

Biofertilizante como activador del gen *CaWRKY6* asociado a estrés hídrico en *Capsicum annuum* L.

Biofertilizer as gene *CaWRKY6* activator associated with hydric stress in *Capsicum annuum* L.

Santiago Amariles Barrera*, Alejandra Vargas Ruiz, Diego Mauricio Martínez Rivillas*****

Resumen:

Colombia presenta un potencial en cuanto a las condiciones agroecológicas para la producción de pimentón (*Capsicum annuum* L.); sin embargo, su manejo tradicional ha sido principalmente por medio del uso agroquímicos. Por ende, la producción orgánica podría dar valor agregado a los productos, y facilitar su entrada a los mercados internacionales. Se ha evidenciado que los biofertilizantes y bioestimulantes pueden activar genes que ayudan a las plantas a tolerar estrés biótico y abiótico. En este estudio se evaluó la activación del gen *CaWRKY6*, uno de los genes más relevantes para *C.annuum*, después de la aplicación de un biofertilizante sobre plántulas de pimentón cultivadas bajo invernadero. Para ello, Se tomaron muestras foliares a las 48 horas de la aplicación de cinco tratamientos: Biofertilizante a dos concentraciones (5mL/L y 10mL/L), ácido salicílico (5 ppm) y dos controles (agua), y posteriormente se hizo una extracción de ARN y una prueba RT- qPCR para determinar la expresión relativa del gen *CaWRKY6*. Para comparar el efecto coadyuvante del biofertilizante y el ácido salicílico, las plántulas tratadas fueron expuestas a un estrés hídrico del 100% durante 21 días. El análisis de varianza (ANOVA) realizado para evaluar diferencias entre los tratamientos sugiere que los tratamientos con el biofertilizante a 5mL/L y 10mL/L fueron los que tuvieron mayor expresión del gen *CaWRKY6*, así como un mayor crecimiento y una menor marchitez ante el estrés hídrico.

* Biólogo, Universidad CES. Estudiante de Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad CES.
amariles.santiago@uces.edu.co

** Biotecnóloga, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia. Investigadora Unidad de Biotecnología, UBi, Universidad CES. avargas@ces.edu.co

*** PhD Biólogo, Universidad de Antioquia. Docente Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES.
dmartinez@CES.EDU.CO

PALABRAS CLAVE

Pimientos, producción orgánica, bioestimulantes, resistencia a estrés abiótico.

ABSTRACT

Colombia has a potential in terms of agroecological conditions for the production of bell pepper (*Capsicum annuum* L.); however, its traditional management has been mainly through the use of agrochemicals. Therefore, organic production could add value to products and facilitate their entry into international markets. It has been known that biofertilizers and biostimulants could activate genes that help plants to tolerate biotic and abiotic stress. In this study, the activation of the *CaWRKY6* gene, one of the most relevant genes for *C.annuum*, was evaluated after the application of a biofertilizer on pepper seedlings grown in greenhouses. For this, foliar samples were taken 48 hours after the application of five treatments: Biofertilizer at two concentrations (5mL/L and 10mL/L), salicylic acid (5 ppm) and two controls (water), and subsequently a RNA extraction and an RT- qPCR test to determine the relative expression of the *CaWRKY6* gene. To compare the adjuvant effect of biofertilizer and salicylic acid, treated seedlings were exposed to 100% water stress for 21 days. The analysis of variance (ANOVA) performed to evaluate differences between treatments suggests that treatments with biofertilizer at 5mL/L and 10mL/L had the highest expression of the *CaWRKY6* gene, as well as higher growth and less wilting against water stress.

KEY WORDS

Peppers, organic production, biostimulant, abiotic stress resistance.

INTRODUCCIÓN

El estrés biótico como abiótico son factores que tienen la capacidad de afectar la productividad y calidad de los cultivos de alimentos alrededor del mundo, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria global (Abdou Zayan, 2020). Puntualmente, el déficit hídrico es un factor abiótico en los suelos es el principal factor ambiental que

limita el crecimiento y rendimiento de las plantas a nivel mundial (Campos *et al.*, 2014).

Una de las principales causas de la reducción de la disponibilidad de agua en el suelo son los fenómenos producidos por el cambio climático, tales como el incremento en las temperaturas y el cambio en los patrones de las precipitaciones, los cuales pueden generar deficiencias en los niveles de agua en los suelos, haciendo que las plantas pierdan sus funciones biológicas (Abdou Zayan, 2020). Debido al estrés generado, existe una alta posibilidad que las plantas puedan volverse más susceptibles al ataque de enfermedades y plagas (Sinha *et al.*, 2019).

Investigaciones llevadas a cabo en plantas de *C.annuum*, han demostrado que el estrés hídrico y térmico, generan disminución de la tasa de crecimiento, disminución de la producción y calidad de frutos, y fomentan la susceptibilidad al ataque de microorganismos patógenos (Jang *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2018). Es por esto que las condiciones climáticas que promueven el estrés hídrico pueden contribuir activamente a que las condiciones fitosanitarias de los cultivos se vean deterioradas.

Colombia es un país tradicionalmente agrícola con potencial de proveer productos orgánicos con menor carga de insumos de síntesis química, sin embargo, tanto para la fertilización como para el manejo de plagas y enfermedades, en la producción de pimentón, se han utilizado tradicionalmente fertilizantes de síntesis química e insecticidas (Bojacá *et al.*, 2012; Jaramillo *et al.*, 2014). En los agroecosistemas, los productos anteriormente mencionados generan toxicidad para organismos no objetivos, alteración de los ecosistemas acuáticos y terrestres (Campos-Soriano *et al.*, 2020; Mandal *et al.*, 2020), y afectación directa a la salud humana (Elahi *et al.*, 2019). Por tal motivo los mercados de exportación tienen normas cada vez más exigentes encaminadas a la disminución y no uso de agroquímicos (Martínez Bernal, 2012).

