



Capítulo X

188

Respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares al estrés por déficit hídrico en especies forrajeras

Gabriela Toro-Tobón
Carolina Pachón-Venegas
Daniel Torres-Cuesta
Germán Estrada-Bonilla
Fagua Álvarez-Flórez

Introducción

El uso de forrajes en la producción bovina constituye la base fundamental de un sistema de alimentación de bajo costo, debido a que son la fuente de nutrientes más económica (Mccarthy et al., 2013). En Colombia, la alimentación del ganado bovino se basa en el consumo de pastos, suplementados con alimentos concentrados, en caso de que los bovinos así lo requieran (Guerrero & Londoño Martínez, 2014). No obstante, la utilización de esta suplementación alimenticia en la producción láctea, por ejemplo, representa alrededor del 50 % de los costos totales (Flórez-Delgado & Gómez-Parada, 2016), siendo el pasto la fuente más rentable respecto al suministro de concentrados.

Aunque el área precisa de cobertura de las diversas especies forrajeras utilizadas para la ganadería bovina en el país no está bien documentada, sí se conocen las especies representativas por nicho agroecológico. En el caso de la lechería especializada del trópico alto (zonas ubicadas entre los 2.000 y 3.000 m s. n. m.), la base forrajera predominante es el pasto Kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) (Marín et al., 2017; Mojica et al., 2009; Restrepo Arias, 2016) y los Ryegrass anuales o perennes (*Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*), que son utilizados para incrementar la calidad de las praderas, tanto en monocultivo como en asocio con pasto Kikuyo (Restrepo Arias, 2016). En las explotaciones ganaderas del trópico medio y bajo (zonas ubicadas entre los 0 y 1.900 m s. n. m.), las especies más utilizadas como base forrajera en las praderas son el pasto estrella (*Cynodon plectostachyus*), diferentes especies de *Brachiaria* spp. (*B. decumbens*, *B. humidicola* y *B. brizantha*) y algunas especies nativas (Tapasco et al., 2015), cuyo uso se encuentra relacionado al tipo de suelo, las características climáticas y los tipos de manejo.

En los últimos años, la producción bovina en Colombia se ha visto afectada por diferentes situaciones de índole social (paros nacionales y un excesivo sobre costo en los insumos y fertilizantes) y por efecto de la variabilidad climática. El comportamiento climático de las diferentes zonas afecta la actividad ganadera, incidiendo drásticamente sobre la productividad de las explotaciones. En general, la productividad de los pastos y forrajes en los sistemas ganaderos de Colombia es estacional, con abundancia de forraje en las praderas durante las épocas de lluvia y rendimientos reducidos en épocas de baja precipitación, lo que ocasiona elevadas pérdidas en la producción animal (Arteaga Álvarez, 2009; Betancourt et al., 2012) y aumento en los costos de producción, debido al uso de alimentos concentrados (Nieto-Sierra et al., 2020).

Desde el punto de vista productivo, tanto la escasez como el exceso de precipitaciones, además de disminuir el rendimiento de los pastos nativos o

introducidos, incide en una reducción drástica de la capacidad de carga animal de las praderas y afecta el estado nutricional del ganado. Ello debido a que, ante el estrés hídrico, los pastos aceleran su metabolismo, lo que ocasiona el paso en menor tiempo de la fase de crecimiento a la fase reproductiva o de formación de semilla, reduciendo su contenido nutricional en cuanto a cantidad y calidad de sus nutrientes, razón por la cual los bovinos no puedan cubrir sus requerimientos nutricionales de mantenimiento, de producción o reproductivos (Vanegas Moreno, 2015). Tapasco et al. (2015) reportaron que el cambio climático tendrá efectos negativos sobre la ganadería, lo que provocará pérdidas en la producción de leche y carne del 7,6 % y 2,2 %, respectivamente, siendo los departamentos de Nariño, Caquetá, Casanare, Cundinamarca y Córdoba los más afectados por los efectos de la variabilidad climática.

El conocimiento de los efectos de la variabilidad climática sobre la ganadería es un reto para la ciencia aplicada, y también lo es entender cuantitativamente cómo los cambios climáticos afectan la fisiología de las especies de pastos.

En el presente capítulo, se aborda la revisión de las respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares de especies forrajeras ante el estrés por déficit hídrico y se plantean algunas estrategias para mitigar su efecto.

Respuestas al estrés por déficit hídrico

190

En el medio ambiente, las plantas responden a diferentes estímulos que condicionan su crecimiento, su desarrollo y su supervivencia. La percepción de cambios en el entorno natural es de gran importancia para los organismos vivos, desde los procariotas hasta los eucariotas, y ello es especialmente válido para el caso de las plantas, que son organismos sésiles y que dependen de las fluctuaciones abióticas y bióticas del lugar donde se encuentran.

Cuando una planta se encuentra en condiciones diferentes de las óptimas para cumplir con sus funciones vitales, estaría sometida a estrés. Cada especie o variedad vegetal difiere en sus requerimientos óptimos. Además, de acuerdo con su etapa de desarrollo, puede ser más susceptible a un determinado estrés (Hsiao, 1973; Levitt, 1980). Los tipos de estrés conocidos en plantas son de tipo biótico (relacionados con organismos vivos) y abiótico (relacionados con el entorno). En el segundo grupo encontramos el estrés por temperaturas (altas o bajas), disponibilidad hídrica (déficit o anegamiento), radiación, presencia de metales pesados, estrés oxidativo, salinidad y nutrientes

(deficiencia o exceso). En general, los diferentes tipos de estrés generan en la planta una cascada de reacciones que causan cambios a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular.

Uno de los tipos de estrés abiótico que más afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas es la disponibilidad de agua, bien sea por déficit o por exceso. El efecto del estrés por déficit hídrico es el más común y el que genera mayor impacto en la agricultura. A nivel mundial, los principales factores por sequía, temperaturas altas y salinidad provocan las mayores reducciones en el rendimiento de los cultivos (Kosová et al., 2018). Cuando hay sequía, disminuye el potencial hídrico del suelo, lo que afecta la absorción de agua por parte de la raíz y genera diferentes efectos, como aumento de las especies reactivas de oxígeno, mientras que las tasas de fotosíntesis y transpiración disminuyen como resultado del cierre estomático, lo que resulta en un bajo contenido relativo de agua en las hojas (RWC, sigla de *relative water content*). Además, la sequía influye en la fotosíntesis, lo que reduce la asimilación del dióxido de carbono en la hoja, los contenidos de clorofila y carotenoides, y los pigmentos accesorios. Todos estos efectos reducen el rendimiento y la producción en los cultivos (Jaleel et al., 2009; Sharma et al., 2019; Yang et al., 2020).

Para adaptarse a las condiciones adversas, las plantas han generado estrategias de supervivencia, como evitar el estrés, escape, tolerancia y recuperación (Fang & Xiong, 2015; Seleiman et al., 2021). Estos mecanismos varían entre las especies. La estrategia para evitar el estrés por escasa disponibilidad de agua se produce cuando las plantas consiguen mantener un balance hídrico, lo que aumenta su eficiencia en el uso del agua. Esto también se consigue mediante adaptaciones morfológicas, como la reducción de superficies foliares para disminuir la tasa de transpiración, y el aumento de la longitud o densidad de las raíces, para utilizar el agua disponible de manera más eficiente (Haddoudi et al., 2021). Los mecanismos de escape están asociados a un rápido desarrollo de la planta, para permitir la finalización del ciclo vital completo antes de un evento de estrés. Por su parte, la tolerancia es el resultado de la coordinación de cambios fisiológicos y bioquímicos a nivel celular y molecular, pues las plantas tolerantes son capaces de compensar la disminución de la turgencia mediante el ajuste osmótico, o la producción de metabolitos que pueden ayudarles a reparar el daño. Indirectamente, se induce la expresión de genes para la síntesis de prolina, azúcares solubles, acuaporinas y proteínas quinasas —como, por ejemplo, CDPK, MAPK HD-zip/bZIP, AP2/ERF, NAC, MYB y WRKY—, entre otros (Ilyas et al., 2021; Yang et al., 2021).

Respuestas en el balance hídrico

Las plantas pueden generar diferentes tipos de respuesta a los cambios en la disponibilidad hídrica para mantener el balance o estatus hídrico. Entre ellos se encuentran variar la superficie foliar, para disminuir la transpiración; cerrar estomas, para controlar la pérdida de agua; modificar la conductividad hidráulica en diferentes partes de la planta, para minimizar embolias, y adaptar el sistema radicular, para mejorar la captación de agua. Cuando las plantas están sometidas a déficit hídrico, disminuyen las tasas de fotosíntesis y transpiración, como resultado del cierre estomático, lo que se traduce en un bajo contenido relativo de agua (RWC) (Yang et al., 2020).

