

Efectos de la aplicación de CSL en plantas hortícolas para mejorar su crecimiento en diferentes condiciones medioambientales



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS Y TECNOLOGÍAS
AGRARIAS, AGROAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS

IVÁN NAVARRO MORILLO

TESIS DOCTORAL

2024

DIRECTOR

DR. FRANCISCO GARCÍA SÁNCHEZ

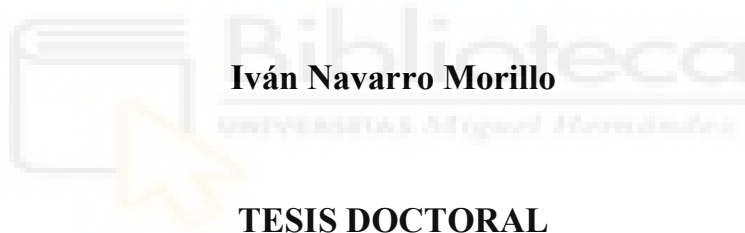
CODIRECTOR

DR. JOSÉ MARÍA CÁMARA ZAPATA



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN RECURSOS Y TECNOLOGÍAS
AGRARIAS, AGROAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS**

**Efectos de la aplicación de CSL en plantas hortícolas
para mejorar su crecimiento en diferentes condiciones
medioambientales**



Iván Navarro Morillo

TESIS DOCTORAL

2024

DIRECTOR

DR. FRANCISCO GARCÍA SÁNCHEZ

CODIRECTOR

DR. JOSÉ MARÍA CÁMARA ZAPATA



EFFECTOS DE LA APLICACIÓN DE CSL EN PLANTAS HORTÍCOLAS PARA MEJORAR SU CRECIMIENTO EN DIFERENTES CONDICIONES MEDIOAMBIENTALES

CALIDAD DEL COMPENDIO DE CADA PUBLICACIÓN

Esta tesis se presenta como compendio de las siguientes publicaciones:

Navarro-Morillo, I.; Garcia-Sanchez, F.; Camara-Zapata, J.M.; Navarro-León, E.; Izquierdo-Ramos, M.J.; Blasco, B.; Ruiz, J.M. Physiological Study of the Efficacy of Archer® Eclipse in the Protection against Sunburn in Cucumber Plants. *Horticulturae* 2022, 8, 500.

DOI: 10.3390/horticulturae8060500



horticulturae



Article

Physiological Study of the Efficacy of Archer® Eclipse in the Protection against Sunburn in Cucumber Plants

Iván Navarro-Morillo ¹, Francisco Garcia-Sanchez ^{2,*}, Jose Maria Camara-Zapata ³, Eloy Navarro-León ⁴, María José Izquierdo-Ramos ⁴, Begoña Blasco ⁴ and Juan Manuel Ruiz ⁴

Editores: Begoña Miras-Moreno and Esther Novo-Uzal

ISSN: 2311-7524

Ámbito de la publicación: Horticulture

| Categoría JCR | Categoría del cuartil | Factor de impacto | Factor de impacto de los últimos 5 años |
|---------------|-----------------------|-------------------|---|
| Horticulture | Q1 | 2,923 (2022) | 3.4 (2022) |



EFFECTOS DE LA APLICACIÓN DE CSL EN PLANTAS HORTÍCOLAS PARA MEJORAR SU CRECIMIENTO EN DIFERENTES CONDICIONES MEDIOAMBIENTALES

Navarro-Morillo, I.; Navarro-Perez, V.; Perez-Millan, R.; Navarro-León, E.; Blasco, B.; Cámara-Zapata, J.M.; Garcia-Sanchez, F. Effects of Root and Foliar Application of Corn Steep Liquor on Pepper Plants: A Physiological, Nutritional, and Morphological Study. *Horticulturae* 2023, 9, 221.

DOI: 10.3390/horticulturae9020221



horticulturae



Article

Effects of Root and Foliar Application of Corn Steep Liquor on Pepper Plants: A Physiological, Nutritional, and Morphological Study

Iván Navarro-Morillo ¹, Valeria Navarro-Perez ², Rafael Perez-Millan ¹, Eloy Navarro-León ³, Begoña Blasco ³, Jose Maria Cámara-Zapata ^{4,*} and Francisco Garcia-Sanchez ²

Editor: Stefania De Pascale

ISSN: 2311-7524

Ámbito de la publicación: Horticulture

| Categoría JCR | Categoría del cuartil | Factor de impacto | Factor de impacto de los últimos 5 años |
|---------------|-----------------------|-------------------|---|
| Horticulture | Q1 | 3,1 (2023) | 3.4 (2023) |



EFFECTOS DE LA APLICACIÓN DE CSL EN PLANTAS HORTÍCOLAS PARA MEJORAR SU CRECIMIENTO EN DIFERENTES CONDICIONES MEDIOAMBIENTALES

Navarro-Morillo, I.; Pardo-Pina, S.; Garcia-Sánchez, F.; Ruiz, J.M.; Laserna-Arcas, S.; Plasencia, F.; Cámara-Zapata, J.M. Corn Steep Liquor Application Improves Pepper (*Capsicum annum* L.) Tolerance to Salinity. *Horticulturae* 2023, 9, 785.
DOI: 10.3390/horticulturae9070785



horticulturae



Article

Corn Steep Liquor Application Improves Pepper (*Capsicum annum* L.) Tolerance to Salinity

Iván Navarro-Morillo ¹, Sofía Pardo-Pina ², Francisco Garcia-Sánchez ³, Juan Manuel Ruiz ⁴, Santiago Laserna-Arcas ¹, Felix Plasencia ⁵ and José M. Cámara-Zapata ^{2,*}

Editor: Anoop Kumar Srivastava

ISSN: 2311-7524

Ámbito de la publicación: Horticulture

| Categoría JCR | Categoría del cuartil | Factor de impacto | Factor de impacto de los últimos 5 años |
|---------------|-----------------------|-------------------|---|
| Horticulture | Q1 | 3,1 (2023) | 3.4 (2023) |



EFFECTOS DE LA APLICACIÓN DE CSL EN PLANTAS HORTÍCOLAS PARA MEJORAR SU CRECIMIENTO EN DIFERENTES CONDICIONES MEDIOAMBIENTALES



Navarro-Morillo, I., Blasco, B., Cámara-Zapata, J. M., Muñoz-Acero, J., Simón-Grao, S., Alfosea-Simón, M., Plasencia, F., & García-Sánchez, F. Corn Steep Liquor application on pepper plants (*Capsicum annum* L.) stimulates growth under nitrogen-deficient growing conditions. *Scientia Horticulturae* 2024, 328, 112955. DOI: 10.1016/j.scienta.2024.112955

Scientia Horticulturae 328 (2024) 112955

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Scientia Horticulturae

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scihorti



Research Paper

Corn Steep Liquor application on pepper plants (*Capsicum annum* L.) stimulates growth under nitrogen-deficient growing conditions

Iván Navarro-Morillo ^a, Begoña Blasco ^b, José M. Cámara-Zapata ^{c,*}, Julia Muñoz-Acero ^c, Silvia Simón-Grao ^d, Marina Alfosea-Simón ^d, Felix Plasencia ^e, Francisco García-Sánchez ^d



Editor: Gholamreza Gohari

ISSN: 1879-1018 0304-4238

Ámbito de la publicación: Horticulture

| Categoría JCR | Categoría del cuartil | Factor de impacto | Factor de impacto de los últimos 5 años |
|---------------|-----------------------|-------------------|---|
| Horticulture | Q1 | 4,3 (2022) | 4.5 (2022) |



Dr. D. Francisco García Sánchez, Investigador Científico del Departamento de Nutrición Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) como director,

Dr. D. José María Cámara Zapata, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Física Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH) como codirector,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral Titulada “Efectos de la aplicación de CSL en plantas hortícolas para mejorar su crecimiento en diferentes condiciones medioambientales”, realizada por D. Iván Navarro Morillo, se ha desarrollado bajo nuestra dirección y autorizamos a que sea presentada para optar a la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Dr. Francisco García Sánchez

Dr. José María Cámara Zapata

Investigador Científico

Profesor Titular

Dpto. Nutrición Vegetal (CEBAS-CSIC)

Dpto. Física Aplicada (UMH)

Murcia, marzo de 2024



*Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias,
Agroambientales y Alimentarias*



Dr. Dña. Juana Fernández López, Catedrática de Universidad y Coordinadora del Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrarias, Agroambientales y Alimentarias (ReTos-AAA) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH),

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Efectos de la aplicación de CSL en plantas hortícolas para mejorar su crecimiento en diferentes condiciones medioambientales” de la que es autor el Biólogo, **D. Iván Navarro Morillo**, ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. Francisco García Sánchez** y el **Dr. José María Cámara Zapata** actuando como tutor de la misma el **Dr. Juan José Martínez Nicolás**. Considero que la Tesis es conforme, en cuanto a forma y contenido, a los requerimientos del Programa de Doctorado ReTos-AAA, siendo por tanto apta para su exposición y defensa pública.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Orihuela a 8 de marzo de 2024.