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

Países como Estados Unidos tienen alta demanda de pimentón, lo cual se convierte en una oportunidad para que países emergentes como Colombia puedan llegar a tener oportunidad de exportación, gracias a los tratados de libre comercio, en mercados en los cuales se reconoce el valor agregado de acuerdo al tipo de producción, en donde el hecho de ser un producto orgánico juega un papel determinante en los precios de venta (Agronegocios, 2015; MINCIT, 2019), pero para poder acceder a los mercados orgánicos internacionales, es necesario que los agricultores colombianos se certifiquen en prácticas ambientalmente sostenibles y libres de agroquímicos, y así poder dar un valor agregado a sus productos (MADR, 2020; Martínez Bernal, 2012). Para alcanzar este objetivo, los agricultores deben fertilizar sus cultivos por medio de la aplicación de insumos que sean inocuos para el medio ambiente y que protejan la salud humana, entre los cuales se encuentran, los biofertilizantes, los microorganismos eficientes, los extractos de plantas (MADR, 2020).

Se ha encontrado que los biofertilizantes además de contener nutrientes de alta biodisponibilidad para las plantas (Ernita, 2015; Goñi et al., 2018; Kour et al., 2020), contienen algunas sustancias bioestimulantes, como ácido indolacético (Etesami et al., 2015), ácido húmico y fúlvico, fosfitos (Han et al., 2021) y aminoácidos libres (Ahammed et al., 2020; Vijayakumar et al., 2019) que pueden llegar a activar genes y rutas metabólicas que ayudan a las plantas a tolerar y/o ser resistentes ante factores medio ambientales adversos y al ataque de patógenos que puedan alterar su desarrollo (Malo et al., 2015; Orozco-Mosqueda et al., 2020; Xu et al., 2019). De acuerdo a esto, los genes *CaWRKY* es una de las familias de genes más representativas en *C.annuum* a la hora de proteger a las plantas ante el estrés biótico y abiótico (Hussain et al., 2019; Jingyuan et al., 2011; Zheng et al., 2019).

Existen estudios en donde se evidencia el uso de un extracto de *Equisetum arvense* como sustancia bioestimulante con acción activadora de los genes *SIWRKY* en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Malo et al., 2015). Esta especie guarda cierta similitud con las plantas de la especie *C.annuum* en cuanto a su

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

cercanía filogenética (Park et al., 2011), condiciones de cultivo y manejo (Roselló i Oltra et al., 2012); lo cual puede servir de referente para evaluar la activación de genes *CaWRKY* en *C.annuum*. y su relación con la actividad protectante contra estrés biótico y abiótico.

Es preciso encontrar evidencia que permita aportar datos para verificar la efectividad y sustentar el uso y toma de decisiones asertivas para la aplicación de biofertilizantes y/o sustancias bioestimulantes en la nutrición de cultivos de *C.annuum*, demostrando así su acción coadyuvante en la protección ante estrés abiótico por medio de la activación de genes del sistema *CaWRKY*. Por consiguiente, es importante evaluar el efecto de la aplicación de biofertilizantes sobre plántulas de *C.annuum* con el fin de evaluar la activación del gen *CaWRKY6* asociado a estrés hídrico, como una estrategia para enfrentar condiciones ambientales de cultivo adversas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Plántulas de *C.annuum* de la variedad California Wonder fueron obtenidas de un proveedor comercial y establecidas en las instalaciones del invernadero de la Universidad CES sede Poblado, empleando tierra negra como sustrato. Con el ánimo de verificar la calidad y que la carga de aluminio en el sustrato se encontraba dentro de los estándares adecuados para la siembra, se le realizó un análisis fisicoquímico. Adicionalmente, se realizó una curva de retención de agua para determinar la capacidad de campo del sustrato. Una vez las plántulas alcanzaron una altura promedio de 11 centímetros, estas fueron sometidas a los diferentes tratamientos considerados en este estudio.

En este estudio se utilizaron plántulas juveniles de *C.annuum* de aproximadamente 30 días de desarrollo, en esta etapa las plántulas son más susceptibles ante cambios en el riego y al estrés hídrico, debido a que su sistema radicular es menos desarrollado que en plantas adultas (Bykova et al., 2019). Esto permitió detectar

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

cambios en su crecimiento de una manera más precisa a la hora se someter las plántulas a los diferentes tratamientos.

El biofertilizante utilizado para esta investigación es un extracto filtrado derivado de un proceso de fermentación. La composición del biofertilizante es la siguiente: nitrógeno total 50.60 g/L, fósforo 31.72 g/L, potasio 33.27 g/L, calcio 0.70 g/L, magnesio 3.34 g/L, zinc 0,06 g/L, cobre 43.2 ppm, hierro 0.07 g/L, manganeso < 0.1 ppm, azufre 0.63 g/L, boro 0.005 g/L (GIEM - Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares de la Universidad de Antioquia, 2021). Por otro lado, la tierra negra utilizada como sustrato para la siembra de las plántulas presentó la siguiente composición, pH 5.7, textura franco arenosa, 17.24% de materia orgánica, 7,63% de carbono orgánico y aluminio 1.2 cmol/Kg (Laboratorio de Suelos Universidad Nacional de Colombia, 2021).

