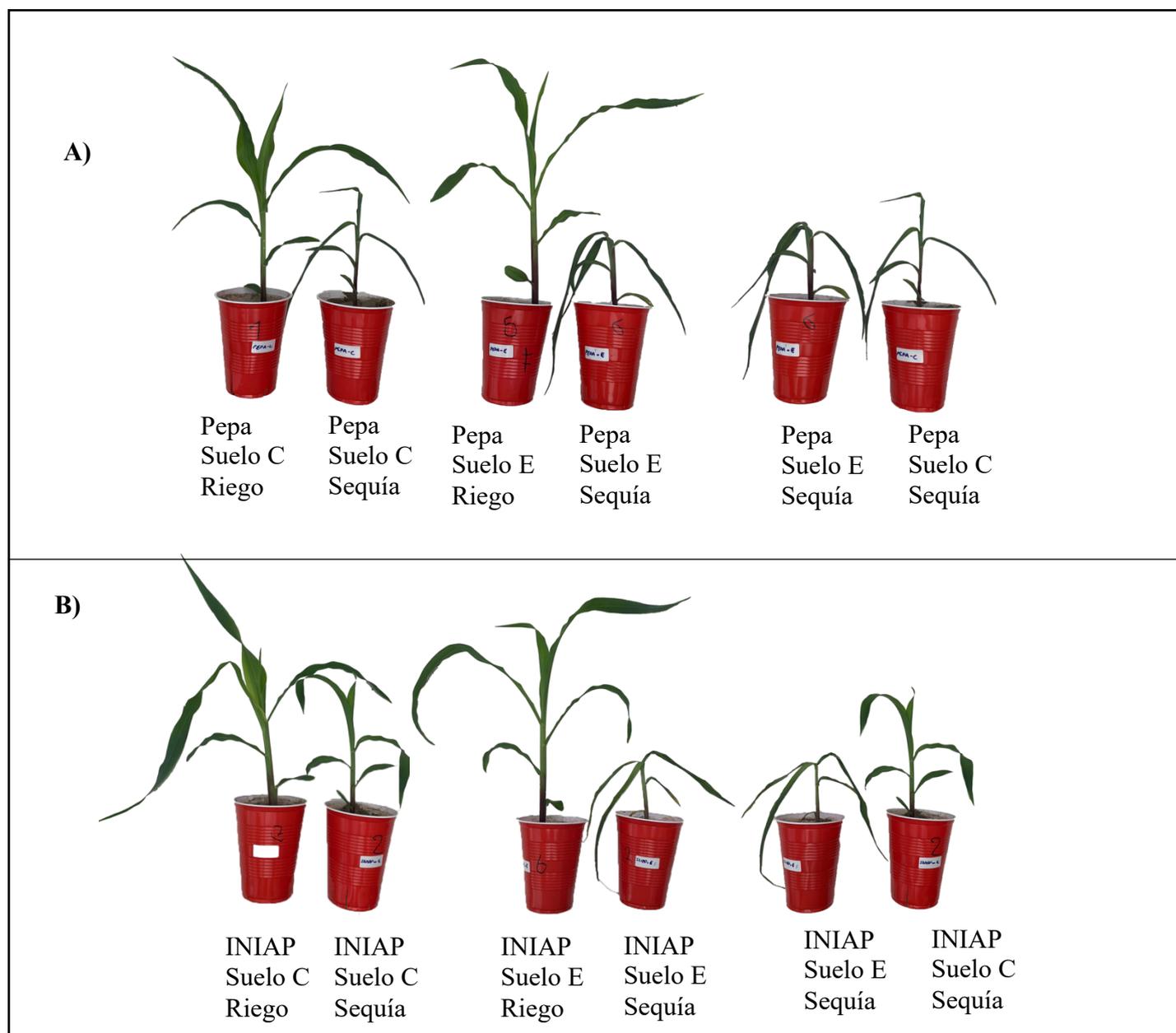


Figura 2. Plantas de la variedad: **A) PEPA & B) INIAP.** Bajo régimen bien regado y sequía completa luego de 7 días de sequía, sembradas en los distintos suelos (C y E). No se observa sintomatología de respuesta a estrés en las plantas de INIAP sembradas en el suelo C bajo sequía. Se observan signos de estrés en las plantas sembradas en el suelo E de las dos variedades. C) Comparativa entre variedades. INIAP en el suelo C presenta la mejor tolerancia a la sequía.

Respuesta fisiológica de dos variedades de maíz.

La conductancia estomática, es una medida que permite cuantificar la cantidad de vapor de agua que está siendo liberado por los estomas, de esta manera, mientras mayor sea el valor, más abiertos están los estomas (Hopkins & Hüner, 2009). En este trabajo se encontraron conductancias diferenciales entre los dos tipos de suelo bajo sequía, siendo la conductancia de las plantas sembradas en el suelo C mayores a las del tipo E (Figura 3). Se observa que a partir del día 1 los valores tienen una tendencia a la baja. Las plantas suelen cerrar los estomas cuando enfrentan estrés hídrico para evitar la pérdida de agua (Yang et al., 2021).

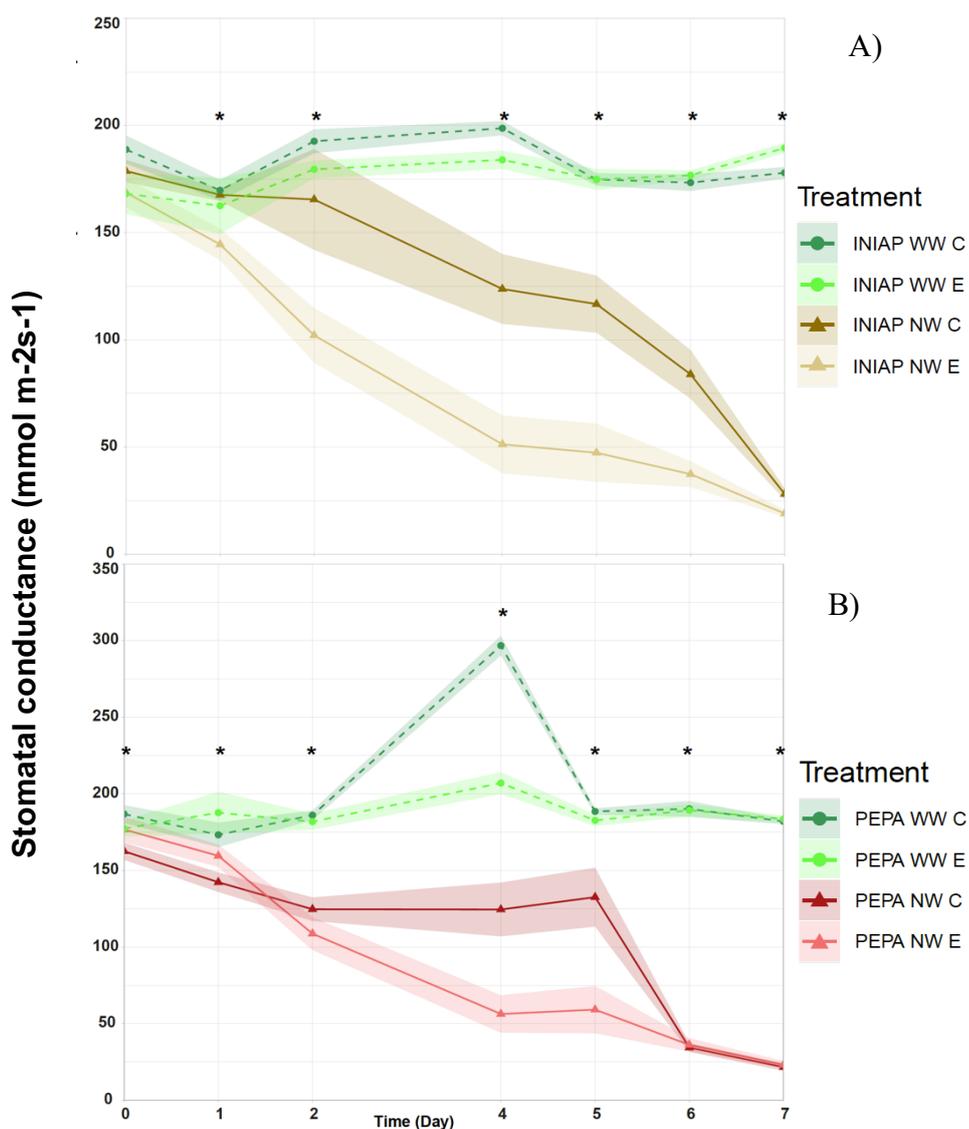


Figura 3. Conductancia estomática de dos variedades de maíz: **A)** INIAP (amarillo) y **B)** Pepa (rojo) bajo riego completo (WW – líneas punteadas) y sequía (NW-líneas sólidas) sembradas en suelo E y suelo C. Sequía aplicada durante 7 días. La sombra de cada línea representa el error estándar. *Diferencia significativa (ANOVA; $p < 0,05$). Anexo 4 y 5 incluye la prueba post-hoc Tukey HSD para cada punto de tiempo).

La capacidad fotosintética de la planta es crucial para que se lleven a cabo procesos como la absorción de CO₂ y el metabolismo de azúcares (Guerrieri et al., 2019). Mediante la fluorescencia de la clorofila se puede conocer el nivel de estrés de una planta (Mathur & Roy, 2021). Bajo sequía, INIAP-122 manifiesta los valores de conductancia más altos (Figura 4A) mientras que en Pepa los valores tienden a la baja a partir del día 2 (Figura 4B). En Pepa se observa una diferencia significativa entre las plantas sembradas en el suelo E y C. Un estado fisiológico normal manifiesta valores superiores a 0.7, mientras más bajo sea el valor significa un mayor estrés en la planta (Hopkins & Hüner, 2009).