La mayor parte de las gramíneas forrajeras tropicales muestra respuestas a la sequía de tipo evasivo, así como tolerancia (Baruch & Fisher, 1991; Fisher & Ludlow, 1984; Guenni et al., 2007). Las primeras incluyen cambios morfológicos que incrementan el acceso a la humedad del suelo y minimizan las pérdidas de agua por transpiración, por lo que la eficiencia de uso de agua (WUE, sigla de *water use efficiency*) aumenta. Las respuestas de tolerancia permiten el mantenimiento de la turgencia celular, aun a potenciales hídricos foliares bajos. Como consecuencia, las plantas mantienen, durante la sequía, una actividad fotosintética reducida, pero capaz de soportar el crecimiento por un tiempo mayor (Guenni et al., 2004).

Por ejemplo, en avena (*Avena sativa*), los efectos más notorios frente a la baja disponibilidad de agua en el suelo se observan en el crecimiento y vigorosidad de las plantas, en las que hay baja turgencia en las hojas, relacionada con un bajo RWC; disminución en la acumulación de biomasa seca, y afección en el desarrollo de anteras y en el llenado del grano (Canales et al., 2021; Sadras et al., 2017; Sadras & Calderini, 2021; Sánchez-Martín et al., 2015). No obstante, algunos genotipos de avena han presentado cierta resistencia al estrés, por medio de un mejor control estomático; mayor producción de biomasa; estrategias de acumulación de agua; regulación de la producción de ácido abscísico (ABA), para mantener la transpiración, y una alta conductancia hidráulica radicular (Canales et al., 2021; Gong et al., 2022; Sánchez-Martín et al., 2015).

Por otra parte, en comunidades forrajeras de *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Phleum pratense* y *Trifolium repens*, Vitra et al. (2019) observaron un aumento en la pérdida de conductividad hidráulica en las plantas en la medida que aumentaba el déficit hídrico, lo que se traduce en una limitación del transporte de agua a lo largo del xilema y en disminución en la producción de biomasa aérea. En especies del género *Brachiaria*, se han evidenciado estrategias de evasión por su alta sensibilidad estomática, ya que

realizan cierre estomático temprano, como consecuencia de una rápida reducción del RWC foliar (Guenni et al., 2006). De igual modo, dos variedades de *Brachiaria* disminuyeron el potencial hídrico foliar y el RWC bajo estrés por déficit hídrico (Rocha et al., 2021).

Asimismo, Wang et al. (2018) reportaron, en plantas de sorgo, la disminución de la conductancia estomática y de la transpiración, pero también el aumento de WUE . En las especies de leguminosas *Trifolium repens*, *Medicago lupulina* y *Lotus corniculatus*, Komainda et al. (2019) identificaron un alto control estomático y un aumento en la WUE intrínseca bajo estrés en las plantas, el cual está relacionado con una mayor cantidad de carbono fijado por mol de agua. En trébol blanco (*T. repens*), Norton & Morgan (2020) observaron variación intraespecífica en el potencial hídrico, potencial osmótico y RWC de las plantas, como respuesta al déficit de agua. Igualmente, Kirigwi et al. (2022) evidenciaron variación intraespecífica en el RWC y potencial hídrico en 1.000 genotipos de pasto *Festuca arundinacea*.

Respuestas en la fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso fisiológico a partir del cual las plantas usan la energía lumínica para oxidar el agua (H_2O), liberando oxígeno (O_2), y reducir el dióxido de carbono (CO_2), para formar largos compuestos de carbono, principalmente azúcares (Taiz et al., 2015a). Es así como la fotosíntesis está compuesta de dos reacciones globales diferenciadas: en la primera se da la transducción de la energía lumínica a química, y en la segunda se realiza la reducción y fijación del carbono (Solarte et al., 2010; Taiz et al., 2015b).

En la primera reacción global, la luz es absorbida por las moléculas de clorofila de la hoja con el fin de desencadenar reacciones de oxidorreducción a lo largo de una serie de moléculas que actúan como donadores y aceptores de electrones, para destinar la energía en la reducción de $NADP^+$ a $NADPH$, en la oxidación de H_2O a O_2 , y en la generación de un gradiente protónico para la síntesis de ATP (Stirbet y Govindjee, 2011). A través de la primera reacción global, la energía lumínica puede tomar tres destinos, que compiten entre sí: i) puede ser utilizada para el proceso fotosintético, por medio de reacciones fotoquímicas, ii) puede ser disipada en forma de calor o iii) puede ser reemitida en una longitud de onda diferente como fluorescencia (Maxwell & Johnson, 2000; Strasser et al., 2000).

A causa de ello, con la cuantificación de la fluorescencia de la clorofila se pueden obtener múltiples parámetros asociados a la primera reacción global de la fotosíntesis, como, por ejemplo, la eficiencia fotoquímica del fotosistema II

($PSII$) (F_v/F_m), el decaimiento no fotoquímico (NPQ) y la tasa del transporte de electrones (ETR) (Maxwell & Johnson, 2000), que constituyen una herramienta no invasiva o destructiva, sensible y útil, para evaluar el desempeño fotoquímico frente a múltiples tipos de estrés biótico y abiótico, y que funge como indicador de la estructura y funcionamiento de la fotoquímica de la planta (González Moreno et al., 2008; Maxwell & Johnson, 2000; Stirbet & Govindjee, 2011; Strasser et al., 2000).

Bajo estrés por déficit hídrico —por ejemplo, en especies forrajeras leguminosas del género *Trifolium*—, se ha observado un mejor desempeño fotoquímico en comparación con especies de pastos de los géneros *Avena*, *Lolium* y *Triticosecale* (Leitão et al., 2021). Mouradi et al. (2022) reportaron disminución del F_v/F_m y de la tasa de transporte de electrones (ETR , por su sigla en inglés) en genotipos de alfalfa (*Medicago sativa*). Contrario a esto, Fariaszewska et al. (2020) no evidenciaron disminución significativa del F_v/F_m después de dos semanas de estrés en variedades de pastos de los géneros *Festuca*, *Lolium* y *Festulolium*. Resultados similares reportaron Perera et al. (2019) en los pastos forrajeros *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea* y *Cichorium intybus*, sometidos a déficit hídrico moderado a corto plazo. Sin embargo, al combinar el estrés hídrico con el estrés por alta temperatura, sí se observaron disminuciones del F_v/F_m en todas las especies. Por otro lado, las especies promisorias para la alimentación de ganado *Raphanus sativus* y *Crambe abyssinica*, que son tolerantes a la sequía, no demostraron cambios en los parámetros F_v/F_m , NPQ, rendimiento cuántico efectivo de $PSII$ ($\Delta F/F_m$), ni en la ETR (Moura et al., 2018). Así pues, no evidenciar cambios en el F_v/F_m tras someter las plantas a déficit hídrico da indicio de tolerancia en el modelo vegetal utilizado a dicho estrés, y puede estar relacionado con la activación de mecanismos antioxidantes y de fotoprotección, que permiten mantener en óptimas condiciones el $PSII$, y los procesos y biomoléculas asociados al transporte de electrones en la primera reacción global de la fotosíntesis (Mouradi et al., 2022).

En relación con la segunda reacción global de la fotosíntesis, que sucede en el estroma del cloroplasto, consiste en reacciones cíclicas para la fijación del carbono (ciclo de Calvin-ruta C_3), con tres etapas: carboxilación, reducción y regeneración, mediadas principalmente por la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO). Este proceso de fotosíntesis puede ser alterado por la fijación de O_2 , que también realiza la RuBisCO (fotorrespiración), por lo que algunas plantas han desarrollado mecanismos metabólicos que mitigan el impacto que genera la fotorrespiración, por medio de la fijación de carbono C_4 , metabolismo del ácido de las crasuláceas (CAM), o de bombas de CO_2 en la membrana plasmática (Solarte et al., 2010; Taiz et al., 2015a).

Bajo condiciones de estrés hídrico, la asimilación de CO_2 está determinada por la apertura y el cierre estomático, pues, en la medida que las células empiezan a perder turgencia, las plantas reaccionan por medio del cierre de estomas para disminuir la transpiración, y de esta manera evitar la pérdida de agua, lo que ocasiona una disminución del CO_2 y, por consiguiente, de su suministro en los sitios de carboxilación dentro de la hoja (Cousins et al., 2020; Fariaszewska et al., 2020). Por otra parte, cuando el estrés por déficit hídrico es excesivo, se da una reducción de la tasa fotosintética, asociada a limitaciones bioquímicas como consecuencia del daño en el sitio de carboxilación de la enzima RuBisCO o en la regeneración de la enzima ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) (Moura et al., 2018). El proceso de fotorrespiración que se da por estrés hídrico es uno de los principales factores que ocasionan la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que genera estrés oxidativo en la planta (Hussain et al., 2019).

