

Efecto bioestimulante de una chalcona sintética sobre frijol guajiro (*Vigna unguiculata* L. Walp)*

Biostimulant effect of a synthetic chalcone on guajiro beans (*Vigna unguiculata* L. Walp)

VALERO-VALERO, NELSON-OSVALDO¹; CHIMA-MARTÍNEZ, KENIA-ADOLFINA²; GÓMEZ-GÓMEZ, JAVIER-ALEXANDER³

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 15 de Febrero 2022

Aprobado para publicación: 22 de Marzo 2023

* Título del proyecto de origen: "Evaluación del efecto de una chalcona sintética sobre el crecimiento temprano del frijol guajiro (*Vigna unguiculata* (L.) walp.)" Financiación: Universidad de La Guajira. Finalización: 4 febrero de 2020.

- 1 Universidad de la Guajira, Facultad de Ciencias Básicas y aplicadas, Grupo de investigación Desarrollo de estudios y tecnologías ambientales del carbono (DESTACAR). Ph.D Ciencias agrarias. La Guajira, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9186-6245>
- 2 Universidad de la Guajira, Facultad de Ciencias Básicas y aplicadas, Grupo de investigación Desarrollo de estudios y tecnologías ambientales del carbono (DESTACAR). Bióloga. La Guajira, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-0309-692a>
- 3 Universidad Popular del Cesar, Facultad de Ciencias Básicas y educación, Grupo de investigación en Microbiología agrícola y Ambiental (MAGYA). Universidad de la Guajira, Facultad de Ciencias Básicas y aplicadas, Grupo de investigación Desarrollo de estudios y tecnologías ambientales del carbono (DESTACAR). Ph.D Química. La Guajira. Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9505-6987>.

Cómo citar este artículo

VALERO-VALERO, NELSON-OSVALDO; CHIMA-MARTÍNEZ, KENIA-ADOLFINA; GÓMEZ-GÓMEZ, JAVIER-ALEXANDER. Efecto bioestimulante de una chalcona sintética sobre frijol guajiro (*Vigna unguiculata* L. Walp). Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 21, n. 2, 2023, p. 62-74. DOI: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v21.n2.2023.2153>

RESUMEN

El frijol guajiro es un cultivo de subsistencia importante en zonas secas del Caribe colombiano, allí, los factores ambientales a menudo ocasionan estrés vegetal y limitan la producción agrícola. Los bioestimulantes vegetales mejoran el desempeño de las plantas bajo condiciones de estrés; las chalconas no se han estudiadas como bioestimulantes pero son moléculas multifuncionales que expresan bioactividad y están involucradas en la regulación del metabolismo vegetal, por lo anterior es conveniente estudiar sus propiedades como bioestimulantes en la agricultura. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la chalcona sintética 3-(4-nitrofenil)-1-(piridin-2-il)-prop-2-en-1-ona (CHSNPP) sobre el crecimiento temprano del frijol guajiro (*Vigna unguiculata*), bajo condiciones de cámara de crecimiento vegetal, para aportar evidencia sobre una posible aplicación como bioestimulante. Se probaron soluciones de CHSNPP a concentraciones de 25, 50, 100 y 150 ppm, y se evaluaron dos formas de aplicación (por aspersión foliar - AF e inmersión - IM de plántulas en la solución). El tratamiento mediante IM con 25 ppm ocasionó un incremento del 321 % en el área superficial de raíces, con 50 ppm hubo incremento del 78 % en el número de nódulos formados por la simbiosis con rizobios nativos presentes en el suelo, además de incrementos del 111 % en biomasa y del 16 % en el índice de contenido de clorofila -ICC, finalmente con 150 ppm se incrementó el número de raíces hasta el 82 %; por su parte, el tratamiento mediante AF con 150 ppm ocasionó incrementos en área foliar y biomasa del 101 % y 137 %. Se concluye que las respuestas observadas en las plantas tratadas con CHSNPP son características de los mecanismos de acción de algunos bioestimulantes no microbianos, lo que permite sugerir un posible uso como bioestimulante en frijol guajiro.

ABSTRACT

Guajiro bean is an important subsistence crop in dry lands of the Colombian Caribbean, where environmental stresses often enhance plant stress and limit crop production. Plant biostimulants improve plant performance under stress conditions; chalcones have not been studied as biostimulants but they are multifunctional molecules that express bioactivity and are involved in the regulation of plant metabolism; therefore, it is convenient to study their properties as biostimulants in agriculture. The aim of this work was to evaluate the effect of the synthetic chalcone 3-(4-nitrophenyl)-1-(pyridin-2-yl)-prop-2-en-1-one (CHSNPP) on the early growth of guajiro bean (*Vigna unguiculata*), under plant growth chamber conditions, to provide evidence for a possible application as a biostimulant. CHSNPP solutions were tested at concentrations of 25, 50, 100 and 150 ppm, and two forms of application were evaluated (foliar spray - AF and immersion - IM of seedlings in the solution). The IM treatment with 25 ppm caused an increase of 321 % in the surface area of roots, with 50 ppm there was an increase of 78 % in the number of nodules formed by symbiosis with native rhizobia present in the soil, in addition to increases of 111 % in biomass and 16 % in the chlorophyll

PALABRAS CLAVES:

Bioestimulación; Nódulos; Rizobios; Chalconas; Simbiosis; Promoción del crecimiento vegetal; Leguminosas; Estrés vegetal.

KEYWORDS:

Biostimulation; Nodules; Rhizobia; Chalcones; Symbiosis; Plant growth promotion; Legumes; Plant stress..

content index -ICC, finally with 150 ppm the number of roots increased up to 82 %; the PA treatment with 150 ppm resulted in increases in leaf area and biomass of 101 % and 137 %. It is concluded that the responses observed in plants treated with CHSNPP are characteristic of the mechanisms of action of some non-microbial biostimulants, which suggests a possible use as a biostimulant in guajiro beans.

INTRODUCCIÓN

Los bioestimulantes en el contexto de la agricultura son definidos como un grupo de sustancias o microorganismos benéficos que inducen respuestas fisiológicas en las plantas, especialmente bajo condiciones desfavorables, y conducen a mejorar su desempeño coadyuvando a la tolerancia frente al estrés (Shah *et al.*, 2021), intervienen positivamente en la regulación del metabolismo primario y secundario, modifican la arquitectura del sistema radical, mejoran las habilidades nutricionales (Rouphael and Colla, 2020a) y favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas (Nardi *et al.*, 2021). Los bioestimulantes vegetales comprenden ácidos húmicos y fúlvicos, hidrolizados de proteínas, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, oligosacáridos, compuestos inorgánicos, extractos de algas y productos botánicos, además de los insumos a base de microorganismos (Bhupenchandra *et al.*, 2020; Du Jardin *et al.*, 2020, Shahrajabian *et al.*, 2021).

