

Ácidos húmicos inducen crecimiento y protección contra el estrés hídrico en maíces nativos de México

Humic acids induce growth and protection against water stress in native maize of Mexico

Reinier Hernández-Campos^{1*}, Celerino Robles¹, Andrés Calderín-García², Ernesto Castañeda-Hidalgo³, Sahylin Muñiz-Becerá⁴, Sandra Perez-Alvares⁵

¹Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Oaxaca, Laboratorio de Suelos. Hornos 1003, Col. Noche Buena, CP. 71230. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México.

²Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro, Departamento de Suelos, Laboratorio de Química y Biología del Suelo. Autopista BR-465 km 7. Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

³Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, Tecnológico Nacional de México Dirección oficial: Ex-Hacienda de Nazareno, CP. 71230. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México.

⁴Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Escolar, Ingeniería S/N, C.U., Coyoacán, CP. 04510. Ciudad de México, México.

⁵Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, Universidad Autónoma de Chihuahua. Carretera Delicias-Rosales, Km 2.5, Campus Delicias, CP. 33000. Delicias, Chihuahua, México.

*Autor de correspondencia: reinierhc86@hotmail.com

Artículo científico

Recibido: 15 de noviembre 2023

Aceptado: 07 de febrero 2024

RESUMEN. En condiciones controladas, la aplicación de sustancias húmicas (SH) favorece el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Pero la evidencia científica en condiciones de campo abierto con y sin riego, está escasamente documentada. El objetivo fue caracterizar los ácidos húmicos (AH) extraídos de vermicompost de residuos sólidos urbanos empleando técnicas químicas y espectroscópicas, y evaluar el efecto de su aplicación vía radical en la etapa reproductiva, con riego y déficit hídrico inducido, en tres selecciones de maíz (*Zea mays* L.) de tres regiones del estado de Oaxaca, México. Las selecciones regionales de maíz empleadas se identificaron como Cajete (Caj), Zapalote (Zap) y Cuilapam (Cuil). Se ensayaron tres concentraciones de AH: 140, 150 y 160 mg L⁻¹, se incluyó un tratamiento control, sin aplicación. El producto se aplicó por aspersión vía radical, antes, durante y después de la etapa de floración de las plantas de maíz. Los AH promovieron mayor altura de la planta, diámetro del tallo, producción de biomasa radical y aérea, en presencia de riego y con déficit hídrico inducido. El contenido relativo de agua y de prolina también fue estimulado, así como el contenido de clorofilas a, b y a+b. Los efectos negativos causados por un estrés hídrico inducido fueron atenuados por la aplicación de los AH. Los AH procedentes de vermicompost de residuos sólidos urbanos estimularon los parámetros de crecimiento en la fase reproductiva e indujeron protección anti estrés cuando se limitó el uso del riego.

Palabras clave: Déficit hídrico, etapa reproductiva, sustancias húmicas, *Zea mays*.

ABSTRACT. Under controlled conditions, it has been shown that the application of humic substances (HS) favors the growth and development of plants. But, scientific evidence in open field conditions with and without irrigation has been poorly documented. The objective was to characterize the humic acids (HA) extracted from vermicompost of urban solid waste using chemical and spectroscopic techniques, and to evaluate the effect of its root application on the reproductive stage, with continuous irrigation and with induced water deficit, in three selections of maize (*Zea mays* L.) from three regions of the state of Oaxaca, Mexico, grown under field conditions. The regional corn selections used were identified as Cajete (Caj), Zapalote (Zap) and Cuilapam (Cuil). Three concentrations of HA were tested: 140, 150 and 160 mg L⁻¹, a control treatment was included, without application. The product was applied by radical spraying, before, during and after the flowering stage of the corn plants. The HA promoted higher values in plant height, stem diameter, and production of root and shoot biomass, in the presence of irrigation and with induced water deficit. The relative content of water and proline were also stimulated, as well as the content of chlorophylls a, b, and a+b. The negative effects caused by an induced water stress were attenuated by the application of HA. HA from municipal solid waste vermicompost stimulated growth parameters in the reproductive phase and induced stress protection when irrigation use was limited.

Keywords: Water stress, reproductive stage, humic substances, *Zea mays*.

Como citar: Hernández-Campos R, Robles C, Calderín-García A, Castañeda-Hidalgo E, Muñiz-Becerá S, Perez-Alvares S (2024) Ácidos húmicos inducen crecimiento y protección contra el estrés hídrico en maíces nativos de México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 11(1): e3947. DOI: 10.19136/era.a11n1.3947.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales de mayor consumo y producción a nivel mundial (Yadav *et al.* 2023). En México, en el ciclo agrícola 2018, se sembraron 1 787 116 ha de maíz bajo riego, con rendimiento promedio de 9.3 t ha⁻¹; bajo condiciones de temporal en campo abierto sembraron 6 155 570 ha, con rendimiento promedio de 2.0 t ha⁻¹, siendo el estrés hídrico uno de los principales factores que lo afectaron (SIAP 2021). La afectación del rendimiento ante el estrés hídrico depende del momento en que ocurre y de la intensidad (Sah *et al.* 2020).

Entre las situaciones desfavorables que perturban el desarrollo de las plantas y su producción, están el cambio climático y los estreses abióticos. Estos últimos son los responsables de la mayor pérdida de cosechas a nivel mundial, incidiendo de forma negativa en el rendimiento y las funciones vitales de alrededor del 50% de los cultivos agrícolas (Kim y Lee 2023). Para atenuar los efectos del estrés hídrico en los rendimientos de los cultivos de ciclo corto en condiciones de campo abierto, en los últimos años se ha incrementado el uso de fertilizantes orgánicos (compost, vermicompost, estiércoles, residuos agrícolas y agroindustriales, abonos verdes y sustancias húmicas), al ser considerados una alternativa amigable con el medio ambiente y con grandes beneficios para el desarrollo de los procesos fisiológicos de la planta. Los biomejoradores utilizados en la agricultura son de tres tipos, mejoradores orgánicos, inoculantes microbianos y bioestimulantes. Entre estos últimos están el quitosano, los aminoácidos, los extractos de algas marinas y las sustancias húmicas (SH) (Abbott *et al.* 2018).

Algunos autores han relacionado la actividad biológica de las SH con su estructura a pesar de ser extraídas de diferentes fuentes (Wang *et al.* 2023). Sin embargo, la comprensión de la disposición estructural presente en las SH, relacionada con las funciones en las plantas, aún está en debate, justificándose su marcada actividad biológica sobre las plantas con la presencia de dominios aromáticos, alifáticos que presentan O-, y de grupos funcionales que contienen N y S (De Hita *et al.* 2019). La aplicación de ácidos húmicos (AH) en la agricultura a campo abierto y a pequeña escala pudiera ayudar a disminuir el uso de productos de síntesis química y evitar la reducción de los rendimientos (De Hita *et al.* 2019). Estos pueden ser empleados como bioestimulantes en la agricultura, al ser macromoléculas orgánicas que incrementan la capacidad productiva de los cultivos, con énfasis en los procesos relacionados con la disponibilidad y absorción de nutrientes (Eyheraguibel *et al.* 2008). Los AH también tienen la capacidad de incrementar la tolerancia por parte de las plantas a los diferentes tipos de estreses abióticos (Muscolo *et al.* 2020, Tiwari *et al.* 2023).