En condiciones de déficit hídrico, en genotipos de sorgo, por ejemplo, se ha observado que hay una disminución de la tasa fotosintética neta (A), de la conductancia estomática (g_s) y de la tasa de transpiración (E), sin embargo, en algunos genotipos las concentraciones internas de CO_2 aumentaron (Shehab et al., 2020). De igual manera, la disminución de A, g_s y de la tasa máxima de carboxilación de la enzima RuBisCO (V_{cmax}) se evidenció en el pasto Guinea (*Panicum maximum*), lo cual tuvo implicaciones en la calidad nutricional del forraje (Habermann et al., 2019). Igualmente, Fariaszewska et al. (2020) reportaron una disminución en la asimilación de CO_2 , y en la transpiración en variedades de pastos de los géneros *Festuca*, *Lolium* y *Festulolium*. Sin embargo, en el WUE se observó un aumento, lo que posiblemente estuvo relacionado con el cierre estomático realizado por las plantas y con la correlación inversa del WUE con la transpiración (Fariaszewska et al., 2020).

Efectos similares se han reportado en otras especies forrajeras, como la avena (*Avena sativa*), donde la intensidad del estrés por déficit hídrico puede variar según el estado fenológico de la planta. Por ejemplo, Zhao et al. (2021) sometieron dos genotipos de avena (Shadow y Bia), en tres estadios de desarrollo (crecimiento GS40, formación de espiga GS55 y floración GS65), a estrés por déficit hídrico durante 15 días, y determinaron que en los estadios de producción, específicamente, GS55 para Shadow y GS65 para Bia, son más sensibles a este tipo de estrés, lo que muestra reducción en la economía de la hoja (menor fotosíntesis neta y área foliar), bajas tasas de g_s y reducción en la producción de grano.

Contrario a esto, en *Raphanus sativus* y *Crambe abyssinica*, no se observaron cambios en la tasa fotosintética neta, en la tasa de transpiración, ni en la

relación de la concentración interna y externa del CO_2 (C_i/C_a), lo que evidenció la tolerancia de ambas especies al déficit hídrico (Moura et al., 2018). Por otra parte, Leitão et al. (2021) observaron que, para mitigar los efectos de la sequía, las especies de leguminosas forrajeras poseen estrategias diferentes a aquellas de las especies de pastos, pues las leguminosas del género *Trifolium* obtuvieron mayores tasas de asimilación de CO_2 , fotosíntesis neta y WUE, en comparación con especies de la familia *Poaceae* bajo condiciones de irrigación y déficit hídrico.

Respuestas bioquímicas

El estrés por déficit hídrico induce la generación de ROS, como los radicales superóxido (O_2^-), hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$) y alcoxi ($\text{RO}^\cdot$), y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete (O_2), que son moléculas de moderada a elevada reactividad y que, en grandes cantidades, pueden reaccionar con biomoléculas de la célula (ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos, lípidos y enzimas), lo que genera interrupciones en la homeostasis celular y desencadena efectos sobre el crecimiento y el desarrollo (Hussain et al., 2019; Moreno et al., 2010; Yadav et al., 2021). Por consiguiente, la planta realiza cambios bioquímicos para desencadenar respuestas relacionadas con el ajuste osmótico y la desintoxicación de ROS, por medio de la acumulación de biomoléculas que no interfieren con los procesos metabólicos de la planta y que permiten realizar un ajuste para aliviar los efectos deletéreos que genera el estrés. De esta manera, puede acumular proteínas protectoras, como las proteínas de choque térmico (HSP, sigla de *heat shock proteins*), las proteínas de la embriogénesis tardía (LEA, de *late embryogenesis abundant*) y enzimas antioxidantes. También puede acumular osmolitos, como prolina, trealosa, glicina y azúcares, y hormonas como el ácido abscísico, etileno y metil jasmonatos (Kumar et al., 2018).

Dentro de estas diferentes biomoléculas, se destaca el papel que desempeñan los osmolitos, ya que cumplen la función de proteger la planta del daño oxidativo, generar balance osmótico, estabilizar las membranas y mantener la estructura de múltiples enzimas y proteínas (Zia et al., 2021). Por ejemplo, los azúcares median el desarrollo y crecimiento de la planta, y son sustratos para procesos de protección contra el estrés hídrico, lo que permite la estabilización de la membrana celular y el mantenimiento de la turgencia, de la homeóstasis y de la estructura celular (Kacienė et al., 2021). De esta manera, para el mantenimiento de la estructura celular los azúcares interactúan con la membrana y con las proteínas por medio de enlaces de hidrógeno que forman con sus grupos hidroxilos, así, los azúcares mantienen las interacciones hidrofílicas y pueden estabilizar y evitar la desnaturalización de las biomoléculas (Ayub et

al., 2021). La prolina juega un papel multifuncional metabólico en la planta, pues se ha observado que contribuye a la adaptación al estrés —por medio de la osmorregulación en la célula—, a la protección del aparato fotosintético, a la detoxificación de ROS —a través de enzimas antioxidantes—, a la estabilización del balance redox y a la disposición de carbono y nitrógeno en la rehidratación celular (Moreno et al., 2010; Pouris et al., 2022).

De igual modo, los metabolitos secundarios desempeñan múltiples funciones en la respuesta de la planta al estrés, pues están involucrados en funciones de señalización, comunicación, regulación de actividad enzimática, y defensa biótica y abiótica (Taiz et al., 2015c; Yadav et al., 2021). Específicamente, en la respuesta a la sequía se ha observado que los compuestos fenólicos inducen el sistema antioxidante a disminuir el daño ocasionado por los ROS, reducen la peroxidación de la membrana lipídica, modulan la pared celular e inducen el ciclo de Krebs y la glicólisis, para modular la síntesis de energía y de prolina, y, de esta manera, inducir procesos osmorreguladores en la planta (Yadav et al., 2021).

Bajo condiciones de déficit hídrico, por ejemplo, en variedades de pastos de los géneros *Festuca*, *Lolium* y *Festulolium*, se observó aumento en la concentración de prolina, de flavonoides y de contenido de ácidos fenólicos (Fariaszewska et al., 2020). De igual manera, en variedades de sorgo se evidenció el incremento de prolina, de proteína y de azúcares solubles en la etapa previa a la polinización, que corresponde a un estado susceptible fenológico del sorgo (Sarshad et al., 2021). Lo mismo ocurre en genotipos tolerantes de maíz, en los que hay una mayor concentración de prolina, azúcares totales y aminoácidos en genotipos susceptibles, en comparación con genotipos tolerantes (Ayub et al., 2021). Resultados similares del aumento de prolina, de azúcares totales, de proteína, de compuestos fenólicos, de ácido ascórbico y de glicina betaína reportaron Ghafar et al. (2021) en los pastos forrajeros *Cenchrus ciliaris* y *Cyperus arenarius*. Cabe resaltar que el ácido ascórbico funciona como un antioxidante no enzimático para la detoxificación de ROS y que la glicina betaína es un osmolito que actúa en la primera línea de defensa contra el estrés hídrico, ya que mantiene la turgencia celular y protege la célula contra el estrés oxidativo (Ghafar et al., 2021). En consecuencia, los osmolitos desempeñan un papel importante en la estabilización de biomoléculas y en la osmorregulación celular, como parte de la respuesta tolerante al estrés hídrico.

De igual modo, para evitar el daño oxidativo generado por el déficit hídrico, las plantas han desarrollado un sistema de defensa antioxidante que neutraliza la acumulación de ROS y mantiene un adecuado balance redox en la célula

(Mouradi et al., 2022). Dentro de este sistema antioxidante, se encuentran enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza el O_2^- en H_2O_2 ; la catalasa (CAT), que cataliza H_2O_2 en H_2O (agua) y O_2 (oxígeno molecular); y las peroxidasas (POD), que reducen el H_2O_2 (Hussain et al., 2019; Moreno et al., 2010). También están las enzimas del ciclo del glutatión-ascorbato o ciclo de Halliwell-Asada, como la ascorbato peroxidasa (APX), la dehidroascorbato reductasa (DHAR), la monodeshidroascorbato reductasa (MDAR) y la glutatión reductasa (GR), que se encargan de detoxificar el H_2O_2 (Avashthi et al., 2018; Hussain et al., 2019), y moléculas no enzimáticas, como ascorbato, glutatión, carotenoides, flavonoides y prolina, como se mencionó anteriormente.