Las chalconas son compuestos fenólicos que se encuentran de manera natural en las plantas, se pueden encontrar en forma de agliconas y O-glucósidos de chalcona en diferentes familias botánicas, con especial distribución en la familia Leguminosae. Se consideran moléculas multifuncionales, puesto que una estructura en particular puede mostrar múltiples actividades biológicas (Aljalami *et al.*, 2020); están involucradas en procesos del metabolismo vegetal primario y secundario (Yingjia *et al.*, 2022) y presentan propiedades bioactivas en organismos procariotas y algunos eucariotas (Cadena, 2018), entre ellas esta su actividad antioxidante (Goyal *et al.*, 2021), antimicrobiana (Vasquez-Martinez *et al.*, 2019) y anticancerígena (Constantinescu and Lungu, 2021). Se considera que la presencia de dobles enlaces en conjugación con el grupo carbonilo le confiere a las chalconas la funcionalidad que ocasiona las actividades biológicas, puesto que la eliminación de estas características las hace inactivas (Singh *et al.*, 2014).

Hasta el momento, las chalconas no se han incluido dentro de la categoría de los bioestimulantes vegetales, sin embargo, estos compuestos podrían considerarse dentro de esta definición, tras comprobar sus aplicaciones en la agricultura. Esto puede ser factible dado que están involucradas en una variedad de funciones metabólicas vegetales como la actividad antioxidante, la capacidad para inducir la respuesta de defensa frente al ataque por patógenos (Aljalami *et al.*, 2020), además de favorecen la comunicación entre la raíz y los microorganismos benéficos. Se ha encontrado que pueden estimular la reproducción, el crecimiento y favorecer la adaptación vegetal ante factores de estrés (Rai *et al.*, 2021) como las infecciones fúngicas o bacterianas y la radiación UV (Jayaraman *et al.*, 2021). En algunas plantas leguminosas las chalconas se han relacionado con la inducción de la expresión de los genes nod, responsables de la formación de nódulos fijadores de nitrógeno por bacterias del género *Rhizobium* (Stambulska *et al.*, 2020), dado que después de la biosíntesis de las chalconas ocurre una isomerización que da origen a los flavonoides (Zhou *et al.*, 2021), estos compuestos son intermediarios de la comunicación planta-bacteria, lo cual es un requisito necesario para la formación de la simbiosis (Mathesius, 2019; Rosa *et al.*, 2021).

Las chalconas se pueden extraer a partir de los tejidos vegetales, sin embargo, la extracción con fines tecnológicos y comerciales para aplicaciones de uso masivo no es totalmente factible, debido a la baja concentración y dificultad de purificación, por lo cual se ha investigado la producción de chalconas sintéticas en mayores cantidades y a bajo costo, para diferentes propósitos industriales (Ibarra y Gutierrez, 2016). Algunos estudios de chalconas sintéticas han mostrado su capacidad para promover el crecimiento en diferentes plantas medicinales como Albahaca, menta y flor de Jamaica (Hassan *et al.*, 2020) y leguminosas como soya, maní y garbanzo (Kalambe, 2017)

Las zonas áridas y semiáridas de La Guajira son afectadas por problemas de seguridad alimentaria y este es uno de los cultivos de subsistencia de mayor importancia, dado que reúne características favorables para su producción agroecológica (Valero *et al.*, 2021), de tal forma que es conveniente estudiar estrategias para incrementar su producción, para ello es necesario desarrollar y evaluar tecnologías pertinentes para mejorar la adaptación y el desempeño de las plantas bajo las condiciones climáticas y edáficas limitantes en esta zona.

Así, en este trabajo se estudiaron algunos efectos de la aplicación de la chalcona sintética 3-(4-nitrofenil)-1-(piridin-2-il)-prop-2-en-1-ona sobre aspectos relacionados con el crecimiento temprano y la formación de nódulos fijadores de nitrógeno bajo condiciones controladas, con el propósito de aportar evidencia sobre el posible uso de esta chalcona como un agente bioestimulante para el frijol guajiro.

MÉTODO

Síntesis de la chalcona

El compuesto 3-(4-nitrofenil)-1-(piridin-2-il)-prop-2-en-1-ona que en adelante se denominará (CHSNPP) (figura 1) fue preparada siguiendo la metodología descrita por Liu *et al.* (2013) con pequeñas adaptaciones. Se preparó una suspensión en agua de la piridina (1 mmol) y el aldehído correspondiente (1,05 mmol), se tomaron 10 ml de dicha suspensión y se adicionaron 10 mL de NaOH en solución (1,0 mmol), esta mezcla fue agitada durante 12 horas a temperatura ambiente, el precipitado resultante se separó por filtración y se recrystalizó en metanol para generar un polvo amarillo claro. El rendimiento fue del 86 %, el compuesto resultante presenta un punto de fusión de 157 °C y las siguientes bandas características del espectro Infrarrojo (ATR, cm^{-1}): 1668 (banda C=O), 1606 (banda C=N), 1577 (banda C=C).

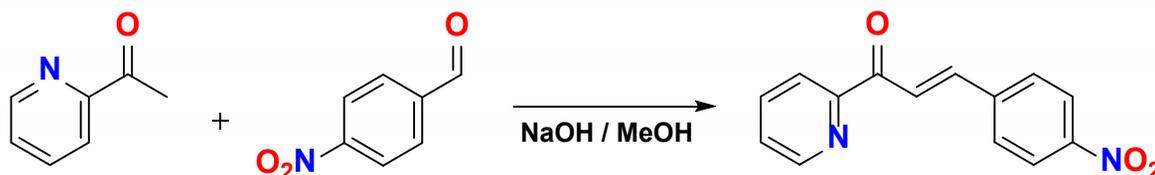


Figura 1. Síntesis de la 3-(4-nitrofenil)-1-(piridin-2-il)-prop-2-en-1-ona (CHSNPP)

Evaluación del efecto de la chalcona sobre el crecimiento temprano y formación de nódulos por rizobios

El experimento fue desarrollado en el laboratorio de ciencias ambientales de la Universidad de La Guajira (ciudad de Riohacha, Colombia). Las semillas de frijol guajiro utilizadas en los experimentos se compraron a cultivadores locales en el mercado público de la ciudad de Riohacha. Para los ensayos se utilizó suelo fresco colectado en los primeros 20 cm del horizonte superficial, en un predio rural cultivado con *V. unguiculata* localizado en la localidad de Uribia (11°35'38,8" N, y 72°19'28,5" W), en una zona semiárida de la media Guajira, cuyas características son: textura arenosa franca (arena 84 %, limo 10 %, arcilla 6 %), pH alcalino (8), alta salinidad (conductividad eléctrica de 17,8 dSm), contenido limitante de N (0,25 %), contenido medio de fósforo disponible (124 ppm) baja capacidad de intercambio de cationes (9,2 cmol (c) Kg^{-1}), bajo contenido de materia orgánica (0,67 %), baja saturación de bases (contenido de K, Mg, Ca y Na es de 0,44, 1,6, 6,7 y 0,45 $\text{cmolc}^*\text{kg}^{-1}$).