La aplicación foliar y radical de AH como bioestimulantes naturales procedentes de compost y vermicompost es de gran interés por parte de la comunidad científica, al ser una técnica capaz de mejorar la sostenibilidad ecológica de la producción de cultivos; a través de la restauración de las poblaciones microbianas efectivas en suelo e introducir periódicamente fertilizantes orgánicos; reduciendo así la dependencia de los productos sintéticos en la agricultura (Johnson *et al.* 2023). Por lo anterior, esta investigación tiene como objetivo caracterizar los ácidos húmicos (AH) extraídos de vermicompost de residuos sólidos urbanos empleando técnicas químicas y espectroscópicas, y evaluar el efecto de la aplicación radical de AH extraídos de vermicompost de residuos sólidos urbanos (RSU) en la etapa reproductiva de maíces nativos en presencia de estrés hídrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y purificación de ácidos húmicos a partir de vermicompost de RSU

Los AH se obtuvieron a partir de vermicompost de residuos sólidos urbanos (residuos vegetales de cocina y materiales de poda de jardinería); los cuales fueron sometidos a un proceso de vermicompostaje (Ali *et al.* 2015); obteniéndose las siguientes características (pH: 9.8, conductividad eléctrica: 5 460 $\mu\text{S cm}^{-1}$, materia orgánica total: 65.2%). La metodología empleada para extraer los AH fue la propuesta por la sociedad internacional de sustancias húmicas (IHSS) y de acuerdo con (Swift 1996).

Caracterización composicional y estructural de los ácidos húmicos extraídos

La determinación de la composición elemental (CHN) se realizó utilizando un equipo LECO TruSpec® CHN (St. Joseph MI, USA). Las relaciones atómicas fueron calculadas de acuerdo con las siguientes fórmulas: $H/C = \frac{(\%H/1)}{(\%C/12)}$; $O/C = \frac{(\%O/16)}{(\%C/12)}$; $C/N = \frac{(\%C/12)}{(\%N/14)}$

Caracterización de AH mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FTIR).

Los espectros fueron obtenidos utilizando un espectrómetro VERTEX 70/70v FTIR (Bruker Corporation, Alemania) con un dispositivo acoplado de reflexión total atenuada (ATR) de diamante y platino. Se registraron las bandas de absorción en la región de 400.00 a 4 000.00 cm^{-1} , a resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros se registraron y analizaron con el software OPUS-Bruker versión 8.5.

Caracterización de AH mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de giro de ángulo mágico de polarización cruzada de carbono 13 (13C NMR CP/MAS)

Se realizó un análisis de ^{13}C NMR CP/MAS en el Centro Analítico del Programa de Posgrado en Química de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro PPGQ/UFRRJ, usando un instrumento Bruker AVANCE II NMR de 400 MHz (Bruker Corporation, Germany), equipado con una sonda MAS de 4 mm y operando en una de resonancia ^{13}C de 100 a 163 MHz (García *et al.* 2019). Las muestras de AH se colocaron en un rotor (soporte de muestra) de dióxido de circonio (ZrO_2) con tapas Kel-F a una frecuencia de rotación de 8 kHz. El tiempo de contacto para la secuencia de rampa 1H fue de 2 ms. La recopilación y el procesamiento espectrales se realizaron con el software Bruker Topspin 2.1. Los espectros se analizaron con el software ACD/Labs v.12.01 (Freeware Academic Edition). Para la asignación de picos y el cálculo de la cantidad relativa de los tipos de carbono, las regiones del espectro se integraron sobre el área total.

Evaluación de los efectos de la aplicación de ácidos húmicos de vermicompost de RSU en selecciones de maíz nativo en etapa reproductiva

El estudio se realizó de noviembre de 2018 a abril de 2019 en una parcela experimental en campo abierto del CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca, en Santa Cruz Xoxocotlán (Oaxaca, México). El pH del suelo fue neutro (6.88), la conductividad baja (0.20 dS m^{-1}), contenido de materia orgánica del 0.4%, bajo en fósforo extraíble y textura franco-arenosa.

Las semillas empleadas provinieron de selecciones masales realizadas por pequeños agricultores de tres regiones con problemas constantes de sequía en el estado de Oaxaca: Mixteca (Cajete-Caj), Istmo (Zapalote-Zap) y Valles Centrales (Cuilapam-Cuil); pertenecientes a las razas “Bolita” y “Zapalote”; plantas de porte bajo, precoces, mazorcas y semillas pequeñas y mediana tolerancia a la sequía (Kato *et al.* 2009); con ciclos medios de 120 días.

Previo a la siembra, las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 min. La siembra se realizó al final del mes de noviembre de 2018. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con distribución trifactorial 2x3x4, con cuatro réplicas. La distancia entre surcos fue de 0.80 m y entre plantas de 0.20 m, para una densidad de siembra de 50 000 plantas por hectárea. El primer factor fue la condición hídrica, se aplicó con dos niveles: con riego (R) y déficit hídrico (DH). Se realizó un riego para la emergencia de las plántulas en toda la parcela, a los 15 días después de la siembra se tuvo un 85% de plántulas. A partir de ese momento, se aplicó riego a toda la parcela con una frecuencia de tres veces por semana durante 49 días, con una lámina de riego de 42 cm; fraccionada en 21 aplicaciones de 2 cm cada una. A los tratamientos con estrés hídrico se les suspendió el riego por 32 días (día 49 hasta día 81), después de los cuales se reanudó el riego con la misma frecuencia inicial. Los tratamientos sin estrés hídrico continuaron recibiendo riego con la misma frecuencia inicial, hasta el final del experimento. Para el factor concentraciones de AH se usaron cuatro niveles (T1 – 0, T2 – 140, T3 – 150, T4 – 160 mg L⁻¹). La aplicación a la zona radical se hizo en solución acuosa, disolviendo la cantidad de cada dosis en un volumen de agua equivalente a 450 L ha⁻¹; se realizaron 13 aplicaciones en 26 días, cada dos días, ocho días antes de la floración, 10 días durante la floración y ocho días después de la floración. El tercer factor fueron las selecciones de maíz, con tres niveles, correspondientes a selecciones Cajete (Caj), Zapalote (Zap) y Cuilapam (Cuil). Los 24 tratamientos se replicaron en cuatro ocasiones para un total de 96 unidades experimentales. Cada unidad experimental consistió de tres surcos de 5 m de longitud, con 25 plantas por surco.

Las variables evaluadas fueron altura de la planta (Ap); diámetro basal del tallo (Dt); biomasa seca en parte aérea y radical (MSa y MSr); contenido relativo de agua (CRH, %), contenido de prolina (C-Prl) y contenido de clorofila a (Clor-a), clorofila b (Clor-b) y clorofilas totales (Clor a+b) (Hiscox y Israelstam 1979).

Tratamiento estadístico de datos

A los datos se les verificó el comportamiento normal y la homogeneidad de varianzas. Una vez cumplidos, se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, de acuerdo al diseño experimental empleado; se utilizó el software SAS (Statistical Analysis System, Versión 9.0). Cuando existieron diferencias significativas se realizó la separación de medias con la prueba DSH de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS

Características químicas y físicas de los ácidos húmicos

La caracterización química de los AH obtenidos permitió conocer los elementos predominantes en la estructura, además de las relaciones atómicas y propiedades químicas y

físicas. Los AH están compuestos en su mayoría por carbono (50.10%), hidrógeno (3.05%), nitrógeno (3.14%) y oxígeno (43.71%). La relación H/C (0.73) muestra un valor menor que la unidad, lo que indica una elevada presencia de estructuras aromáticas condensadas, reafirmado también por la elevada relación C/N (19.94). Aunque la relación O/C (0.65) no fue superior a la unidad, el grado de oxidación (w) 1.65 fue ligeramente elevado, lo que puede ser justificado por la presencia de compuestos aromáticos oxigenados como polifenoles o quinonas. El parámetro volumen (v) 0.60 resultó ligeramente bajo y, contrariamente, la densidad (d) 1.62 mostró valores superiores a la unidad. Estos resultados justifican una estructura con características aromáticas predominantes y un grado de condensación elevado. La relación E4/E6 (4.18) mostró un valor característico de AH inferior a cinco, lo que justifica el grado de condensación estructural descrito anteriormente.