Aplicación del biofertilizante y ácido salicílico

De las plántulas crecidas en el invernadero se seleccionaron aleatoriamente 30 de ellas, las cuales fueron distribuidas en cinco tratamientos. Primer tratamiento: Biofertilizante líquido disuelto en agua a una concentración de 5mL/L (Bio 5). Segundo tratamiento: Biofertilizante líquido disuelto en agua a una concentración de 10mL/L (Bio 10). Tercer tratamiento: Ácido salicílico (AS) disuelto en agua a una concentración de 5ppm, valores similares ha sido propuestos por otros autores (Jingyuan et al., 2011). Cuarto tratamiento: Control riego limitado (CRL), grupo de plántulas a las cuales se les aplicó agua y que posteriormente fueron expuestas a estrés hídrico. Quinto tratamiento: Control riego total (CRT), grupo de plántulas que tuvieron riego constante a lo largo de todo el experimento, esto con el fin de descartar que las condiciones ambientales del invernadero, el tipo de sustrato en el que fueron sembradas, y el agua de riego, no estuvieran ejerciendo un efecto indeseado sobre las plántulas.

Es importante resaltar que, se realizó una única aplicación del biofertilizante (5mL/L, 10mL/L) y ácido salicílico al inicio del experimento, y fue hecha por medio de

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

aspersión en las hojas y en el agua de riego, garantizando el mismo volumen de solución preparada para todas las plántulas.

Extracción y cuantificación del ARN

Para el análisis de expresión de los genes se consideraron las metodologías propuestas por Han *et al.* (2021) y Verly *et al.* (2020), las cuales sugieren que el tiempo indicado para evidenciar la activación de genes después de la aplicación de sustancias bioestimulantes y proceder a tomar las muestras para extraer el RNA está entre 48 y 72 horas. En este estudio, se tomaron muestras foliares una vez transcurridas 48 horas de las aplicaciones de las sustancias, y se procedió a la extracción del ARN siguiendo las instrucciones del kit Thermo Scientific™ GeneJET RNA Purification Kit. Posteriormente se cuantificó el ARN de cada muestra por medio del equipo NanoDrop™ 2000.

Detección de la expresión del gen *CaWRKY6*:

Para determinar la transcripción del gen *CaWRKY6* y su control *CaActin*, siguiendo la metodología propuesta por Cai *et al.* (2015) se llevó a cabo una prueba RT - qPCR usando los primers:

CaWRKY6 – Forward 5´GGTAGCTAGACAATTATGCTGC 3´

CaWRKY6 – Reverse 5´CAAAAAAAAAATCTTATCAACTTG 3´

CaActin – Forward 5´AGGGATGGGTCAAAAGGATGC 3´

CaActin – Reverse 5´GAGACAACACCGCCTGAATAGC 3´

Para la detectar la expresión del gen *CaWRKY6*, se utilizó el kit Verso 1-Step RT-PCR Kit ReddyMix de ThermoFisher y se siguió el programa sugerido por Dang *et al.* (2013): 95°C por 30 s; 40 ciclos de 95°C por 5 s, 60°C por 34 s; 95°C por 15 s, 60°C por 1 min, 95°C por 15 s, 60°C por 15 s, 95°C por 15 s; en un equipo Eppendorf Mastercycler ep ® *realplex*. Cada reacción consistió de 1uL de muestra (100ng/uL), 10uL de enzima, 1,6uL de primers y 7,4uL de agua, para un volumen total de 20uL.

Para el análisis de la expresión relativa se realizaron cinco réplicas de cada experimento y los datos se analizaron mediante el método “Livak” $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak &

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

Schmittgen, 2001). Este, cuantifica el nivel de expresión relativo normalizado del gen de interés *CaWRKY6*, comparándolo con el gen de referencia de actina *CaActin* que fue previamente reportado en pimentón (Cai et al., 2015; Dang et al., 2013).

Inducción de estrés hídrico, crecimiento en altura y proporción de hojas marchitas

Tres días después de la aplicación de los tratamientos Bio 5, Bio 10, AS y CRL, las plántulas fueron sometidas a estrés hídrico del 100%, retirando completamente el riego, durante un periodo de 21 días, similar a los reportados por Ahammed *et al.* (2020) y Goñi *et al.* (2018). Para evaluar el efecto del estrés hídrico se realizó seguimiento hasta los 21 días, los datos se obtuvieron en los días 0,3,5,8,11,14,16,18,21, después del inicio del estrés hídrico. Para estimar el efecto se consideraron factores como crecimiento en altura y proporción de hojas marchitas.

El crecimiento en altura fue medido con la ayuda de una cinta métrica, y se registró la longitud, expresada en centímetros, desde la base de cada plántula hasta su meristemo apical. Para la medición de hojas marchitas, se calculó la proporción entre el número de hojas que presentaban algún signo de marchitez sobre el total de hojas presentes en cada plántula. Los criterios de selección cualitativos para determinar si las hojas de una plántula presentaban signos de marchitez fueron: enroscamiento de los bordes de las hojas y curvatura de las hojas por debajo de la horizontal (epinastia). Cuando se presentaron una o ambas características, se consideró que hubo presencia de marchitez, por el contrario, se consideró ausencia de la misma.

Análisis estadístico

Para el análisis de la expresión relativa del gen *CaWRKY6*, crecimiento en altura y marchitez, se comprobaron parámetros de normalidad y se ejecutó un análisis de varianza (ANOVA), y para identificar diferencias entre los tratamientos se realizó una prueba de rango múltiple de Tukey ($p < 0,05$). Los análisis se realizaron con ayuda del software estadístico R, versión R Studio 3.6.2.

RESULTADOS

Expresión relativa del gen *CaWRKY6*

Después de 48 horas de las aplicaciones de las sustancias, se puede evidenciar que entre los tratamientos a los cuales se les aplicó biofertilizante no hubo diferencias significativas en cuanto a expresión relativa ($p = 0.797$). A pesar que el tratamiento AS tuvo inducción del gen, esta fue significativamente menor que el tratamiento Bio 5 ($p = 0.0001$). Adicionalmente, la expresión del tratamiento AS fue diferente a los controles. Cabe resaltar que entre los controles no hubo diferencias significativas ($p = 0.9986$) (Figura1).