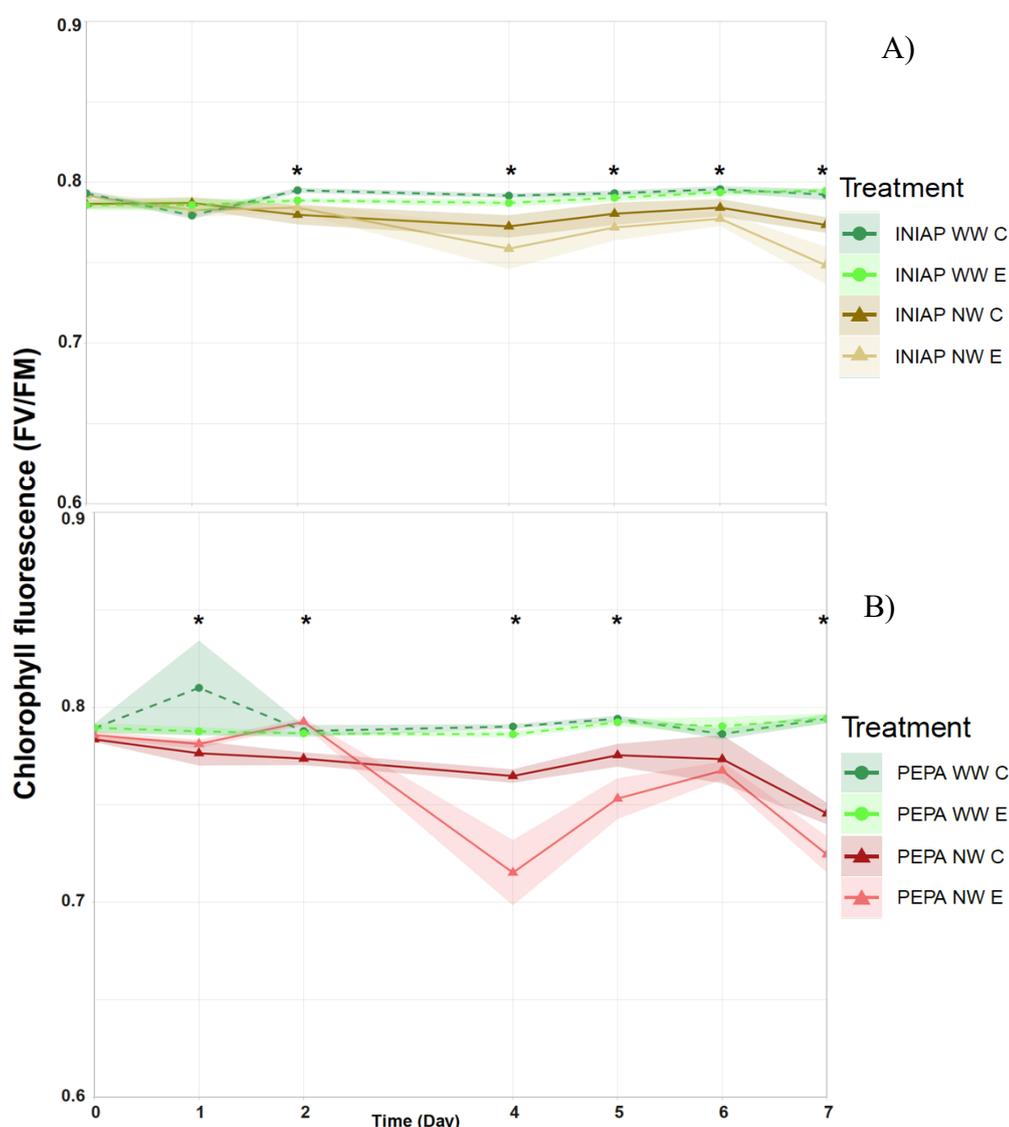


Figura 4. Fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) de dos variedades de maíz: Pepa (rojo) e INIAP (amarillo) bajo riego completo (WW – líneas punteadas) y sequía (NW–líneas sólidas) sembradas en suelo E y suelo C. Sequía aplicada durante 7 días. La sombra de cada línea representa el error estándar. Se encontraron diferencias significativas en la variedad Pepa entre suelo C y E en los días 2, 4, 5. *Diferencia significativa (ANOVA; $p < 0,05$). Anexo 6 y 7 incluye la prueba post-hoc Tukey HSD para cada punto de tiempo).

Otro parámetro muy importante en la respuesta a estrés de sequía es el potencial hídrico. Cuando la planta experimenta déficit hídrico, empieza a aumentar la demanda de agua para mantener el ajuste osmótico, de este modo el agua viaja de una zona con mayor potencial hídrico a una con menor (Moreno, 2009). Disminuir el agua libre en los tejidos tiene un efecto más negativo sobre el potencial hídrico y por eso los valores son negativos, mientras más negativo el potencial hídrico, más deficiencia de agua (Aroca, 2013).

En la figura 5 se observa los valores resultantes de la medición de potencial hídrico a los 7 días de sequía. Se observa que INIAP-122 sembrada en el suelo C tienen mayor potencial hídrico que el resto de los tratamientos.

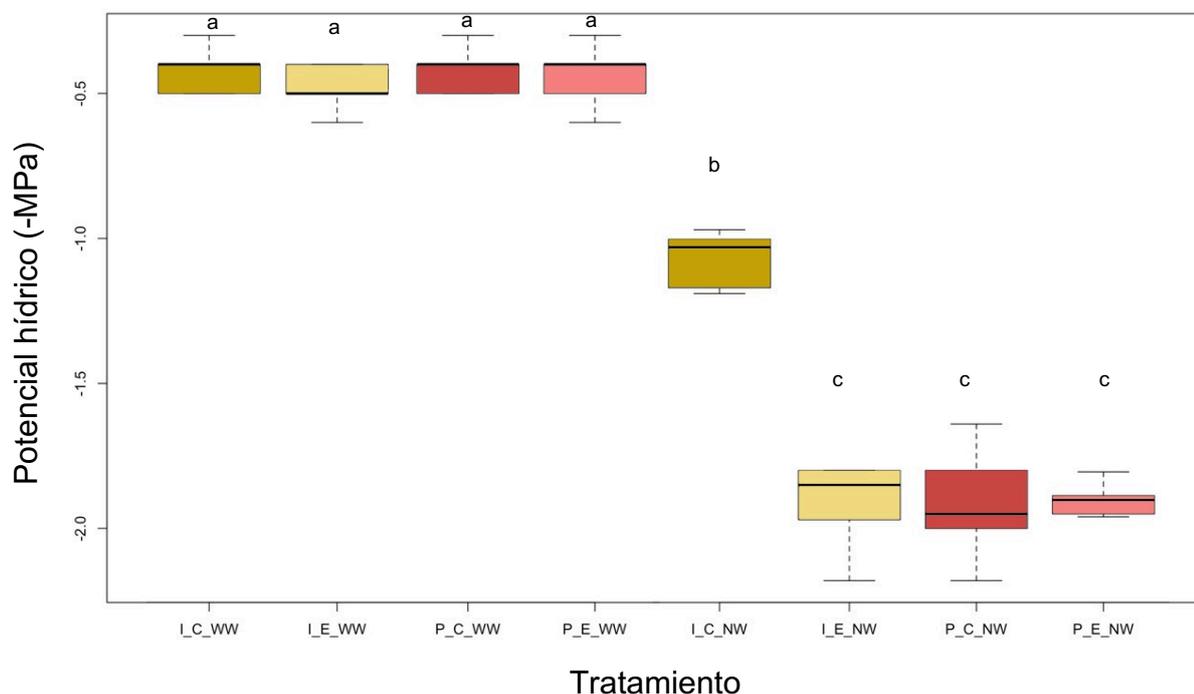


Figura 5. Potencial hídrico (MPa) de dos variedades de maíz: Pepa (rojo) e INIAP (amarillo) luego de 7 días de sequía. Diferencias significativas para la variedad INIAP sembrada en suelo C. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (Tukey's HSD $p < 0.05$).

Análisis del microbioma asociado a estrés de sequía

Los microorganismos, en este caso las bacterias, tienen ciertas adaptaciones según el lugar donde se encuentran y el genotipo de la planta al que están asociadas (Graham et al., 2018). En la figura 6 se puede observar que el genotipo (suelo, rizósfera y endósfera, Figura 6A), genotipo (Pepa e INIAP, Figura 6A) y tratamiento (riego y sequía, Figura 6B) presentan diferencias significativas y pudieran ser considerados factores que dan forma a la composición de la comunidad bacteriana.

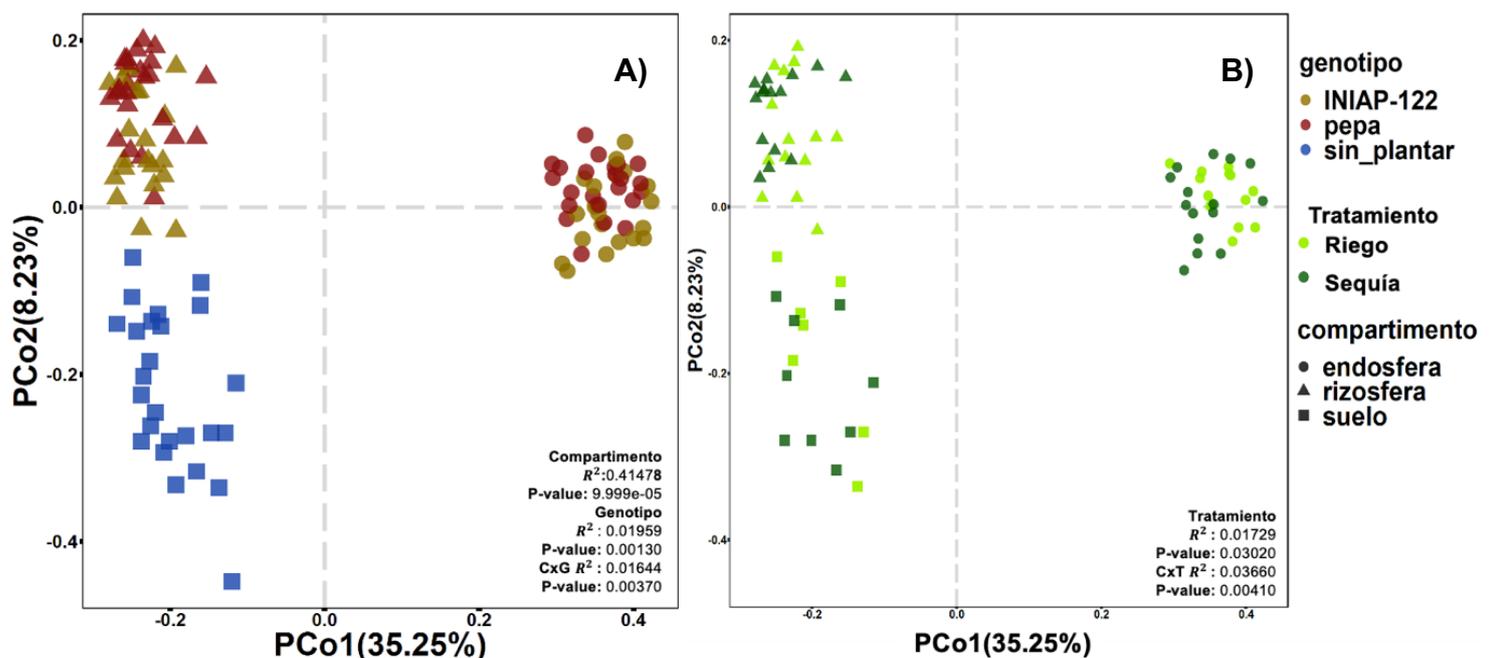


Figura 6. El genotipo de la planta y el día de sequía dan forma a la composición general de las comunidades bacterianas. Los puntos verdes oscuro corresponden a la sequía y verde claro al riego, los puntos amarillos corresponden a la variedad INIAP-122, color rojo a la variedad Pepa y color azul al suelo sin plantar. Las muestras con círculo (●) pertenecen a la endósfera, triángulo (▲) a la rizosfera y cuadrado (■) al suelo sin plantar.

Por otra parte, se ha determinado la abundancia relativa a nivel de filo de las variedades INIAP-122 y Pepa bajo condiciones de sequía y riego. Adicionalmente se analizó muestras de suelo sin plantar, esto va a permitir conocer la abundancia que se pudiera encontrar en un suelo sin efecto del cultivo (Figura 9). Se puede observar que no existen diferencias muy marcadas entre los tratamientos. Sin embargo, el gráfico indica que hay ciertos filos que se encuentran en mayor proporción.

Por otra parte, se determinó la abundancia relativa a nivel de filo de las variedades en estudio bajo condiciones de sequía y riego. Adicionalmente se analizó muestras de suelo sin plantar, que va a permitir conocer la abundancia que se puede encontrar en este tipo de suelo sin efecto del cultivo (Figura 7). Se puede observar en el gráfico que hay ciertos filos en mayor proporción, en endosfera encontramos una proporción muy baja de Actinobacterias en comparación con la rizosfera. Adicionalmente, se observa un aumento de Actinobacterias en los compartimentos de Pepa y en el suelo sin plantar. En INIAP-122, por su parte, observamos un incremento de Bacteroidetes en la endosfera.