Dra. Dña. Juana Fernández López

Coordinadora del Programa Doctorado ReTos-AAA

Agradecimientos

A mi Rosa, mi principal apoyo, quien ha estado a mi lado en cada paso de este viaje con sus “críticas reacias”. Por muchas y opíparas risas más.

“Fue el tiempo que pasaste con tu rosa lo que la hizo tan importante.”
– Inspirado en **El principito**.

A mi pequeña Inés “Sarmiento”, quien me inspira para ser mejor cada día. Con el insomnio del biberón de las 4 vinieron las mejores ideas.

“Sólo dos legados duraderos podemos dejar a nuestros hijos: uno, raíces; otro, alas.”
– **Hodding Carter**.

A Betty, mi queridísima hermana, este es el fin de tantos proyectos en los que he podido contar contigo. Aún nos queda Berlín, no se me olvida.

“Siempre estaré ahí para levantarte si te caes...cuando termine de reírme.”
– **Beatriz Navarro**.

A mi padre, mi guía, mi modelo, mi motivo, el reflejo en el que mirarme. Me enseñaste el amor por aprender y la curiosidad para moverme a ello. Nos faltó CPU para más *Supaplex*.

“Para que la diferencial de la vida te resulte una integral directa.”
– **Juan Navarro**.

A mi madre, le doy las gracias por traerme al mundo, enseñarme el valor del *carpe diem* y a contar fábulas que maravillan a Inés.

*“Del Arcipreste de Hita muy poco sabemos
Por un famoso autorretrato lo conocemos
Y aunque no es muy exacto lo que tenemos
La obra del Arcipreste, admiraremos.”*
– **Pilar Morillo**.

A mi familia, habéis sido mi mayor sostén, mi refugio y mi fuente de felicidad. Por infinitas paellas juntos.

“Una familia feliz no es sino un paraíso anticipado.”
– **Sir John Bowring**.

A mi gran amigo Alexis, por su constante apoyo y compañerismo, sobre todo en los momentos más difíciles. Ama, ama, ama y ensancha el alma.

*“No vine aquí para hacer amigos
Pero sabes que siempre puedes contar conmigo
Dicen de mí que soy un tanto animal
Pero en el fondo soy un sentimental.”*
– **Loquillo**.

A Juanma Ruíz y su equipo de investigadores, por todas las horas que me han dedicado, el soporte científico y las agradables visitas a Granada. Grandísimos profesionales.

A mi Director de tesis, Paco García Sánchez, y a mi Codirector, José María Cámara Zapata, quiero dar mi más profundo agradecimiento por toda la ayuda, los consejos y el gran apoyo durante toda la investigación. Sois unos cracks.

“Si he podido ver más allá, ha sido por subirme a hombros de gigantes.”
– **Sir Isaac Newton**.

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| 1. ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS | 1 |
| 2. ESTRUCTURA DE LA TESIS | 5 |
| 3. RESUMEN | 8 |
| 4. INTRODUCCIÓN | 15 |
| 4.1 Importancia económica y características agronómicas de los cultivos hortícolas en España: pimiento y pepino | 16 |
| 4.2 Consecuencias socioeconómicas del estrés abiótico en los cultivos | 23 |
| 4.3 Respuesta de los cultivos al estrés abiótico | 25 |
| 4.4 Uso de bioestimulantes en la agricultura | 36 |
| 5. OBJETIVOS | 49 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 52 |
| 6.1 Ensayo en pepino: Protección solar | 53 |
| 6.2 Ensayo en pimiento: Estudio fisiológico, nutricional y morfológico | 57 |
| 6.3 Ensayo en pimiento: Salinidad | 63 |
| 6.4 Ensayo en pimiento: Deficiencia de nitrógeno | 67 |
| 7. RESUMEN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES | 72 |
| 7.1 PUBLICACIÓN 1 | 73 |
| 7.1.1 Resumen de resultados y discusión | 73 |
| 7.1.2 Conclusiones | 75 |
| 7.2 PUBLICACIÓN 2 | 77 |
| 7.2.1 Resumen de resultados y discusión | 77 |
| 7.2.2 Conclusiones | 80 |
| 7.3 PUBLICACIÓN 3 | 81 |
| 7.3.1 Resumen de resultados y discusión | 81 |
| 7.3.2 Conclusiones | 84 |
| 7.4 PUBLICACIÓN 4 | 85 |
| 7.4.1 Resumen de resultados y discusión | 85 |
| 7.4.2 Conclusiones | 87 |
| 8. CONCLUSIONES GENERALES | 88 |
| 9. INVESTIGACIONES FUTURAS | 93 |
| 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 97 |
| 11. ANEXO – PUBLICACIONES | 142 |
| 11.1 PUBLICACIÓN 1 | 143 |
| 11.2 PUBLICACIÓN 2 | 161 |
| 11.3 PUBLICACIÓN 3 | 186 |
| 11.4 PUBLICACIÓN 4 | 207 |

1. ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS



1. ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

| | |
|-------------------------|---|
| 1-Vj | Producción de electrones |
| A | Tasa fotosintética |
| ABS | Flujos de absorción de luz |
| A_{CO2} | Tasa fotosintética neta |
| AIA | Ácido indolacético |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| AsA | Ascorbato |
| BSs | Bioestimulantes |
| Bw | Producción de biomasa |
| Chl | Clorofila |
| Ci | CO ₂ subestomático |
| CKs | Citoquininas |
| CSL | Licor de maceración de maíz |
| das | Días después de la aplicación de condiciones de quemadura |
| DM | Materia seca |
| DW | Peso seco |
| E | Tasa de transpiración |
| EC | Conductividad eléctrica |
| EC1 | Conductividad eléctrica inicial |
| EC2 | Conductividad eléctrica final |
| E_{leaf} | Tasa de transpiración |
| Fm | Fluorescencia máxima |
| FM | Masa fresca |
| Fo | Fluorescencia inicial |
| FRAP | Capacidad antioxidante de reducción del ion férrico |
| Fv | Fluorescencia variable |
| Fv/Fm | Rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria |

| | |
|-------------------------|---|
| FW | Peso fresco |
| GA | Giberelinas |
| Gln | Glutamina |
| Glu | Glutamato |
| GOGAT | Glutamato sintasa |
| GR | Glutación reductasa |
| gs | Conductividad estomática |
| GS | Glutamina sintetasa |
| GSH | Glutación reducido |
| GSSG | Glutación oxidado |
| HESI | Interfaz de ionización por electropulverización calentada |
| HFA | Hidroxiácidos grasos |
| IAA | Ácido Indolacético |
| iP | Adenina isopentenil |
| LSD | Diferencias significativas mínimas |
| MDA | Malondialdehido |
| NI | Cantidad de nitrógeno en las hojas |
| NMR | Espectroscopía de resonancia magnética nuclear |
| NR | Nitrato reductasa |
| NUE | Eficiencia en el uso del nitrógeno |
| NU_pE | Eficiencia en la absorción del nitrógeno |
| NU_tE | Eficiencia en la utilización del nitrógeno |
| PAR | Radiación fotosintéticamente activa |
| PDBs | Bioestimulantes derivados de plantas |
| P_{IABS} | Índice de desempeño |
| PPFD | Densidad de flujo de fotones fotosintéticos |
| PSII | Fotosistema II |
| r | Conductividad estomática |

| | |
|--------------|---|
| RC | Centros de reacción activos |
| RH | Humedad relativa |
| ROS | Especies reactivas del oxígeno |
| RWC | Contenido relativo de agua |
| SLA | Área foliar específica |
| TEAC | Actividad antioxidante equivalente a Trolox |
| tZ | Trans-zeatina |
| UHPLC | Cromatografía líquida de alto rendimiento |
| VOCs | Compuestos orgánicos volátiles |
| WUE | Eficiencia instantánea en el uso del agua (A/E) |



2. ESTRUCTURA DE LA TESIS



2. ESTRUCTURA DE LA TESIS

Para la elaboración de la presente Tesis Doctoral se ha seguido la metodología basada en la publicación de un compendio de artículos de investigación siguiendo la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

La estructura de esta Tesis Doctoral consta de las siguientes partes:

- **Resumen.** Incluye una exposición abreviada de los resultados y conclusiones más relevantes.
- **Introducción.** Contiene una breve revisión bibliográfica sobre la importancia económica y características agronómicas de los cultivos de pimiento y pepino. Además, se analizan los principales problemas medioambientales en los cultivos hortícolas. También, se estudian generalidades, tipos y uso de bioestimulantes en la agricultura. Por último, se profundiza en el extracto de licor de maíz fermentado y su aptitud bioestimulante.
- **Objetivos.** Se describen los objetivos generales de la tesis, así como los objetivos específicos.
- **Resumen de la metodología.** Se explican las condiciones experimentales de los ensayos llevados a cabo; así como las distintas determinaciones realizadas y los equipos y técnicas utilizadas para su medición.
- **Publicaciones científicas.** Artículos publicados que componen la base de la tesis doctoral, se detallan a continuación:
 - En la primera publicación (*Horticulturae*, 8, 500), se investigó el impacto del producto protector Archer® Eclipse, que contiene "corn steep liquor (CSL)", en plantas de pepino frente a daños por quemadura solar. Se evaluaron cambios en biomasa, fotosíntesis, temperatura foliar y estrés oxidativo, observándose mejoras significativas en plantas tratadas en comparación con las no tratadas.
 - En la segunda publicación (*Horticulturae*, 9, 221), se analizó el efecto de la aplicación radicular y foliar del CSL en plantas de pimiento. Se observó un aumento en el tamaño de las plantas, siendo la aplicación radicular más eficiente. Se descubrió que el CSL mejora la síntesis de hormonas, la tasa de asimilación neta de CO₂ y las concentraciones de aminoácidos como alanina, prolina y triptófano, sugiriendo que su acción se relaciona con la regulación hormonal y el estímulo del metabolismo del carbono y nitrógeno.
 - En la tercera publicación (*Horticulturae*, 9, 785), se realizaron cuatro tratamientos en una cámara de cultivo, variando las condiciones de salinidad y la aplicación de CSL.