Para evaluar el efecto sobre el crecimiento temprano y formación de nódulos por rizobios, en plantas de frijol guajiro (*Vigna unguiculata* L. Walp), se realizó por duplicado un experimento en macetas, bajo condiciones controladas en una cámara de crecimiento vegetal. Se evaluó el efecto de tres concentraciones de CHSNPP (25, 50, 100 y 150 ppm) y dos formas de aplicación: 1) inmersión (IM) completa de plántulas tras 24 horas después de la germinación, en las soluciones de CHSNPP, y 2) aspersión foliar (AF) de las soluciones sobre plántulas.

Se tomaron semillas de *V. unguiculata* y se lavaron con solución de detergente al 1 % durante 10 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua potable y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 % por 15 minutos, luego se enjuagaron tres veces con agua estéril y se llevaron a germinación *in vitro* en cámara de humedad, después de la germinación se tomaron grupos de 20 plántulas con tamaño de radícula homogéneo y se sumergieron por tres horas en cada una de las cuatro soluciones de CHSNPP y en agua destilada para el tratamiento control; las soluciones se prepararon en agua estéril desionizada a partir de una solución stock de CHSNPP utilizando acetona al 20 % como diluyente. Cada plántula tratada se sembró en una maceta con 500 g de suelo, en las muestras de suelo utilizado previamente se confirmó la presencia de una población basal de rizobios con capacidad para nodular esta leguminosa (Valero *et al.*, 2021).

Las macetas con las plántulas tratadas se llevaron a una cámara de crecimiento vegetal SANYO MLR-351 bajo un fotoperíodo de 12 horas, humedad relativa entre 60 y 80 %, temperatura entre 26 y 29 °C y riego por capilaridad con agua potable, tres veces por semana. Para la aplicación por aspersión foliar se tomaron grupos de 20 plántulas con tamaño de radícula homogéneo, obtenidas como se describió previamente, se sembraron en las macetas con suelo y 7 días después de la aparición de las primeras hojas se asperjaron 5 mL de las soluciones de 25, 50, 100 y 150 ppm de de CHSNPP sobre el haz y envés de todas las hojas, la aplicación se llevó a cabo una hora después de concluido el período de iluminación, en el tratamiento control se asperjaron las plantas con agua destilada; las plantas se mantuvieron bajo las mismas condiciones descritas previamente.

A los 21 y 28 días después de la emergencia de las plantas se determinó el índice relativo de contenido de clorofila (ICC), utilizando un medidor de clorofila digital SPAD-502 marca Minolta, se tomó el valor ICC calculado por el equipo tras el registro de la transmitancia de la luz a 650 y 940 nm en todos los folíolos de 3 hojas ubicadas en la parte media de la planta. Después de 30 días se desenterraron las plantas, se lavaron minuciosamente y se determinaron las siguientes variables: área foliar, número de raíces, biomasa seca de raíz y follaje tras secado en horno a 70 °C hasta peso constante. Adicionalmente se determinó el número de nódulos radicales fijadores de nitrógeno activos por planta, para ello se contaron los nódulos y tras hacer un corte por mitad de cada nódulo se verificó la coloración roja brillante en el interior dada por la presencia de leghemoglobina; este dato se tomó como indicador del desarrollo de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, a causa de la población nativa de rizobios que estaba presente en el suelo utilizado para el ensayo. A partir de secciones desinfectadas de nódulos activos se procedió a hacer un aislamiento de rizobios en medio selectivo YMA con adición de Rojo Congo, siguiendo la metodología descrita por Cubillos-Hinojosa *et al.* (2021), esto para confirmar que los nódulos formados corresponden efectivamente a la simbiosis con *Rhizobium*.

Los datos de cada variable fueron sometidos a verificación de los parámetros de normalidad y homogeneidad de varianza. Se realizó un análisis de varianza bajo un diseño en bloques, por cada variable, utilizando el paquete de análisis estadístico SAS® versión University Edition. Se realizaron pruebas de comparación de medias de cada variable mediante el test de Duncan ($p=0,05$) para establecer el mejor tratamiento en cada una de las variables analizadas.

RESULTADOS

Efectos de la aplicación de chalcona sintética en el crecimiento de *V. unguiculta*

Los dos métodos de aplicación de CHSNPP, por inmersión (IM) y aspersión foliar (AF) ocasionaron un efecto positivo con respecto a las plantas no tratadas, en relación al área foliar, número de raíces, la biomasa del follaje y raíces, además de la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces; pero no se encontró diferencia significativa que indique que una forma de aplicación presenta mejores resultados que la otra. En la figura 2A se observa que todas las concentraciones de CHSNPP utilizadas ocasionan incrementos en el área foliar, con un mejor efecto ocasionado por las concentraciones de 100 y 150 ppm en aplicación por AF. También se observa una tendencia al incremento en el número de raíces (figura 2B) por planta en respuesta al tratamiento con todas las concentraciones en las dos formas de aplicación, pero solamente el tratamiento a 150 ppm en aplicación por IM presentó diferencia significativa en esta variable. Igualmente, los tratamientos con 50 ppm por IM, 100 y 150 ppm por AF ocasionaron diferencias significativas en la biomasa del follaje (figura 2C), mientras que las demás concentraciones en los dos métodos de aplicación mostraron tendencias al incremento en esta variable.