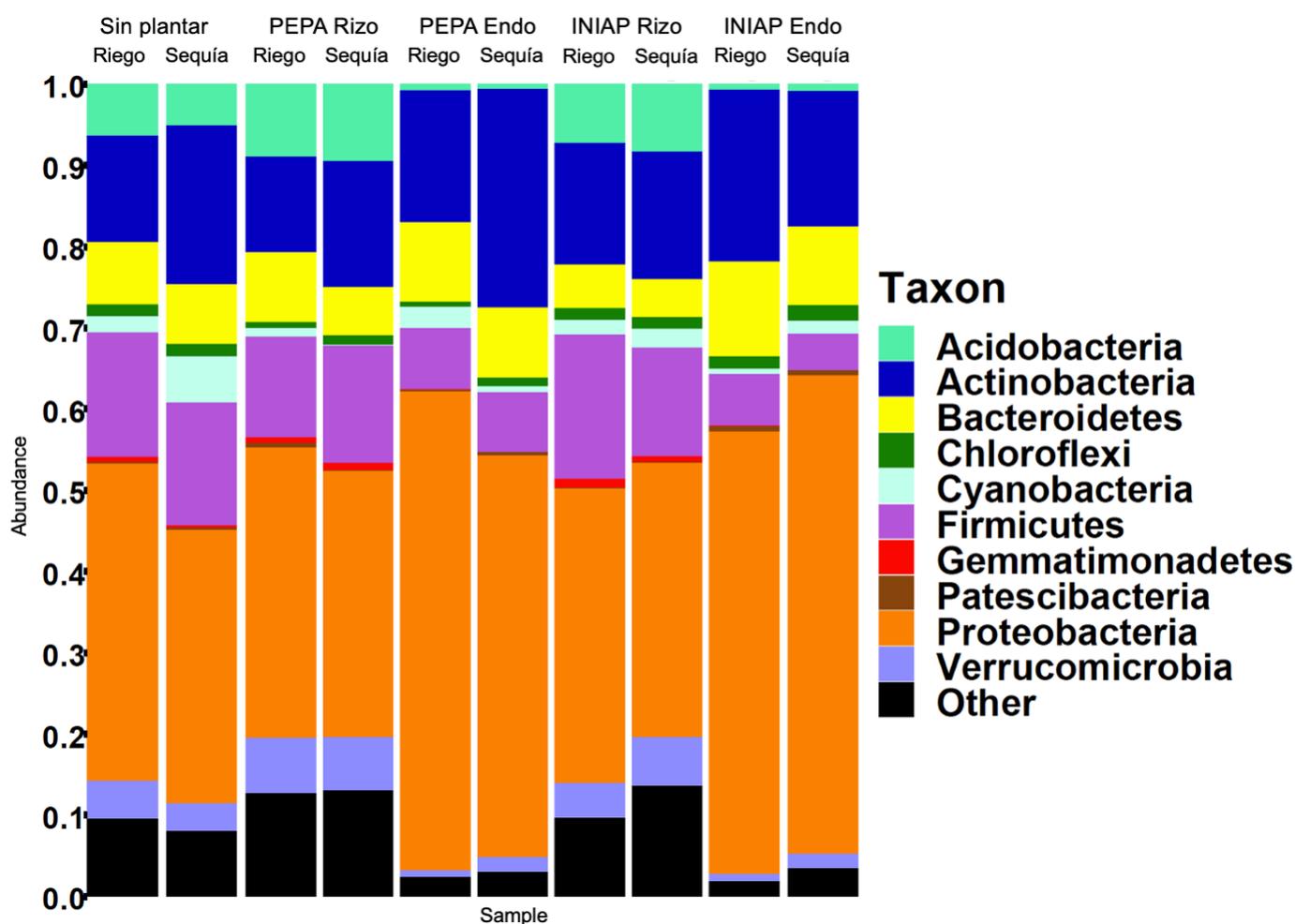


Figura 7. Abundancias relativas de los filos más abundantes presentes en las dos variedades PEPA e INIAP-122 en endósfera radicular (Endo), rizósfera (Rizo) y suelo sin plantar (Sin plantar) bajo riego y sequía.

El análisis de la diversidad alfa permite conocer la diversidad existente en un ambiente u organismos de interés (Moreno, Barragán & Pineda, 2011). Se calcularon los 5 índices de alfa diversidad (Tabla 1). Donde podemos ver que en todos los casos existe mayor diversidad en el suelo y la rizósfera. Es importante conocer cuál es la dinámica de las comunidades microbiana dentro de cada compartimento. Para esto, utilizando el análisis de coordenadas principales, se observa en la figura 8 cómo las comunidades se agrupan significativamente en Pepa, lo que no ocurre en INIAP-122. Esto nos da una idea de que las comunidades microbianas están cambiando durante la sequía. También observamos este comportamiento en las muestras del suelo sin plantar (figura 8C).

Tabla 1. Índices de alfa diversidad para los diferentes tratamientos.

Variedad	Tratamiento	Compartimento	Riqueza	Chao1	Shannon	InvSimpson	Evenness
Pepa	Riego	Rizosfera	1133	1208.5	6.5	396.9	0.9
	Sequía	Rizosfera	1139	1217.7	6.5	402.1	0.9
	Riego	Endosfera	723	757.0	5.7	147.8	0.9
	Sequía	Endosfera	781	808.6	5.9	181.7	0.9
INIAP-122	Riego	Rizosfera	1237	1331.9	6.5	355.2	0.9
	Sequía	Rizosfera	1208	1284.9	6.6	428.0	0.9
	Riego	Endosfera	582	609.5	5.5	113.7	0.9
	Sequía	Endosfera	910	981.0	6.0	168.3	0.9
Sin plantar	Riego	Suelo	1010	1064.2	6.3	287.1	0.9
	Sequía	Suelo	1202	1291.7	6.5	337.3	0.9

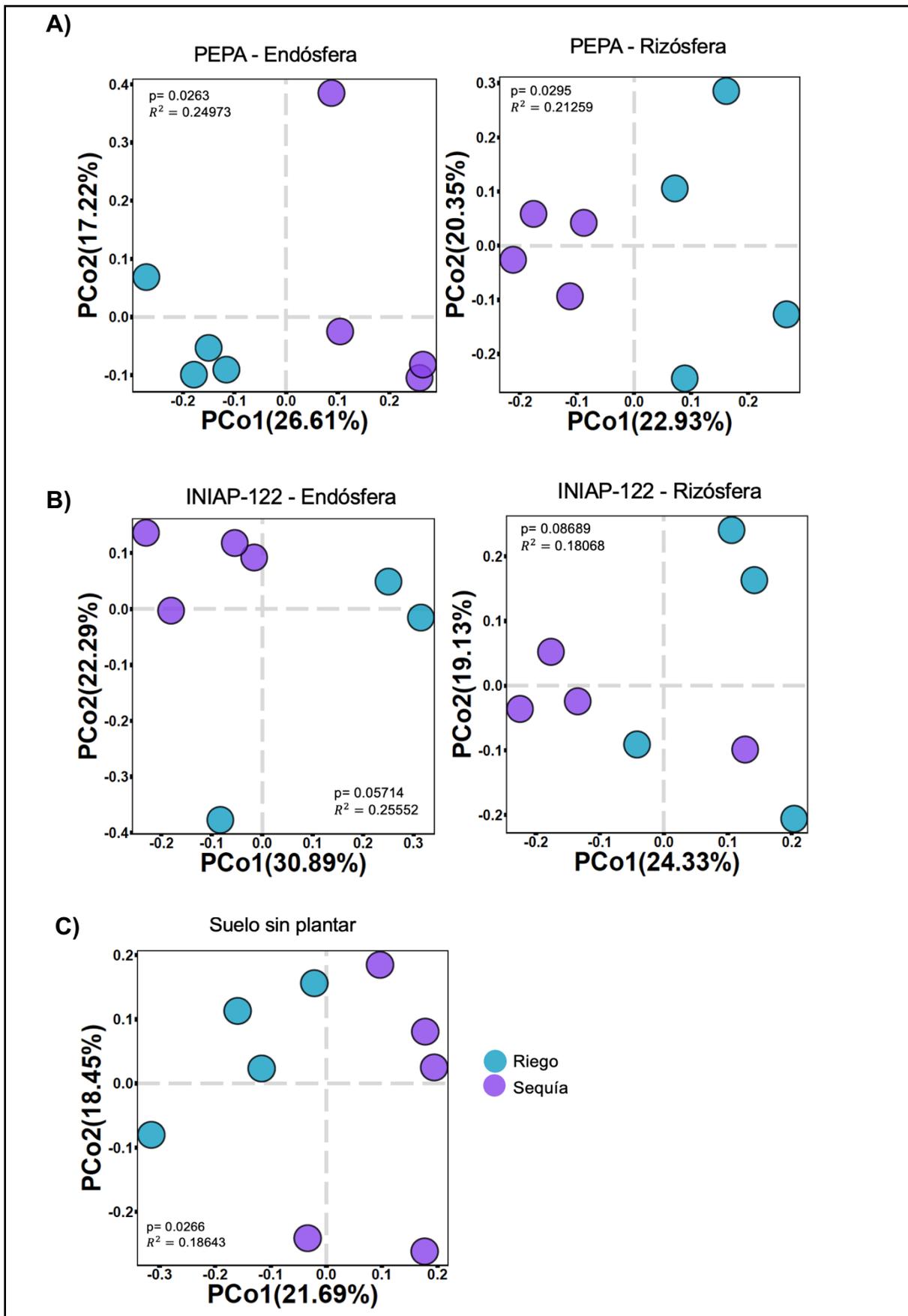


Figura 8. A) Variedad PEPA B) Variedad INIAP-122 C) Suelo sin plantar. Las muestras de color turquesa pertenecen al tratamiento riego (●) y morado (●) a la sequía.

Para identificar cuáles son los cambios que permiten el agrupamiento de las comunidades por día, se realizaron análisis de abundancia diferencial. Estos análisis permitieron identificar ciertos taxones que aumentan o disminuyen en la sequía. La siguiente tabla 2 pertenece a los datos obtenidos de la variedad Pepa. Donde se encontraron 15 taxones que su abundancia es diferencial, estando únicamente 2 taxones presentes en la rizósfera.

Tabla 2. ASV con abundancia diferencial en la sequía de la variedad PEPA.

Filo	ASV	Género/Familia	Variedad	Compartimento	Acción
Actinobacteria	114	<i>Streptomyces</i>	PEPA	Endosfera	Reduce
Actinobacteria	202	<i>Streptomicetacea</i>	PEPA	Endosfera	Reduce
Actinobacteria	80	<i>Propionibacteriales</i>	PEPA	Endosfera	Reduce
Proteobacteria	450	<i>Burkholderiaceae</i>	PEPA	Rizosfera	Reduce
Proteobacteria	10	<i>Sphingomonadaceae</i>	PEPA	Endosfera	Reduce
Proteobacteria	131	<i>Rugamonas</i>	PEPA	Endosfera	Reduce
Proteobacteria	180	<i>Sphingomonadaceae</i>	PEPA	Endosfera	Reduce
Proteobacteria	279	<i>Burkholderiaceae</i>	PEPA	Endosfera	Reduce
Proteobacteria	677	<i>Proteobacteria unclassified</i>	PEPA	Endosfera	Aumenta
Proteobacteria	184	<i>Corticibacterium</i>	PEPA	Endosfera	Aumenta
Actinobacteria	370	<i>Micromonosporaceae</i>	PEPA	Endosfera	Aumenta
Actinobacteria	390	<i>Promicromonospora</i>	PEPA	Endosfera	Aumenta
Actinobacteria	888	<i>Micromonosporaceae</i>	PEPA	Endosfera	Aumenta
Actinobacteria	154	<i>Micromonosporaceae</i>	PEPA	Endosfera	Aumenta
Firmicutes	51	<i>Firmicute unclassified</i>	PEPA	Rizosfera	Aumenta

La abundancia diferencial para la variedad INIAP-122 se muestra en la siguiente tabla 2. A diferencia de la variedad Pepa, en la variedad INIAP-122 hay 11 taxones con abundancia diferencial. El compartimento donde ocurre esto es en la endosfera radicular, mientras que en la rizosfera hay únicamente 2 taxones que aumentan.