Se encontró que el CSL reduce la fitotoxicidad del estrés salino, mejorando la eficiencia fotosintética y reduciendo la generación de especies reactivas de oxígeno.

- En la cuarta publicación (*Scientia Horticulturae*, 328, 112995), se evaluó la aplicación foliar y radicular de CSL en plantas de pimiento cultivadas con diferentes condiciones de fertilización nitrogenada. Este tratamiento mejoró el uso eficiente del nitrógeno, incrementando la asimilación de nitrógeno.

- **Resumen de los resultados, discusión y conclusiones.** Análisis y resumen de los resultados y conclusiones obtenidos en cada uno de los ensayos realizados.
- **Conclusiones generales.** Conclusiones globales de los estudios que forman parte de la tesis doctoral.
- **Investigaciones futuras.** Posibles nuevas líneas de trabajo futuras.



3. RESUMEN Y ABSTRACT



3. RESUMEN

La exposición de las plantas a condiciones ambientales adversas ha cobrado una importancia creciente en la agricultura moderna, especialmente en situación de cambio climático. Entre dichas condiciones ambientales estresantes para los cultivos podemos encontrar la radiación ultravioleta (UV) que puede causar quemaduras solares y daños moleculares en las plantas, afectando negativamente su fotosíntesis y metabolismo. También, la salinidad del suelo que puede interferir en la absorción de agua y nutrientes, provocando desequilibrios osmóticos y toxicidad iónica en las plantas.

Por otro lado, con el aumento de la población mundial se ha realizado una excesiva fertilización nitrogenada para incrementar la productividad de los cultivos, ocasionando problemas medioambientales. Estos factores pueden impactar negativamente en el desarrollo de los cultivos y en la salud de las personas. En este contexto, la investigación sobre estrategias para mejorar la resistencia y la eficiencia en el uso de nutrientes de los cultivos es crucial.

Entre estas estrategias, se ha estudiado el uso de productos agroquímicos denominados “bioestimulantes”. Uno de los ingredientes para la formulación de los bioestimulantes es el licor de maceración de maíz (CSL), este es un subproducto derivado de la industria procesadora de dicho cereal, que tiene muchos compuestos que pueden actuar con efecto bioestimulante. Sin embargo, no se ha profundizado en qué efectos concretos puede tener, ni el modo y el momento de aplicación.

En este contexto, la presente tesis se enfoca en evaluar diferentes formas de CSL como bioestimulante, su modo de acción y su impacto, tanto, en plantas sometidas a condiciones de estrés ambiental (radiación UV y alta salinidad), como en la eficiencia en el uso de la fertilización nitrogenada. Se han llevado a cabo cuatro experimentos para determinar el efecto bioestimulante y que formas de aplicación son más efectivas para incrementar la resiliencia en los cultivos.

Los cultivos seleccionados para los experimentos fueron el pepino y el pimiento. Estos fueron elegidos dada su relevancia en la agricultura y su conocida sensibilidad a estos tipos de estreses ambientales. El pepino, por ejemplo, es particularmente susceptible a los daños causados por la radiación UV, mientras que el pimiento muestra una sensibilidad notable a la salinidad del suelo.

En el primer experimento se evaluó si CSL mejoraba el crecimiento y desarrollo de plantas de pimiento en condiciones controladas. Por esta razón, se realizaron cuatro tratamientos con dos tipos de CSL (CSL-H y CSL-B), diferenciados por su método de estabilización, y aplicados tanto de manera foliar como radicular. El objetivo era determinar qué método de aplicación y tipo de CSL era más efectivo en cuanto a la promoción del crecimiento vegetativo y el desarrollo de las plantas de pimiento.

En el segundo experimento se analizó si la aplicación de CSL mitigaba la absorción y acumulación de iones tóxicos y su fitotoxicidad en plantas de pimiento cultivadas en condiciones de estrés salino. Para ello, se realizaron cuatro tratamientos en una cámara de cultivo: riego con solución nutritiva; riego con 100 mM de NaCl en la solución nutritiva; riego con 100 mM de NaCl en la solución nutritiva y aplicación foliar de CSL a 5 mL L⁻¹ cada 7 días; y riego con 100 mM de NaCl en la solución nutritiva y aplicación radicular de CSL a 5 mL L⁻¹ cada 7 días. Este enfoque permitió determinar el método de aplicación de CSL más efectivo (vía foliar y/o vía radicular) para reducir los efectos fitotóxicos del estrés salino en las plantas.

En el tercer experimento se investigó si la aplicación del producto protector Archer® Eclipse, cuya composición incluye CSL, mitigaba el daño por quemaduras solares y sus efectos asociados en plantas de pepino cultivadas en condiciones que inducen quemadura solar. Con este fin, se establecieron dos tratamientos: plantas no tratadas (control) y plantas rociadas con Archer® Eclipse. El objetivo era determinar la eficacia de Archer® Eclipse en la reducción de los síntomas de quemaduras solares y en la mejora de parámetros como la biomasa, temperatura foliar, fotosíntesis y estrés oxidativo en las plantas. Las plantas tratadas con Archer® Eclipse se compararon con las no tratadas para evaluar diferencias significativas en la resistencia a las condiciones de radiación solar intensa y altas temperaturas.

En el cuarto experimento se valoró si la aplicación de CSL mitigaba los efectos de la reducción de nitrógeno en plantas de pimiento cultivadas en diferentes concentraciones de fertilización nitrogenada. Para ello, se establecieron cuatro tratamientos que variaban en la cantidad de nitrógeno proporcionado (100% N, 75% N, 50% N, y 25% N) y el tipo de aplicación de CSL (sin CSL, CSL foliar y CSL radicular) para determinar la forma más efectiva de aplicación de CSL en términos de reducir los efectos negativos de la limitación de nitrógeno en las plantas. Los tratamientos se diseñaron para investigar cómo la aplicación de CSL podría mejorar la eficiencia en el uso del nitrógeno (N_utE y N_uE), aumentando la asimilación de nitrógeno (incremento de actividades enzimáticas) y la concentración de aminoácidos y proteínas en condiciones de suministro reducido de nitrógeno.

De estos experimentos las conclusiones más relevantes fueron las que se muestran a continuación:

- I. Primer experimento: Los resultados obtenidos mostraron que la aplicación de productos CSL (tanto CSL-B como CSL-H) en plantas de pimiento resultó en un aumento significativo del crecimiento vegetativo en comparación con las plantas control. Este incremento en el crecimiento se debió a: (i) la rica composición de los productos CSL, que incluye aminoácidos libres, ácidos húmicos y fúlvicos, y nutrientes como nitrógeno orgánico, potasio y fósforo, y (ii) la estimulación de procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas, incluyendo el metabolismo del carbono, la eficiencia en el uso del agua y

la síntesis hormonal. Además, se observó que la aplicación de CSL a través de las raíces fue más efectiva que la aplicación foliar. La aplicación de CSL en dosis bajas (5 mL L^{-1}) no solo aumentó la biomasa de las plantas, sino que también mejoró la absorción y concentración de nutrientes esenciales en las hojas.