Para ejemplificar el déficit hídrico en genotipos tolerantes de sorgo, algunas ROS aumentan —como el O_2^- , H_2O_2 , malondialdehído (MDA)—, y también lo hacen las concentraciones de enzimas antioxidantes, como POD, SOD, CAT y APX (Shehab et al., 2020). Igualmente, la canola (*Brassica napus*), utilizada como especie forrajera, responde a este estrés por medio del incremento de carotenoides, flavonoides, y de las enzimas SOD y CAT, sin evidenciar cambios de las enzimas del ciclo glutatión-ascorbato (Kacienė et al., 2021). De manera similar, las especies de pastos *Cenchrus ciliaris* y *Cyperus arenarius* aumentaron el contenido de CAT, SOD y POD (Ghafar et al., 2021). Contrario a esto, en la leguminosa forrajera *Stylosanthes capitata*, no se evidenciaron cambios en la concentración de CAT, SOD ni en GR, enzimas cuantificadas a las 6:00 a. m., después de 46 días de déficit hídrico combinado con altas temperaturas. De esta forma, al no haber cambios enzimáticos antioxidantes, se generó un aumento de MDA y H_2O_2 en la célula (Borjas-Ventura et al., 2020).

Respuestas moleculares

Como se observó anteriormente, los forrajes generan una respuesta al déficit hídrico a nivel fisiológico y bioquímico, según la especie, su estado fenológico y la intensidad del estrés. De igual manera, a nivel molecular, se producen cambios relacionados con dichas respuestas, pues la activación o silenciamiento de genes es consecuencia de los diferentes estímulos del exterior. Para el caso de un estrés por déficit hídrico, la supervivencia de la planta dependerá del tipo de genes que se activen y del momento en el que se realice. A nivel general, bajo este tipo de estrés, se activan rutas de señalización relacionadas con el transporte de agua, el recambio de proteínas, la desintoxicación de ROS, la síntesis de osmolitos y la acumulación de fitohormonas, así como otros señalizadores, como Ca^{+} y proteínas quinasas, y regulación de la transcripción de ADN (Chaves et al., 2003; Trejo-Calzada & O'Connell, 2005).

Uno de los principales señalizadores bajo este tipo de estrés es el ABA. La acumulación de esta fitohormona activa diferentes estrategias —como el cierre de estomas—, aumenta la longitud de las raíces, inhibe la expansión foliar e induce la expresión de genes relacionados al estrés (Seki et al., 2007; Zia et al., 2021). Estos genes pueden ser activados por dos rutas: ABA dependiente y ABA independiente (Fang & Xiong, 2015; Shinozaki et al., 2003).

Bajo la primera ruta, se encuentran genes involucrados en la biosíntesis de ABA con genes que codifican las proteínas 9-cis epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED); el cierre de estomas por los genes ABF3 o AREB2/AREB4, RD22 y RD29B, CDPK10 y la proteína SnRK2; y regulación osmótica por los genes AtMYC2 y AtMYB2, que codifican las proteínas MYC y MYB, respectivamente (Fang & Xiong, 2015; Shinozaki et al., 2003). Bajo la segunda ruta, se encuentran los factores de transcripción activados por etileno (ERF, sigla de *ethylene response transcription factor*), los cuales pueden silenciar o activar genes; el factor de transcripción SHN, que activa la biosíntesis de cera para protección de las hojas en *Arabidopsis*; los genes de respuesta a la deshidratación, como el DREB2 y el CBF/DREB1, involucrados en la respuesta osmótica; y los genes de respuesta temprana a la deshidratación (ERD1), también activados en procesos de senescencia (Chaves et al., 2003; Fang & Xiong, 2015; Shinozaki et al., 2003).

Otras fitohormonas involucradas en la respuesta al déficit hídrico son el ácido salicílico (SA), las auxinas (IAA), el ácido giberélico y las citoquininas (CTK), las cuales regulan el crecimiento de la planta y su senescencia, principalmente a nivel radicular (Zia et al., 2021). Por otro lado, también hay cambios en la fluidez de los lípidos de membrana, que funcionan como sensores de estrés osmótico y cambian la disposición de los canales de iones y de agua, esto mediado por las fosfolipasas C y D y la fosfatidil-4,5-fosfato-5-kinasa (PIP5) (Chaves et al., 2003).

Por ejemplo, en *Avena sativa* sometida a estrés por déficit hídrico, se ha observado que, a nivel transcripcional, hay un aumento en la expresión de genes relacionados a la producción de osmolitos y de enzimas antioxidantes (Alyammahi & Gururani, 2020; Gong et al., 2022; Zhang & Unver, 2018). Gong et al. (2022) reportan que la expresión génica involucrada en la respuesta al estrés es mucho mayor en genotipos tolerantes, en comparación con genotipos susceptibles, como, por ejemplo, la expresión de factores de transcripción de las rutas de señalización MAPK, involucradas en la regulación de la actividad antioxidante; proteínas de la familia BURP, involucradas en el crecimiento y la respuesta a estrés; y genes como SnRK2 (proteína-quinasa relacionada con la no fermentación de la sacarosa 1), regulados por la acumulación de ABA y la activación de las rutas de señalización por las

fitohormonas auxinas (IAA), citoquininas y brasinoesteroides (BR). Resultados similares presentaron Ma et al. (2021) para genotipos de alfalfa resistentes al estrés hídrico.

En otros forrajes, como la alfalfa (*M. sativa*), se han encontrado genes clave en la respuesta a estrés por déficit hídrico, como los factores de transcripción de la familia WRKY, específicamente el gen *MsWRKY11*, involucrado en la acumulación de lignina en el tallo, en la reducción de la densidad estomática y en mejorar el WUE (Wen et al., 2021); y el gen *MsDIUP1* (*Medicago sativa* Drought-Induced Unknown Protein 1), el cual, al ser sobreexpresado en plántulas de alfalfa, reduce la acumulación de MDA y aumenta la concentración de prolina y azúcares totales (Luo et al., 2022).

De manera similar, en el pasto *Psammochloa villosa*, se reporta que bajo un estrés hídrico fuerte hay una mayor expresión diferencial de genes, representada por mayor expresión de señalizadores MAPK (PP2C, CTR1 y EBF1), factores de transcripción (de la superfamilia MYB y las familias AP2/ERF, NAC, C2C2 y WRKY) e interacciones entre proteínas involucradas en el metabolismo de la prolina, como el gen P5CS (Pirrolina-5-carboxilato sintasa) (Liu et al., 2022).

El conocimiento en este campo de la ciencia sigue abierto a investigaciones y desarrollos, muy importantes en el mejoramiento genético de especies de interés agronómico y en el manejo de cultivos frente a las nuevas condiciones generadas por el cambio climático.

Estrategias para la mitigación del estrés por déficit hídrico en forrajes

200

La mitigación del estrés por déficit hídrico en los cultivos ha abarcado múltiples métodos y tecnologías de manera interdisciplinar, reuniendo aspectos de la hidrometeorología, en términos de monitoreo y predicción de sequías, para una mejor proyección del manejo agronómico (Sawada et al., 2020), y de la agronomía, por medio del manejo del suelo, de prácticas culturales, irrigación y selección de cultivos más apropiados, incluido el uso de tecnologías genéticas y moleculares para obtención de cultivos genéticamente tolerantes a la sequía (Lamaoui et al., 2018). En el presente apartado, se hablará de algunas de estas estrategias de mitigación del déficit hídrico, aplicadas a cultivos de especies forrajeras.

En primer lugar, se ha observado que la aplicación exógena de fertilizantes, compuestos osmoprotectantes —como la prolina— y compuestos

inorgánicos —como el silicato de sodio—, tiene efectos en las plantas que coinciden con una mejora de la respuesta frente al estrés por déficit hídrico en diferentes modelos vegetales. Por ejemplo, en avena (*Avena sativa*), la aplicación de fertilizantes foliares con sílice demostró una mejora en la tasa fotosintética, uso eficiente del agua, conductancia estomática y contenido de clorofila en plantas sometidas a estrés por sequía (Kutasy et al., 2022). En maíz (*Zea mays*), esta aplicación mostró efectos similares, además de disminuir la densidad estomática y aumentar el área de los vasos del nervio medio y el contenido de iones K^+ y Ca^+ de la hoja (Bijanazadeh et al., 2022). De igual manera, Ghafoor et al. (2019) reportaron que la aplicación foliar de prolina en plantas de avena sometidas a estrés hídrico causa un aumento en la prolina foliar, actividad antioxidante (SOD y POD) y crecimiento de la planta, además de aumentar el grosor de las raíces, lo que permite tolerar el estrés inducido.