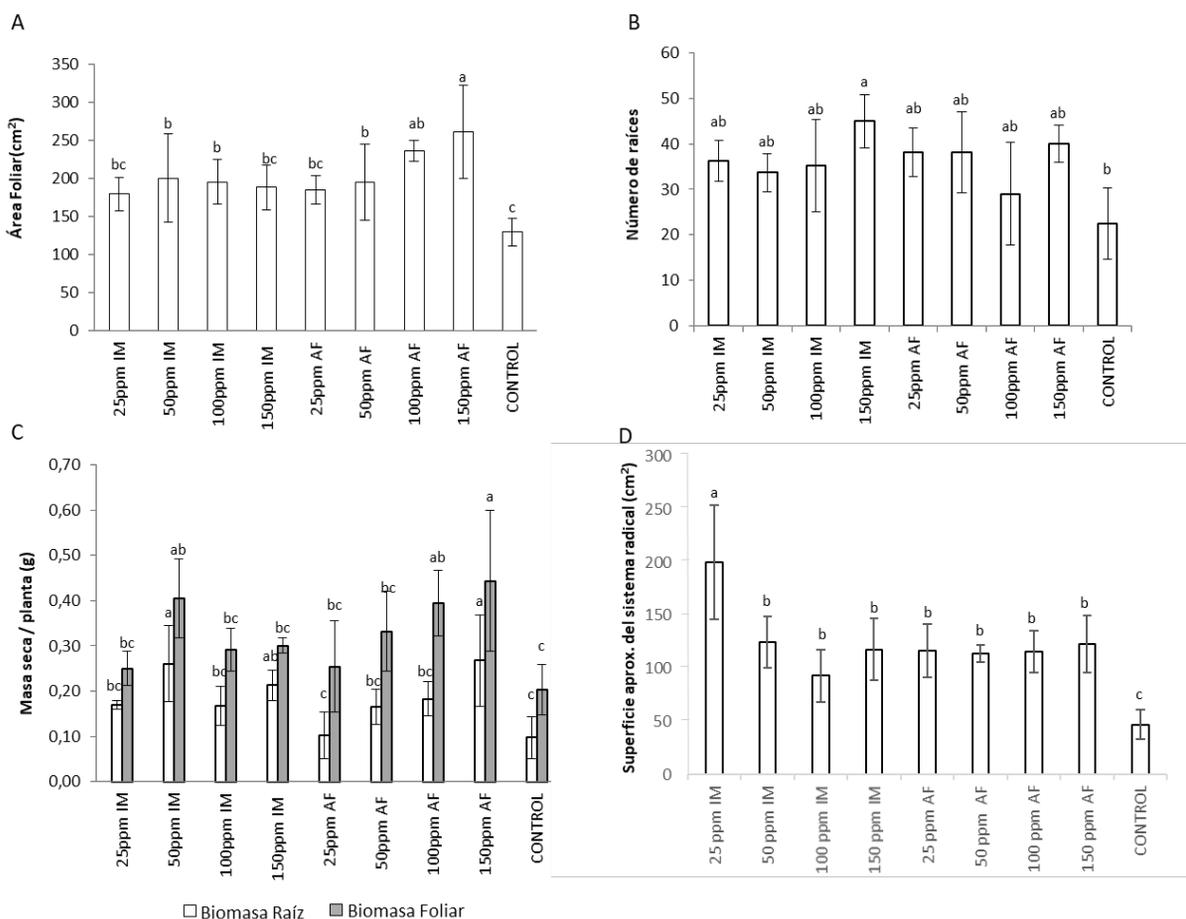


Figura 2. Parámetros de crecimiento en plantas de frijol guajiro tratadas con CHSNPP mediante aplicación por inmersión de las plántulas (IM) en la solución de chalcona y aspersión foliar (AF). A. Área Foliar B. Número de raíces C. Masa seca D. Superficie del sistema radical, comparaciones con el test de Duncan ($p=0,05$).

En complemento al anterior resultado, las observaciones del sistema radical (figura 3) muestran algunos cambios cualitativos en la arquitectura de las raíces de plantas tratadas con diferentes concentraciones de CHSNPP mediante las dos formas de aplicación probadas, mientras que en las raíces de las plantas control se observan raíces más cortas y apariencia menos ramificada, en las raíces de las plantas tratadas se observa proliferación de raíces y mayor longitud de las raíces principales, así como mayor desarrollo de raíces secundarias y raicillas finas. En concordancia con estas observaciones, la determinación de biomasa de las raíces mostró que algunas concentraciones de CHSNPP aplicadas por los dos métodos ocasiona mayor ganancia de biomasa (figura 2C), los mayores valores se presentaron para las plantas tratadas con 50 ppm por inmersión de las plántulas en solución de CHSNPP y 150 ppm por aspersión foliar ($P < 0,05$). Todos los tratamientos también ocasionaron aumento significativo en la superficie estimada del sistema radical, con diferencias muy marcadas con respecto al tratamiento control (Figura 2D).



Figura 3. Arquitectura del sistema radical de plantas de frijol guajiro tratadas con CHSNPP: A) control, B) 150 ppm -AF, C) 25 ppm -IM y D) 50 ppm - IM.

Los resultados descritos aportan evidencia de efectos estimuladores del crecimiento vegetal por parte de CHSNPP sobre las plantas de *V. unguiculata*. Se pudieron identificar claramente tres respuestas, en primer lugar, un incremento en el área foliar y en consecuencia en la acumulación de biomasa, en segundo lugar, cambios en el sistema radical conducentes a la proliferación de raíces y ganancia de biomasa y en tercer lugar una aparente estimulación del proceso de nodulación de las raíces por los rizobios del suelo. Estas tres respuestas se pueden relacionar con los mecanismos de estimulación del crecimiento y desarrollo vegetal descritos para la mayoría de agentes bioestimulantes, como la estimulación del metabolismo primario (Gupta *et al.*, 2021), la modulación de rutas biosintéticas de las principales fitohormonas (Canellas *et al.*, 2020), el efecto tipo auxina responsable por la proliferación de raíces (Baia *et al.*, 2020), y la estimulación en la producción de exudados radiculares y cambios en su composición (Canellas *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2019).

Con respecto a la inducción de cambios sobre el sistema radicular, se ha documentado ampliamente el efecto de las sustancias bioestimulantes sobre la cantidad y actividad de las bombas H^+ ATPasas en la membrana de las células de la raíz, lo que conduce a una mayor acidificación del apoplasto y la pared celular, para permitir el crecimiento de las células, por otra parte, se estimula la actividad auxínica responsable de la expresión de genes involucrados en la activación de la mitosis para inducir la proliferación de nuevas raíces (De Azevedo *et al.*, 2019; Pizzeghello *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2020.), en consecuencia de esta actividad se consigue un mayor número de raíces por planta, el alargamiento individual de las raíces y la formación de numerosas raíces secundarias y pelos radiculares. Además, el incremento en el gradiente electroquímico de la membrana de las células de la corteza radical también conduce al mejoramiento de la absorción y transporte de iones celulares por medio de sistemas de transporte secundarios (Nunes *et al.*, 2019). En los resultados de este trabajo se puede observar que el tratamiento de las plantas con CHSNPP ocasionó proliferación de raíces e incremento en la biomasa del sistema radicular (figura 2), además de modificaciones en la arquitectura radical (figura 3).