Características estructurales de los ácidos húmicos

La Figura 1 muestra los espectros ATR-FTIR y ^{13}C NMR CP/MAS de los AH obtenidos de vermicompost de RSU. El espectro de la Figura 1A mostró una amplia banda de absorción a $3\,437.04\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a las vibraciones de estiramiento de -OH y -NH (carboxilo, alcoholes, fenoles, aminas y amidas). Las bandas presentes en $2\,920.14$ y $2\,850.07\text{ cm}^{-1}$ corresponden a tramos alifáticos asimétricos y simétricos de CH_2 y CH_3 . La banda de $1\,645.23\text{ cm}^{-1}$ se atribuye a vibraciones de estiramiento $\text{C}=\text{C}$ de fragmentos aromáticos y $\text{C}=\text{O}$ de amidas, cetonas y quinonas. A $1\,514.07\text{ cm}^{-1}$ aparecen las bandas correspondientes a tramos $\text{C}=\text{C}$ (estructuras aromáticas, lignina). El espectro mostró bandas en $1\,462.00\text{ cm}^{-1}$ pertenecientes a tramos asimétricos de CH_2 y tramos simétricos de COO^- (carboxilatos). La banda de $1\,224.76\text{ cm}^{-1}$ se puede atribuir a tramos $\text{C}-\text{O}$ (ésteres de arilo y fenoles) y $\text{C}=\text{O}$ (ésteres de arilo). A $1\,037.67\text{ cm}^{-1}$, la banda del espectro corresponde al tramo $\text{C}-\text{O}$ (carbohidratos y polisacáridos).

Las muestras del espectro ^{13}C NMR CP/MAS (Figura 1B) de AH de vermicompost, presentan picos correspondientes a cada tipo de carbono en la estructura. El espectro mostró la presencia de picos intensos entre 0-45 ppm que pueden atribuirse a carbonos del tipo $^*\text{CH}_3\text{-R}$, $\text{R}^*\text{CH}_2\text{-R}'$, $\text{R}-\text{CH}-\text{R}'$, correspondientes a lípidos, aminoácidos y/o estructuras proteicas, cadenas carbonadas de lignina, cutinas y suberinas. Los picos presentes entre 45-60 ppm indican la presencia de carbonos metoxilados ($\text{RO}-^*\text{CH}_3$), polipeptídicos ($\text{CA}(\text{alkyl}-\text{O},\text{N})$), y de carbonos alfa ($-\text{CO}-^*\text{CHR}-\text{NH}$) pertenecientes a los aminoácidos. Los picos a 60-90 ppm corresponden a carbonos $\text{CA}(\text{alkyl}-\text{O})$ del tipo $^*\text{C}-\text{OH}$ y de la naturaleza química de la celulosa/hemicelulosa y la lignina. Los picos entre 90-110 ppm indican la presencia de carbonos anoméricos de carbohidratos ($\text{CA}(\text{alkyl}-\text{di}-\text{O})$) y carbonos C_2 de syringil y guaiacil. Las estructuras aromáticas no funcionalizadas ($\text{CA}(\text{aromatic}-\text{H}, \text{R})$) se observaron en los picos presentes entre 110-140 ppm y son indicativas de C_1 en fragmentos de lignina de syringil y guaiacil. En la región entre 140-160 ppm se encuentran los picos que pertenecen a carbonos aromáticos funcionalizados ($\text{CA}(\text{aromatic}-\text{O},\text{N})$), indicando la presencia de fragmentos fenólicos de naturaleza lignínica y de suberinas. Los picos entre 160-185 ppm pertenecen a los carbonos carboxílicos ($-\text{COOH}$), y entre 185-230 ppm los picos que indican carbonos carbonílicos ($\text{CC}=\text{O}$) de estructuras cetónicas y aldehídicas.

En la Figura 2 se muestran las cantidades relativas de estructuras presentes en AH. Con 25% de estructuras alifáticas no funcionalizados y casi el 20% de estructuras aromáticas no funcionalizados. Las estructuras peptídicas y los fragmentos con grupos funcionales carboxílicos

están presentes en los AH; en una cantidad del 13% y casi el 11%; son carbonos aromáticos funcionalizados. Los fragmentos de hidratos de carbono se encuentran en menor proporción, sumando un 16.8% y, finalmente, los carbonilos están en un 4%. Estos valores permiten inferir que los AH son, estructuralmente, 30% aromáticos y 70% alifáticos.

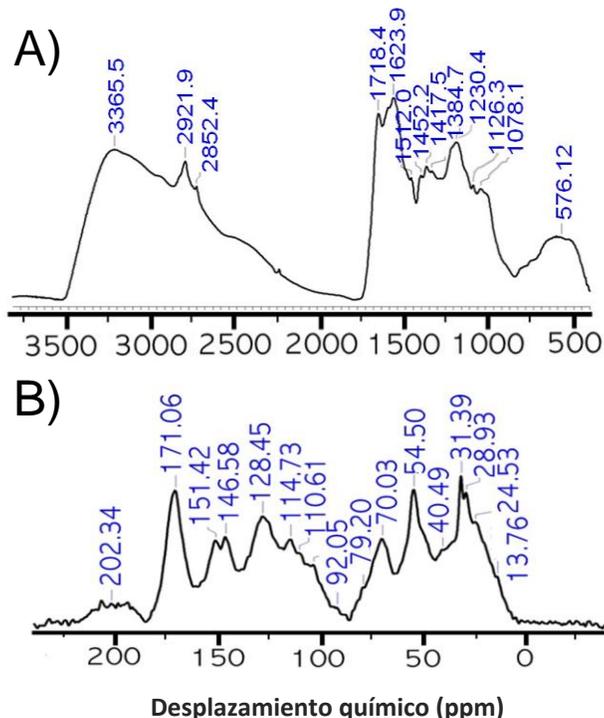


Figura 1. Espectros de los ácidos húmicos extraídos de vermicompost. A) espectro ATR-FTIR. B) espectro ¹³C NMR CP/MAS.

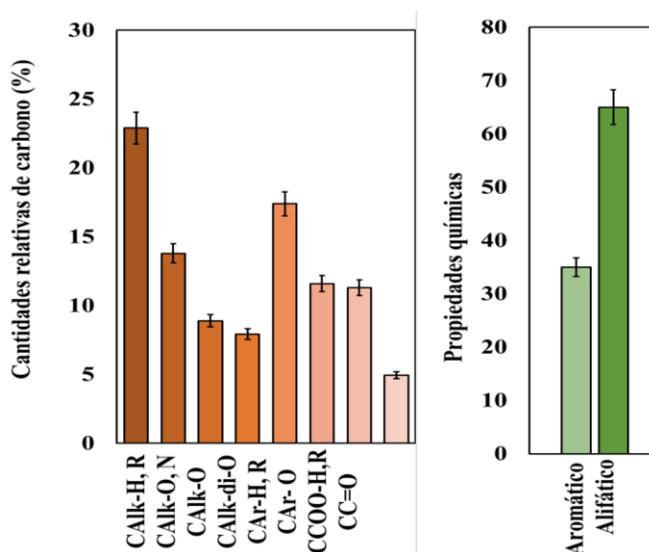


Figura 2. Cantidades relativas de tipo de carbonos presentes en los ácidos húmicos extraídos de vermicompost de residuos sólidos urbanos.