- II. Segundo experimento: Los resultados obtenidos mostraron que CSL, especialmente la aplicación radicular, mejoró significativamente el crecimiento de las plantas de pimiento sometidas a alta salinidad. Se observó que la aplicación de CSL radicular mantuvo la actividad fotoquímica y estimuló la eficiencia fotosintética, lo que, junto con una mayor concentración foliar de K y una reducción del cierre estomático bajo estrés salino, permitió una alta tasa de fotosíntesis neta y redujo la generación de ROS, contrarrestando así el efecto fitotóxico de los iones de Na.
- III. Tercer experimento: Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con Archer® Eclipse en plantas de pepino bajo condiciones de estrés por alta luminosidad y temperatura resultó en un incremento significativo en el crecimiento y biomasa de las plantas. Además, se observó que el tratamiento con Archer® Eclipse no afectó negativamente los mecanismos de regulación del intercambio gaseoso. Por otro lado, las plantas no tratadas mostraron un aumento en su respuesta antioxidante, indicando un estrés más intenso en comparación con las plantas tratadas. Estos hallazgos sugieren que Archer® Eclipse ofrece una protección efectiva contra las condiciones que inducen quemaduras solares en las plantas de pepino.
- IV. Cuarto experimento: Los resultados obtenidos mostraron que reducciones hasta 50% y 25% en la concentración de nitrógeno (N-50% y N-25%) provocaron una disminución notable en la biomasa y el área foliar de las plantas. Sin embargo, la aplicación de CSL, especialmente radicular, mostró una capacidad significativa para mitigar estos efectos negativos. El CSL mejoró la asimilación de nitrógeno, aumentó la eficiencia en su uso e incrementó la síntesis de aminoácidos y proteínas. A diferencia de la aplicación foliar, que tuvo un impacto limitado, la aplicación radicular de CSL resultó ser una estrategia efectiva para mejorar el crecimiento y la salud de las plantas de pimiento en condiciones de deficiencia de nitrógeno.

ABSTRACT

The exposure of plants to adverse environmental conditions has gained increasing importance in modern agriculture, particularly in this situation of climate change. Among these stressful environmental conditions for crops, we can find ultraviolet (UV) radiation, which can cause sunburn and molecular damage in plants, negatively affecting their photosynthesis and metabolism. Also, soil salinity can interfere with the absorption of water and nutrients, causing osmotic imbalances and ionic toxicity in plants.

On the other hand, with the sustained increase in the world population, excessive nitrogen fertilization has been carried out to increase crop productivity without increasing the cultivated space, causing environmental problems. These factors can negatively impact crop development and human health. In this context, research on methods to improve plant resistance and nutrient use efficiency is crucial.

Among these methods, the use of plant-derived biostimulants has been studied. One of these biostimulants is corn steep liquor (CSL), a by-product derived from the corn processing industry, which contains many molecules that can act as biostimulants, but its specific effects, as well as the mode and timing of application, have not been thoroughly investigated.

In this context, this thesis focuses on evaluating different forms of CSL as a biostimulant, its mode of action, and its impact, both on plants subjected to environmental stress conditions (UV radiation and high salinity), and on the efficiency of nitrogen fertilization. Four experiments were carried out to determine the biostimulant effect and which forms of application are most effective in increasing resilience in crops.

The crops selected for the experiments were cucumber and pepper, due to their relevance in agriculture and their known sensitivity to these types of environmental stress. Cucumber, for example, is particularly susceptible to damage caused by UV radiation, while pepper shows notable sensitivity to soil salinity.

In the first experiment, it was evaluated whether CSL improved the growth and development of pepper plants under controlled conditions. For this reason, four treatments were carried out with two types of CSL (CSL-H and CSL-B), differentiated by their stabilization method, and applied both foliarly and radicularly. The objective was to determine which method of application and type of CSL was most effective in terms of promoting vegetative growth and development in pepper plants.

In the second experiment, it was analyzed whether the application of CSL mitigated the absorption and accumulation of toxic ions and their phytotoxicity in pepper plants grown under saline stress conditions. For this, four treatments were carried out in a growth chamber: irrigation with nutrient

solution; irrigation with 100 mM NaCl in the nutrient solution; irrigation with 100 mM NaCl in the nutrient solution and foliar application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days; and irrigation with 100 mM NaCl in the nutrient solution and radicular application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days. This approach allowed determining the most effective method of CSL application (foliar and/or radicular) to reduce the phytotoxic effects of saline stress in plants.

In the third experiment, it was investigated whether the application of the protective product Archer® Eclipse, whose composition includes CSL, mitigated sunburn damage and its associated effects on cucumber plants grown under conditions that induce sunburn. To this end, two treatments were established: untreated plants (control) and plants sprayed with Archer® Eclipse. The objective was to determine the efficacy of Archer® Eclipse in reducing the symptoms of sunburn and in improving parameters such as biomass, leaf temperature, photosynthesis, and oxidative stress in plants. Plants treated with Archer® Eclipse were compared with untreated ones to evaluate significant differences in resistance to conditions of intense solar radiation and high temperatures.

In the fourth experiment, it was assessed whether the application of CSL mitigated the effects of nitrogen reduction in pepper plants grown at different concentrations of nitrogen fertilization. For this, four treatments were established that varied in the amount of nitrogen provided (100% N, 75% N, 50% N, and 25% N) and the type of CSL application (without CSL, foliar CSL, and radicular CSL) to determine the most effective form of CSL application in terms of reducing the negative effects of nitrogen limitation in plants. The treatments were designed to investigate how CSL application could improve nitrogen use efficiency (NUtE and NUE), increasing nitrogen assimilation (increase in enzymatic activities) and the concentration of amino acids and proteins under conditions of reduced nitrogen supply.

From these experiments, the most relevant conclusions were as follows:

- I. First experiment: The results obtained showed that the application of CSL products (both CSL-B and CSL-H) in pepper plants resulted in a significant increase in vegetative growth compared to control plants. This increase in growth was due to: (i) the rich composition of CSL products, which includes free amino acids, humic and fulvic acids, and nutrients such as organic nitrogen, potassium, and phosphorus, and (ii) the stimulation of physiological and biochemical processes in plants, including carbon metabolism, water use efficiency, and hormonal synthesis. In addition, it was observed that the application of CSL through the roots was more effective than foliar application. CSL at low doses (5 mL L⁻¹) not only increased plant biomass but also improved the absorption and concentration of essential nutrients in the leaves.

- II. Second experiment: The results obtained showed that CSL, especially radicular application, significantly improved the growth of pepper plants subjected to high salinity. It was observed that radicular application of CSL maintained photochemical activity and stimulated photosynthetic efficiency, which, along with a higher foliar concentration of K^+ and a reduction of stomatal closure under saline stress, allowed a high rate of net photosynthesis and reduced ROS generation, thus counteracting the phytotoxic effect of Na^+ ions.

- III. Third experiment: The results obtained showed that treatment with Archer® Eclipse in cucumber plants under high light and temperature stress conditions resulted in a significant increase in plant growth and biomass. In addition, it was observed that treatment with Archer® Eclipse did not negatively affect the mechanisms of gas exchange regulation in plants. On the other hand, untreated plants showed an increase in their antioxidant response, indicating more intense stress compared to treated plants. These findings suggest that Archer® Eclipse offers effective protection against conditions that induce sunburn in cucumber plants.

- IV. Fourth experiment: The results obtained showed that reductions up to 50% and 25% in nitrogen concentration (N-50% and N-25%) caused a notable decrease in biomass and leaf area of the plants. However, the application of CSL, especially radicular, showed a significant capacity to mitigate these negative effects. CSL improved nitrogen assimilation, increased its use efficiency, and increased the synthesis of amino acids and proteins. Unlike foliar application, which had a limited impact, radicular application of CSL proved to be an effective strategy for improving the growth and health of pepper plants under nitrogen deficiency conditions.

4. INTRODUCCIÓN



4. INTRODUCCIÓN

4.1 Importancia económica y características agronómicas de los cultivos hortícolas en España: pimiento y pepino

4.1.1 Importancia económica del pimiento y pepino

Como ya hemos comentado anteriormente, en esta tesis se han seleccionado como cultivos de ensayo el pimiento y pepino dada la importancia socioeconómica que tienen en España y a los diversos problemas medioambientales que se enfrentan en las zonas de clima mediterráneo. Comenzando con el análisis del pimiento, la superficie mundial de este cultivo (*Capsicum annuum* L.) en la última década ha mantenido una tendencia global creciente, alcanzando en el año 2021 una superficie de cultivo superior a 2 millones de hectáreas y una producción de 55 millones de toneladas. La Figura 4.1 muestra las evoluciones de la superficie de cultivo (cuadrados azules) y la producción mundial (cuadrados verdes) de pimiento. Ambas variables han aumentado en el intervalo representado, aunque la pendiente de la producción es menor que la de la superficie de cultivo.

La evolución de la superficie y producción de cultivo mundial de pepino (*Cucumis sativus* L.) muestra una evolución similar a la de pimiento, con un incremento progresivo de ambos parámetros siendo mayor el incremento de la producción. En el año 2021 se alcanzaron 2,45 millones de hectáreas y una producción de 95 millones de toneladas (Figura 4.1).