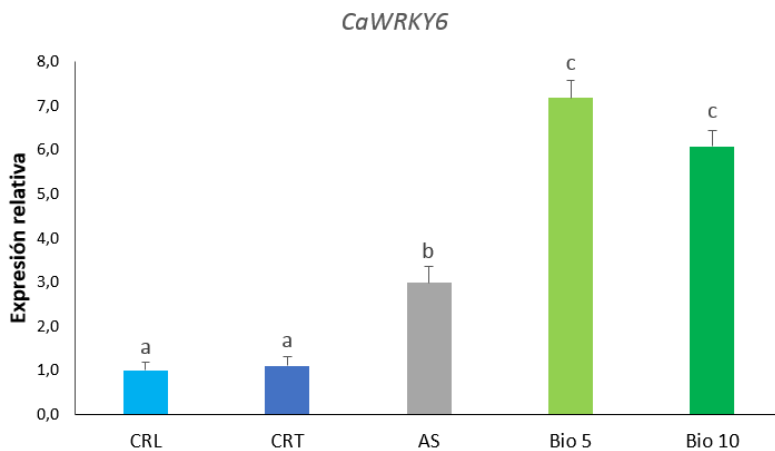


Figura 1. Expresión relativa del gen *CaWRKY6* ("Livak" $2^{-\Delta\Delta CT}$) después de 48 horas de la aplicación de los cinco tratamientos. Las letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas. ANOVA, Tukey ($p < 0,05$)

Crecimiento en altura

Los resultados muestran una tendencia en donde se puede apreciar que desde el inicio del experimento hasta el día 21, el crecimiento en altura de los tratamientos a los cuales se les aplicó biofertilizante tuvo una tendencia casi igual, y no hubo diferencias significativas entre ellos. Por otro lado, los tratamientos AS y CRL tuvieron una tendencia de crecimiento similar, sin embargo, a partir del día 16 hubo un ligero incremento en el crecimiento de las plantas del tratamiento AS, sin que se presentaran diferencias entre ellos (Figura 2).

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

En el día 8, los tratamientos con biofertilizante tuvieron alturas promedio de 15cm sin diferencias significativas entre ellos ($p = 0,855$), es importante notar que ambos tratamientos tuvieron una altura ligeramente mayor al tratamiento CRT, y solo el tratamiento Bio 10 tuvo diferencias significativas con CRT ($p = 0,035$). Para el día 11, los tratamientos a los cuales se les aplicó biofertilizante y el tratamiento CRT tuvieron una altura promedio de 16cm, y no presentaron diferencias significativas.

En el día 14, los tratamientos con biofertilizante tuvieron alturas promedio de 17cm, alturas que fueron menores a los 18,7cm del tratamiento CRT, ésta fue significativamente diferente a los demás tratamientos. A partir del día 16 luego de eliminar el riego, las plántulas detuvieron su crecimiento, mientras que las plántulas del tratamiento CRT continuaron creciendo.

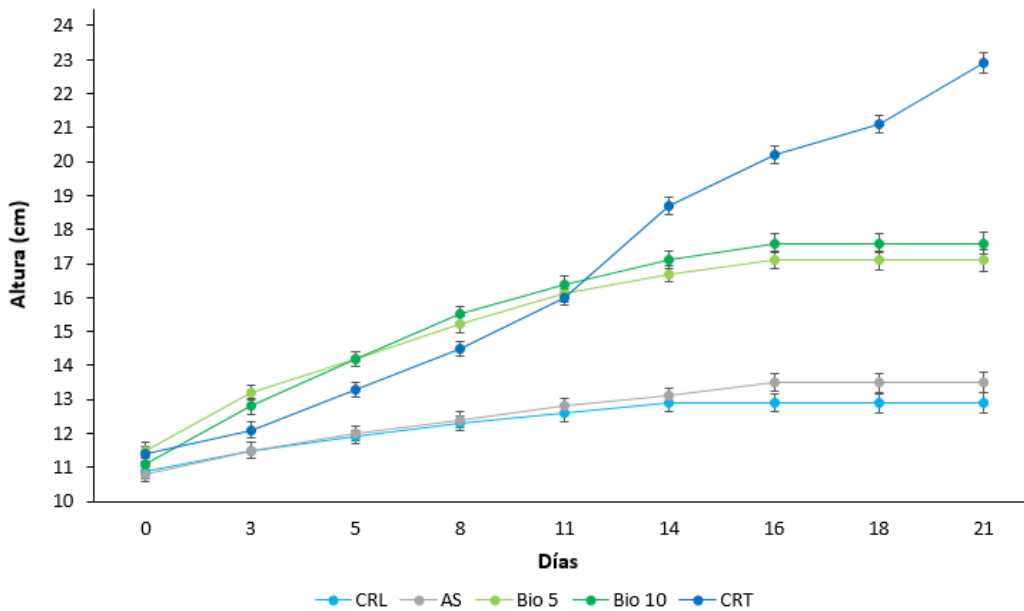


Figura 2. Promedio de crecimiento en altura (cm) para los cinco tratamientos durante los 21 días después del inicio de estrés hídrico. Los resultados son presentados como la media de 6 réplicas biológicas (\pm EE), ANOVA, Tukey ($p < 0,05$).

Proporción de hojas marchitas

Los resultados indican que los cinco tratamientos no muestran signos de marchitez durante los primeros 5 días. Desde el día 5 hasta el día 18, el porcentaje de marchitez de los tratamientos a los cuales se les aplicó biofertilizante tuvo una tendencia casi igual durante los 21 días y no hubo diferencias significativas entre ellos. Situación similar se presentó entre los tratamientos AS y CRL. Es importante tener en cuenta que el tratamiento CRT tuvo riego constante a lo largo de todo el experimento, lo que puede explicar la ausencia de signos de marchitez (Figura 3).