Los cambios en el sistema radicular, podrían incidir en la capacidad de la planta para explorar mayor volumen de suelo y por consiguiente mejorar la absorción de agua y nutrientes, por otra parte una mayor superficie de raíces, también implica una mayor superficie de colonización por microorganismos benéficos de la rizósfera;

adicionalmente, también supone la posibilidad de mayor liberación de exudados radiculares para potenciar la comunicación e interacción para establecer relaciones simbióticas y asociativas, e incluso propiciar la colonización endófitra por microorganismos promotores del crecimiento vegetal (Muscolo *et al.*, 2020), este fenómeno también conduce al incremento de la diversidad microbiana en el suelo influenciado por las raíces y estimulación de los procesos mediados por dichos microorganismos, lo que se ha denominado “bucle microbiano” (Stambulska *et al.*, 2020), modificando positivamente para la planta las propiedades químicas y físicas del suelo.

La respuesta observada en el desarrollo del sistema radical toma importancia al considerar las características limitantes del suelo empleado para el ensayo; el valor alto de salinidad, el pH alcalino, la baja CIC, el bajo contenido en nitrógeno y materia orgánica generan condiciones causantes de estrés vegetal. Entonces, bajo estas condiciones las respuestas positivas de las plantas tratadas con bioestimulantes resultan importantes para mejorar la adaptación de la planta y su desempeño bajo las condiciones adversas.

Efectos de la aplicación la chalcona sintética sobre la simbiosis con *Rhizobium* y el índice de contenido de clorofila

Para el número de nódulos de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Cuadro 1) en varios tratamientos con CHS-NPP hubo mayor formación de nódulos con respecto a las plantas control. A partir de las secciones de nódulos inoculadas en medio de cultivo YMA se desarrollaron colonias cuyas características morfológicas y bioquímicas corresponden a las descritas para el género *Rhizobium* aisladas previamente de muestras del mismo suelo utilizado en este ensayo (Valero *et al.*, 2021). Las chalconas naturales pueden actuar en el establecimiento de señales químicas en la rizosfera entre la planta y bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, para promover la infección de los pelos radiculares, de esta manera se incrementa la probabilidad de establecer la simbiosis efectiva (Dong and Song, 2020), provocando además la activación de enzimas involucradas en la expresión de los genes *nod* de *Rhizobium* (Ahmad *et al.*, 2021). La quimiotaxis de los rizobios también depende de los compuestos flavonoides presentes en los exudados de las leguminosas (Bosse *et al.*, 2021). Por lo anterior, es posible que la aplicación exógena de la chalcona CHNSPP haya tenido influencia en el establecimiento de la dinámica planta-bacteria, que junto con una mayor superficie de contacto por el incremento de pelos radiculares conllevó a un mayor número de nódulos establecidos en las plantas tratadas.

En cuanto al valor del índice de contenido de clorofila (ICC) registrado a las tres y cuatro semanas de crecimiento (Cuadro 1), refleja que algunos tratamientos con CHSNPP (25 ppm por IM y 100 y 150 ppm AF) ocasionan incrementos significativos a los 21 días, para el día 28 se observa que se mantiene el incremento en el ICC para los mismos tratamientos del día 21 además de para los tratamientos de 50 ppm y 150 ppm IM, la mayoría de los tratamientos ocasionaron valores por encima del tratamiento control y se hizo evidente que el tratamiento de 50 ppm por IM ocasionó mayor incremento en el ICC a los 28 días. También se encontró incremento en el número de nódulos radiculares fijadores de nitrógeno formados por planta en respuesta al tratamiento con CHSNPP, hubo diferencia significativa en las plantas bajo los tratamientos con concentraciones de 50 y 100 ppm IM y 100 ppm AF; por otra parte, la concentración más baja y la más alta no ocasionaron efecto sobre esta variable.

Cuadro 1. Nodulación por rizobios e índice de contenido de clorofila -ICC ($\bar{X} \pm DE$) de plantas de frijol guajiro tratadas con CHSNPP, diferencias calculadas con el test de Duncan ($p= 0,05$).

Tratamiento con CHSNPP	Nódulos activos por planta	ICC	
		Día 21	Día 28
25 ppm IM	13,2± (2,9) ab	13,2±(1,1)b	13,1±(0,7)b
50 ppm IM	20± (1,6)b	13,3±(0,7)ab	14,2±(1,4)b
100 ppm IM	18,2± (1,9)b	13,2±(0,9)ab	13,2±(1,4)ab
150 ppm IM	11,5± (2,1)a	12,3±(0,5)ab	13,1±(0,9)b
25 ppm AF	13,5± (1,9)ab	11,6±(1,2)a	11,6±(1,3)ab
50 ppm AF	15,2± (2,7)ab	12,3±(0,8)a	12,4±(1,3)ab
100 ppm AF	17± (2,6)b	12,9±(0,7)b	13,2±(0,2)b
150 ppm AF	14,8± (3,1)ab	13,4±(1,1)b	13,1±(0,7)b
CONTROL	11,2± (2,2)a	11,5±(1,1)a	10,9±(0,8)a