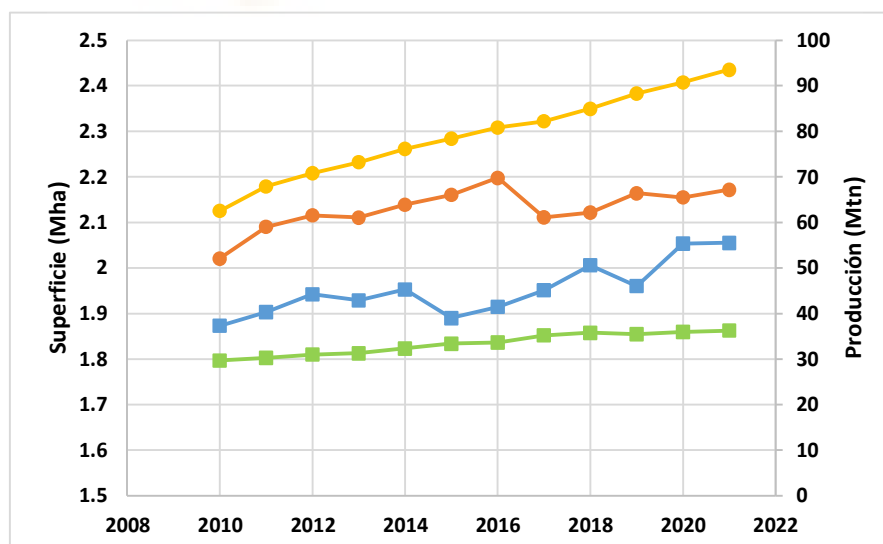


Figura 4.1. Superficie (Mha) y producción (Mtn) mundiales de pimiento (azul y verde, respectivamente) y pepino (naranja y amarillo, respectivamente).

El mayor productor mundial de pimiento es China, con una producción anual en 2021 de casi 17 Mtn (47 % de la producción mundial), seguido de Turquía, con 3 Mt, Indonesia, con 2,7 Mtn,

México, con 2,6 Mtn, y España con 1,5 Mtn. Por continentes, Asia es el principal productor mundial de pimienta fresca, con el 68 %, mientras que África, Europa y América contribuyen de un modo similar a la producción mundial (aproximadamente el 10 % cada uno; Figura 4.2).

China también es el principal productor mundial de pepino con una producción en 2021 de 75,7 Mtn, ocupando España la quinta posición con 0,7 Mtn. Por continentes, Asia es el principal productor de pepino con un 89 % del total mundial en 2021 (FAO, 2022; Figura 4.2).

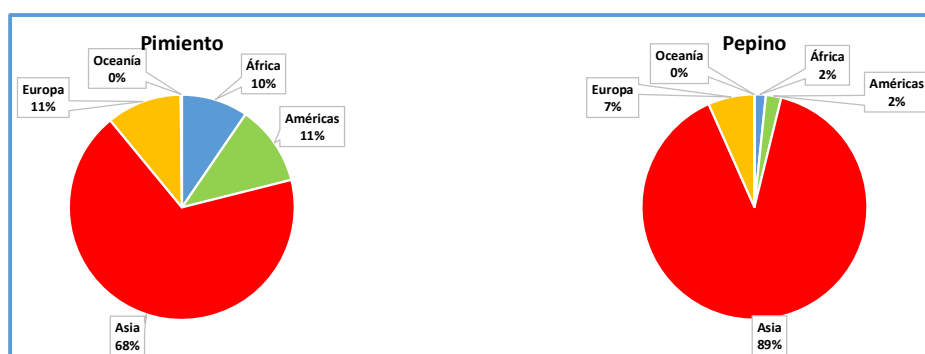


Figura 4.2. Proporción continental de producción de pimienta y pepino (%).

Pasando al valor económico y productivo del cultivo, en la última década, el valor de la producción de pimienta tiende a crecer, aunque en los últimos años, intervalo 2018-2021, disminuyó ligeramente alcanzando un valor de 31 G€ (Figura 4.3). Sin embargo, el rendimiento productivo se mantiene aproximadamente constante, por lo que el descenso en el valor económico se debe a una disminución en el precio de mercado a escala global (datos no disponibles). A pesar de ello, el pimienta es un cultivo que representa una buena fuente de ingresos para los productores en muchos países y desempeña un papel importante en el comercio internacional.

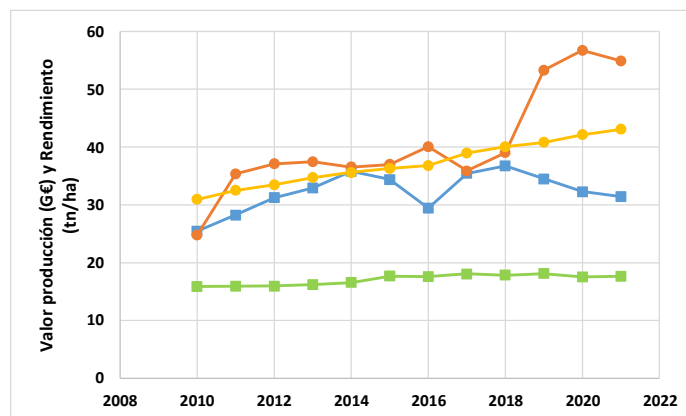


Figura 4.3. Valor económico de la producción anual (10^9 €) y del rendimiento medio (tn/ha) a escala mundial para pimienta (azul y verde, respectivamente) y pepino (naranja y amarillo, respectivamente).

El valor económico del cultivo de pepino en la última década muestra una tendencia creciente hasta un valor de 55 G€ en 2021, con un elevado incremento en 2019 (Figura 4.3). Por su parte,

el rendimiento del cultivo también muestra una tendencia creciente durante el intervalo analizado, pasando de 31 a 43 tn/ha, esto es, un incremento cercano al 50 % (FAO, 2022). Dado que todos los indicadores mantienen una evolución creciente similar, el incremento del valor de la producción en 2019 puede ser debido a un incremento en el precio de mercado global (datos no disponibles).

En España, el cultivo del pimiento ha sido muy importante debido a la demanda de los mercados europeos. En los últimos años, la situación de incertidumbre en los mercados internacionales y la competencia con nuevas áreas de producción han obligado a evaluar nuevas estrategias de rentabilidad en numerosas regiones españolas. En 2022, la superficie de cultivo fue de 9.861 ha y la producción anual de 1.529.034 tn (Tabla 4.1). La producción se concentra principalmente en invernaderos a lo largo de la costa mediterránea española. Las comunidades autónomas más importantes son Andalucía, con 2.160 ha, 1.895 de ellas (73 % del total) en invernaderos en la provincia de Almería; Región de Murcia, con 2.009 ha, 1.621 de ellas (83 % del total) en invernaderos; Castilla-La Mancha, con 1.858 ha; Navarra, con 993 ha; y Comunidad Valenciana con 808 ha, 364 de ellas en invernaderos de la provincia de Alicante (MAPA, 2023). Para la exportación, se seleccionan frutos de tamaño moderado, con forma rectangular y alargada, ya sea en forma cuadrada o en estilo California en colores como rojo (para el mercado francés, suizo y sueco), amarillo y verde (para el mercado alemán o portugués). Estos se suelen envasar en mallas tricolores, especialmente para el mercado del centro y norte de Europa. España es actualmente el principal exportador de pimientos en la Unión Europea y ocupa el quinto lugar a nivel mundial.

Tabla 4.1. Superficie de cultivo (ha), producción (tn) y rendimiento en invernadero (tn/ha) para las comunidades autónomas con mayor cultivo de pimiento y pepino en España en 2022 (MAPA, 2023).

| | Pimiento | | | Pepino | | |
|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| | Superficie (ha) | Producción (tn) | Rto. Inv. (tn/ha) | Superficie (ha) | Producción (tn) | Rto. Inv. (tn/ha) |
| Andalucía | 2.610 | 1.077.592 | 69,5 | 1.205 | 702.819 | 106,5 |
| R. de Murcia | 2.009 | 197.436 | 83,3 | 98 | 22.787 | 83,7 |
| Castilla-La Mancha | 1.858 | 42.164 | - | 195 | 4.108 | - |
| Navarra | 1.388 | 36.473 | - | 11 | 306 | - |
| C. Valenciana | 808 | 55.868 | 115,3 | 13 | 5.915 | 85,1 |
| España | 9.861 | 1.529.034 | 77,3 | 1.671 | 769.905 | 104,3 |

En 2022, la superficie nacional de cultivo de pepino fue de 1.671 ha y la producción anual de 769.905 tn. Como en el resto de las hortalizas más importantes, la mayor parte de la producción

tiene lugar en invernadero. Las principales zonas productoras son Andalucía, con 1.205 ha, 1.194 de ellas (prácticamente el 100 %) en invernaderos en la provincia de Almería; Castilla-La Mancha, con 195 ha, prácticamente todas al aire libre; Región de Murcia, con 98 ha, todas en invernadero; Comunidad Valenciana con 13 ha; y Navarra, con 993 ha (MAPA, 2023).

4.1.2 Características agronómicas

4.1.2.1 El pimiento

Alrededor del género *Capsicum*, hay un creciente interés y fascinación debido a la increíble diversidad de este cultivo en lo referente a la arquitectura de la planta, la morfología de las flores, la tipología de los frutos, los colores, la picantez y los rasgos cualitativos que hacen que sea extremadamente versátil y adecuado para innumerables usos.