Efectos de la aplicación de los AH en la etapa reproductiva de selecciones de maíz

La fase reproductiva inicia cuando se visualiza la espiga y termina con la madurez fisiológica de la mazorca. En la Figura 3A se muestra el comportamiento de la variable Ap en las tres selecciones de maíz ante la aplicación de los AH en condiciones de riego continuo, y en la Figura 3B con déficit hídrico inducido. Bajo condiciones de riego, solo en Zap se registran diferencias significativas con respecto al control, al aplicar las concentraciones de 140 y 160 mg L⁻¹. En plantas sometidas a déficit hídrico, la mayor Ap se obtuvo con la concentración de 140 mg L⁻¹ en la selección Caj. La Figura 3C (riego continuo); muestra que la aplicación de AH a las concentraciones de 140 y 150 mg L⁻¹, incrementa significativamente el Dt para la selección Caj. Sin embargo, en la Figura 3D (déficit hídrico) se observó que los AH aplicados estimularon significativamente ($P < 0.05$) a dos selecciones, Cuil al aplicar 160 mg L⁻¹ y Zap al aplicar 140 y 160 mg L⁻¹. En las Figuras 3E (riego continuo) y 3F (déficit hídrico), al evaluar el indicador biomasa seca en la parte aérea, se observó que la concentración 160 mg L⁻¹ promovió un incremento significativo ($P < 0.05$) de esta variable en ambas condiciones de manejo. La aplicación de AH en el rango de 140 a 160 mg L⁻¹ incrementaron significativamente ($P < 0.01$) el contenido de MSr (Figuras 3G, riego continuo y 3H, déficit hídrico). En condiciones de riego se observó una clara evidencia de estimulación ($P < 0.01$) con respecto al control en la selección Zap, al ser estimulada por todas las concentraciones empleadas. Bajo esta misma condición de riego también fue estimulada la selección Caj, aunque solo por el tratamiento con concentración de 150 mg L⁻¹. En déficit hídrico, los mayores incrementos significativos ($P < 0.01$) se alcanzaron cuando las selecciones Zap y Caj estuvieron en contacto con las concentraciones 150 y 160 mg L⁻¹.

En la Figura 4 se muestra el contenido de prolina en hojas de plantas de maíz con riego continuo (4A) y déficit hídrico inducido (4B). En ambos casos, las aplicaciones de AH estimularon la acumulación de prolina con respecto al control, con diferencias significativas en las selecciones. Con riego continuo, en Cuil se tuvo la mayor estimulación con 140 mg L⁻¹, mientras que para la selección Caj la mayor estimulación se alcanzó con 150 mg L⁻¹; y para la selección Zap ninguna de las concentraciones empleadas estimuló esta variable. La concentración de prolina en hojas aumentó en plantas bajo condiciones de estrés hídrico (Figura 4B), presentando Caj un incremento altamente significativo ($P < 0.01$) con respecto al control al aplicar 140 mg L⁻¹. Lo mismo ocurrió con Cuil, pero con la concentración de 160 mg L⁻¹.

El contenido relativo de agua es uno de los mejores indicadores para cuantificar las respuestas de los cultivos ante el estrés hídrico (Figura 5). Para el riego continuo, el contenido relativo de agua no mostró cambios significativos al aplicar las diferentes concentraciones de AH en las tres selecciones de maíz. En todos los tratamientos el valor fue similar al control. Por otra parte, un valor alto de contenido relativo de agua foliar, en plantas bajo condiciones de estrés hídrico inducido, es indicativo de plantas con resistencia a la sequía. En la Figura 5B se muestra que al menos dos de las tres selecciones de maíz exhibieron mejor condición hídrica foliar con respecto al control, al aplicar las diferentes concentraciones de AH, presentando diferencias significativas ($P < 0.05$) en las selección Cuil con 150 y 160 mg L⁻¹, y para Zap se obtuvieron los mejores resultados con 140 y 160 mg L⁻¹, siendo estas mismas selecciones las que también mostraron un mejor contenido de prolina bajo condiciones de déficit hídrico.

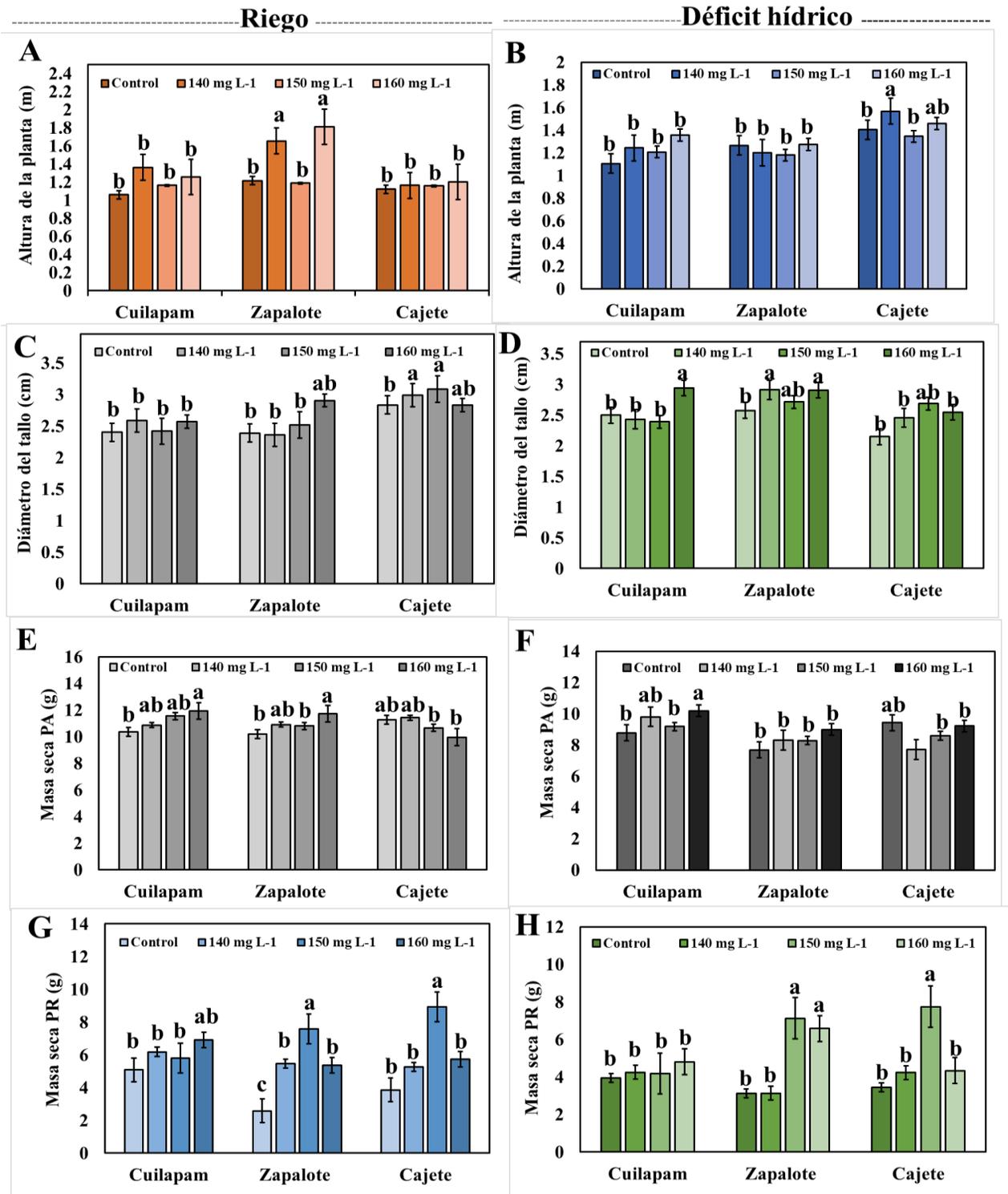


Figura 3. Efectos de la aplicación radical de ácidos húmicos extraídos de residuos sólidos urbanos en cultivo de maíz, bajo condiciones de riego y con déficit hídrico en campo abierto.