Específicamente, los bioestimulantes a base de sustancias húmicas, hidrolizados de proteínas y carbohidratos, son capaces de estimular la actividad de las enzimas malato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y citrato sintasa, que funcionan en el ciclo del ácido tricarbóxico, además incrementan la actividad de cinco enzimas (nitrato reductasa, nitrito reductasa, glutamina sintetasa, glutamato sintasa y aspartato aminotransferasa) involucradas en la reducción y asimilación de N (Bulgari *et al.*, 2019; Ertani *et al.*, 2020; Nardi *et al.*, 2021). Algunas sustancias bioestimulantes también promueven la síntesis de la clorofila y la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa e inducen el retraso de la senescencia foliar a través de la reducción en la degradación de la clorofila, con lo cual favorece de manera integral el proceso de fotosíntesis (Lotfi *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2020), en este sentido los resultados encontrados en este trabajo muestran efectos que podrían estar relacionados con aumento de la actividad fotosintética; así se encontró aumento en el área y biomasa foliar (figura 2) lo que podría ser consecuencia de mayor actividad fotosintética y activación del metabolismo primario, por otra parte en el cuadro 1 se muestran incrementos hasta del 27 % en el ICC (tratamiento con 50 ppm de CHSNPP), lo cual no solamente supone una mayor capacidad fotosintética, sino también la disponibilidad de N para la síntesis de clorofila, dado que en numerosos estudios se ha encontrado una alta correlación entre el índice SPAD obtenido con el clorofilómetro, la cantidad de clorofila y el contenido de nitrógeno foliar (Macías-Duarte *et al.*, 2021); el mejor desempeño en la asimilación de N y síntesis de Clorofila ha sido confirmado como un mecanismo de acción de algunos bioestimulantes (Bhupenchandra *et al.*, 2020). Por otra parte, la expansión de la lámina foliar también se relaciona con la modulación de la actividad y balance de citoquininas, auxinas y giberelinas, aspecto en el cual se ha visto involucrada de manera positiva la actividad de los ácidos húmicos y otros bioestimulantes (Rouphael *et al.*, 2020b).

CONCLUSIONES

Se demostró que la chalcona sintética 3-(4-nitrofenil)-1-(piridin-2-il)-prop-2-en-1-ona (CHSNPP) puede ser aplicada en frijol guajiro en soluciones a concentraciones entre 50 y 150 ppm por aspersión foliar o por inmersión de plántulas, pero la aplicación por aspersión foliar resulta más efectiva para algunas variables, así se sugiere una concentración a 100 ppm para generar una respuesta promedio superior.

El uso de la chalcona sintética sobre frijol guajiro ocasiona el incremento significativo del área foliar, estimula la acumulación de biomasa y proliferación de raíces, además favorece el contenido de clorofila (ICC) lo que se relaciona con el incremento de nódulos fijadores de nitrógeno por la simbiosis *Rhizobium-leguminosa*. Los efectos

descritos aportan evidencia sobre un posible uso de la chalcona CHNSPP como un bioestimulante, con perspectivas de aplicaciones futuras en agricultura, para lo cual es necesario desarrollar estudios adicionales sobre el impacto en la productividad, descartar efectos adversos y estimar los costos de producción y aplicación.

REFERENCIAS

- AHMAD, MUHAMMAD-ZULFIQAR; ZHANG, YANRUI; ZENG, XIANGSHENG; LI, PENGHUI; WANG, XIAOBO; BENEDITO, VAGNER; ZHAO, JIAN. Isoflavone malonyl-CoA acyltransferase GmMat2 is involved in nodulation of soybean by modifying synthesis and secretion of isoflavones. *Journal of Experimental Botany*, v. 72, n. 4, 2021, p. 1349-1369.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa511>
- ALI, QASIM; SHEHZAD, FAISAL; WASEEM, MUHAMMAD; SHAHID, SAMREENA; HUSSAIN, AABDULLAH-IJAZ; HAIDER, MUHAMMAD-ZULQURNAIN; HABIB, NOMAN; HUSSAIN, SYED-MURTAZA; JAVED, TARIQ; PERVEEN, RASHIDA. Plant-based biostimulants and plant stress responses. En HASANUZZAMAN, MIRZA. *Plant ecophysiology and adaptation under climate change: Mechanisms and perspectives*, 1 ed, Singapore (Singapore): Springer, 2020, 261 p.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-2156-0_22
- ALJAMALI, NAGHAM; HAMZAH DAYLEE, SHAYMAA; JABER KADHIUM, AFAQ. Review on chemical-biological fields of chalcone compounds. *Forefront Journal of Engineering & Technology*, v. 2, n. 1, 2020, p. 33-44.
- BAÍA, DAIANE-CARVALHO; OLIVARES, FABIO; ZANDONADI, DANIEL; DE PAULA-SOARES, CLEITON; SPACCINI, RICCARDO; CANELLAS, LUCIANO. Humic acids trigger the weak acids stress response in maize seedlings. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 7, n. 1, 2020, p. 1-13.
<https://doi.org/10.1186/s40538-020-00193-5>
- BHUPENCHANDRA, INGUDAM; DEVI, SOIBAM-HELENA; BASUMATARY, ANJALI; DUTTA, SAMIRON; SINGH, LAISHRAM-KANTA; KALITA, PRAKASH; BORA, S; ROMA, DEVI; SAIKIA, AMARJIT; SHARMA, PRIYANKA; BHAGOWATI, SEEMA; TAMULI, BABITA; DUTTA, NAMITA; BORAH, KRIPAL. Biostimulants: Potential and Prospects in Agriculture International Research. *Journal of Pure and Applied Chemistry*, v. 21, 2020, p. 20-35.
<https://doi.org/10.9734/irjpac/2020/v21i1430244>
- BOSSE, MARCO-ANTONIO; DA SILVA, MARIANA; DE OLIVEIRA, NATÁLIA-GABRIELA; DE ARAUJO, MAYCON-ANDERSON; RODRIGUES, CLEVERSON; DE AZEVEDO, JAQUELYNE-POLISZUK; RODRIGUES, ANDRÉ. Physiological impact of flavonoids on nodulation and ureide metabolism in legume plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 166, 2021, p. 512-521.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.06.007>
- BULGARI, ROBERTA; FRANZONI, GIULIA; FERRANTE, ANTONIO; Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy*, v. 9, n. 6, 2019, p. 306.
<https://doi.org/10.3390/agronomy9060306>
- CADENA J. Preparación y caracterización de compuestos con estructuras de chalcona [Tesis Maestría en Farmacia y Química de productos naturales]. Braganza (Portugal), Salamanca (España): Instituto Politécnico de Braganza, Facultad de tecnología y gestión; Universidad de Salamanca, Facultad de ciencias químicas, 2018., 88p.
- CANELLAS, LUCIANO; CANELLAS, NATALIA; OLIVARES, FABIO; PICCOLO, ALESSANDRO. Plant chemical priming by humic acids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 7, n. 12, 2020, p. 1-17.
<https://doi.org/10.1186/s40538-020-00178-4>
- CANELLAS, LUCIANO; OLIVARES, FABIO; CANELLAS, NATALIA; MAZZEI, PIERLUIGI; PICCOLO, ALESSANDRO. Humic acids increase the maize seedlings exudation yield. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 6, n. 1, 2019, p. 1-14.
<https://doi.org/10.1186/s40538-018-0139-7>