La aplicación en el suelo de polímeros superabsorbentes (SAP, sigla de *super absorbent polymers*), sintéticos o naturales, ha sido también utilizada para la mitigación del estrés hídrico en los cultivos, pues estos polímeros tienen la capacidad de aumentar el agua disponible para la planta, reducir la densidad aparente del suelo y mejorar las condiciones para la absorción de nutrientes por parte de la planta (Ostrand et al., 2020). Por ejemplo, en avena, el uso de SAP aumentó la biomasa y redujo el estrés oxidativo (Islam et al., 2011). De igual manera, en plantas de maíz se observó que el uso de estos polímeros aumentó la biomasa seca y la altura (Abdallah et al., 2021). Resultados similares reportaron Yaseen et al. (2020), en maíz; Abrisham et al. (2018), en la planta forrajera *Seidlitzia rosmarinus*, utilizada para restauración de suelos áridos; y Keshavarz & Farahbakhsh (2012), en mijo (*Pennisetum americanum*). Lo anterior evidencia el potencial uso de los SPA para mitigar el efecto deletéreo del estrés por déficit hídrico en cultivos de forrajes.

Asimismo, la aplicación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB, sigla de *plant growth promoting bacteria*) ha sido utilizada para mejorar la respuesta de diferentes cultivos frente al estrés hídrico, por medio de mecanismos directos e indirectos, que involucran la facilitación de la toma de nutrientes, como el nitrógeno y el fósforo; de producción de sustancias estimuladoras, como el ácido abscísico o el ácido indolacético; de modulación de hormonas vegetales, por medio de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa; y de la producción de biopelículas sobre el tejido radicular de la planta (Oleńska et al., 2020; Pardo-Díaz et al., 2021).

Por ejemplo, Cortés-Patiño et al. (2021) evidenciaron un efecto positivo en la altura, la biomasa y el contenido hídrico relativo en plantas de Ryegrass sometidas a déficit hídrico tras la aplicación de consorcios bacterianos

endófitos de los géneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Pseudomonas*. Este efecto positivo puede estar relacionado con la capacidad que poseen estas bacterias para producir compuestos indólicos y exopolisacáridos, que reducen las concentraciones de etileno en la planta e inducen tolerancia sistémica. Moreno-Galván et al. (2020) observaron que la aplicación de PGPB en pasto Guinea (*Megathyrsus maximus*) modula la respuesta antioxidante en la planta, por medio de la disminución del contenido de la enzima GR y de la prolina. Por el contrario, Mendoza-Labrador et al. (2021) evidenciaron el aumento de prolina y de la enzima APX como parte de la tolerancia inducida por la coinoculación de *Bacillus* sp. en microesferas de alginato en pasto Guinea, bajo déficit hídrico. Asimismo, en pasto Buffel (*Cenchrus ciliaris*), en variedades de *Brachiaria* y en sorgo, se ha observado el aumento de la tolerancia a la sequía con el uso de PGPB (Antunes et al., 2019; Domingues Barreiros et al., 2020; Santana et al., 2020).

Además de la aplicación de diferentes sustancias y bioproductos para mejorar la respuesta de la planta al estrés por déficit hídrico, se encuentran los procesos de mejoramiento genético de cultivos, en los que se han implementado múltiples técnicas novedosas que han permitido superar los largos tiempos que involucran los procesos tradicionales de selección fenotípica (Kumar et al., 2018; Lamaoui et al., 2018). Entre estos procesos está el uso de la tecnología del ADN recombinante, que permite la modulación génica de regiones de interés del genoma para aumentar la tolerancia al estrés. Por ejemplo, en alfalfa, la sobreexpresión del gen GDP-manosa 3,5-epimerasa induce un aumento en la producción de ascorbato, lo cual mejora su respuesta frente al estrés hídrico (Lei et al., 2017). Por otra parte, Uga et al. (2013) aumentaron la respuesta de evasión de la sequía en arroz, por medio de la modificación de la arquitectura del sistema radicular de esta especie, como resultado de la clonación del gen DR+O1 (Deeper Rooting 1), y la caracterización de su función de elongación celular en la punta de la raíz, encargada del crecimiento asimétrico y de la flexión hacia abajo de la raíz como respuesta al gravitropismo.

De igual forma, la manipulación del transcrito del ARN mensajero por medio del control de micro-ARN (miRs) es una herramienta que permite modificar la expresión génica de manera diferencial para la regulación de procesos metabólicos esenciales a nivel postranscripcional en las plantas, y de esta manera modular su respuesta a un estrés (Djami-Tchatchou et al., 2017). Wang et al. (2021) evidenciaron el incremento en la tolerancia de la alfalfa al estrés hídrico, por medio de la sobreexpresión de genes asociados al precursor MicroRNA156 (miR156). Resultados similares reportaron Arshad et al. (2017) en alfalfa, con la sobreexpresión de miR156, que regula negativamente los genes SPL, involucrados en el desarrollo de la raíz y en la modulación de la

acumulación de metabolitos secundarios, contribuyendo al aumento de la tolerancia de la planta. Por otra parte, Hamza et al. (2016) identificaron perfiles de expresión de micro-ARN en 11 genotipos de Sorgo (*Sorghum bicolor*), asociados a la respuesta de estrés por sequía, mientras que Zhu et al. (2021) identificaron la vía regulatoria de micro-RNAs asociada a la respuesta a sequía en plantas de arveja (*Vicia sativa*).

Referencias

- AbdAllah, A. M., Mashaheet, A. M., & Burkey, K. O. (2021). Super absorbent polymers mitigate drought stress in corn (*Zea mays* L.) grown under rainfed conditions. *Agricultural Water Management*, 254 (106946), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.106946>
- Abrisham, E. S., Jafari, M., Tavili, A., Rabii, A., Zare Chahoki, M. A., Zare, S., Egan, T., Yazdanshenas, H., Ghasemian, D., & Tahmoures, M. (2018). Effects of a super absorbent polymer on soil properties and plant growth for use in land reclamation. *Arid Land Research and Management*, 32(4), 407-420. <https://doi.org/10.1080/15324982.2018.1506526>
- Alyammahi, O., & Gururani, M. A. (2020). Chlorophyll-a fluorescence analysis reveals differential response of photosynthetic machinery in melatonin-treated oat plants exposed to osmotic stress. *Agronomy*, 10(10), 1520. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101520>
- Antunes, G. D. R., Santana, S. R. A., Escobar, I. E. C., Brasil, M. D. S., Araújo, G. G. L. de, Voltolini, T. V., & Fernandes-Júnior, P. I. (2019). Associative diazotrophic bacteria from forage grasses in the Brazilian semi-arid region are effective plant growth promoters. *Crop and Pasture Science*, 70(10), 899-907. <https://doi.org/10.1071/CP19076>
- Arshad, M., Feyissa, B. A., Amyot, L., Aung, B., & Hannoufa, A. (2017). MicroRNA156 improves drought stress tolerance in alfalfa (*Medicago sativa*) by silencing SPL13. *Plant Science*, 258, 122-136. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.01.018>
- Arteaga Álvarez, S. R. (2009). *Elaboración de un bloque multinutricional a partir de los subproductos generados por la industria panelera, destinado para la alimentación de ganado bovino productor de carne, en el municipio de Sandona - Nariño*. Universidad de Nariño.
- Avashthi, H., Pathak, R. K., Pandey, N., Arora, S., Mishra, A. K., Gupta, V. K., Ramteke, P. W., & Kumar, A. (2018). Transcriptome-wide identification of genes involved in ascorbate-glutathione cycle (Halliwell-Asada pathway) and related pathway for elucidating its role in antioxidative potential in finger millet (*Eleusine coracana* (L.)). *3 Biotech*, 8(12), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1511-9>
- Ayub, M., Ashraf, M. Y., Kausar, A., Saleem, S., Anwar, S., Altay, V., & Ozturk, M. (2021). Growth and physio-biochemical responses of maize (*Zea mays* L.) to drought and heat stresses. *Plant Biosystems*, 155(3), 535-542. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1762785>
- Baruch Z, Fisher M (1991) Factores climáticos y de competencia que afectan el desarrollo de la planta en el establecimiento de una pastura. En C. Lascano, & J. Spain (Eds.), *Establecimiento y renovación de pasturas* (pp. 103-142). CIAT.