Tabla 3. ASV con abundancia diferencial en la sequía de la variedad INIAP-122

Filo	ASV	Género/Familia	Variedad	Compartimento	Acción
Proteobacteria	204	<i>Pseudomonas</i>	INIAP	Endosfera	Reduce
Proteobacteria	263	<i>Pseudomonas</i>	INIAP	Endosfera	Reduce
Proteobacteria	364	<i>Pseudomonas</i>	INIAP	Endosfera	Reduce
Proteobacteria	703	<i>Rugamonas</i>	INIAP	Endosfera	Reduce
Acidobacteria	1034	<i>RB41</i>	INIAP	Rizosfera	Aumenta
Actinobacteria	107	<i>Thermomonosporaceae</i>	INIAP	Rizosfera	Aumenta
Proteobacteria	123	<i>Beijerinckiaceae</i>	INIAP	Endosfera	Aumenta
Proteobacteria	2036	<i>Gamaproteobacteria</i>	INIAP	Endosfera	Aumenta
Proteobacteria	656	<i>Burkholderiaceae</i>	INIAP	Endosfera	Aumenta
Proteobacteria	677	<i>Proteobacteria unclassified</i>	INIAP	Endosfera	Aumenta
Proteobacteria	832	<i>Mycoplana</i>	INIAP	Endosfera	Aumenta

Los datos de abundancias diferenciales para el suelo se muestran en la tabla 4. Se indican 17 ASV con abundancias diferenciales, de los cuales únicamente 5 se reducen y el resto aumentan.

Tabla 4. ASV con abundancia diferencial en la sequía de la variedad INIAP-122

Filo	ASV	Género/Familia	Variedad	Acción
Bacteroidetes	1238	<i>Chitinophagacea</i>	suelo	Reduce
Bacteroidetes	1600	<i>Chitinophagacea</i>	suelo	Reduce
Proteobacteria	120	<i>Rizobiaceae</i>	suelo	Reduce
Proteobacteria	1755	<i>Sphingobacteriales</i>	suelo	Reduce
Proteobacteria	3514	<i>Peredibacter</i>	suelo	Reduce
Proteobacteria	131	<i>Rugamonas</i>	suelo	Aumenta
Proteobacteria	345	<i>Opitutaceae</i>	suelo	Aumenta
Proteobacteria	17	<i>Pseudomonas</i>	suelo	Aumenta
Proteobacteria	1387	<i>Youhaiella</i>	suelo	Aumenta
Verrucomicrobia	419	<i>Pedospaeraceae</i>	suelo	Aumenta
Actinobacteria	2283	<i>Nocardioides</i>	suelo	Aumenta
Actinobacteria	87	<i>Nocardiodaceae</i>	suelo	Aumenta
Bacteroidetes	413	<i>Flavobacterium</i>	suelo	Aumenta
Cyanobacteria	2206	<i>Oxyphotobacteria</i>	suelo	Aumenta
Firmicutes	1873	<i>Exiguobacterium</i>	suelo	Aumenta
Firmicutes	739	<i>Planomicrobium</i>	suelo	Aumenta
Firmicutes	833	<i>Planococcaceae</i>	suelo	Aumenta

Se analizó el microbioma central de cada variedad. Es decir, aquellos ASV que estuvieran presentes en el 100% de las plantas y en riego y sequía, por compartimento. Se obtuvo el siguiente Diagrama de Venn identificando cuantos ASV se comparten entre las dos variedades (Figura 9). Al conocer esta información se pueden identificar aquellos taxones que se han mantenido constantemente asociados a los compartimentos en las dos variedades durante la sequía. A nivel de rizosfera, Pepa presenta un microbioma central de 117 ASV, de los cuales comparte 58 ASV con INIAP que tiene 70. En el caso de la endosfera, Pepa tiene un microbioma central de 69 ASV, de los cuales comparte 56 con INIAP, que tiene 84.

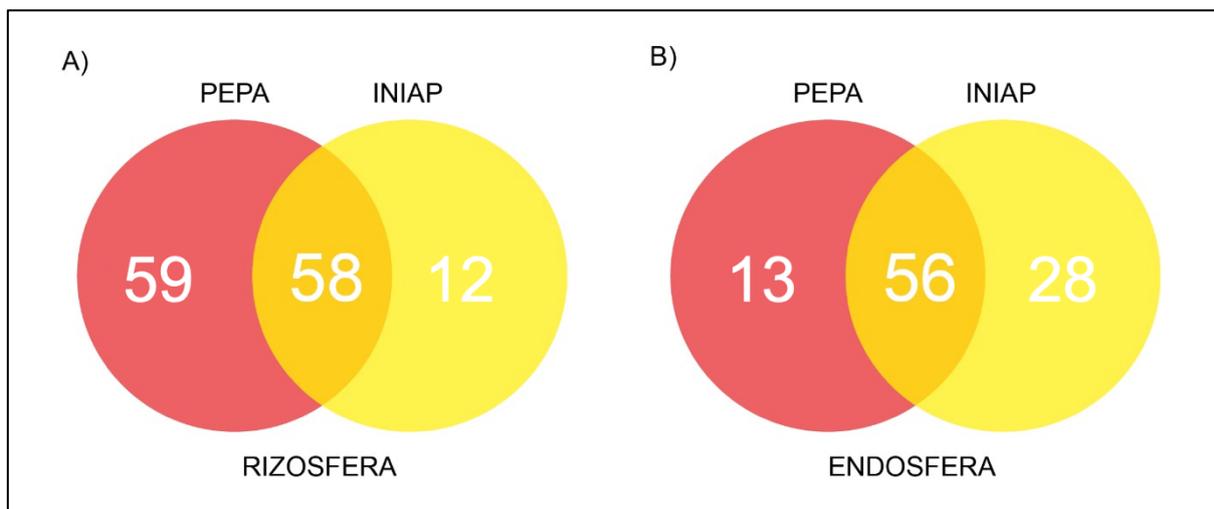


Figura 9. Diagrama de Venn para los ASVs que conforman el microbioma central de cada variedad: Pepa (rojo) & INIAP-122 (amarillo). **A)** ASVs compartidos entre la rizósfera de las dos variedades. **B)** ASVs compartidos entre la endósfera de las dos variedades.

DISCUSIÓN

Respuesta fisiológica de la planta a estrés de sequía

Los resultados de biomasa de las plantas indican que la sequía impacta el crecimiento. La mayoría de las investigaciones sobre sequía evalúan cuanta biomasa se pierde por impacto de la sequía (Q. Chen et al., 2022), esto debido a que puede ser un indicio de cómo se ve afectada la productividad en campo (Noein & Soleymani, 2022). Noein y Soleymani, encontraron que la sequía afecta al crecimiento del maíz, en biomasa y en rendimiento del grano y lograron revertir el efecto de la sequía con la adición de reguladores de crecimiento (Noein & Soleymani, 2022). En este trabajo, se tiene pérdida de biomasa en aquellas plantas que han sido cultivadas en un suelo que carece de microbioma y este resultado podemos contrastar con la investigación de (Ferrarezi et al., 2022) que en ausencia de microbioma y bajo sequía obtiene plantas más pequeñas de maíz.

Los parámetros fisiológicos medidos muestran un comportamiento diferencial entre las variedades de maíz estudiadas cuando están bajo cada tratamiento. Se observa ciertas diferencias significativas, por ejemplo, la variedad INIAP-122 sembrada en un suelo que carece de microbioma tiene valores de conductancia inferiores a las plantas que crecen en un suelo que conserva su microbioma. Pudiendo inferir que la ausencia de microbioma provoca que las plantas se estresen rápidamente y como consecuencia las plantas toleran en menor medida el estrés (Kränzlein et al., 2021).

El maíz es un cultivo de secano, generalmente depende de las lluvias para obtener agua (FAO, 2021), por este motivo se han desarrollado o seleccionado variedades con capacidad de tolerar la sequía (Bruce et al., 2002). La respuesta fisiológica tiene muchos factores que la modulan, desde la temperatura ambiental, la luz, la genética de la planta y distintos tipos de estrés (Yang et al., 2021). En el presente estudio se obtuvo valores diferentes en las dos

variedades de maíz estudiadas, siendo INIAP-122 la variedad que tolera más la sequía. En este caso la genética de la planta si se influye en la tolerancia a la sequía (Singh & Prasad, 2021).

Microbioma asociado a sequía

La búsqueda de una estrategia para hacerle frente al déficit hídrico, cada vez más constante, ha direccionado las investigaciones a encontrar microorganismos que induzcan tolerancia a la sequía en las plantas (Lata et al., 2018). Estas investigaciones han podido elucidar mecanismos moleculares de comunicación entre los microorganismos y las plantas (Walters et al., 2018) (C. Chen et al., 2022). En este trabajo, al utilizar un suelo proveniente de una zona climática árida, se trabajó con microbioma adaptado a sequía. Es decir, el microbioma presente en este suelo se puede considerar que se ha ensamblado por efecto de la sequía (Thiergart et al., 2020). Y es, justamente de ambientes áridos, que la mayoría de investigaciones buscan consorcios microbianos candidatos para inducir la tolerancia al sequía (Marasco et al., 2022) (Schmitz et al., 2022) (Wang et al., 2022).

La diversidad alfa es menor en la endosfera radicular debido a que la planta es muy selectiva con las bacterias que permite que ingresen a los tejidos (Marasco et al., 2012). Se observa una mayor diversidad en el suelo sin plantar, menor en la rizósfera y aún menos en la endosfera. El suelo se considera un reservorio de aquellos taxones que la planta pudiese necesitar y mediante comunicación química, la planta permite el enriquecimiento o delección de taxones en la rizosfera y en la endosfera radicular (Ossowicki & Raaijmakers, 2021).

La investigación realizada por Fitzpatrick y colaboradores (Fitzpatrick et al., 2018) reportan cambios fuertemente asociados a la sequía en endósfera radicular y rizósfera. De igual manera los hallazgos de este trabajo coinciden con la investigación por Santos y colaboradores (Santos-Medellín et al., 2021), donde el microbioma se ve impactado por el genotipo de la planta. En este trabajo, también el genotipo de la planta da forma a la comunidad bacteriana. Adicionalmente, se evidencia que el tratamiento de sequía da forma a la comunidad bacteriana

(Figura 8), lo que nos sugiere que a una sequía prolongada la abundancia de los taxones empieza a cambiar, que es lo que concluye Santos-Medellín y colaboradores. Además, se sugiere que a una sequía prolongada los taxones cambian en abundancia (Santos-Medellín et al., 2021) y es lo que se observa en las Tablas 2,3 y 4.