Para el día 8 es importante destacar que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con biofertilizante y el CRT ($p = 0.99$). De otro lado, el tratamiento AS y el CRL presentaron diferencias ($p = 0.03$), el tratamiento AS tuvo un menor porcentaje de marchitez del 15,2%. En el día 11 los tratamientos con biofertilizante presentaron valores del 8%, en contraste, los tratamientos AS y CRL evidenciaron una marchitez cercana al 55%.

Para el día 14 los tratamientos con biofertilizante presentaron una marchitez promedio del 19%, mientras que los tratamientos AS y CRL tuvieron valores cercanos al 100%. En el día 18, todos los tratamientos presentaron valores cercanos al 100% de marchitez y a los 21 días todas las plantas se encontraban secas, excepto en el tratamiento control CRT con riego constante.

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

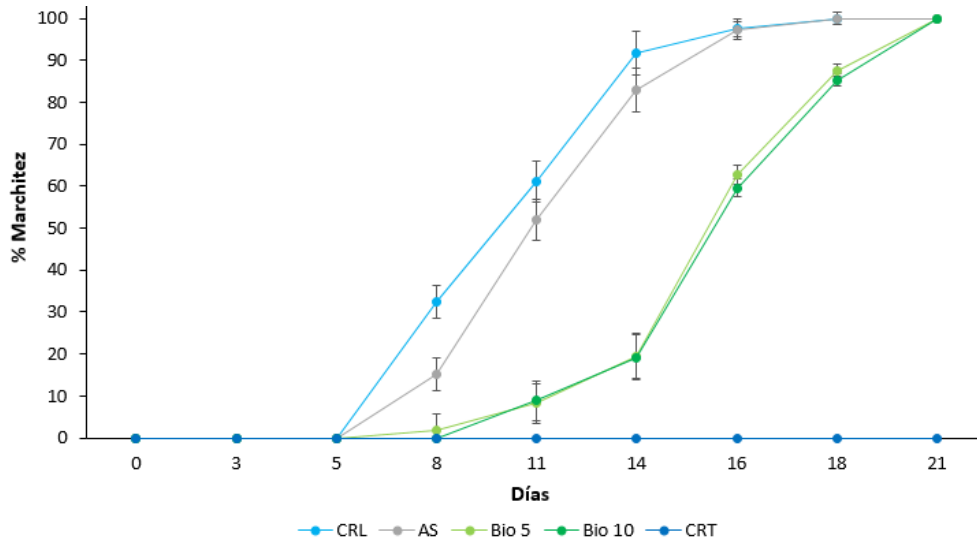


Figura 3. Promedio de marchitez para los cinco tratamientos durante los 21 días después del inicio de estrés hídrico. Los resultados son presentados como la media de 6 réplicas biológicas (\pm EE), ANOVA, Tukey ($p < 0,05$).



Fotografía 1. Día 14 después del inicio del estrés hídrico. De izquierda a derecha: CRL, AS, Bio 5, Bio 10, CRT.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos, permiten evidenciar que las plántulas que tuvieron una mayor expresión del gen *CaWRKY6*, fueron los tratamientos con aplicación de biofertilizante, presentando mayores alturas y menores signos de marchitez en comparación con el AS y CRL, se evidenció una mayor tolerancia al estrés hídrico (Fig 1). Estos resultados son consecuentes con los planteamientos de otros autores (Cai et al., 2015; Hussain et al., 2019; Zheng et al., 2019), los cuales han descrito

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

CaWRKY6 como un gen que participa en varios procesos de tolerancia y resistencia tanto a estrés biótico como abiótico en *C.annuum*; Particularmente, Hussain *et al.* (2019) plantean que este gen juega un papel importante en las vías de señalización mediadas por jasmonatos, etileno, y ácido abscísico, sustancias que no solamente son importantes en la respuesta defensiva de las plantas, sino también en la red de señalización relacionada con el estrés biótico y abiótico. Es por esto que las vías mediadas por jasmonatos, etileno, y ácido abscísico, son un componente crucial de la inducción de la tolerancia al estrés térmico, sequía y la respuesta inmune en pimientos mediada por el gen *CaWRKY6*.

Adicionalmente, Cai *et al.* (2015) encontraron que, en *C.annuum* el gen *CaWRKY6* tiene una capacidad inductora parcial del gen *CaWRKY40* al unirse a su promotor y activarlo, de la misma manera en que *CaWRKY40* está involucrado en la resistencia a condiciones de estrés biótico por ataque de patógenos y tolerancia a altas temperaturas. Las anteriores investigaciones sugieren que la activación de *CaWRKY6* detectada en este trabajo sea un posible mecanismo que permite que las plántulas tratadas con biofertilizante soporten el estrés hídrico de una mejor manera que los tratamientos AS y CRL.

Una posible correlación entre la activación de *CaWRKY6* en *C.annuum* con el mayor crecimiento en altura encontrado, podría estar asociado a que el gen *CaWRKY6* tiene expresión en raíz, tallo, hojas, botones florales y flores, además de participar en el desarrollo de hojas y frutos, como ha sido reportado por autores como Zheng *et al.* (2019). Adicionalmente, soporta el hecho que el gen se haya expresado en los tratamientos control, esto por ser un gen presente en el desarrollo vegetativo.