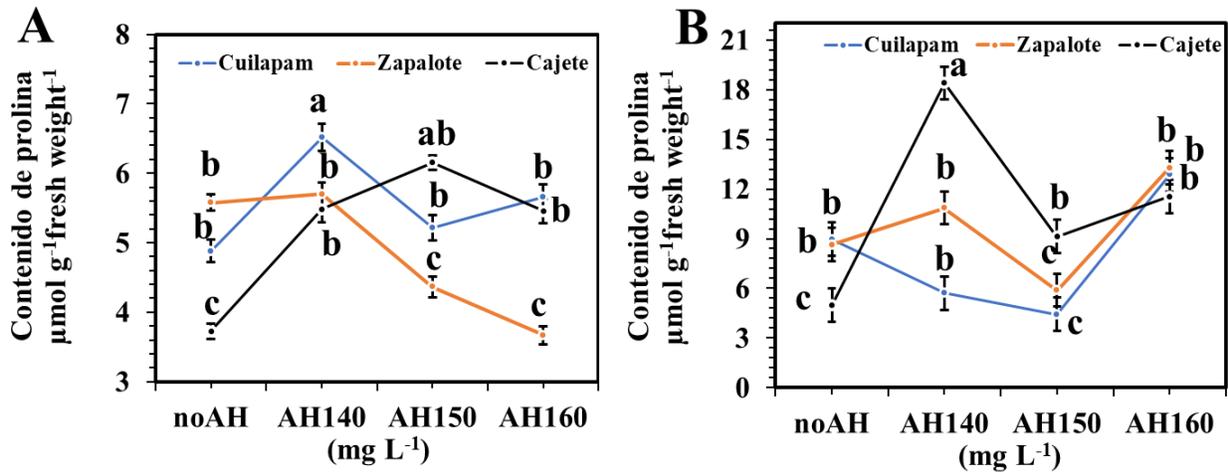


Figura 4. Efectos de la aplicación de diferentes concentraciones de ácidos húmicos (AH) sobre el contenido de prolina en tres selecciones de maíz (A: con riego, B: déficit hídrico).

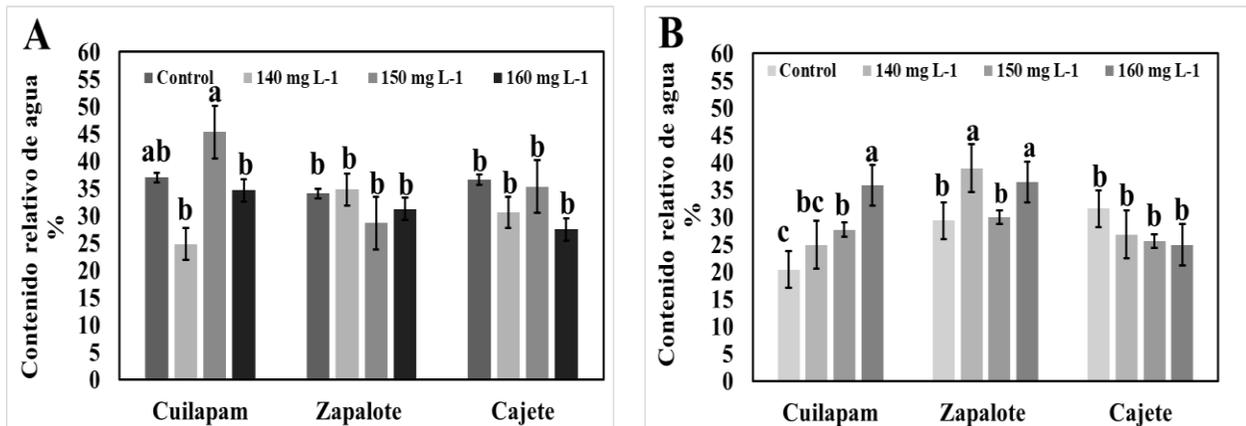


Figura 5. Efectos de la aplicación de diferentes concentraciones de ácidos húmicos (AH) sobre el contenido relativo de agua foliar en tres selecciones de maíz en condiciones de campo abierto con riego y déficit hídrico.

La biosíntesis de clorofilas Chl a, Chl b y Chl a + b se ve afectada en la mayoría de las plantas que enfrentan un déficit hídrico, provocada por el cierre de estomas, la cual es una actividad realizada por las plantas para evitar la pérdida de agua por transpiración. La Figura 6 muestra el contenido de Chl a, Chl b y Chl a + b para condiciones de riego continuo (6A) y déficit hídrico (6B). Bajo condiciones de riego se observa estimulación con respecto al control para las selecciones Cuil y Caj, mientras que en Zap todos los tratamientos fueron semejantes al control. Bajo condiciones de déficit hídrico, los AH estimularon el contenido de Chl a, aunque los valores fueron ligeramente inferiores a los obtenidos bajo riego. La selección Zap mostró un incremento respecto al control en presencia de las tres concentraciones de AH empleadas. La selección Cuil superó al control con 140 y 150 mg L⁻¹, mientras que los incrementos en la selección Caj se presentaron al aplicar 140 y 160 mg L⁻¹. La Figura 6C presenta el contenido de Chl b bajo condiciones de riego continuo. En esta condición, Zap fue estimulada significativamente ($P < 0.01$) por dos de las tres concentraciones de AH, incrementando en más del doble el contenido de Chl b con respecto al control.

En las selecciones Zap y Caj, no hubo diferencias significativas con respecto al control; en ninguna de las tres concentraciones de AH. La Figura 6D, en condiciones de déficit hídrico, muestra

que las tres selecciones tuvieron incrementos significativos del contenido de Chl b con respecto al tratamiento control, en las tres concentraciones aplicadas. En la Figura 6E se presenta el contenido de clorofilas totales (Chl a+b) bajo condiciones de riego continuo. En la selección Zap se muestra estimulación en esta variable por las tres concentraciones de AH empleadas, mientras que las otras dos selecciones muestran tendencia decreciente con respecto al control. Bajo condiciones de déficit hídrico (Figura 6F), el contenido de clorofilas totales fue estimulado en las tres selecciones de maíz por las tres concentraciones de AH aplicadas.