- Betancourt, J. E., Cuastumal, H. B., Rodríguez, S. P., Navia, J. F., & Insuasty, E. G. (2012). Alimentación de vacas Holstein con suplemento de papa de desperdicio (*Solanum tuberosum*) y acacia negra (*Acacia decurrens*), y su efecto en la calidad de leche. *Revista Investigación Pecuaria*, 1(2), 41-51.
- Bijanazadeh, E., Barati, V., & Egan, T. P. (2022). Foliar application of sodium silicate mitigates drought stressed leaf structure in corn (*Zea mays* L.). *South African Journal of Botany*, 147, 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.12.032>
- Borjas-Ventura, R., Ferraudo, A. S., Martínez, C. A., & Gratão, P. L. (2020). Global warming: antioxidant responses to deal with drought and elevated temperature in *Stylosanthes capitata*, a forage legume. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 206(1), 13-27. <https://doi.org/10.1111/jac.12367>
- Canales, F. J., Risipail, N., García-Tejera, O., Arbona, V., Pérez-de-Luque, A., & Prats, E. (2021). Drought resistance in oat involves ABA-mediated modulation of transpiration and root hydraulic conductivity. *Environmental and Experimental Botany*, 182(1), 102233. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104333>
- Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3), 239-264. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32689007/>
- Cortés-Patiño, S., Vargas, C., Álvarez-Flórez, F., Bonilla, R., & Estrada-Bonilla, G. (2021). Potential of *Herbaspirillum* and *Azospirillum* consortium to promote growth of perennial ryegrass under water deficit. *Microorganisms*, 9(1), 1-16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010091>
- Cousins, A. B., Mullendore, D. L., & Sonawane, B. V. (2020). Recent developments in mesophyll conductance in C3, C4, and crassulacean acid metabolism plants. *Plant Journal*, 101(4), 816-830. <https://doi.org/10.1111/tpj.14664>
- Djami-Tchatchou, A. T., Sanan-Mishra, N., Ntushelo, K., & Dubery, I. A. (2017). Functional roles of microRNAs in agronomically important plants-potential as targets for crop improvement and protection. *Frontiers in Plant Science*, 8(378). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00378>
- Domingues Barreiros, A. R., Cecato, U., Domingues Duarte, C. F., Hungria, M., Biserra, T. T., Rodrigues da Silva, D., Mamédio, D., Sanches, R., & Fernandes, H. J. (2020). Forage mass, tillering, nutritive value and root system of ruzigrass inoculated with plant growth promoting bacteria associated with doses of N-fertilizer. *International Journal for Innovation Education and Research*, 8(10), 41-55. <https://doi.org/10.31686/ijier.vol8.iss10.2634>
- Fang, Y., & Xiong, L. (2015a). 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>
- Fariaszewska, A., Aper, J., Van Huylenbroeck, J., De Swaef, T., Baert, J., & Pecio. (2020). Physiological and biochemical responses of forage grass varieties to mild drought stress under field conditions. *International Journal of Plant Production*, 14(2), 335-353. <https://doi.org/10.1007/s42106-020-00088-3>
- Fisher M. J., Ludlow, M. M. (1984). Adaptation to water deficits in *Stylosanthes*. En H. M. Stace, & L. A. Edye (Eds.), *The biology and agronomy of Stylosanthes* (pp. 163-179). Academic Press.

- Flórez-Delgado, D. F., & Gómez-Parada, B. J. (2016). Estimation of costs of production of terneras in breeding phase in hacienda Aposentos, municipality of Chinacota, North of Santander. *Revista Facultad Ciencias Agropecuarias*, 8(2), 88-90. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8628203>
- Ghafar, M. A., Akram, N. A., Saleem, M. H., Wang, J., Wijaya, L., & Alyemeni, M. N. (2021). Ecotypic morphological and physio-biochemical responses of two differentially adapted forage grasses, *Cenchrus ciliaris* L. and *Cyperus arenarius* Retz. to drought stress. *Sustainability*, 13(14), 8069. <https://doi.org/10.3390/su13148069>
- Ghafoor, R., Akram, N. A., Rashid, M., Ashraf, M., Iqbal, M., & Lixin, Z. (2019). Exogenously applied proline induced changes in key anatomical features and physio-biochemical attributes in water stressed oat (*Avena sativa* L.) plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(5), 1121-1135. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00683-3>
- Gong, W., Ju, Z., Chai, J., Zhou, X., Lin, D., Su, W., & Zhao, G. (2022). Physiological and transcription analyses reveal the regulatory mechanism in oat (*Avena sativa*) seedlings with different drought resistance under peg-induced drought stress. *Agronomy*, 12(5), 1005. <https://doi.org/10.3390/agronomy12051005>
- González Moreno, S., Perales, H., & Salcedo, M. (2008). La fluorescencia de la clorofila como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119-129.
- Guenni, O., Baruch, Z., & Marín, D. (2004). Responses to drought of five *Brachiaria* species. II. Water relations and leaf gas exchange. *Plant and Soil*, 258(1), 249-260.
- Guenni, O., Gil, J. L., Baruch, Z., Márquez, L., & Núñez, C. (2006). Respuestas al déficit hídrico en especies forrajeras de *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Poaceae). *Interciencia*, 31(7), 505-511.
- Guenni, O., Gil, J., Baruch, Z., Rodríguez, I., & Tam, J. (2007). Relaciones hídricas e intercambio gaseoso en una colección de leguminosas forrajeras cultivadas en las sabanas orientales de Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria*, 24(1), 348-354.
- Guerrero, A., & Londoño Martínez, M. A. (2014). *Análisis del cambio climático y el ambiente en las cuencas lecheras del valle de Ubaté-Chiquinquirá y del Caquetá como herramienta para el fortalecimiento de la política pública del sector lechero colombiano*. Asistencia Técnica - Programa de Apoyo Presupuestario al Sector Lácteo en Colombia en desarrollo del programa DCI-ALA/2011/22872.
- Habermann, E., Dias de Oliveira, E. A., Contin, D. R., Delvecchio, G., Viciado, D. O., De Moraes, M. A., De Mello Prado, R., De Pinho Costa, K. A., Braga, M. R., & Martínez, C. A. (2019). Warming and water deficit impact leaf photosynthesis and decrease forage quality and digestibility of a C4 tropical grass. *Physiologia Plantarum*, 165(2), 383-402. <https://doi.org/10.1111/ppl.12891>
- Haddoudi, L., Hdira, S., Hanana, M., Romero, I., Haddoudi, I., Mahjoub, A., Jouira, H. ben, Djébal, N., Ludidi, N., Sanchez-Ballesta, M. T., Abdelly, C., & Badri, M. (2021). Evaluation of the morpho-physiological, biochemical and molecular responses of contrasting *Medicago truncatula* lines under water deficit stress. *Plants*, 10(10), 2114. <https://doi.org/10.3390/plants10102114>

- Hamza, N. B., Sharma, N., Tripathi, A., & Sanan-Mishra, N. (2016). MicroRNA expression profiles in response to drought stress in *Sorghum bicolor*. *Gene Expression Patterns*, 20(2), 88-98. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2016.01.001>
- Hsiao, T. C. (1973). *Plant responses to water stress*. *Annual Review of Plant Physiology*, 24(1), 519-570. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.24.060173.002511>
- Hussain, S., Rao, M. J., Anjum, M. A., Ejaz, S., Zakir, I., Ali, M. A., Ahmad, N., & Ahmad, S. (2019). Oxidative stress and antioxidant defense in plants under drought conditions. En M. Hasanuzzaman, K. Hakeem, K. Nahar, & H. F. Alharby (Eds.), *Plant abiotic stress tolerance: agronomic, molecular and biotechnological approaches* (pp. 207-219). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-06118-0_9
- Ilyas, M., Nisar, M., Khan, N., Hazrat, A., Khan, A. H., Hayat, K., Fahad, S., Khan, A., & Ullah, A. (2021). Drought tolerance strategies in plants: a mechanistic approach. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(3), 926-944. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10174-5>
- Islam, M. R., Eneji, A. E., Ren, C., Li, J., & Hu, Y. (2011). Impact of water-saving superabsorbent polymer on oat (*Avena* spp.) yield and quality in an arid sandy soil. *Scientific Research and Essays*, 6(4), 720-728.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram, R., & Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11(1), 100-105.
- Kacienė, G., Miškelytė, D., Dikšaitytė, A., Januškaitienė, I., Sujetovienė, G., Žaltauskaitė, J., Praspaliauskas, M., & Juknys, R. (2021). A manifold response of forage rape to combined heat wave and drought under current and elevated CO₂. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 207(5), 873-883. <https://doi.org/10.1111/jac.12535>
- Keshavarz, L., & Farahbakhsh, H. (2012). Effect of superabsorbent on physio-morphological traits and forage yield of millet (*Pennisetum americanum* L.) under different irrigation treatments. *International Journal of Plan, Animal and Environmental Sciences*, 2(3), 149-156.
- Kirigwi, F. M., Saha, M. C., & Wang, Z. (2022). Screening of tall fescue genotypes for relative water content and osmotic potential under drought stress. *Grassland Research*, 1(2), 84-93. <https://doi.org/10.1002/qlr2.12021>
- Komainda, M., Küchenmeister, K., Küchenmeister, F., Breitsameter, L., Wrage-Mönnig, N., Kayser, M., & Isselstein, J. (2019). Forage legumes for future dry climates: lower relative biomass losses of minor forage legumes compared to *Trifolium repens* under conditions of periodic drought stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 205(5), 460-469. <https://doi.org/10.1111/jac.12337>
- Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M. O., Prášil, I. T., & Renaut, J. (2018). Plant abiotic stress proteomics: the major factors determining alterations in cellular proteome. *Frontiers in Plant Science*, 9, 122. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00122>
- Kumar, S., Sachdeva, S., Bhat, K. v., & Vats, S. (2018). Plant responses to drought stress: physiological, biochemical and molecular basis. En S. Vats (Ed.), *Biotic and abiotic stress tolerance in plants* (pp. 1-25). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-9029-5_1