El pimiento forma parte del género *Capsicum*, cuya familia son las Solanáceas que incluye más de 90 géneros y 2500 especies de plantas con flores entre las que se encuentran vegetales comercialmente importantes como el tomate, la patata, y la berenjena. Hasta la fecha, en el género *Capsicum* se han registrado 35 especies (Carrizo García *et al.*, 2016), cinco de las cuales, *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*, han sido domesticadas y difundidas con diferentes nombres dependiendo de la región de cultivo. En la Figura 4.4 se indica la descripción taxonómica del pimiento.

| | |
|---|--|
| Reino: <i>Plantae</i> |  |
| División: <i>Magnoliophyta</i> | |
| Clase: <i>Magnoliopsida</i> | |
| Subclase: <i>Asteridae</i> | |
| Orden: <i>Solanales</i> | |
| Familia: <i>Solanaceae</i> | |
| Subfamilia: <i>Solanoideae</i> | |
| Tribu: <i>Capsiceae</i> | |
| Género: <i>Capsicum</i> | |
| Especie: <i>Capsicum annuum</i> L. | |

Figura 4.4. Descripción taxonómica del pimiento.

El pimiento es una planta herbácea perenne, aunque generalmente se cultiva como anual o bienal. Algunos ejemplares tienen un porte arbustivo y alcanzan alturas de entre 80 y 100 cm, mientras que otros pueden llegar a los 200 cm. Sus estados fenológicos, germinación y establecimiento, crecimiento vegetativo, floración, fructificación y maduración se representan en la Figura 4.5.

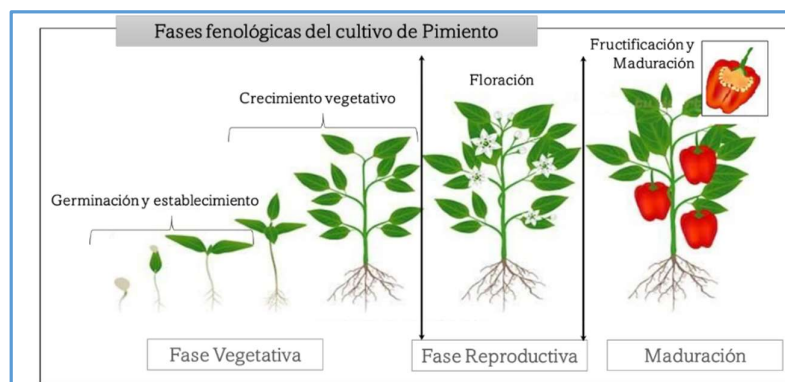


Figura 4.5. Desarrollo fenológico del cultivo de pimiento.

El sistema de raíces del pimiento es voluminoso y profundo, compuesto por una raíz principal pivotante. Sin embargo, en suelos compactados o de textura pesada, el desarrollo de las raíces principales puede estar limitado. Además de la raíz pivotante, la planta desarrolla numerosas raíces adventicias que se extienden horizontalmente, llegando a medir hasta medio metro o incluso un metro de longitud. Los tallos del pimiento son ramificados y ligeramente vellosos, con hojas ovaladas, pecioladas y solitarias o en pares. Estas hojas miden entre 4 y 12 cm de largo y entre 1,5 y 4 cm de ancho. También presentan pubescencia y sus márgenes son lisos, con una base estrecha y un ápice ligeramente puntiagudo. Las flores del pimiento pueden ser solitarias o agruparse en pequeñas cantidades. Son erectas o ligeramente colgantes y nacen en la axila de las hojas en el tallo. El cáliz de la flor es persistente, en forma de campana y completo, con 5-7 costillas principales redondeadas que terminan en un diente, generalmente roma, y algunas costillas secundarias. La corola de la flor es relativamente pequeña, con aproximadamente 1 cm de diámetro. Está compuesta por 5-7 pétalos que están ampliamente unidos en la base, de color blanco y con bordes finamente dentados. Las anteras suelen ser de color púrpura. El fruto del pimiento puede tener una amplia variedad de formas. Es una baya hueca con 2-4 tabiques incompletos en los que se encuentran las semillas, que están fuertemente comprimidas. Estas semillas son de color amarillento y tienen forma discoidal, midiendo entre 3 y 5 mm de diámetro. La planta florece desde mayo hasta agosto y la fructificación ocurre desde julio hasta noviembre. El pimiento es capaz de autopolinizarse.

Una de las singularidades del pimiento radica en las variedades picantes debido a la presencia de capsaicinoides. Los capsaicinoides son metabolitos secundarios y derivados de fenilpropanoides producidos en células de la epidermis placentaria y acumulados en estructuras (ampollas) ubicadas en la superficie de la placenta (Stewart *et al.*, 2007). Los pimientos también son una fuente extremadamente buena de compuestos con propiedades antioxidantes y responsables de la pigmentación de los frutos. Se encuentran diferentes colores en los frutos maduros como resultado de la acumulación de carotenoides en los cromoplastos durante la maduración, como la capsantina y la capsorrubina (principalmente en frutos rojos), la violaxantina y la neoxantina (principalmente

en frutos amarillos) y la luteína y el β -caroteno (principalmente en frutos naranjas) (Gómez-García y Ochoa-Alejo, 2013). Además, se ha demostrado que los frutos desempeñaron un papel destacado en el descubrimiento de la vitamina C por parte de Albert Szent-György, quien extrajo el primer compuesto químico puro del pimentón húngaro y fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1937 (<http://www.nobelprize.org>). De hecho, dentro de las especies de *Capsicum*, se encuentra comúnmente un alto nivel de ácido ascórbico (vitamina C) capaz de satisfacer la ingesta diaria recomendada (FDA, 2018), que se estima en 60 mg por cada 100 g de pimiento crudo), tanto en los tipos dulces como en los picantes, y está ampliamente documentado en la literatura. Se reconoce que también contienen altos niveles de otras vitaminas esenciales, como la vitamina A en forma de β -caroteno y las vitaminas del grupo B (tiamina, riboflavina y niacina). Todos estos compuestos, cuyo contenido está determinado por la especie, la variedad, las condiciones ambientales y el estado de maduración, ejercen sus efectos biológicos protegiendo las células contra el daño oxidativo mediante la interacción con las moléculas de oxígeno y la eliminación de radicales peroxilo (Padayatty *et al.*, 2003; Howard y Wildman, 2007). Por último, se han visto propiedades antimicrobianas y antivirulentas contra el *Streptococcus pyogenes*, un importante patógeno humano (Marini *et al.*, 2015), y la infección por *Fusarium* (Tewksbury *et al.*, 2008), un hongo polífago que afecta a muchas hortalizas. Todas estas propiedades hacen del pimiento un buen candidato contra enfermedades.

4.1.2.2 El pepino

El pepino es uno de los cultivos de hortalizas más populares cultivados ampliamente en todo el mundo (Soleimani *et al.*, 2009). Su descripción taxonómica se indica en la Figura 4.6.

Reino: *Plantae*
División: *Magnoliophyta*
Clase: *Magnoliopsida*
Subclase: *Dilleniidae*
Orden: *Cucurbitales*
Familia: *Cucurbitaceae*
Subfamilia: *Cucurbitoideae*
Tribu: *Benincaseae*
Género: *Cucumis*
Especie: *Cucumis sativus* L.



Figura 4.6. Descripción taxonómica del pepino.

El pepino es una herbácea anual monoica con tallos rastreros o trepadores de 4-5 ángulos que pueden alcanzar hasta 5 m de longitud. Tiene ramificación escasa con zarcillos simples de hasta 30 cm de largo. La planta está cubierta de pelos ásperos y el sistema radicular es extenso y superficial. Las hojas son alternas, simples y se encuentran en pecíolos de 5-20 cm de largo. La

lámina tiene forma triangular-ovada, de 7-20 cm de ancho por 7-15 cm de largo, palmatilobulada de 3-7 lóbulos, con base profundamente cordada, ápice agudo, margen dentado, y presenta pelos ásperos o ásperos en ambas superficies. Las flores son unisexuales, regulares y pentámeras; los sépalos son estrechamente triangulares, de 0,5-1 cm de largo; la corola es ampliamente campanulada, con lóbulos de hasta 2 cm de largo y color amarillo. Las flores estaminadas se presentan en fascículos de 3-7 flores, con pedicelo de 0,5-2 cm de largo y 3 estambres. Las flores pistiladas son solitarias, con pedicelo corto y grueso de hasta 0,5 cm de largo, que se alarga hasta 5 cm en el fruto; el ovario es inferior, elipsoide, muricado, de 2-5 cm de largo, cubierto de pelos punzantes o verrugosos, y el estigma es trilobulado. El fruto es una baya péndula, globosa o cilíndrica, de más de 30 cm de largo, a menudo ligeramente curvada, con tubérculos o verrugas escasas cuando es joven y luego se vuelve lisa y glabra; la piel suele ser verde, pero en algunas variedades es blanca, amarilla o marrón; la pulpa es verde claro y contiene numerosas semillas. Sus estados fenológicos pasan por germinación, desarrollo vegetativo, floración y maduración (Figura 4.7). Las semillas son ovado-oblongas, de 8-10 mm de largo por 3-5 mm de ancho, comprimidas, de color blanco y lisas.