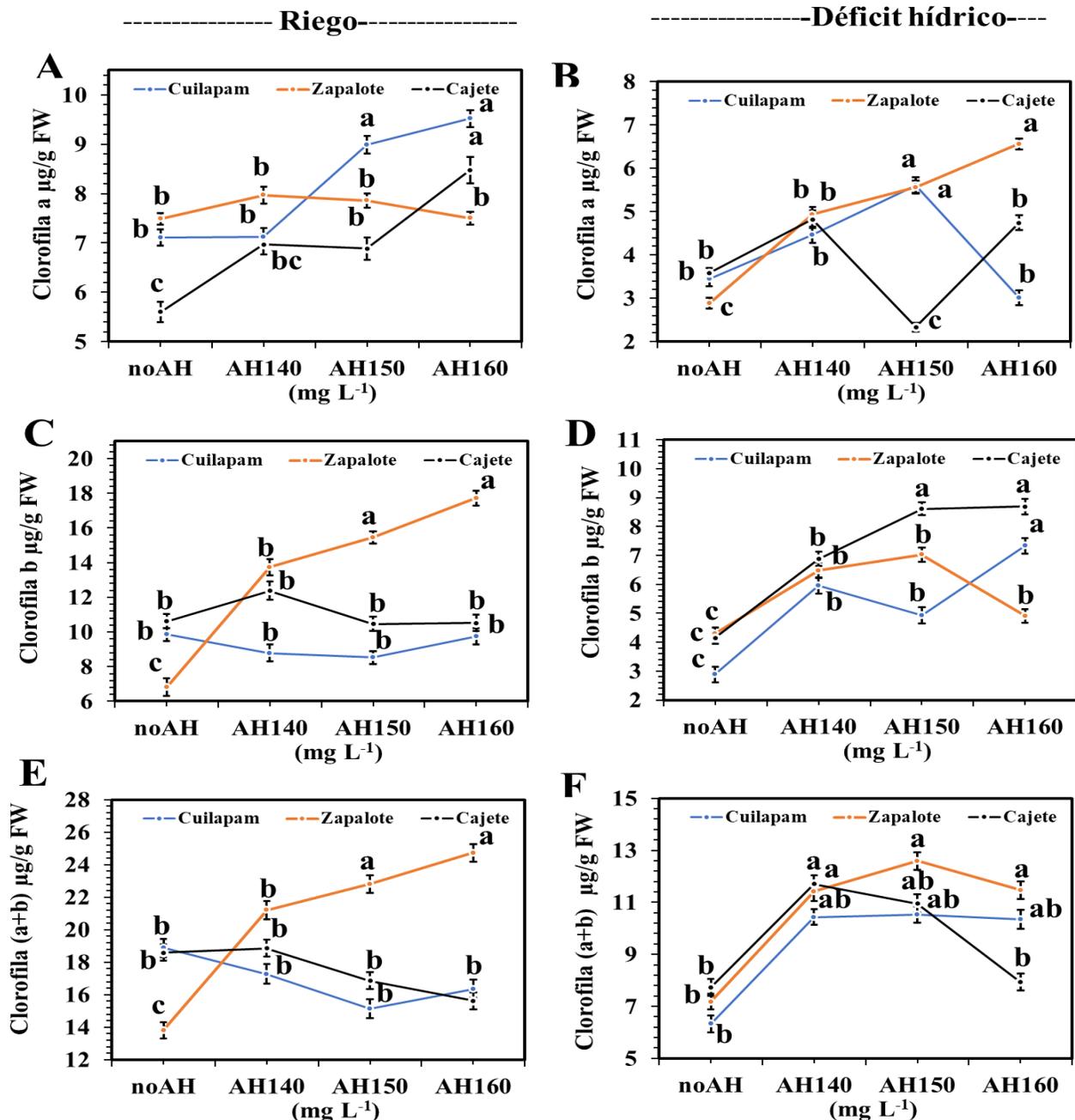


Figura 6. Contenido de Chl a (riego A y déficit hídrico B), Chl b (riego C y sin riego D), Chl a+b (riego E y sin riego F) en cultivo de maíz en respuesta a la aplicación de ácidos húmicos.

DISCUSIÓN

Las cantidades de los elementos presentes al realizar la caracterización composicional de los AH obtenidos están dentro del rango reportado por el IHSS (Hernández *et al.* 2018). También Jindo *et al.* (2012) reportaron valores similares en los análisis de la composición elemental en AH extraídos de residuos sólidos municipales. En investigaciones realizadas por Pinos *et al.* (2019), con aplicaciones de AH a plantas de maíz y arroz, observaron valores de la relación E4/E6 similares a los reportados en este trabajo. Los espectros ATR-FTIR y ¹³C NMR CP/MAS (Figura 1) se encuentran dentro de los rangos reportados por otros autores que han extraído ácidos húmicos de materiales compostados y vermicompostados (Hernández *et al.* 2018, García *et al.* 2019). Las características espectroscópicas (Figura 2) de estos AH permiten, suponer efectos similares a los reportados por García *et al.* (2019). Al respecto, Savy *et al.* (2020) informan que en los AH hay presencia de estructuras aromáticas y metoxílicas, que ejercen efectos positivos en el crecimiento de las raíces. Mientras que Hernández *et al.* (2018), empleando AH con características espectroscópicas similares observaron efectos significativos antiestrés en plantas sometidas a déficit hídrico.

El efecto de la aplicación vía radical de los ácidos húmicos en el cultivo del maíz (Figura 3), bajo condiciones de riego y déficit hídrico en campo abierto, en altura de la planta fue similar a lo reportado por Reyes-Pérez *et al.* (2014) cuando aplicaron humatos extraídos de vermicompost, en altura y biomasa fresca en la parte aérea. Mientras que Eyheraguibel *et al.* (2008), con aplicaciones de SH derivadas de residuos orgánicos, estimularon la biomasa de la raíz, hoja y altura. En este sentido, algunas de las principales vías de acción por las cuales las SH ejercen efecto sobre la parte aérea, están relacionada con mejor desarrollo del sistema radical e incrementos de los niveles de citoquininas, y la translocación de elementos minerales desde la raíz hasta los brotes, llegando a estimular de forma significativa el crecimiento aéreo (García *et al.* 2016). Con respecto al Dt; resultados similares fueron informados por Wulandari *et al.* (2019), realizando un experimento con cultivo de maíz en condiciones de campo abierto, empleando diferentes dosis de AH en combinación con macronutrientes, reportan baja actividad significativa de estas dosis, sobre el Dt y Ap al ser asperjadas de forma foliar. Pero estas mismas variables, sí fueron estimuladas cuando la forma de aplicación de los AH, se dirigió al suelo.

Los mecanismos relacionados con la aplicación directa de SH al suelo están bien definidos. Pero no están del todo claros, cuando las SH son aplicadas vía foliar e interactúan de forma indirecta con el sistema radical de las plantas. El incremento en altura puede relacionarse (Figura 3A), de forma indirecta, con un incremento de la biomasa seca de la parte aérea (Figura 3E). Esta relación podría explicarse por el incremento en el contenido de clorofila en las hojas, lo cual, estimula mayor tasa fotosintética que realiza una planta con mayor biomasa (Rose *et al.* 2014). Mientras que Olaetxea *et al.* (2019) reportan otras vías de acción, por las cuales los AH estimulan el crecimiento de los brotes, estando relacionadas con incrementos en la actividad de las citoquininas en los brotes, que a su vez está relacionado con aumentos inducidos por la aplicación vía radical de los AH sobre la actividad H⁺-ATPasa en la raíz. También, informan que los incrementos en la concentración del AIA en la raíz, producen aumentos en la actividad de las acuaporinas de la membrana plasmática de la raíz y de la conductividad hidráulica de la raíz, lo cual es crucial para mejorar el crecimiento de los brotes inducido por los AH. Por otra parte, se ha reportado que dos de las tres fracciones principales de las SH (ácidos húmicos y fúlvicos) mejoran el crecimiento de

las raíces, así como los brotes aéreos, estimulando la biomasa seca en la parte aérea y radical con incrementos superiores al 20% (Rose *et al.* 2014).