- Kutasy, E., Buday-Bódi, E., Virág, I. C., Forgács, F., Melash, A. A., Zsombik, L., Nagy, A., & Csajbók, J. (2022). Mitigating the negative effect of drought stress in oat (*Avena sativa* L.) with silicon and sulphur foliar fertilization. *Plants*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/plants11010030>
- Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R., & Bekkaoui, F. (2018). Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry*, 6, 26. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00026>
- Lei, Y., Hannoufa, A., & Yu, P. (2017). The use of gene modification and advanced molecular structure analyses towards improving alfalfa forage. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 298. <https://doi.org/10.3390/ijms18020298>
- Leitão, S. T., Alves, M. L., Pereira, P., Zerrouk, A., Godinho, B., Barradas, A., & Patto, M. C. V. (2021). Towards a trait-based approach to potentiate yield under drought in legume-rich annual forage mixtures. *Plants*, 10, 1763. <https://doi.org/10.3390/plants10091763>
- Levitt J. (1980). *Responses of plants to environmental stress: Water, radiation, salt and other stress*. Academic Press.
- Liu, T., Liu, Y., Fu, G., Chen, J., Lv, T., Su, D., Wang, Y., Hu, X., Su, X., & Harris, A. J. (2022). Identification of genes involved in drought tolerance in seedlings of the desert grass, *Psammochloa villosa* (Poaceae), based on full-length isoform sequencing and de novo assembly from short reads. *Journal of Plant Physiology*, 271, 153630. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153630>
- Luo, D., Zhang, X., Liu, J., Wu, Y., Zhou, Q., Fang, L., & Liu, Z. (2022). Drought-induced unknown protein 1 positively modulates drought tolerance in cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.). *The Crop Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2022.05.013>
- Ma, Q., Xu, X., Wang, W., Zhao, L., Ma, D., & Xie, Y. (2021). Comparative analysis of alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedling transcriptomes reveals genotype-specific drought tolerance mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 203-214. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.008>
- Marín, A., Baldissera, T., Pinto, C., Garagorry, F., Zubieta, A., Giraldo, L., Chirinda, N., Arango, J., & Carvalho, P. (2017). *Una innovación en el manejo del pastoreo como estrategia para mejorar la producción animal y reducir las emisiones de GEI*. [Info note, CGIAR]. Research Program on Climate Change Agriculture and Food Security. <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/89804?show=full>
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659-668.
- Mccarthy, B., Pierce, K. M., Delaby, L., Brennan, A., Fleming, C., & Horan, B. (2013). The effect of stocking rate and calving date on grass production, utilization and nutritive value of the sward during the grazing season. *Grass and Forage Science*, 68(3), 364-377. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2012.00904.x>
- Mendoza-Labrador, J., Romero-Perdomo, F., Abril, J., Hernández, J. P., Uribe-Vélez, D., & Buitrago, R. B. (2021). *Bacillus* strains immobilized in alginate macrobeads enhance drought stress adaptation of Guinea grass. *Rhizosphere*, 19, 100385. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100385>
- Mojica, J. E., Castro, E., León, J., Cárdenas, E. A., Pabón, M. L., & Carulla, J. E. (2009). Efecto de la oferta de pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) sobre la producción y calidad composicional

de la leche bovina. *Livestock Research for Rural Development*, 21(1), 1-12. <http://www.lrrd.org/lrrd21/1/moji21001.htm>

Moreno, L., Crespo, S. C., Pérez, W., & Melgarejo, L. M. (2010). Pruebas bioquímicas como herramientas para estudios en fisiología. En L. M. Melgarejo (Ed.), *Experimentos en fisiología vegetal* (pp. 187-248). Universidad Nacional de Colombia.

Moreno-Galván, A. E., Cortés-Patiño, S., Romero-Perdomo, F., Uribe-Vélez, D., Bashan, Y., & Bonilla, R. R. (2020). Proline accumulation and glutathione reductase activity induced by drought-tolerant rhizobacteria as potential mechanisms to alleviate drought stress in Guinea grass. *Applied Soil Ecology*, 147, 103367. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103367>

Moura, L. M. de F., Costa, A. C., Müller, C., Filho, R. de O. S., Almeida, G. M., Vital, R. G., de Castro, J. N., & Teixeira, M. B. (2018). Drought tolerance in potential oilseed plants for biofuel production. *Australian Journal of Crop Science*, 12(2), 289-298. <https://doi.org/10.21475/ajcs.18.12.02.pne836>

Mouradi, M., Farissi, M., Lahrizi, Y., Oukaltouma, K., Saaidi, A., Khadraji, A., Bouizgaren, A., & Ghoulam, C. (2022). Water deficit effects on canopy light interception, chlorophyll fluorescence, and stomatal conductance in Moroccan alfalfa genotypes. *Plant Physiology Reports*, 27(3), 420-480. <https://doi.org/10.1007/s40502-022-00668-7>

Nieto-Sierra, D. F., Lagos-Burbano, E., Avellaneda-Avellaneda, Y., & Castro-Rincón, E. (2020). Productivity of dairy cows supplemented with silage of fava bean or fodder beet. *Agronomy Mesamerican*, 31(2), 341-351. <https://doi.org/10.15517/am.v31i2.37806>

Norton, M. R., & Morgan, J. M. (2020). Intraspecific variation for osmotic adjustment in white clover (*Trifolium repens*). *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 65(4-5), 302-308. <https://doi.org/10.1080/00288233.2020.1791913>

Oleńska, E., Matek, W., Wójcik, M., Swiecicka, I., Thijs, S., & Vangronsveld, J. (2020). Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: a methodical review. *Science of the Total Environment*, 743, 140682. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682>

Ostrand, M. S., DeSutter, T. M., Daigh, A. L. M., Limb, R. F., & Steele, D. D. (2020). Superabsorbent polymer characteristics, properties, and applications. *Agrosystems, Geosciences and Environment*, 3(1), 1-14. <https://doi.org/10.1002/agg2.20074>

Pardo-Díaz, S., Romero-Perdomo, F., Mendoza-Labrador, J., Delgadillo-Duran, D., Castro-Rincón, E., Silva, A. M. M., Rojas-Tapias, D. F., Cardoso, E. J. B. N., & Estrada-Bonilla, G. A. (2021). Endophytic PGPR improves plant growth and quality, and modulates the bacterial community of an intercropping system. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.715270>

Perera, R. S., Cullen, B. R., & Eckard, R. J. (2019). Growth and physiological responses of temperate pasture species to consecutive heat and drought stresses. *Plants*, 8(7), 1-23. <https://doi.org/10.3390/plants8070227>

Pouris, J., Levizou, E., Karatassiou, M., Meletiou-Christou, M. S., & Rhizopoulou, S. (2022). The influence of the partitioning of sugars, starch, and free proline in various organs of *Cyclamen graecum* on the biology of the species and its resistance to abiotic stressors. *Plants*, 11(9), 1254. <https://doi.org/10.3390/plants11091254>