Con respecto a la aplicación del tratamiento AS, se encontró que la expresión relativa del gen *CaWRKY6* inducida por ácido salicílico tuvo valor de 3.0 (Fig 1). En el día 8 de este experimento, comparando la proporción de hojas marchitas del tratamiento AS 15,2% con el CRL 32,5% (Fig 3), se pudo observar una diferencia significativa ($p = 0,032$); y en los días 11 y 14 a pesar que no hubo diferencias significativas entre

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

los tratamientos AS y CRL (día 11: $p = 0.68$, día 14: $p = 0.77$), sí se puede apreciar que el porcentaje de marchitez del tratamiento AS (día 11: 52.1%, día 14: 82.9%) fue ligeramente menor que el CRL (día 11: 61.2%, día 14: 91.7%). Esto demuestra que el ácido salicílico activó *CaWRKY6*, y con ello hubo una disminución de los signos de marchitez durante los experimentos. Sin embargo, la activación por parte de los tratamientos con Bio 5 y Bio 10 tuvo una mayor expresión relativa (Bio 5: 7.2, Bio 10: 6.1) y un mayor efecto protectante frente a la desecación.

El ácido salicílico ha sido considerado como inductor de respuesta a estrés biótico y abiótico a través de la modulación de procesos metabólicos, actuando como elicitador del sistema de resistencia adquirida en las plantas (Estaji & Niknam, 2020; Thakur et al., 2019). Para el caso de *C. annuum* se han reportado estudios que demuestran cómo el ácido salicílico activa genes del complejo *CaWRKY* los cuales están relacionados con protección ante estrés biótico y abiótico, entre ellos se puede destacar a Jingyuan et al. (2011) quienes reportaron que dos cultivares de *C. annuum* tratados con ácido salicílico presentaron una rápida inducción de transcritos y activación del gen *CaWRKY30*, lo cual se vio reflejado en la protección de las plantas ante el ataque de patógenos como *Meloidogyne incognita*, *Phytophthora capsici*, virus mosaico del tabaco, *Ralstonia solanacearum* y estrés por bajas temperaturas. Adicionalmente, estudios realizados por Dang et al. (2013) reportaron que transcritos de *CaWRKY40*, son inducidos por mecanismos de señalización mediados por ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno, lo cual tiene un efecto protectante ante estrés por calor, alta humedad relativa y al ataque de la bacteria *Ralstonia solanacearum*.

En los resultados de la expresión relativa *CaWRKY6* se puede evidenciar que, a pesar que el tratamiento Bio 10 tuvo una mayor concentración de biofertilizante, el tratamiento Bio 5 tuvo una expresión mayor de *CaWRKY6* (Fig1). Esto puede deberse a un posible punto de saturación en la planta por los minerales que contiene el biofertilizante. Investigaciones realizadas por Campos-Soriano et al. (2020) y Melnikova et al. (2015) muestran que variación en la concentración de nutrientes

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

pueden afectar la expresión de genes relacionados con el metabolismo de proteínas y enzimas en las plantas.

La activación del gen *CaWRKY6*, después de la aplicación del biofertilizante, y su potencial actividad protectante al ser activado antes de someter las plántulas a un estrés hídrico del 100%, podría ser sustentado por el comportamiento que presentaron las plántulas que fueron tratadas con el biofertilizante y sometidas a 11 días de sequía, ya que éstas tuvieron un crecimiento similar a las plántulas que se les suministró riego constante pero que no fueron tratadas con el biofertilizante. La descripción del crecimiento en altura de los diferentes tratamientos se realizó en los días 8, 11 y 14, puesto que durante este rango de tiempo se pudo evidenciar cómo los tratamientos tuvieron el siguiente comportamiento: en el día 8, Bio 5 y Bio 10 con valores de 15.2 cm y 15.5 cm respectivamente, superaron la altura de 14.5 cm del tratamiento CRT; posteriormente en el día 11, Bio 5 y Bio 10 tuvieron valores de 16.1 cm y 16.4 cm los cuales fueron aproximados a los 16 cm del tratamiento CRT; y en el día 14, las alturas de los tratamientos Bio 5 y Bio 10 con valores de 16.7 y 17.1 cm respectivamente, fueron superadas por los 18.7 cm del tratamiento CRT, que siguió incrementándose hasta final de la experimentación (Fig 2).

Por otro lado, el punto que se eligió para empezar a hacer una descripción de la proporción de hojas marchitas fue el día 5, ya que después de este día, los cinco tratamientos empezaron a mostrar signos de marchitez. Para el día 8, las plántulas tratadas con el biofertilizante demostraron tener una tolerancia a la deshidratación, tal que Bio 10 tuvo ausencia total (0%) de hojas marchitas y Bio 5 una ligera presencia de marchitez del 1.85% (Fig 3). Uno de los posibles factores que puede estar involucrado, es la presencia de ácido indolacético detectado en la composición del biofertilizante (Agrilab, 2022), éste regulador de crecimiento se ha reportado en plantas de *C. annuum* como un promotor de acumulación de agua en tejidos foliares bajo condiciones de estrés hídrico (Pérez-Jiménez et al., 2016).

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

En las plántulas del tratamiento CRL, el crecimiento de 12.9 cm hasta el día 14 y la ausencia de marchitez del 0% en los primeros 5 días después de la depleción de agua, puede explicarse debido a la presencia de agua remanente en el sustrato donde fueron sembradas las plántulas, lo cual ayudó a mantener hidratadas las raíces promoviendo su crecimiento y su resistencia a la deshidratación. Sin embargo, se aprecia una marcada diferencia con los tratamientos a los cuales se les aplicó biofertilizante, lo cual respalda su acción protectante ante la deshidratación.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio permitieron identificar que la aplicación de biofertilizante en dos concentraciones 5mL/L y 10 mL/L a plantas de *C.annuum* promueve la activación del gen *CaWRKY6*. Se logra evidenciar un efecto protectante a plántulas de pimentón sometidas a déficit hídrico bajo condiciones de invernadero.