Con respecto al sistema radical de cualquier planta, tanto en condiciones de riego continuo como en déficit hídrico, desarrolla un papel indispensable en la adquisición de agua y nutrientes que provienen del suelo, además de promover actividad rizosférica, mejorando su defensa e incrementando la disponibilidad de nutrientes, por medio de la optimización de la comunidad microbiana que la rodea (López-Bucio *et al.* 2003, Mohammadi-Alagoz *et al.* 2023). La mayoría de estos procesos pueden ser desencadenados con la presencia de SH procedentes de diferentes fuentes (Canellas y Olivares 2014). Una mejora sobre el crecimiento radical se puede traducir en un incremento en la MSr. Al respecto Canellas *et al.* (2002), informan que la aplicación de SH estimula la formación de raíces laterales y la hiperinducción de sitios de emergencia de raíces laterales. Esto está relacionado, con lo que ocurre en las zonas de diferenciación y elongación celular de las raíces; ya que, en estas áreas, hay elevada presencia de células meristemáticas, con metabolismo totalmente activo y susceptibles a bajos valores de pH, los cuales pueden ser inducidos por la aplicación de SH vía radical. Al respecto, Hernández *et al.* (2018), reportan que aplicar diferentes concentraciones de AH en plantas del arroz con y sin estrés hídrico, incrementa la producción de biomasa seca radical. Sobre lo mismo Hernández *et al.* (2018), con diferentes concentraciones de AH en plantas del arroz con y sin estrés hídrico, reportan incremento en producción de biomasa seca radical.

Uno de los mecanismos fisiológicos empleados por las plantas para atenuar los daños causados por el estrés hídrico es el ajuste osmótico. Mediante este mecanismo, las plantas sintetizan y acumulan solutos que funcionan como osmolitos protectores (Choudhary *et al.* 2023), como la prolina. Al respecto, varias investigaciones informan el rol crucial de la prolina conservando la estructura de los compuestos celulares; eliminando las especies reactivas de oxígeno (ERO), y manteniendo el ajuste osmótico en condiciones de estrés hídrico; favoreciendo, la transferencia de agua dentro de la planta (Bayat y Moghadam 2019). Al respecto Alhverdzadeh y Danaee (2023) aplicando AH (0, 50, and 100 mg L⁻¹) para atenuar el estrés hídrico (capacidad de campo del 50%) en plantas de *Catharanthus roseus* L., con incrementos del contenido de prolina de 100 mg L⁻¹

El contenido relativo de agua, es uno de los mejores indicadores para cuantificar las respuestas de los cultivos ante el estrés hídrico. Resultados similares a los reportados en condiciones de riego, han sido informado por Pirzad *et al.* (2011), en un experimento donde aplicaron diferentes niveles de riego, encontraron alto contenido relativo de agua en presencia de una buena irrigación. Mientras que Li *et al.* (2005) bajo déficit hídrico, informan incremento del contenido relativo de agua con respecto al control, al aplicar fracciones de SH (ácidos fúlvicos), asociando dicha estimulación con una disminución de la pérdida de agua por transpiración, además de mejor conductividad hidráulica, debido a un sistema radical más desarrollado.

Las SH pueden estimular diferentes vías metabólicas, una de las de mayor trascendencia es la fotosíntesis. En esta investigación, la aplicación de AH mejoró la fotosíntesis de las selecciones de maíces evaluadas, al aumentar la clorofila a, b y a+b principalmente bajo condiciones de déficit hídrico. Resultados similares fueron reportados por Song *et al.* (2020), indicando incrementos de la tasa fotosintética neta y del contenido de pigmentos fotosintéticos al tratar plantas con AH, sometidas a estrés por presencia de cadmio. También, Shahryari *et al.* (2011), después de evaluar

los cambios del contenido de clorofilas en genotipos de maíz aplicando SH, concluyen que las estimulaciones sobre el contenido de clorofilas, se correlacionan tanto con los genotipos de maíz empleado, como con el origen y la fuente de las SH. Mientras que Castro *et al.* (2021) y Souza *et al.* (2021) reportaron que, en plantas de maíz, tomate y arroz bajo condiciones de déficit hídrico inducido y con aplicación de AH, extraídos de diferentes fuentes, incrementaron de forma significativa el contenido de clorofila a y b. En tanto que Castro *et al.* (2022) reportan que la aplicación de AH extraídos de vermicompost en plantas de arroz bajo déficit hídrico mejoró la actividad fotosintética, siendo asociados estos cambios fotosintéticos con una condición previa de eustrés o estrés blando que genera incrementos fotosintéticos, dada la acción del AH en las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis.

CONCLUSIONES

Los AH extraídos de vermicompost de RSU, presentaron estructura con características de composición y espectroscópicas típicas para este tipo de compuestos, con alta aromaticidad y alifaticidad química que generan alta hidrofobicidad. La aplicación de tres concentraciones de AH a selecciones de maíces estimularon las variables reproductivas y atenuaron el efecto de la limitación de riego cuando se aplicaron vía radical. Los efectos negativos causados por el déficit hídrico inducido, en la etapa de floración, disminuyen con la aplicación de AH, lo que se confirma con los valores de Ap, Dt, producción de biomasa aérea y radical, contenido de prolina, contenido relativo de agua y contenido de clorofilas. La aplicación de AH es una opción viable para reducir la inhibición del crecimiento de maíces criollos, cuando se desarrollan en condiciones de campo abierto y con estrés hídrico.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT México) la concesión de una beca para estudios de doctorado (615819). La Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional financió la investigación (SIP20196131).

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

LITERATURA CITADA

Abbott LK, Macdonald LM, Wong MTF, Webb MJ, Jenkins SN, Farrell M (2018) Potential roles of biological amendments for profitable grain production: a review. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 256: 34-50. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.12.021>.