- Restrepo Arias, C. (2016). *Evaluación de diversas estrategias nutricionales para mitigar las emisiones de metano en ganadería de leche especializada* [Tesis de maestría, Universidad de Antioquia].
- Rocha, J. R., De Mello Prado, R., Teixeira, G. C. M., & De Oliveira Filho, A. S. B. (2021). Si fertigation attenuates water stress in forages by modifying carbon stoichiometry, favouring physiological aspects. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 207(4), 631-643. <https://doi.org/10.1111/jac.12479>
- Sadras, V. O., & Calderini, D. F. (Eds.). (2021). *Crop physiology case histories for major crops*. Elsevier.
- Sadras, V. O., Mahadevan, M., & Zwer, P. K. (2017). Oat phenotypes for drought adaptation and yield potential. *Field Crops Research*, 212(1), 135-144. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.07.014>
- Sánchez-Martín, J., Heald, J., Kingston-Smith, A., Winters, A., Rubiales, D., Sanz, M., Mur, L. A. J., & Prats, E. (2015). A metabolomic study in oats (*Avena sativa*) highlights a drought tolerance mechanism based upon salicylate signalling pathways and the modulation of carbon, antioxidant and photo-oxidative metabolism. *Plant Cell and Environment*, 38(7), 1434-1452. <https://doi.org/10.1111/pce.12501>
- Santana, S. R. A., Voltolini, T. V., Antunes, G. dos R., Da Silva, V. M., Simões, W. L., Morgante, C. V., De Freitas, A. D. S., Chaves, A. R. de M., Aidar, S. de T., & Fernandes-Júnior, P. I. (2020). Inoculation of plant growth-promoting bacteria attenuates the negative effects of drought on sorghum. *Archives of Microbiology*, 202(5), 1015-1024. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01810-5>
- Sarshad, A., Talei, D., Torabi, M., Rafiei, F., & Nejatkah, P. (2021). Morphological and biochemical responses of *Sorghum bicolor* (L.) Moench under drought stress. *SN Applied Sciences*, 3(1), 81. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03977-4>
- Sawada, Y., Koike, T., Ikoma, E., & Kitsuregawa, M. (2020). Monitoring and predicting agricultural droughts for a water-limited subcontinental region by integrating a land surface model and microwave remote sensing. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, 58(1), 14-33. <https://doi.org/10.1109/TGRS.2019.2927342>
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., & Shinozaki, K. (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.014>
- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Haleem Abdul-Wajid, H., & Leonardo Battaglia, M. (2021). Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, 10(2), 259. <https://doi.org/10.3390/plants>
- Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., Handa, N., Kapoor, D., Bhardwaj, R., & Zheng, B. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules*, 9(7), 285. <https://doi.org/10.3390/biom9070285>
- Shehab, A. A., Yao, L., Wei, L., Wang, D., Li, Y., Zhang, X., & Guo, Y. (2020). The increased hydrocyanic acid in drought-stressed sorghums could be alleviated by plant growth regulators. *Crop and Pasture Science*, 71(5), 459-468. <https://doi.org/10.1071/CP20057>
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5), 410-417. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00092-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00092-X)

- Solarte, M. E., Moreno, L., & Melgarejo, L. M. (2010). Fotosíntesis y pigmentos vegetales. En L. M. Melgarejo (Ed.), *Experimentos en fisiología vegetal* (Vol. 1) (pp. 107-122). Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/11144/Experimentos%20en%20Fisiología%20Vegetal%209789587196689.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Stirbet, A., & Govindjee. (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem. II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104(1-2), 236-257. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010>
- Strasser, R. J., Srivastava, A., & Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. En M. Yunus, U. Pathre, & P. Mohanty (Eds.), *Probing photosynthesis: Mechanism, regulation & adaptation* (pp. 443-480). Routledge.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015a). Photosynthesis: carbon reactions. En L. Taiz, E. Zeiger, I. M. Møller, & A. Murphy (Eds.), *Plant physiology and development* (6a ed.) (pp. 145-170). Sinauer Associates Incorporated.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015b). Photosynthesis: the light reactions. En L. Taiz, E. Zeiger, I. M. Møller, & A. Murphy (Eds.), *Plant physiology and development* (Vol. 1) (6a ed.) (pp. 111-143). Sinauer Associates Incorporated.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015c). Secondary metabolites and plant defense. En L. Taiz, E. Zeiger, I. M. Møller, & A. Murphy (Eds.), *Plant physiology and development* (6a ed.) (Vol. 6) (pp. 283-308). Sinauer Associates Incorporated.
- Tapasco, J., Martínez, J., Calderón, S., Romero, G., Ordóñez, D. A., Álvarez, A., Sánchez-Aragón, L., & Ludeña, C. E. (2015). *Impactos económicos del cambio climático en Colombia: sector ganadero*. Cepal; DNP.
- Trejo-Calzada, R., & O'Connell, M. A. (2005). Genetic diversity of drought-responsive genes in populations of the desert forage *Dactylis glomerata*. *Plant Science*, 168(5), 1327-1335. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.01.010>
- Uga, Y., Sugimoto, K., Ogawa, S., Rane, J., Ishitani, M., Hara, N., Kitomi, Y., Inukai, Y., Ono, K., Kanno, N., Inoue, H., Takehisa, H., Motoyama, R., Nagamura, Y., Wu, J., Matsumoto, T., Takai, T., Okuno, K., & Yano, M. (2013). Control of root system architecture by deeper rooting 1 increases rice yield under drought conditions. *Nature Genetics*, 45(9), 1097-1102. <https://doi.org/10.1038/ng.2725>
- Vanegas Moreno, L. A. (2015). *Dinámica de crecimiento y criterios de pastoreo para optimizar el uso de praderas 'Brachiaria brizantha' cv. toledo*. Universidad de La Salle.
- Vitra, A., Deleglise, C., Meisser, M., Risch, A. C., Signarbieux, C., Lamacque, L., Delson, S., Buttler, A., & Mariotte, P. (2019). Responses of plant leaf economic and hydraulic traits mediate the effects of early-and late-season drought on grassland productivity. *AoB Plants*, 11(3), 1-15. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plz023>
- Wang, A., Lam, S. K., Hao, X., Li, F. Y., Zong, Y., Wang, H., & Li, P. (2018). Elevated CO₂ reduces the adverse effects of drought stress on a high-yielding soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivar by increasing water use efficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 660-665. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.10.016>

- Wang, K., Liu, Y., Teng, F., Cen, H., Yan, J., Lin, S., Li, D., & Zhang, W. (2021). Heterogeneous expression of Osa-MIR156bc increases abiotic stress resistance and forage quality of alfalfa. *Crop Journal*, 9(5), 1135-1144. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.11.009>
- Wen, W., Wang, R., Su, L., Lv, A., Zhou, P., & An, Y. (2021). MsWRKY11, activated by MsWRKY22, functions in drought tolerance and modulates lignin biosynthesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 184, 104373. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104373>
- Yadav, B., Jogawat, A., Rahman, M. S., & Narayan, O. P. (2021). Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: a review. *Gene Reports*, 23, 101040. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101040>
- Yang, M. H., Jahufer, M. Z. Z., He, J., Dong, R., Hofmann, R., Siddique, K. H. M., & Li, F. M. (2020). Effect of traditional soybean breeding on water use strategy in arid and semi-arid areas. *European Journal of Agronomy*, 120, 126128. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126128>
- 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>
- Yaseen, R., Hegab, R., Kenaway, M., & Eissa, D. (2020). Effect of super absorbent polymer and bio fertilization on Maize productivity and soil fertility under drought stress conditions. *Egyptian Journal of Soil Science*, 0(0), 0-0. <https://doi.org/10.21608/ejss.2020.35386.1372>
- Zhang, B., & Unver, T. (2018). A critical and speculative review on microRNA technology in crop improvement: current challenges and future directions. *Plant Science*, 274(1), 193-200. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.031>
- Zhao, B., Ma, B. L., Hu, Y., & Liu, J. (2021). Source-sink adjustment: a mechanistic understanding of the timing and severity of drought stress on photosynthesis and grain yields of two contrasting oat (*Avena sativa* L.) genotypes. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(1), 263-276. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10093-5>
- Zhu, Y., Liu, Q., Xu, W., Yao, L., Wang, X., Wang, H., Xu, Y., Li, L., Duan, C., Yi, Z., & Lin, C. (2021). Identification of novel drought-responsive miRNA regulatory network of drought stress response in common vetch (*Vicia sativa*). *Open Life Sciences*, 16(1), 1111-1121. <https://doi.org/10.1515/biol-2021-0109>
- Zia, R., Nawaz, M. S., Siddique, M. J., Hakim, S., & Imran, A. (2021). Plant survival under drought stress: implications, adaptive responses, and integrated rhizosphere management strategy for stress mitigation. *Microbiological Research*, 242, 126626. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126626>