Este trabajo aporta elementos para reconocer la participación del complejo de genes *CaWRKY*, en los procesos de tolerancia al estrés hídrico en plántulas de pimentón. Se reporta también que el ácido salicílico es un inductor de la actividad gen *CaWRKY6* en *C.annuum*. Aunque el ácido salicílico logró activar el gen, no se evidenció una actividad protectante equiparable a la del biofertilizante empleado.

Los resultados aportan información sobre los efectos de biofertilizantes y bioestimulantes como una alternativa viable para abordar el estrés hídrico en el cultivo de *C.annuum*. Esto a su vez podría ser útil para la toma de decisiones en regiones productoras de pimentón que pueden verse afectadas por oleadas de calor y sequía generados por fenómenos de cambio climático.

AGRADECIMIENTOS

Los autores presentan agradecimientos a la Universidad CES y la Dirección de investigación e innovación por los recursos de financiación y a la Unidad de Biotecnología UBi Vegetal y su personal por el valioso apoyo técnico.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Abdou Zayan, S. (2020). Impact of Climate Change on Plant Diseases and IPM Strategies.

En S. Topolovec-Pintarić (Ed.), *Plant Diseases—Current Threats and Management Trends*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87055>

Agrilab. (2022). *Análisis de Fitihormonas del Biofertilizante—Laboratorio de análisis químicos e insumos agrícolas -Agrilab*.

Agronegocios. (2015). *El futuro del pimentón que se produce en Colombia está en la más exclusiva gastronomía*. <https://www.agronegocios.co/agricultura/el-futuro-del-pimenton-esta-en-la-mas-exclusiva-gastronomia-2621159>

Ahammed, G. J., Li, X., Wan, H., Zhou, G., & Cheng, Y. (2020). SIWRKY81 reduces drought tolerance by attenuating proline biosynthesis in tomato. *Scientia Horticulturae*, 270, 109444. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109444>

Bojacá, C. R., Monsalve, O., Casilimas, H., Gil, R., Villagrán, E., Arias, L. A., & Fuentes, L. S. (2012). *Manual de producción de pimentón bajo invernadero*. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. 202 p.

Bykova, O., Chuine, I., & Morin, X. (2019). Highlighting the importance of water availability in reproductive processes to understand climate change impacts on plant biodiversity. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 37, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2019.01.003>

Cai, H., Yang, S., Yan, Y., Xiao, Z., Cheng, J., Wu, J., Qiu, A., Lai, Y., Mou, S., Guan, D., Huang, R., & He, S. (2015). *CaWRKY6 transcriptionally activates CaWRKY40, regulates Ralstonia solanacearum resistance, and confers high-temperature and*

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

- high-humidity tolerance in pepper. *Journal of Experimental Botany*, 66(11), 3163-3174. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv125>
- Campos, H., Trejo, C., Peña-Valdivia, C. B., García-Nava, R., Conde-Martínez, F. V., & Cruz-Ortega, M. R. (2014). Stomatal and non-stomatal limitations of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under water stress and re-watering: Delayed restoration of photosynthesis during recovery. *Environmental and Experimental Botany*, 98, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.10.015>
- Campos-Soriano, L., Bundó, M., Bach-Pages, M., Chiang, S., Chiou, T., & San Segundo, B. (2020). Phosphate excess increases susceptibility to pathogen infection in rice. *Molecular Plant Pathology*, 21(4), 555-570. <https://doi.org/10.1111/mpp.12916>
- Dang, F.-F., Wang, Y.-N., Yu, L., Eulgem, T., Lai, Y., Liu, Z.-Q., Wang, X., Qiu, A.-L., Zhang, T.-X., Lin, J., Chen, Y.-S., Guan, D.-Y., Cai, H.-Y., Mou, S.-L., & He, S.-L. (2013). *CaWRKY40*, a WRKY protein of pepper, plays an important role in the regulation of tolerance to heat stress and resistance to *Ralstonia solanacearum* infection: *CaWRKY40* in heat and *R. solanacearum* infection. *Plant, Cell & Environment*, 36(4), 757-774. <https://doi.org/10.1111/pce.12011>
- Elahi, E., Weijun, C., Zhang, H., & Nazeer, M. (2019). Agricultural intensification and damages to human health in relation to agrochemicals: Application of artificial intelligence. *Land Use Policy*, 83, 461-474. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2019.02.023>
- Ernita, M. (2015). *THE EFFECT OF FERMENTED LIQUID ORGANIC FERTILIZER AND POTASSIUM FOR NUTRIENT UPTAKE AND YIELD OF RICE AT TROPICAL UPLAND*. 9(04), 6.
- Estaji, A., & Niknam, F. (2020). Foliar salicylic acid spraying effect' on growth, seed oil content, and physiology of drought-stressed *Silybum marianum* L. plant. *Agricultural Water Management*, 234, 106116. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106116>

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

Etesami, H., Alikhani, H. A., & Hosseini, H. M. (2015). Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*, 2, 72-78.

<https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.02.008>

GIEM - Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares de la Universidad de Antioquia. (2021). *Análisis fisicoquímico biofertilizante*.

Goñi, O., Quille, P., & O'Connell, S. (2018). Ascophyllum nodosum extract biostimulants and their role in enhancing tolerance to drought stress in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 126, 63-73.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.02.024>

Han, X., Xi, Y., Zhang, Z., Mohammadi, M. A., Joshi, J., Borza, T., & Wang-Pruski, G.

(2021). Effects of phosphite as a plant biostimulant on metabolism and stress response for better plant performance in *Solanum tuberosum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 210, 111873. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111873>

Hussain, A., Noman, A., Khan, M. I., Zaynab, M., Aqeel, M., Anwar, M., Ashraf, M. F., Liu, Z., Raza, A., Mahpara, S., Bakhsh, A., & He, S. (2019). Molecular regulation of pepper innate immunity and stress tolerance: An overview of WRKY TFs. *Microbial Pathogenesis*, 135, 103610. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103610>

Jang, J.-O., Kim, B.-H., Lee, J.-B., Joa, J.-H., & Koh, S. (2019). Evaluation of Bacterial Spot Disease of *Capsicum annuum* L. in Drought Stress Environment by High Temperature. *Research in Plant Disease*, 25(2), 62-70.