- CONSTANTINESCU, TEODORA; LUNGU, CLAUDIU. Anticancer Activity of Natural and Synthetic Chalcones. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 21, 2021, p. 11306.
<https://doi.org/10.3390/ijms222111306>
- CUBILLOS-HINOJOSA, JUAN-GUILLERMO; DA SILVA-ARAUJO, FERNANDA; SACCOL-DE SÁ, ENILSON-LUIZ. Native rhizobia efficient in nitrogen fixation in *Leucaena leucocephala* in Rio Grande do Sul, Brazil. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 19, n. 1, 2021, p. 128-138.
<https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n1.2021.1482>
- DE AZEVEDO, INGA G.; OLIVARES, FABIO L.; RAMOS, ALESSANDRO C.; BERTOLAZI, AMANDA A.; CANELLAS, LUCIANO P. Humic acids and *Herbaspirillum seropedicae* change the extracellular H⁺ flux and gene expression in maize roots seedlings. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 6, n. 1, 2019, p. 1-10.
<https://doi.org/10.1186/s40538-019-0149-0>
- DONG, WEI; SONG, YUGUANG. The significance of flavonoids in the process of biological nitrogen fixation. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 16, 2020, p. 5926.
<https://doi.org/10.3390/ijms21165926b>
- DU JARDIN, PATRICK; XU, LIN; GEELLEN, DANNY. Agricultural Functions and Action Mechanisms of Plant Biostimulants (PBs) an Introduction. En GEELLEN, DANNY.; XU, LIN; The Chemical Biology of Plant Biostimulants. London (United Kingdom): John Wiley and Sons Ltd, 2020, p. 1-30.
- ERTANI, ANDREA; SCHIAVON, MICHELA; SERENELLA, NARDI. Humic substances (HS) as plant biostimulant in agriculture. En ROUPHAEL, YOUSSEF; Biostimulants for sustainable crop production. London (United Kingdom): Burleigh Dodds Science Publishing, 2020, p. 55-76.
- GOYAL, KAMYA; KAUR, RAJWINDER; GOYAL, ANJU; AWASTHI, RAJENDRA. Chalcones: A review on synthesis and pharmacological activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 11, n. 1, 2021, p. 001-014.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2021.11s101>
- GUPTA, SHUBHPRIYA; KULKARNI, MANOJ; WHITE, JAMES; STIRK, WENDY; PAPPENFUS, HEINO; DOLEZAL, KAREL; ÖRDOG, VINCE; NORRIE, JEFFREY; CRITCHLEY, ALAN; VAN STADEN, JOHANNES. Chapter 1 - Categories of various plant bioestimulants – mode of application and shelf-life. En GUPTA, SHUBHPRIYA; VAN STADEN, JOHANNES; Bioestimulants for crops from seed germination to plant development, Amsterdam (Países Bajos): Academic press, 2021 p. 1-60.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823048-0.00018-6>
- HASSAN, MOHAMED; ALZANDI, ABDEL-RAHMAN; HASSAN, MOSTAFA. Synthesis, structure elucidation and plants growth promoting effects of novel quinolinyl chalcones. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 13, n. 7, 2020, p. 6184-6190.
- IBARRA-ARELLANO, NICOL; GUTIÉRREZ-CABRERA, MARGARITA. Síntesis, caracterización y bioactividad de sistemas α - β insaturados (chalconas) [Memoria de pregrado Tecnología médica]. Talca (Chile): Universidad de Talca, Escuela de Tecnología Médica, 2016, 74 p.
- JAYARAMAN, KARIKALAN; RAMAN, VENKAT; SEVANTHI, AMITHA MITHRA; SIVAKUMAR, SIVA; VISWANATHAN, C.; MOHAPATRA, TRILOCHAN; MANDAL, PRANAB-KUMAL. Stress-inducible expression of chalcone isomerase2 gene improves accumulation of flavonoids and imparts enhanced abiotic stress tolerance to rice. *Environmental and Experimental Botany*, v. 190, 2021, p. 104582.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104582>
- KALAMBE, NILIMA A. Synthesis and Study of 2-Hydroxy Substituted Quinoxaline Effects on Different Crop Plant Growth. *International Journal for Researches in Biosciences Agriculture & Technology*, v. 5, n. 2, 2017, p. 657- 661.
- LOTFI, RAMIN; KALAJI, HAZEM; VALIZADEH, GHOLAMREZA; KHALILVAND, BEHROZYAR E; HEMATI, ARASH; GHARAVI-KOCHEBAGH, POURIYA; GHASSEMI, MASOUMEH. Effects of humic acid on photosynthetic efficiency of rapeseed plants growing under different watering conditions. *Photosynthetica*, v. 56, n. 3, 2018, p. 962-979.
<https://doi.org/10.1007/s11099-017-0745-9>