- Alhverdzadeh S, Danaee E (2023) Effect of humic acid and vermicompost on some vegetative indices and proline content of *Catharanthus roseus* under low water stress. *Environment and Water Engineering* 9: 141-152. <https://doi.org/10.22034/EWE.2022.333951.1745>.
- Ali U, Sajid N, Khalid A, Riaz L, Rabbani MM, Syed JH, Malik RN (2015) A review on vermicomposting of organic wastes. *Environmental Progress & Sustainable Energy* 34(4): 1050-1062. <https://doi.org/10.1002/ep.12100>
- Bayat H, Moghadam AN (2019) Drought effects on growth, water status, proline content and antioxidant system in three *Salvia nemorosa* L. cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum* 41: 149. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2942-6>.
- Canellas LP, Olivares FL (2014) Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 1(1): 3. <https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>.
- Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Façanha AL, Façanha AR (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology* 130: 1951-1957. <https://doi.org/10.1104/pp.007088>.
- Castro TAVT, García AC, Tavares OCH, Pereira EG, De Souza CCB, Torchia DFDO (2022) Humic acids affect photosynthetic quantum efficiency in rice under water deficit. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 34(4): 463-483.
- Castro TAVT, García AC, Tavares OCH, Pereira EG, Souza CCB, Torchia DFO (2021) Humic acids induce a eustress state via photosynthesis and nitrogen metabolism leading to a root growth improvement in rice plants. *Plant Physiology Biochemistry* 162: 171-184. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.043>.
- Choudhary S, Wani KI, Naeem M (2023) Cellular responses, osmotic adjustments, and role of osmolytes in providing salt stress resilience in higher plants: Polyamines and nitric oxide crosstalk. *Journal of Plant Growth Regulation* 42: 539-553. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10584-7>.
- De Hita D, Fuentes M, García AC, Olaetxea M, Baigorri R, Zamarréño AM, García-Mina JM (2019) Humic substances: A valuable agronomic tool for improving crop adaptation to saline water irrigation. *Water Supply* 19: 1735-1740. <https://doi.org/10.2166/ws.2019.047>.
- Eyheraguibel B, Silvestre J, Morard P (2008) Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresource Technology* 99: 4206-4212. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.082>.
- García AC, Olaetxea M, Santos LA, Mora V, Baigorri R, Fuentes M, García-Mina JM (2016) Involvement of hormone- and ROS-signaling pathways in the beneficial action of humic substances on plants growing under normal and stressing conditions. *BioMed Research International* 2016:1-13. <https://doi.org/10.1155/2016/3747501>.
- García AC, Van Tol-de Castro TA, Santos LA, Tavares OCH, Castro RN, Berbara RLL, García-Mina JM (2019) Structure-property-function relationship of humic substances in modulating the root growth of plants: A review. *Journal of Environmental Quality* 48: 1622-1632. <https://doi.org/10.2134/jeq2019.01.0027>.
- Hernández R, Robles C, Calderín A, Guridi F, Reynaldo IM, González D (2018) Efectos antiestrés de ácidos húmicos de vermicompost en dos cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales* 39: 65-74.
- Hiscox JD, Israelstam GF (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany* 57: 1332-1334. <https://doi.org/10.1139/b79-163>.
- Jindo K, Martim SA, Navarro EC, Pérez-Alfocea F, Hernández T, García C, Aguiar NO, Canellas LP (2012) Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant and Soil* 353: 209-220. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1024-3>.
- Johnson R, Joel JM, Puthur JT (2023) Biostimulants: The futuristic sustainable approach for alleviating crop productivity and abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation* 1:1308641. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11144-3>.
- Kato TA, Mapes C, Mera LM, Serratos JA, Bye RA (2009) Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 116p.
- Kim KH, Lee BM (2023) Effects of climate change and drought tolerance on maize growth. *Plants* 12: 3548. <https://doi.org/10.3390/plants12203548>.
- Li M, Li S, Zhang S, Chi B (2005) Physiological effect of new FA antitranspirant on winter wheat at ear filling stage. *Journal of Agricultural sciences in China* 11: 820-825

- López-Bucio J, Cruz-Ramirez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 280-287. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00035-9).
- Mohammadi-Alagoz S, Zahra N, Hajiaghahi Kamrani M, Asgari Lajayer B, Nobaharan K, Astatkie T, Farooq M (2023) Role of root hydraulics in plant drought tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation* 42: 6228-6243. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10807-x>.
- Musco A, Pizzeghello D, Francioso O, Sanchez Cortes S, Nardi S (2020) Effectiveness of humic substances and phenolic compounds in regulating plant-biological functionality. *Agronomy* 10(10): 1553. <https://doi.org/10.3390/agronomia10101553>.
- Olaetxea M, Mora V, Bacaicoa E, Baigorri R, Garnica M, Fuentes M, García-Mina JM (2019) Root ABA and H⁺-ATPase are key players in the root and shoot growth-promoting action of humic acids. *Plant Direct* 3(10): 1-12. <https://doi.org/10.1002/pld3.175>.
- Pinos NQ, Berbara RL, Tavares OCH, García AC (2019) Different structures in humic substances lead to impaired germination but increased protection against saline stress in corn. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 50: 2209-2225. <https://doi.org/10.1080/00103624.2019.1659294>.
- Pirzad A, Shakiba MR, Zehtab-Salmasi S, Mohammadi SA, Darvishzadeh R, Samadi A (2011) Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla* L. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 2483-2488. <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000503>.
- Reyes-Pérez JJ, Murillo-Amador B, Nieto-Garibay A, Troyo-Diéguez E, Reynaldo-Escobar IM, Rueda-Puente EO, Guridi-Izquierdo F (2014) Humatos de vermicompost como mitigador de la salinidad en albahaca (*Ocimum basilicum* L.). *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* 46: 149-162.
- Rose MT, Patti AF, Little KR, Brown AL, Jackson WR, Cavagnaro TR (2014) A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. In *Advances in Agronomy* 124: 37-89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800138-7.00002-4>.
- Sah RP, Chakraborty M, Prasad K, Pandit M, Tudu VK, Chakravarty MK, Moharana D (2020) Impact of water deficit stress in maize: Phenology and yield components. *Scientific Reports* 10(1): 2944. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59689-7>.
- Savy D, Brostaux Y, Cozzolino V, Delaplace P, Du Jardin P, Piccolo A (2020) Quantitative structure-activity relationship of humic-like biostimulants derived from agro-industrial byproducts and energy crops. *Frontiers in Plant Science* 11: 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00581>.
- Shahryari R, Khayatnezhad M, Moghanlou BS, Khaneghah AMP, Gholamin PR (2011) Response of maize genotypes to changes in chlorophyll content at presence of two types humic substances. *Advances. Environmental. Biology* 5: 154-156.
- SIAP (2021) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. <http://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Fecha de consulta: 12 de febrero de 2021.
- Song X, Chen M, Chen W, Huixin J, Xian Y (2020) Foliar application of humic acid decreased hazard of cadmium toxicity on the growth of Hybrid Pennisetum. *Acta Physiologiae Plant* 42: 129 <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03118-9>.
- Souza AC, Zandonadi DB, Santos MP, Canellas NOA, Soares CP, Irineu LES (2021) Acclimation with humic acids enhances maize and tomato tolerance to salinity. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 8: 40. <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00239-2>.
- Swift RS (1996) Organic matter characterization. In: *Methods of soil analysis Part 3—Chemical methods*. American Society of Agronomy 5: 1011-1069. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c35>.
- Tiwari J, Ramanathan A L, Baudh K, Korstad J (2023) Humic substances: Structure, function and benefits for agroecosystems a review. *Pedosphere* 33: 237-249. <https://doi.org/10.1016/j.pedsph.2022.07.008>.
- Wang Y, Lu Y, Wang L, Song G, Ni L, Xu M, Nie C, Li B, Bai Y (2023) Analysis of the molecular composition of humic substances and their effects on physiological metabolism in maize based on untargeted metabolomics. *Frontiers in Plant Science* 14:1122621.
- Wulandari P, Sulistyarningsih E, Handayani S, Purwanto BH (2019) Growth and yield response of maize (*Zea mays* L.) on acid soil to different rates of humic acid and NPK fertilizer. *Ilmu Pertanian (Agricultural Science)* 4(2): 76-84. <https://doi.org/10.22146/ipas.36680>.

Yadav PK, Tripathi MK, Tiwari S, Chauhan S, Tripathi N, Sikarwar RS, Solanki RS, Sanjeev Y, Singh AK (2023) Genetic components and variability assessment for grain yield and its accrediting traits in maize (*Zea mays* L.). International Journal of Environment and Climate Change 13: 772-784. <https://doi.org/10.9734/IJECC/2023/v13i92298>.