Los filos identificados a los que pertenecen los ASV enriquecidos o reducidos pertenecen a 5 filos: Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Cyanobacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobia. Dentro de cada filo se han reportado varios taxones con capacidad de inducir tolerancia en las plantas, dentro de las Actinobacterias los principales géneros reportados son *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Mycobacterium* y *Rhodococcus* (Yandigeri et al., 2012). De las cuales, se puede encontrar en este trabajo a *Micromonospora* que aumenta en la endósfera de Pepa. Existen también taxones dentro de las Proteobacterias que han sido reportados como inductores de tolerancia a la sequía, como *Beijerinckiaceae* y *Burkholderiaceae* (Yandigeri et al., 2012) que se puede evidenciar su incremento en la endósfera de INIAP-122.

Si bien se conocen mecanismos indirectos que usan las bacterias para ayudar a las plantas a tolerar la sequía (Ngumbi & Kloepper, 2016), los métodos mediante los cuales las bacterias benefician el crecimiento de las plantas durante la sequía son desconocidos. Es posible considerar, que las bacterias presentes en los compartimentos radiculares, doten a las plantas de una cantidad mínima de agua, a través de la producción de agua metabólica, sin embargo, esta ha sido mayormente estudiada en insectos y mamíferos (Cortés et al., 2000) (Padda & Stahlschmidt, 2022).

Dentro de los ASV identificados se encontraron a *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Rugamonas* y *Pseudomonas*, géneros que han sido descrito en la literatura como capaces de ayudar a las plantas a tolerar a la sequía (Blum & Okon, 1988). Sin embargo, no se encontraron enriquecidos o disminuidos. Se puede asociar esto a que se trataba de un microbioma asociado

a la sequía, que al estar en sequía se pueden considerar condiciones “normales” y no tienen la necesidad de incrementar su población (Ye et al., 2022). Los géneros antes mencionados tienen la capacidad de fijar nitrógeno, lo cual es importante para que la planta tenga un desarrollo adecuado (Pérez-Pazos & Sánchez-López, 2017).

Al ser dos variedades de maíz, una comercial mejorada y otra natural, es importante que se identifique si las dos variedades comparten un mismo microbioma. El microbioma central permite conocer aquellos taxones característicos de un ambiente de interés (Neu et al., 2021). El microbioma central que se ha identificado en este trabajo (Anexo 9) no es el mismo que identificó Walters y colaboradores para 27 líneas de maíz, ya que encontraron únicamente 7 taxones, por su parte, en el presente estudio encontramos muchos más (Walters et al., 2018). Con esto, creemos importante considerar que el microbioma central es específico de un ambiente o un organismo bajo determinadas condiciones, no va a ser el mismo si las condiciones cambiasen.

El microbioma tiene la capacidad de adaptarse a cualquier ambiente y condiciones. Es importante seguir con el estudio de microorganismos que estén adaptados a la sequía para lograr descifrar bajo que mecanismos ayudan a las plantas a tolerar la sequía y poder desarrollar planes de fitomejoramiento.

CONCLUSIONES

- El microbioma conservado en el suelo tipo C estimula el crecimiento de las plantas bajo estrés de sequía.
- La respuesta fisiológica de las dos variedades de maíz (Pepa & INIAP-122) indica que existe un efecto de la genética de planta y el microbioma del suelo sobre la tolerancia a la sequía, siendo la variedad INIAP-122 sembradas en un suelo que conserva su microbioma las plantas que más toleran la sequía.
- Si bien en términos de diversidad no hay mayor diferencia, los cambios generados en el microbioma por efecto de la sequía se ven notoriamente los cambios, con enriquecimiento o reducción de la abundancia de taxones bacterianos.
- El suelo tiene la capacidad de conferir cierta tolerancia a la sequía gracias a su riqueza bacteriana, más aún si el suelo posee historial adaptativo a diferentes condiciones.
- La genética de la planta es un factor clave para evidenciar tolerancia a la sequía. Por lo general son las variedades comerciales mejoradas las que tienen características que les permite adaptarse al estrés de sequía, lo que no pasa con las variedades nativas.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El diseño del invernadero donde se llevaron a cabo los ensayos no permitió que se regule la temperatura de su interior en días bastante soleados, ya que el calor también es un factor que modula la respuesta fisiológica de las plantas.

La utilización de variedades sensibles a la sequía hubiese ayudado a contrastar los resultados entre variedades tolerantes y sensibles. Para poder tener un contraste más real.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUAUF, H. W., JALAL, R. S., ASHY, R. A., SHAMI, A., BAEISSA, H. M., BAZ, L., TASHKANDI, M. A., & ABULFARAJ, A. A. (2022). Microbiome structure and response to watering in rhizosphere of *Nitrosalsola vermiculata* and surrounding bulk soil. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 50(1), 12567. <https://doi.org/10.15835/nbha50112567>
- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Nature Precedings*. <https://doi.org/10.1038/npre.2010.4282.1>
- Aroca, R. (2013). Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features. In *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0>
- ASLAM, M. M., OKAL, E. J., IDRIS, A. L., QIAN, Z., XU, W., KARANJA, J. K., WANI, S. H., & YUAN, W. (2022). Rhizosphere microbiomes can regulate plant drought tolerance. *Pedosphere*, 32(1), 61–74. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60061-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60061-9)
- Bacete, L., Schulz, J., Engelsdorf, T., Bartosova, Z., Vaahtera, L., Yan, G., Gerhold, J. M., Ticha, T., Øvstebø, C., Gigli-Bisceglia, N., Johannessen-Starheim, S., Margueritat, J., Kollist, H., Dehoux, T., McAdam, S. A. M., & Hamann, T. (2022). THESEUS1 modulates cell wall stiffness and abscisic acid production in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(1). <https://doi.org/10.1073/pnas.2119258119>
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*, 148(1), 6–24. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120725>
- Berendsen, R. L., Vismans, G., Yu, K., Song, Y., De Jonge, R., Burgman, W. P., Burmølle, M., Herschend, J., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (2018). Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *ISME Journal*, 12(6), 1496–1507. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0093-1>
- Blum, A., & Okon, Y. (1988). Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*sorghum bicolor*) by inoculation with *azospirillum brasilense*. *The Journal of Agricultural Science*, 110(2), 271–277. <https://doi.org/10.1017/S0021859600081296>
- Bruce, W. B., Edmeades, G. O., & Barker, T. C. (2002). Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 13–25. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.13>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Chaimala, A., Jogloy, S., Vorasoot, N., Holbrook, C., Kvien, C. K., & Laohasiriwong, S. (2021). The variation of relative water content, SPAD chlorophyll meter reading, stomatal conductance, leaf area, and specific leaf area of Jerusalem artichoke genotypes under different durations of terminal drought in tropical region. *Journal of Agronomy and Crop Science*. <https://doi.org/10.1111/jac.12561>
- Chen, C., Wang, M., Zhu, J., Tang, Y., Zhang, H., Zhao, Q., Jing, M., Chen, Y., Xu, X., Jiang, J., & Shen, Z. (2022). Long-term effect of epigenetic modification in plant–microbe interactions: modification of DNA methylation induced by plant growth-promoting bacteria mediates promotion process. *Microbiome*, 10(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01236-9>
- Chen, Q., Qu, Z., Ma, G., Wang, W., Dai, J., Zhang, M., Wei, Z., & Liu, Z. (2022). Humic acid modulates growth, photosynthesis, hormone and osmolytes system of maize under drought conditions. *Agricultural Water Management*, 263, 107447.

- <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.107447>
- Claudia E. Moreno, Felipe Barragán, Eduardo Pineda, N. P. P. (2011). Reanalyzing alpha diversity: alternatives to understand and compare information about ecological communities. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82.
- Compart, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Cortés, A., Rosenmann, M., & Bozinovic, F. (2000). Water economy in rodents: evaporative water loss and metabolic water production. *Revista Chilena de Historia Natural*, 73(2). <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2000000200006>
- D'Alò, F., Baldrian, P., Odriozola, I., Morais, D., Větrovský, T., Zucconi, L., Ripa, C., Cannone, N., Malfasi, F., & Onofri, S. (2022). Composition and functioning of the soil microbiome in the highest altitudes of the Italian Alps and potential effects of climate change. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(3). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac025>
- Decagon Devices. (2005). *No Title*. Operator`s Manual. <https://ictinternational.com/content/uploads/2014/03/Porometer-Manual-v.8.pdf>
- Durán, P., Thiergart, T., Garrido-Oter, R., Agler, M., Kemen, E., Schulze-Lefert, P., & Hacquard, S. (2018). Microbial Interkingdom Interactions in Roots Promote Arabidopsis Survival. *Cell*, 175(4), 973-983.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.020>
- Ekundayo, O. Y., Abiodun, B. J., & Kalumba, A. M. (2022). Global quantitative and qualitative assessment of drought research from 1861 to 2019. *International Journal of Disaster Risk Reduction*, 70, 102770. <https://doi.org/10.1016/j.ijdrr.2021.102770>
- 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>
- FAO. (2019). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos. In *El Estado Del Mundo* (Vol. 32, Issue 3).
- Ferrarezi, J. A., Carvalho-Estrada, P. de A., Batista, B. D., Aniceto, R. M., Tschoeke, B. A. P., Andrade, P. A. de M., Lopes, B. de M., Bonatelli, M. L., Odisi, E. J., Azevedo, J. L., & Quecine, M. C. (2022). Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria from the Brazilian Amazon on the bacterial community associated with maize in field. *Applied Soil Ecology*, 170, 104297. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104297>
- Finkel, O. M., Salas-González, I., Castrillo, G., Spaepen, S., Law, T. F., Teixeira, P. J. P. L., Jones, C. D., & Dangl, J. L. (2019). The effects of soil phosphorus content on plant microbiota are driven by the plant phosphate starvation response. In *PLoS Biology* (Vol. 17, Issue 11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000534>
- Fitzpatrick, C. R., Copeland, J., Wang, P. W., Guttman, D. S., Kotanen, P. M., & Johnson, M. T. J. (2018). Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(6), E1157–E1165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717617115>
- Fitzpatrick, C. R., Salas-González, I., Conway, J. M., Finkel, O. M., Gilbert, S., Russ, D., Teixeira, P. J. P. L., & Dangl, J. L. (2020). The Plant Microbiome: From Ecology to Reductionism and beyond. *Annual Review of Microbiology*, 74, 81–100. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-022620-014327>
- Fundación Cimas del Ecuador. (2015). *Actualización Plan de Desarrollo y ordenamiento Territorial (PDyOT) de la parroquia rural de Malchinguí del Cantón Pedro Moncayo, Provincia de Pichincha*.

- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J. M., Garcarrubio, A., & Covarrubias, A. A. (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5668–5674. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5668>
- Ghosh, U. K., Islam, M. N., Siddiqui, M. N., Cao, X., & Khan, M. A. R. (2022). Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. *Plant Biology*, 24(2), 227–239. <https://doi.org/10.1111/plb.13363>
- Graham, L. E., Graham, J. M., Wilcox, L. W., Cook, M. E., Arancibia-Avila, P., & Knack, J. J. (2018). Evolutionary roots of plant microbiomes and biogeochemical impacts of nonvascular autotroph-microbiome systems over deep time. *International Journal of Plant Sciences*, 179(7), 505–522. <https://doi.org/10.1086/698709>
- Grange, G., Finn, J. A., & Brophy, C. (2021). Plant diversity enhanced yield and mitigated drought impacts in intensively managed grassland communities. *Journal of Applied Ecology*, 58(9), 1864–1875. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13894>
- Groot, S. P. C., van Litsenburg, M.-J., Kodde, J., Hall, R. D., de Vos, R. C. H., & Mumm, R. (2022). Analyses of metabolic activity in peanuts under hermetic storage at different relative humidity levels. *Food Chemistry*, 373, 131020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131020>
- Guerrieri, R., Belmecheri, S., Ollinger, S. V., Asbjornsen, H., Jennings, K., Xiao, J., Stocker, B. D., Martin, M., Hollinger, D. Y., Bracho-Garrillo, R., Clark, K., Dore, S., Kolb, T., William Munger, J., Novick, K., & Richardson, A. D. (2019). Disentangling the role of photosynthesis and stomatal conductance on rising forest water-use efficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(34), 16909–16914. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905912116>
- Halverson, L. J., & Firestone, M. K. (2000). Differential effects of permeating and nonpermeating solutes on the fatty acid composition of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2414–2421. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2414-2421.2000>
- Hopkins & Hüner. (2009). *Introduction to plant physiology* (4th ed.).
- Jost, L., Chao, A., & Chazdon, R. L. (2011). Compositional similarity and β (beta) diversity. *Biological Diversity: Frontiers in Measurement and Assessment*, 66–84.
- KILINÇOĞLU, N., CEVHERİ, C. İ., CEVHERİ, C., & NAHYA, H. Y. (2021). Effects of exogenous glycine betaine application on some physiological and biochemical properties of cotton (*G. hirsutum* L.) plants grown in different drought levels. *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*, 689–700. <https://doi.org/10.31015/jaefs.2021.4.30>
- Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K.-H., Lee, J.-H., Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Kocharunchitt, C., King, T., Gobius, K., Bowman, J. P., & Ross, T. (2014). Global genome response of *Escherichia coli* O157:H7 Sakai during dynamic changes in growth kinetics induced by an abrupt downshift in water activity. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090422>
- Koňuchová, M., & Valík, L. (2021). Modelling the Radial Growth of *Geotrichum candidum*: Effects of Temperature and Water Activity. *Microorganisms*, 9(3), 532. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030532>
- Kränzlein, M., Geilfus, C.-M., Franzisky, B. L., Zhang, X., Wimmer, M. A., & Zörb, C. (2021). Physiological Responses of Contrasting Maize (*Zea mays* L.) Hybrids to

- Repeated Drought. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10468-2>
- Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S. K., & White, J. F. (2018). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Letters in Applied Microbiology*, *66*(4), 268–276. <https://doi.org/10.1111/lam.12855>
- Lebre, P. H., De Maayer, P., & Cowan, D. A. (2017). Xerotolerant bacteria: Surviving through a dry spell. *Nature Reviews Microbiology*, *15*(5), 285–296. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.16>
- Leveau, J. H. (2019). A brief from the leaf: latest research to inform our understanding of the phyllosphere microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, *49*, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.002>
- Loon, A. F. Van, Ploum, S. W., Parajka, J., Fleig, A. K., Garnier, E., Laaha, G., & Lanen, H. A. J. Van. (2015). *Hydrological drought types in cold climates : quantitative analysis. January*. <https://doi.org/10.5194/hess-19-1993-2015>
- Lottie Fallas-Cedeño, Michele Holbrook, Oscar Rocha, Nelly Vásquez, M. G.-S. (2010). Phenology, lignotubers, and water relations of *Cochlospermum vitifolium*, a pioneer tropical dry forest tree in Costa Rica. *Biotropica*, *42*(1), 104–111.
- Marasco, R., Fusi, M., Mosqueira, M., Booth, J. M., Rossi, F., Cardinale, M., Michoud, G., Rolli, E., Mugnai, G., Vergani, L., Borin, S., De Philippis, R., Cherif, A., & Daffonchio, D. (2022). Rhizosheath–root system changes exopolysaccharide content but stabilizes bacterial community across contrasting seasons in a desert environment. *Environmental Microbiome*, *17*(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40793-022-00407-3>
- Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., Abou-Hadid, A. F., El-Behairy, U. A., Sorlini, C., Cherif, A., Zocchi, G., & Daffonchio, D. (2012). A Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming. *PLoS ONE*, *7*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048479>
- Mathur, P., & Roy, S. (2021). Insights into the plant responses to drought and decoding the potential of root associated microbiome for inducing drought tolerance. *Physiologia Plantarum*, *172*(2), 1016–1029. <https://doi.org/10.1111/ppl.13338>
- Microtech Services Cia. Ltda. (2019). *Bioestimulantes*.
- Mishra, A. K., & Singh, V. P. (2010). A review of drought concepts. *Journal of Hydrology*, *391*(1–2), 202–216. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2010.07.012>
- Mukarram, M., Choudhary, S., Kurjak, D., Petek, A., & Khan, M. M. A. (2021). Drought: Sensing, signalling, effects and tolerance in higher plants. *Physiologia Plantarum*, *172*(2), 1291–1300. <https://doi.org/10.1111/ppl.13423>
- Mutnuri, S., Vasudevan, N., Kastner, M., & Heipieper, H. J. (2005). Changes in fatty acid composition of *Chromohalobacter israelensis* with varying salt concentrations. *Current Microbiology*, *50*(3), 151–154. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4396-2>
- Neu, A. T., Allen, E. E., & Roy, K. (2021). Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(51). <https://doi.org/10.1073/pnas.2104429118>
- Ngumbi, E., & Kloepper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, *105*(2), 109–125. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.009>
- No, J. H., Nishu, S. Das, Hong, J.-K., Lyou, E. S., Kim, M. S., Wee, G. N., & Lee, T. K. (2022). Raman-Deuterium Isotope Probing and Metagenomics Reveal the Drought Tolerance of the Soil Microbiome and Its Promotion of Plant Growth. *MSystems*, *7*(1). <https://doi.org/10.1128/msystems.01249-21>
- Noein, B., & Soleymani, A. (2022). Corn (*Zea mays* L.) Physiology and Yield Affected by Plant Growth Regulators Under Drought Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*,

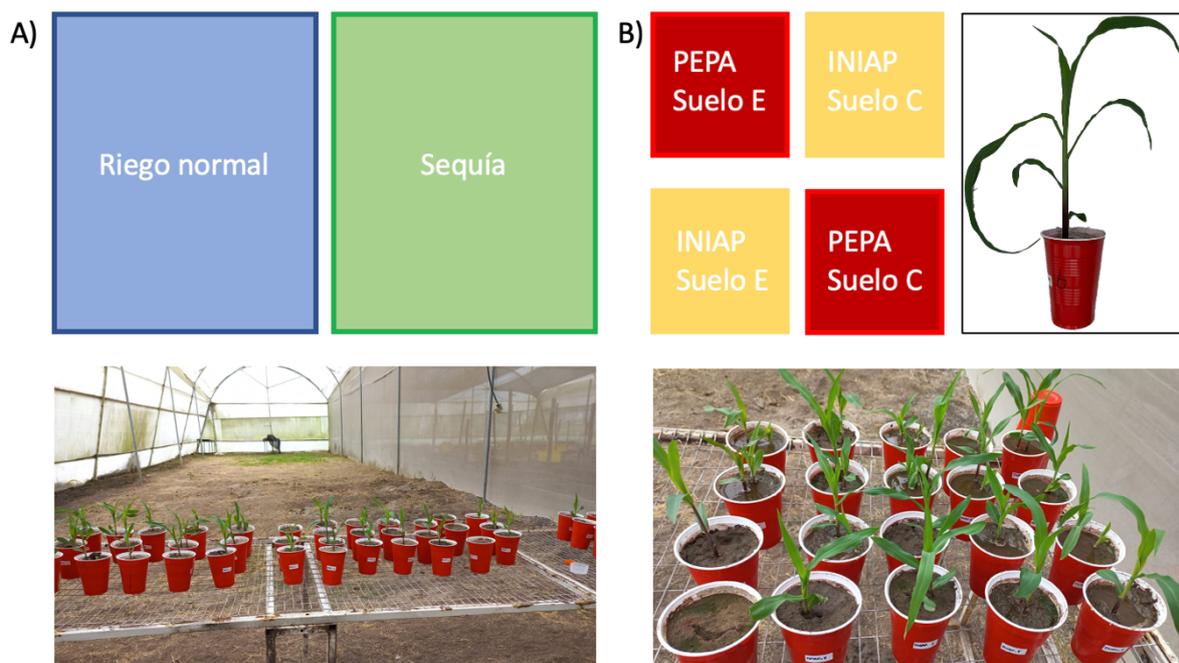
- 41(2), 672–681. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10332-3>
- Oksanen J, Blanchet F G, Kindt R, Legendre P, Minchin P R, O’Hara R B, Simpson G L, Solymos P, Stevens M H H, W. H. (2015). *Vegan: Community Ecology Package*. <https://www.worldagroforestry.org/publication/vegan-community-ecology-package-r-package-vegan-vers-22-1>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2021). *Mundial de la agricultura y la alimentación 2019*.
- Ossowicki, A., & Raaijmakers, J. M. (2021). *Minireview Disentangling soil microbiome functions by perturbation*. 13, 582–590. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12989>
- Padda, S. S., & Stahlschmidt, Z. R. (2022). Evaluating the effects of water and food limitation on the life history of an insect using a multiple-stressor framework. *Oecologia*, 198(2), 519–530. <https://doi.org/10.1007/s00442-022-05115-w>
- Pérez-Pazos, J. V., & Sánchez-López, D. B. (2017). Caracterización y efecto de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* asociadas a *Ipomoea* Batatas del Caribe Colombiano. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 35–46. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.69471>
- Qiagen. (2021). *DNeasy PowerSoil Pro Kit Handbook*.
- Qiagen. (2022). *TissueLyser II User Manual*.
- R Core Team. (2018). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Rebolleda-Gómez, M., Forrester, N. J., Russell, A. L., Wei, N., Fetters, A. M., Stephens, J. D., & Ashman, T. L. (2019). Gazing into the anthosphere: considering how microbes influence floral evolution. *New Phytologist*, 224(3), 1012–1020. <https://doi.org/10.1111/nph.16137>
- Rittershaus, E. S. C., Baek, S. H., & Sasseti, C. M. (2013). The normalcy of dormancy: Common themes in microbial quiescence. *Cell Host and Microbe*, 13(6), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.012>
- Rüger, L., Feng, K., Dumack, K., Freudenthal, J., Chen, Y., Sun, R., Wilson, M., Yu, P., Sun, B., Deng, Y., Hochholdinger, F., Vetterlein, D., & Bonkowski, M. (2021). Assembly Patterns of the Rhizosphere Microbiome Along the Longitudinal Root Axis of Maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in Microbiology*, 12(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.614501>
- Santos-Medellín, C., Liechty, Z., Edwards, J., Nguyen, B., Huang, B., Weimer, B. C., & Sundaresan, V. (2021). Prolonged drought imparts lasting compositional changes to the rice root microbiome. *Nature Plants*, 7(8), 1065–1077. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00967-1>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537–7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Schmitz, L., Yan, Z., Schneijderberg, M., de Rooij, M., Pijnenburg, R., Zheng, Q., Franken, C., Dechesne, A., Trindade, L. M., van Velzen, R., Bisseling, T., Geurts, R., & Cheng, X. (2022). Synthetic bacterial community derived from a desert rhizosphere confers salt stress resilience to tomato in the presence of a soil microbiome. *The ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01238-3>
- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Abdul-Wajid, H. H., & Battaglia, M. L. (2021). Drought Stress Impacts on Plants and Different Approaches to Alleviate Its Adverse Effects. *Plants*, 10(2), 259.