<https://doi.org/10.5423/RPD.2019.25.2.62>

Jaramillo, J., Aguilar, P., Espitia, E., Tamayo, P., & Guzman, M. (2014). *Modelo productivo del cultivo de pimentón bajo condiciones protegidas en el oriente antioqueño* (1.^a ed.). Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria - Corpoica.

<https://doi.org/10.21930/978-958-8711-72-0>

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

- Jingyuan, Z., Xuexiao, Z., Zhenchuan, M., & Bingyan, X. (2011). A Novel Pepper (*Capsicum annuum* L.) WRKY Gene, *CaWRKY30*, Is Involved in Pathogen Stress Responses. *Journal of Plant Biology*, *54*(5), 329-337.
<https://doi.org/10.1007/s12374-011-9171-x>
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A. N., Yadav, N., Kumar, M., Kumar, V., Vyas, P., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2020). Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *23*, 101487. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487>
- Laboratorio de Suelos Universidad Nacional de Colombia. (2021). *Análisis fisicoquímico de sustrato de siembra*.
- Lee, S. G., Kim, S. K., Lee, H. J., Lee, H. S., & Lee, J. H. (2018). Impact of moderate and extreme climate change scenarios on growth, morphological features, photosynthesis, and fruit production of hot pepper. *Ecology and Evolution*, *8*(1), 197-206. <https://doi.org/10.1002/ece3.3647>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, *25*(4), 402-408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- MADR. (2020). *Resolucion_187_de_2006.Normatividad Sello Ecológico*.
https://www.minagricultura.gov.co/tramites-servicios/Documents/Resolucion_187_de_2006.pdf
- Malo, I., Bernacchia, G., & Arevalo, P. (2015). Activación de genes de defensa en plantas de tomate de mesa *lycopersicum esculentum* L., a través de la aplicación de sustancias químicas y naturales. *La Granja*, *21*(1).
<https://doi.org/10.17163/lgr.n21.2015.05>
- Mandal, A., Sarkar, B., Mandal, S., Vithanage, M., Patra, A. K., & Manna, M. C. (2020). Impact of agrochemicals on soil health. En *Agrochemicals Detection, Treatment and*

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

Remediation (pp. 161-187). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103017-2.00007-6>

Martínez Bernal, L. F. (2012). *Sostenibilidad y desarrollo: El valor agregado de la agricultura orgánica* (Primera edición). Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, Facultad de Agronomía, Facultad de Ciencias Económicas, Facultad de Ingeniería, Programa Interdisciplinario de Investigación y Desarrollo en Gestión, Productividad y Competitividad-Biogestión.

MINCIT. (2019). *Pimentón colombiano, a un paso de llegar a Estados Unidos, el mayor importador a nivel mundial*. MINCIT.

<http://mincit.gov.co/prensa/noticias/comercio/pimenton-colombiano-a-un-paso-de-llegar-a-estados>

Orozco-Mosqueda, Ma. del C., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2020). ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research*, 235, 126439.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126439>

Park, M., Jo, S., Kwon, J.-K., Park, J., Ahn, J. H., Kim, S., Lee, Y.-H., Yang, T.-J., Hur, C.-G., Kang, B.-C., Kim, B.-D., & Choi, D. (2011). Comparative analysis of pepper and tomato reveals euchromatin expansion of pepper genome caused by differential accumulation of Ty3/Gypsy-like elements. *BMC Genomics*, 12(1), 85.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-85>

Pérez-Jiménez, M., Pazos-Navarro, M., Piñero, M. C., Otálora-Alcón, G., López-Marín, J., & del Amor, F. M. (2016). Regulation of the drought response of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) by foliar-applied hormones, in Mediterranean-climate greenhouse conditions. *Plant Growth Regulation*, 80(2), 159-169.

<https://doi.org/10.1007/s10725-016-0153-3>

Biofertilizante activador del gen *CaWRKY6*

Roselló i Oltra, J., Porcuna, J. L., & Sociedad Española de Agricultura Ecológica. (2012).

Cultivo ecológico del tomate y del pimiento. Sociedad Española de Agricultura Ecológica. 104 p.

Sinha, R., Irulappan, V., Mohan-Raju, B., Suganthi, A., & Senthil-Kumar, M. (2019). Impact of drought stress on simultaneously occurring pathogen infection in field-grown chickpea. *Scientific Reports*, *9*(1), 5577. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41463-z>

Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., & Puri, S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *12*, 1-12.
<https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.11.004>

Vijayakumar, S., Durgadevi, S., Arulmozhi, P., Rajalakshmi, S., Gopalakrishnan, T., & Parameswari, N. (2019). Effect of seaweed liquid fertilizer on yield and quality of *Capsicum annum* L. *Acta Ecologica Sinica*, *39*(5), 406-410.
<https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.10.001>

Xu, D., Deng, Y., Xi, P., Yu, G., Wang, Q., Zeng, Q., Jiang, Z., & Gao, L. (2019). Fulvic acid-induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in table grapes may be mediated by regulating phenylpropanoid metabolism. *Food Chemistry*, *286*, 226-233.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.015>

Zheng, J., Liu, F., Zhu, C., Li, X., Dai, X., Yang, B., Zou, X., & Ma, Y. (2019). Identification, expression, alternative splicing and functional analysis of pepper WRKY gene family in response to biotic and abiotic stresses. *PLOS ONE*, *14*(7), e0219775.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219775>