- LIU, YITUNG; SUN, XIAOMENG; YIN, DAWEI; YUAN, FANG. Syntheses and biological activity of chalcones-imidazole derivatives. *Research on Chemical Intermediates*, v. 39, n. 3, 2013, p. 1037-1048.
<https://doi.org/10.1007/s11164-012-0665-z>
- MACÍAS-DUARTE, RUBÉN; GRIJALVA-CONTRERAS, RAÚL-LEONEL; ROBLES-CONTRERAS, FABIÁN; NÚÑEZ-RAMÍREZ, FIDEL; CÁRDENAS-SALAZAR, VÍCTOR-ALBERTO; MENDÓZA-PÉREZ, CÁNDIDO. Índice SPAD, nitratos y rendimiento en sorgo en respuesta al suministro de nitrógeno. *Agronomía Mesoamericana*, v. 32, n.32, 2021, p. 293-305.
<https://doi.org/10.15517/am.v32i1.39712>
- MATHESIUS, ULRIKE. The role of the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* in root nodule formation. A review. En DE BRUIJN, FRANS; The model legume *Medicago truncatula*, London (United Kingdom): John Wiley & sons, Inc, 2019, p. 434-438.
- MUSCOLO, ADELE; PIZZEGHELLO, DIEGO; FRANCIOSO, ORNELLA; SANCHEZ-CORTES, SANTIAGO; NARDI, SERENELLA. Effectiveness of humic substances and phenolic compounds in regulating plant-biological functionality, *Agronomy*, v. 10, n. 10, 2020, p. 1553.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10101553>
- NARDI, SERENELLA; SCHIAVON, MICHELA; FRANCIOSO, ORNELLA. Chemical structure and biological activity of humic substances define their role as plant growth promoters. *Molecules*, v. 26, n. 8, 2021, p. 2256.
<https://doi.org/10.3390/molecules26082256>
- NUNES, ROSANE-OLIVEIRA; DOMICIANO, GISELLI; ALVES, WILBER-SOUSA; MELO, ANA-CLAUDIA; NOGUEIRA, FÁBIO-CESAR; CANELLAS, LUCIANO-PASQUALOTO; LOPES-OLIVARES, FÁBIO; BENEDETA, RUSSOLINA; SOARES, MÁRCIA-REGINA. Evaluation of the effects of humic acids on maize root architecture by label-free proteomics analysis. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, 2019, p. 1-11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48509-2>
- PEREIRA, MAYSÁ-MATHIAS; MORAIS, LUDMILA-CAPRONI; MARQUES, ERICA-ALVES; MARTINS, DVID; CAVALCANTI, VYTÓRIA-PISCITELLI; RODRIGUES, FILIPE-ALMENDAGNA; GONCALVES, WILLIAM; BLANK, A.F.; PASQUAL, MOACIR; DÓRIA, JOYCE. Humic substances and efficient microorganisms: elicitation of medicinal plants - a review. *Journal of agricultural Science*, v. 11, n. 11, 2019, p. 268-280.
<https://doi.org/10.5539/jas.v11n7p268>
- PIZZEGHELLO, DIEGO; SCHIAVON, MICHELA; FRANCIOSO, ORNELLA; DALLA VECCHIA, FRANCESCA; ERTANI, ANDREA; NARDI, SERENELLA. Bioactivity of size-fractionated and unfractionated humic substances from two forest soils and comparative effects on N and S metabolism, nutrition, and root anatomy of *Allium sativum* L. *Frontiers in plant science*, 2020, p.1203.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01203>
- RAI, NIDHI; RAI, SHASHI; SARMA, BIRINCHI. Prospects for Abiotic Stress Tolerance in Crops Utilizing Phyto- and Bio-Stimulants. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 5, 2021, p. 754853.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.754853>
- ROSA, SARA-DANTAS; SILVA, CARLOS-ALBERTO; CARLETTI, PAOLO; SAWAYA, ALEXANDRA. Maize Growth and Root Organic Acid Exudation in Response to Water Extract of Compost Application. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 21, n. 4, 2021, p. 2770-2780.
<https://doi.org/10.1007/s42729-021-00564-3>
- ROUPHAEL, YOUSSEF; COLLA, GIUSEPPE. Toward a sustainable agriculture through plant biostimulants: From experimental data to practical applications. *Agronomy*, v. 10, n. 10, 2020a, p. 1461.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10101461>
- ROUPHAEL, YOUSSEF; LUCINI, LUIGI; MIRAS-MORENO, BEGOÑA; COLLA, GIUSEPPE; BONINI, PAOLO; CARDARELLI, MARIATERESA. Metabolomic responses of maize shoots and roots elicited by combinatorial seed treatments with microbio and non-microbial biostimulants. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, n. 11, 2020b, p. 664.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00664>
- SHAH, ATEEQ; SMITH, DONALD. Flavonoids in agriculture: Chemistry and roles in, biotic and abiotic stress responses, and microbial associations. *Agronomy*, v. 10, n. 8, 2020, p. 1209.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10081209>

- SHAHRAJABIAN, MOHAMAD-HESAM; CHASKI, CHRISTINA; POLYZOS, NIKOLAOS; PETROPOULOS, SPYRIDON. Biostimulants application: A low input cropping management tool for sustainable farming of vegetables. *Biomolecules*, v. 11, n. 5, 2021, p. 698.
<https://doi.org/10.3390/biom11050698>
- SINGH, PARVESH; ANAND, AMIT; KUMAR, VIPAN. Recent developments in biological activities of chalcones: a mini review. *European journal of medicinal chemistry*, v. 6, n. 85, 2014, p. 758-777.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.033>
- STAMBULSKA, ULIANA-YA; BAYLIAK, MARIA. Legume-rhizobium symbiosis: Secondary metabolites, free radical processes, and effects of heavy metals. *Co-Evolution of Secondary Metabolites*, En: MÉRILLON, JEAN-MICHEL.; RAMAWAT, KISHAN-GOPAL; Co-Evolution of Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry. Nueva York (Estados Unidos): Springer, 2020, p. 586.
- VALERO-VALERO, NELSON O.; VERGEL-CASTRO, CLAUDIA; USTATE, YEISON; GÓMEZ-GÓMEZ, LILIANA C. Bioestimulación de frijol guajiro y su simbiosis con *Rhizobium* por ácidos húmicos y *Bacillus mycoides*. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, n. 19, v. 2, 2021, p. 119-134.
<https://orcid.org/0000-0001-9186-6245>
- VÁSQUEZ-MARTÍNEZ, YESSY; OSORIO, MAURICIO; SAN MARTÍN, DIEGO; CARVAJAL, MARCELA; VERGARA, ALEJANDRA; SANCHEZ, ELIZABETH; RAIMONDI, MARCELA; ZACCHINO, SUSANA; MASCAYANO, CAROLINA; TORRENT, CLAUDIA; CABEZAS, FRANCISCO; MEJIAS, SOPHIA; MONTOYA, MARGARITA; CORTEZ-SAN MARTÍN, MARCELO. Antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activities of polyoxygenated chalcones. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, 2019, p. 286-304.
<https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180177>
- WONG, WEI S.; ZHONG, HONG T; CROSS, ADAM T.; YONG, JEAN W. Plant Biostimulants in Vermicomposts: Characteristics and Plausible Mechanisms. *The Chemical Biology of Plant Biostimulants*. En GEELEN, DANNY; XU, LIN. The chemical biology of plant biostimulantes. New York (USA): John Wiley & Sons Ltd. 2020, 301 p.
<https://doi.org/10.1002/9781119357254>
- YINGJIA, T.; YONGKUN, L.V.; SHIQIN, YU; YUNBIN, LYU; LIANG, ZHANG; JINQWEN, ZHOU. Improving (2S)-naringenin production by exploring native precursor pathways and screening higher-active chalcone synthases from plants rich in flavonoids. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 156, 2022, p. 109991.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.109991>
- ZHOU, KANG; YANG, SONG; LI, SHU-MING. Naturally occurring prenylated chalcones from plants: structural diversity, distribution, activities and biosynthesis. *Natural Product Reports*, v. 38, 2021, p. 2236-3360.
<https://doi.org/10.1039/D0NP00083C>