- <https://doi.org/10.3390/plants10020259>
- Shama, P. (2015). Chlorophyll Fluorescence parameters, SPAD chlorophyll and yield in Brassica cultivars. *Journal of Oilseed Brassica*, 1(1), 249–256.
- Singh, R. K., & Prasad, M. (2021). Delineating the epigenetic regulation of heat and drought response in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 0(0), 1–14. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1946004>
- Slade, D., & Radman, M. (2011). Oxidative Stress Resistance in *Deinococcus radiodurans*. In *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (Vol. 75, Issue 1). <https://doi.org/10.1128/mnbr.00015-10>
- Stringlis, I. A., Yu, K., Feussner, K., De Jonge, R., Van Bentum, S., Van Verk, M. C., Berendsen, R. L., Bakker, P. A. H. M., Feussner, I., & Pieterse, C. M. J. (2018). MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(22), E5213–E5222. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722335115>
- Thiergart, T., Durán, P., Ellis, T., Vannier, N., Garrido-Oter, R., Kemen, E., Roux, F., Alonso-Blanco, C., Ågren, J., Schulze-Lefert, P., & Hacquard, S. (2020). Root microbiota assembly and adaptive differentiation among European Arabidopsis populations. *Nature Ecology and Evolution*, 4(1), 122–131. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1063-3>
- Tongerlo, E., Trouwborst, G., Hogewoning, S. W., Ieperen, W., Dieleman, J. A., & Marcelis, L. F. M. (2021). Crassulacean acid metabolism species differ in the contribution of C 3 and C 4 carboxylation to end of day CO 2 fixation. *Physiologia Plantarum*, 172(1), 134–145. <https://doi.org/10.1111/ppl.13312>
- Trivedi, P., Batista, B. D., Bazany, K. E., & Singh, B. K. (2022). Plant–microbiome interactions under a changing world: responses, consequences and perspectives. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.18016>
- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Walters, W. A., Jin, Z., Youngblut, N., Wallace, J. G., Sutter, J., Zhang, W., González-Peña, A., Peiffer, J., Koren, O., Shi, Q., Knight, R., Del Rio, T. G., Tringe, S. G., Buckler, E. S., Dangl, J. L., & Ley, R. E. (2018). Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(28), 7368–7373. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800918115>
- Wang, Z., Jiang, S., Struik, P. C., Wang, H., Jin, K., Wu, R., Na, R., Mu, H., & Ta, N. (2022). Plant and soil responses to grazing intensity drive changes in the soil microbiome in a desert steppe. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05409-1>
- Wickham, H. (2011). ggplot2. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 3(2), 180–185. <https://doi.org/10.1002/wics.147>
- William Hopkins; Norman Hüner. (2009). *Stomata respond to water deficit* (4th ed.).
- Yadav, R., Ror, P., Beniwal, R., Kumar, S., & Ramakrishna, W. (2022). Bacillus sp. and arbuscular mycorrhizal fungi consortia enhance wheat nutrient and yield in the second-year field trial: Superior performance in comparison with chemical fertilizers. *Journal of Applied Microbiology*, 132(3), 2203–2219. <https://doi.org/10.1111/jam.15371>
- Yandigeri, M. S., Meena, K. K., Singh, D., Malviya, N., Singh, D. P., Solanki, M. K., Yadav, A. K., & Arora, D. K. (2012). Drought-tolerant endophytic actinobacteria promote growth of wheat (*Triticum aestivum*) under water stress conditions. *Plant Growth Regulation*, 68(3), 411–420. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9730-2>

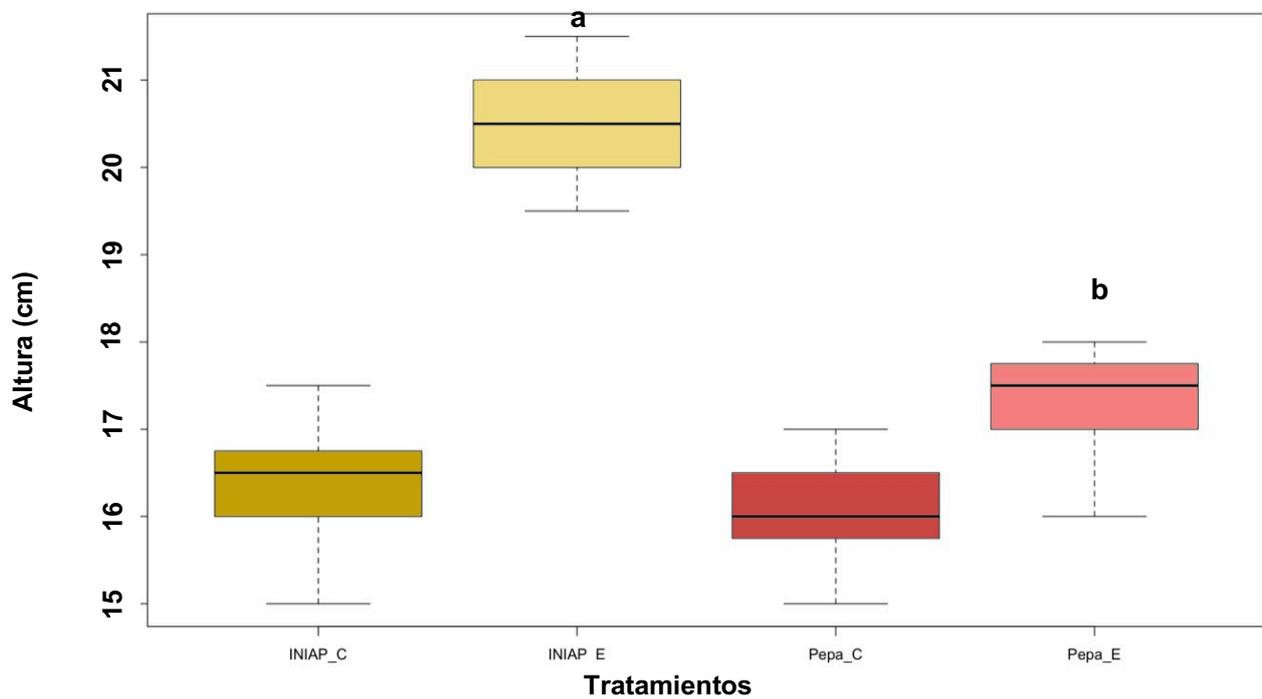
- Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae*, 7(3).
<https://doi.org/10.3390/horticulturae7030050>
- Ye, L., Wu, X., Wu, C., Zhang, Y., Meng, L., Bao, E., & Cao, K. (2022). Response of soil bacterial community to agricultural reclamation in the Tengger desert, northwestern China. *Applied Soil Ecology*, 169, 104189. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104189>
- Zhang, Z., Jatana, B. S., Campbell, B., Gill, J., Suseela, V., & Tharayil, N. (2022). Cross inoculation of rhizobiome from a congeneric ruderal plant imparts drought tolerance in maize (*Zea mays*) through changes in root morphology and proteome. *The Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/tpj.15775>

ANEXOS

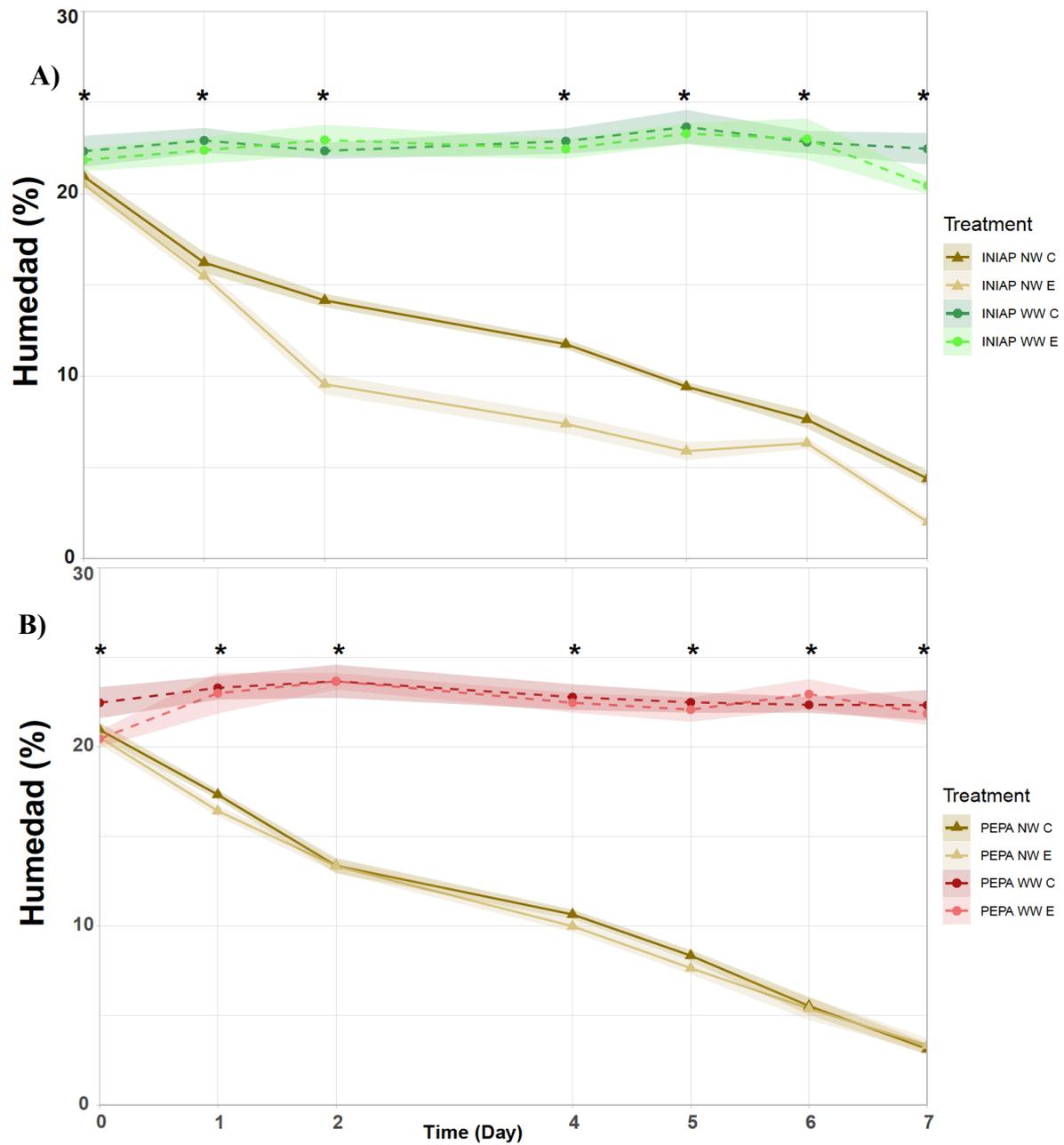
ANEXO 1. Diseño de parcelas divididas con subparcelas factoriales en las que el régimen de riego se asignó a las parcelas principales (A) y las variedades de maíz (Pepa e INIAP-122) y tipo de suelo (estéril y normal) a las subparcelas (B).



ANEXO 2. Altura de las plantas de dos variedades de maíz: Pepa (rojo) e INIAP (amarillo) 4 semanas después de la siembra en suelo estéril (_E) y en suelo que conserva su microbioma (_C). Medición previa a la inducción a sequía. Se encontraron diferencias significativas entre variedades sembradas en el suelo E. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (Tukey's HSD $p < 0.05$).