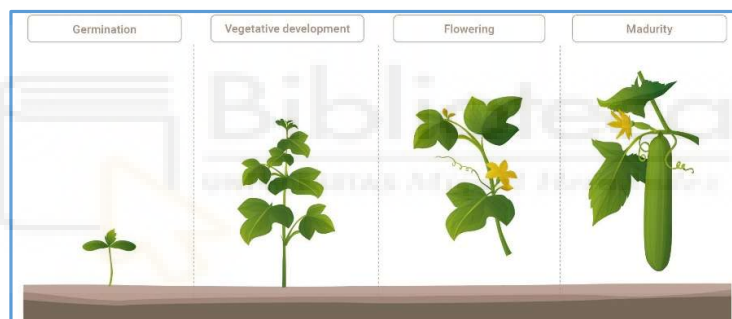


Figura 4.7. Desarrollo fenológico del cultivo de pepino.

El pepino requiere un clima cálido y suave, por lo que en países frescos y templados se cultiva en invernaderos; solo durante los veranos calurosos se puede cultivar al aire libre. La temperatura óptima para el crecimiento es de aproximadamente 30 °C y la temperatura nocturna óptima es de 18-21 °C; la temperatura mínima para un buen desarrollo de la planta es de 15 °C. La planta muere con las heladas y su crecimiento se detiene a 10 °C. Las variedades de pepinos para encurtir suelen estar más adaptadas a bajas temperaturas. El pepino es heliófilo y prospera mejor a pleno sol. Se necesita una alta intensidad de luz para obtener rendimientos óptimos. La sensibilidad a la duración del día varía según la variedad; las duraciones cortas del día generalmente promueven el crecimiento vegetativo y la producción de flores femeninas. El pepino necesita una cantidad adecuada de agua, pero detesta el encharcamiento. Una humedad relativa baja resulta en una alta evaporación de la planta debido a la gran superficie foliar, por lo que el riego suficiente es muy importante. Una humedad relativa alta favorece la aparición del mildiu vellosa. El suelo debe ser fértil, bien aireado, bien drenado, friable, con un pH de 6,0-7,0. Los suelos arenosos, limosos o

arcillosos-arenosos deben enriquecerse mediante la incorporación de cultivos de cobertura o estiércol animal. Los suelos pesados o mal drenados no son adecuados para la producción de pepinos. Los pepinos se pueden cultivar en enrejados en invernaderos hidropónicos en canales o tubos donde las plantas se anclan en grava, arena o mezclas sin suelo.

El pepino es una hortaliza de bajo aporte calórico debido a su reducido contenido en hidratos de carbono, en comparación con otras hortalizas, y a su elevado contenido de agua. El pepino aporta fibra, flavonoides, antioxidantes, vitamina C, provitamina A y vitamina E. En menores proporciones, presenta vitaminas del grupo B tales como folatos, B1, B2 y B3. En su piel se encuentran pequeñas cantidades de β -caroteno. La vitamina A es esencial para la visión, el buen estado de la piel, el cabello, las mucosas, los huesos y para el buen funcionamiento del sistema inmunológico. Los folatos intervienen en la producción de glóbulos rojos y blancos, en la síntesis de material genético y en la formación de anticuerpos del sistema inmunológico. La vitamina E interviene en la estabilidad de las células sanguíneas y en la fertilidad. Al igual que la vitamina C, tiene acción antioxidante, y ésta última además interviene en la formación de colágeno, glóbulos rojos, huesos y dientes, favorece la absorción del hierro y aumenta la resistencia frente a las infecciones. El pepino no se considera una hortaliza rica en minerales, siendo el potasio el más abundante. En menor proporción se hallan el fósforo y el magnesio. El potasio es un mineral necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso y para la actividad muscular normal, además de intervenir en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. El fósforo interviene en la formación de huesos y dientes, al igual que el magnesio. Éste último además se relaciona con el funcionamiento del intestino, mejora la inmunidad y posee un suave efecto laxante. En la composición del pepino está presente una pequeña proporción de β -sitosterol. Se trata de un compuesto con actividad antiinflamatoria e hipoglucemiante, que participa en la respuesta del sistema inmunológico (PROFECO, 2020; MAPA, 2024).

4.2 Consecuencias Socioeconómicas del Estrés Abiótico en los Cultivos

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta la agricultura es al cambio climático ya que impone escenarios medioambientales no aptos para los cultivos. Un aumento en la temperatura durante el último ha sido el factor desencadenante de la salinización de las tierras cultivables mediante el aumento de la tasa de evaporación, la inestabilidad en el contenido de agua del suelo debido a inundaciones o sequías, y la fluctuación de la precipitación, lo cual interfiere gravemente con el acceso a alimentos a nivel global. El aumento de la temperatura global causado por el ser humano aumentó 1 °C en 2017, lo que, dada la estimación reciente de que la temperatura seguirá aumentando ~0,2 °C por década (Allen *et al.*, 2018), lleva a la conclusión de que se está exacerbando el efecto del estrés abiótico en los cultivos y poniendo en peligro el sustento alimentario de una parte significativa de la población mundial. Sin embargo, el rendimiento de algunos cultivos como el maíz se estima que se verá beneficiado con el aumento

de la temperatura global en algunas áreas, ya que una mayor concentración de CO₂ en la atmósfera, así como una temperatura más alta, aceleran el crecimiento, el desarrollo y la producción de biomasa. Para el 2025, la escasez completa de agua afectará a más de 1,8 mil millones de personas en el mundo, además, el 65 % de la población puede enfrentarse a estrés por falta de agua en diversos grados (Lal, 2018). La fluctuación extrema en los eventos climáticos genera cargas socioeconómicas en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo, donde los productos agrícolas sirven como una fuente importante de ingresos financieros para las familias además de su papel en proporcionar alimentos directamente. Entre los estreses abióticos, la sequía es probablemente la que más perjuicios económicos provoca; de hecho, durante un período de tres décadas (1980-2010) se estimó una pérdida económica de aproximadamente US \$2 mil millones debido a la combinación de sequía con estrés por altas temperaturas. En Asia, más de la mitad de las explotaciones agrícolas importantes de arroz están negativamente influenciadas debido a estrés por déficit hídrico (Bouman *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2018), ya que el 95 % de la producción mundial de arroz se consume en Asia, se puede apreciar la magnitud de la amenaza que afrontarán dos tercios de la población mundial (Dey *et al.*, 2018). Recientemente, Ray *et al.* (2019) realizaron una evaluación exhaustiva del impacto del cambio climático en la producción de los diez principales cultivos (es decir, cebada, yuca, maíz, palma aceitera, colza, arroz, sorgo, soja, caña de azúcar y trigo: que componen el 85 % de las calorías consumibles globales). Además, con una recopilación de datos de 1974 a 2013 en aproximadamente 20.000 unidades políticas, se descubrió que existe un 1 % aproximadamente de disminución en la producción de estos cultivos principales debido a estrés abiótico a consecuencia del cambio climático en todo el mundo, lo que significa que los efectos del calentamiento global ya están en marcha. De los tres principales cultivos de cereales, se observó una pérdida importante de producción de arroz en India y Vietnam con aproximadamente 2,2 millones de toneladas (Aggarwal y Mall 2002) y 1 millón de toneladas (Peng *et al.*, 2004), respectivamente, la producción de trigo también se vio afectada, especialmente en Turquía con 0,8 millones de toneladas. Análogamente, en América del Sur y del Norte, los cambios en el clima influenciaron negativamente la producción de tres principales tipos de cereales, mientras que los cambios parecían favorecer la producción de maíz, caña de azúcar, palma aceitera y soja (Mourtzinis *et al.*, 2015; Tack *et al.*, 2015). Durante el período mencionado anteriormente, se observó una reducción del 3 % en las calorías consumibles de los diez cultivos principales del pueblo australiano (Hochman *et al.*, 2017). En el caso de África subsahariana, esta disminución fue de hasta el 1,8 % a pesar del aumento en la producción de yuca o algunos aumentos específicos en los cultivos de interés en ciertos países. Los países europeos sufrieron la mayor pérdida de producción en los diez principales alimentos consumibles debido a los efectos negativos del cambio climático en Francia 24 %, Alemania 11 %, Hungría 10 %, Rumania 7 %, Italia 7 %, España 4 % e Irlanda 3 % (Ray *et al.*, 2019). Las pérdidas de producción valen miles de millones

de dólares, lo cual hace muy vulnerable la capacidad financiera y la seguridad alimentaria; poniendo, de esta manera, a una gran parte de la población mundial en un mayor riesgo. Además, la mitad de los países que tienen actualmente problemas para acceder a alimentos, experimentan pérdidas significativas en la producción, lo cual agrava su situación.

El impacto asociado a la salud que provoca el cambio climático en la sociedad puede reflejarse en la desnutrición infantil que se proyecta que aumentará del 8,5 al 10,5 % en un escenario base. Curiosamente, los efectos impulsados por el cambio climático pueden ser positivos en zonas templadas, sin embargo, reducen el rendimiento en regiones tropicales. Debido al aumento en los insumos requeridos en el proceso de cultivo de productos agrícolas, el precio de producción aumentará, pero también afectará a los consumidores finales de dichos productos que residen en áreas urbanas o rurales (Al *et al.*, 2008; Budhathoki y Zander, 2019).