ANEXO 3. Humedad del suelo durante los 7 días de sequía para la variedad A) INIAP y B) PEPA. *Diferencia significativa (ANOVA; $p < 0,05$).



ANEXO 4. Prueba Post-hoc Tukey HSD para cada punto de tiempo de Conductancia estomática de la variedad INIAP-122.

Time point 0							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	1890	630	1.81	0.171	
2	Residuals	26	9074	349	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_WW_C	189	7.63	26	173	204	a
	I_NW_C	179	6.23	26	166	192	a
	I_NW_E	169	6.23	26	156	182	a
	I_WW_E	168	7.63	26	152	184	a
Time point 1							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	3293	1098	2.79	0.0607	
2	Residuals	26	10242	394	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_WW_C	170	8.1	26	153	186	a
	I_NW_C	168	6.62	26	154	181	a
	I_WW_E	163	8.1	26	146	179	ab
	I_NW_E	145	6.62	26	131	158	b
Time point 2							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	38270	12757	6.29	0.00236	
2	Residuals	26	52736	2028	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_WW_C	193	18.4	26	154.8	230	a
	I_WW_E	180	18.4	26	141.7	217	a
	I_NW_C	165	15	26	134.6	196	a
	I_NW_E	102	15	26	71.3	133	b
Time point 4							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	101894	33965	26.8	4.07E-08	
2	Residuals	26	32948	1267	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_WW_C	198.7	14.5	26	168.8	228.6	a
	I_WW_E	184	14.5	26	154.1	213.8	a
	I_NW_C	123.7	11.9	26	99.3	148.1	b
	I_NW_E	51.3	11.9	26	26.9	75.7	c
Time point 5							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	83605	27868	27	3.78E-08	
2	Residuals	26	26831	1032	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_WW_E	174.8	13.1	26	147.9	201.8	a
	I_WW_C	174.8	13.1	26	147.8	201.8	a
	I_NW_C	116.7	10.7	26	94.7	138.7	b
	I_NW_E	47.4	10.7	26	25.4	69.4	c
Time point 6							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	103995	34665	72.2	9.71E-13	
2	Residuals	26	12476	480	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_WW_E	176.8	8.94	26	158.4	195.1	a
	I_WW_C	173.3	8.94	26	155	191.7	a
	I_NW_C	83.9	7.3	26	68.9	98.9	b
	I_NW_E	37.4	7.3	26	22.4	52.4	c
Time point 7							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	185435	61812	1454	4.64E-29	
2	Residuals	26	1105	42.5	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_WW_E	189.5	2.66	26	184	195	a
	I_WW_C	177.9	2.66	26	172.4	183.4	b
	I_NW_C	28.1	2.17	26	23.6	32.6	c
	I_NW_E	19	2.17	26	14.5	23.5	d

fidence level used 0.95
 ificance leve used alpha 0.05

**ANEXO 5. Prueba Post-hoc Tukey HSD para cada punto de tiempo de Conductancia
estomática de la variedad PEPA.**

Time point 0							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	2288	763	2.21	0.111	
2	Residuals	26	8960	345	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_WW_C	187	7.58	26	171	202	a
	P_WW_E	177	7.58	26	162	193	ab
	P_NW_E	177	6.19	26	164	189	ab
	P_NW_C	163	6.19	26	150	175	b
Time point 01							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	8245	2748	5.04	0.00693	
2	Residuals	26	14178	545	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_WW_E	188	9.53	26	168	207	a
	P_WW_C	173	9.53	26	154	193	ab
	P_NW_E	160	7.78	26	144	176	bc
	P_NW_C	142	7.78	26	126	158	c
Time point 2							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	33740	11247	21.4	3.46E-07	
2	Residuals	26	13694	527	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_WW_C	186	9.37	26	167	205	a
	P_WW_E	182	9.37	26	163	201	a
	P_NW_C	125	7.65	26	109	140	b
	P_NW_E	109	7.65	26	93	124	b
Time point 4							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	232819	77606	56.8	1.51E-11	
2	Residuals	26	35542	1367	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_WW_C	296.8	15.1	26	265.7	327.8	a
	P_WW_E	207	15.1	26	176	238.1	b
	P_NW_C	124.5	12.3	26	99.2	149.9	c
	P_NW_E	56.3	12.3	26	31	81.6	d
Time point 5							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	82315	27438	16.1	0.000004	
2	Residuals	26	44242	1702	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_WW_C	188.5	16.8	26	153.9	223.1	a
	P_WW_E	182.7	16.8	26	148	217.3	a
	P_NW_C	132.6	13.8	26	104.3	160.8	b
	P_NW_E	59.2	13.8	26	30.9	87.4	c
Time point 6							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	171715	57238	459	1.27E-22	
2	Residuals	26	3244	125	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_WW_C	190.2	4.56	26	180.8	199.5	a
	P_WW_E	189.3	4.56	26	179.9	198.7	a
	P_NW_E	36.2	3.72	26	28.5	43.8	b
	P_NW_C	34.4	3.72	26	26.8	42.1	b
Time point 7							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	185216	61739	1510	2.84E-29	
2	Residuals	26	1063	40.9	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_WW_E	183.6	2.61	26	178.2	188.9	a
	P_WW_C	182	2.61	26	176.6	187.4	a
	P_NW_E	23.2	2.13	26	18.8	27.6	b
	P_NW_C	21.6	2.13	26	17.3	26	b

Confidence level used 0.95
significance level used alpha 0.05

ANEXO 6. Prueba Post-hoc Tukey HSD para cada punto de tiempo de Fluorescencia de la clorofila de la variedad PEPA.

Time point 0							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.000185	0.0000616	2.26	0.105	
2	Residuals	26	0.000709	0.0000273	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_WW_E	0.7895	0.002131	26	0.7851	0.7939	a
	P_WW_C	0.7893	0.002131	26	0.785	0.7937	a
	P_NW_E	0.7858	0.00174	26	0.7822	0.7894	ab
	P_NW_C	0.7836	0.00174	26	0.78	0.7871	b
Time point 1							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.00448	0.00149	1.87	0.16	
2	Residuals	26	0.0208	0.0008	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_WW_C	0.81	0.01155	26	0.786	0.834	a
	P_WW_E	0.788	0.01155	26	0.764	0.811	ab
	P_NW_E	0.781	0.00943	26	0.762	0.801	ab
	P_NW_C	0.776	0.00943	26	0.757	0.796	b
Time point 2							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.00173	0.000578	11.7	0.0000496	
2	Residuals	26	0.00129	0.0000495	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_NW_E	0.793	0.00234	26	0.788	0.797	a
	P_WW_C	0.788	0.00287	26	0.782	0.794	a
	P_WW_E	0.787	0.00287	26	0.781	0.793	a
	P_NW_C	0.774	0.00234	26	0.769	0.778	b
Time point 4							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.0278	0.00927	11.4	0.0000579	
2	Residuals	26	0.0211	0.000811	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_WW_C	0.79	0.01163	26	0.766	0.814	a
	P_WW_E	0.786	0.01163	26	0.762	0.81	a
	P_NW_C	0.765	0.00949	26	0.745	0.784	a
	P_NW_E	0.715	0.00949	26	0.696	0.735	b
Time point 5							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.00825	0.00275	6.86	0.00148	
2	Residuals	26	0.0104	0.000401	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_WW_C	0.794	0.00817	26	0.777	0.811	a
	P_WW_E	0.792	0.00817	26	0.776	0.809	a
	P_NW_C	0.775	0.00667	26	0.762	0.789	a
	P_NW_E	0.753	0.00667	26	0.74	0.767	b
Time point 6							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.00249	0.000831	1.62	0.208	
2	Residuals	26	0.0133	0.000512	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_WW_E	0.79	0.00924	26	0.771	0.809	a
	P_WW_C	0.786	0.00924	26	0.767	0.805	a
	P_NW_C	0.773	0.00754	26	0.758	0.789	a
	P_NW_E	0.768	0.00754	26	0.752	0.783	a
Time point 7							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.0272	0.00907	27.5	3.21E-08	
2	Residuals	26	0.00859	0.00033	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	P_WW_E	0.794	0.00742	26	0.779	0.81	a
	P_WW_C	0.794	0.00742	26	0.779	0.809	a
	P_NW_C	0.746	0.00606	26	0.733	0.758	b
	P_NW_E	0.725	0.00606	26	0.712	0.737	c

Confidence level used: 0.95
 Significance level used: alpha 0.05

ANEXO 7. Prueba Post-hoc Tukey HSD para cada punto de tiempo de Fluorescencia de la clorofila de la variedad INIAP.

Time point 0							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.00028	0.0000933	1.93	0.15	
2	Residuals	26	0.00126	0.0000485	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_WW_C	0.793	0.00284	26	0.787	0.799	a
	I_NW_E	0.792	0.00232	26	0.787	0.796	a
	I_NW_C	0.787	0.00232	26	0.782	0.791	a
	I_WW_E	0.786	0.00284	26	0.78	0.792	a
Time point 1							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.000254	0.0000846	0.791	0.51	
2	Residuals	26	0.00278	0.000107	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_NW_C	0.787	0.00345	26	0.78	0.794	a
	I_WW_E	0.786	0.00422	26	0.777	0.795	a
	I_NW_E	0.783	0.00345	26	0.776	0.79	a
	I_WW_C	0.779	0.00422	26	0.771	0.788	a
Time point 2							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.000905	0.000302	2.28	0.102	
2	Residuals	26	0.00343	0.000132	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_WW_C	0.795	0.00469	26	0.785	0.805	a
	I_WW_E	0.789	0.00469	26	0.779	0.798	ab
	I_NW_E	0.784	0.00383	26	0.776	0.792	ab
	I_NW_C	0.78	0.00383	26	0.772	0.788	b
Time point 4							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.00501	0.00167	2.89	0.0545	
2	Residuals	26	0.015	0.000578	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_WW_C	0.792	0.00981	26	0.771	0.812	a
	I_WW_E	0.787	0.00981	26	0.767	0.807	a
	I_NW_C	0.773	0.00801	26	0.756	0.789	ab
	I_NW_E	0.759	0.00801	26	0.742	0.775	b
Time point 5							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.0021	0.000701	2.2	0.112	
2	Residuals	26	0.00827	0.000318	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_WW_C	0.793	0.00728	26	0.778	0.808	a
	I_WW_E	0.79	0.00728	26	0.775	0.805	ab
	I_NW_C	0.78	0.00594	26	0.768	0.793	ab
	I_NW_E	0.772	0.00594	26	0.76	0.784	b
Time point 6							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.00161	0.000538	3.79	0.0222	
2	Residuals	26	0.00369	0.000142	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_WW_C	0.796	0.00486	26	0.786	0.806	a
	I_WW_E	0.794	0.00486	26	0.784	0.804	a
	I_NW_C	0.784	0.00397	26	0.776	0.792	ab
	I_NW_E	0.777	0.00397	26	0.769	0.785	b
Time point 7							
#	A	tibble:	2	x	6		
	term	df	sumsq	meansq	statistic	p.value	
	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	
1	Treatment	3	0.0105	0.0035	7.86	0.000681	
2	Residuals	26	0.0116	0.000446	NA	NA	
	Treatment	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
	I_WW_E	0.795	0.00862	26	0.777	0.812	a
	I_WW_C	0.792	0.00862	26	0.775	0.81	a
	I_NW_C	0.773	0.00704	26	0.759	0.788	a
	I_NW_E	0.748	0.00704	26	0.734	0.763	b

Confidence level used 0.95
significance level used alpha 0.05