Además del impacto socioeconómico sustancial del estrés abiótico, este reto provoca de manera acumulativa perjuicios en la productividad de los cultivos al generar presión osmótica, toxicidad iónica, daño oxidativo y finalmente inadecuación en los elementos nutritivos. Como se mencionó anteriormente, la evolución ha dotado a las plantas de una cantidad innumerable de mecanismos adaptativos que pueden contribuir en gran medida a la tolerancia al estrés (Bohnert *et al.*, 2006; Waqas *et al.*, 2019). Obtener una comprensión profunda de cómo responden, desarrollan y emplean los cultivos mecanismos de tolerancia bajo estrés es fundamental para tener una imagen clara para abordar el creciente impacto del estrés abiótico en la era del cambio climático.

4.3 Respuesta de los Cultivos al Estrés Abiótico

A diferencia de los animales, las plantas son inmóviles y no pueden escapar de las condiciones perjudiciales que les afectan directamente, por lo que la respuesta de las plantas a estas situaciones les permite enfrentarse a los nuevos cambios. Los estreses abióticos están interrelacionados y pueden disminuir multidimensionalmente el crecimiento y rendimiento de los cultivos a través del estrés osmótico, estrés oxidativo y la interrupción de la distribución iónica, relaciones hídricas y homeostasis celular de las plantas. Estas condiciones pueden activar mecanismos de tolerancia que contrarrestan el estrés abiótico mediante una gran cantidad de modificaciones morfológicas, fisiológicas y moleculares para controlar el daño (Bray, 2000; Wani *et al.*, 2016).

Las respuestas a los estreses abióticos involucran cambios que incluyen morfológicamente: reducción del área foliar, disminución en el tamaño del tallo, merma en los procesos de producción y reproducción bajo estrés hídrico y salinidad, fisiológicamente: interrupción de las relaciones hídricas, conductividad estomática y transpiración, bioquímicamente: aumento en antioxidantes, no enzimas y osmoprotectores y finalmente molecularmente: aumento en la biosíntesis de fitohormonas en particular ácido abscísico (ABA), proteínas específicas y factores de transcripción (DREB, ZIP y WRKY) (Conesa *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2013;

Singh *et al.*, 2015). El estrés abiótico desencadena procesos complejos en los cultivos que hacen bastante compleja su interpretación precisa. A continuación, describirnos las respuestas y los mecanismos de tolerancia de las plantas para hacer frente al estrés abiótico.

4.3.1 Crecimiento y Productividad

Un factor determinante en la rentabilidad de los cultivos es el nivel específico de densidad de plantación que afecta a todas las prácticas agrícolas hasta la cosecha. Hay que tener en cuenta que la intensidad que el estrés abiótico tiene en el crecimiento de las plantas depende de la etapa fenológica, y así las respuestas de los cultivos podrían ser específicas para cada fase. Por ejemplo, si los cultivos están en la etapa de germinación, las consecuencias del estrés abiótico serían perjudiciales al eliminar un gran porcentaje de plántulas, lo que reduce la rentabilidad de toda la explotación (Okçu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009).

4.3.2 Etapas de Germinación y Plántulas Tempranas

La sequía en las fases tempranas de la germinación puede ser perjudicial para el porcentaje de germinación debido a una deficiencia en la absorción de agua (Jain *et al.*, 2019), reducción en el potencial hídrico y alteración de actividades enzimáticas (Ahmad *et al.*, 2009). De manera análoga, la alta salinidad en esta etapa impide la germinación y emergencia de las semillas, ya que no solo aumenta la necesidad de absorción de agua debido a la alta presión osmótica, sino que también limita la expansión celular y la emergencia de raíces primarias mediante una disminución en la disponibilidad de agua alrededor de la semilla y entre ellas (Panuccio *et al.*, 2014; Rauf *et al.*, 2007). Las respuestas de los cultivos a la sequía y la salinidad en etapas tempranas han sido estudiadas extensamente, donde la observación reciente en soja mostró la transferibilidad de los efectos del estrés por sequía de los progenitores a los descendientes, lo que en este caso se manifestó en una baja tasa de germinación y vigor (Wijewardana *et al.*, 2019). El estudio realizado por Jovović *et al.* (2018) indicó una considerable variación en las respuestas de varios cultivares de trigo a la salinidad durante la germinación, donde además de la disminución en la tasa de germinación y características relacionadas, se observó un retraso en la germinación. Como se mencionó anteriormente, la acumulación de sal y la disminución del potencial osmótico podrían ser responsables de la desaceleración o inhibición de la absorción de agua vital para movilizar componentes de nutrientes en el curso de la germinación y/o toxicidad por sodio al embrión. Se han informado resultados similares sobre las respuestas de los cultivos a la sequía y la salinidad, como el maíz, la soja, la cebada y el sorgo. La germinación de semillas también depende en gran medida de la temperatura óptima del suelo y varía de un cultivo a otro. Mientras que la germinación adecuada puede comenzar en trigo, como para los cultivos de clima templado, alrededor de 4 °C con una temperatura óptima de 12 a 37 °C, el umbral en cultivos sensibles al enfriamiento como el arroz es de 20-35 °C, que similarmente el maíz y el arroz tienen la misma

temperatura crítica mínima, 10 °C (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). El estrés por frío a menudo se define en dos términos: enfriamiento (menos de 20 °C) y congelación (menos de 0 °C). Teniendo en cuenta la fluctuación en el patrón de temperatura debido al cambio climático, las temperaturas extremas también pueden ser significativamente destructivas, especialmente en regiones tropicales y templadas, donde se produce la mayor parte de los cultivos de granos (por ejemplo, maíz, trigo, arroz y soja) (Beck *et al.*, 2004; Savitch *et al.*, 2011; Srinivasan *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2019). El estrés por frío puede obstaculizar la germinación y el desarrollo de raíces principalmente al simular un efecto fisiológico similar a la sequía, por ejemplo, en semillas de *Brassica napus* L. expuestas a estrés por enfriamiento de 2 °C, solo se observó un 50 % de germinación después de casi dos semanas, mientras que en un período de 3 días bajo 8 °C se registró la misma tasa de germinación. En un estudio reciente para monitorear las respuestas de cultivares de arroz como índice de germinación, longitud de coleóptilo y longitud de radícula a dos semanas de estrés por enfriamiento (13 °C), Cong Dien y Yamakawa (2019) informaron sobre un índice de germinación de cero o ninguna germinación en 55 de 181 cultivares y un índice de germinación del 50 % en solo 13 cultivares. La longitud del coleóptilo bajo estrés por enfriamiento disminuyó en promedio un 97,72 % (2,7 mm), de manera similar, la longitud de la radícula disminuyó un 96,73 % con 12,7 mm como la más larga. Principalmente, la reducción en la conductividad del agua bajo estrés por enfriamiento fue la responsable de posponer la germinación y la emergencia. La imbibición se considera la fase más sensible de la germinación de la semilla sometida a estrés abiótico, el estrés por frío específicamente tiene el impacto negativo más alto en la tasa de germinación en esta fase. Principalmente, porque el estrés por frío daña la membrana plasmática, lo que facilita que los solutos (por ejemplo, aminoácidos y carbohidratos) salgan de la semilla, la condición se llama "imbibición por enfriamiento" (Lyons, 1973). En un estudio donde las semillas de tomate fueron expuestas a 4 °C se observaron síntomas de fuga de electrolitos (Bae *et al.*, 2016). Además, se han investigado ampliamente los efectos no deseados de temperaturas extremadamente altas en la tasa de germinación de los cultivos, la tasa de germinación de las semillas de trigo disminuyó drásticamente a 45 °C, obviamente debido a la desecación del agua contenida en el embrión y la muerte celular en las etapas tempranas de la germinación. El efecto combinado de temperaturas altas (30 °C) y bajas (10 °C) y el estrés osmótico inducido por salinidad (-0,3 MPa) en semillas de *Triticum aestivum* condujo al retraso y la inhibición de la germinación (Hampson y Simpson, 1990).

Otra fuente importante de estrés abiótico son los niveles tóxicos de metales pesados en el suelo, que afectan al potencial de germinación al producir anomalías en las semillas a través de la toxicidad y el daño oxidativo en las membranas biológicas vitales, lo cual interrumpe la biosíntesis de carbohidratos y proteínas. Entre ellos, la influencia tóxica del Cd en la germinación de semillas ha sido investigada con frecuencia, donde los efectos son dependientes de la dosis.

Sin embargo, se ha visto con frecuencia germinación retrasada, fugas a través de la membrana (Bae *et al.*, 2016; Smiri *et al.*, 2011), impedimentos para movilizar los recursos almacenados en la semilla debidos al funcionamiento anómalo de las enzimas esenciales como la alfa-amilasa e invertasas (Sfazi-Bousbih *et al.*, 2010), obstaculización de la producción de aminoácidos y finalmente peroxidación incontrolada de lípidos (Ahsan *et al.*, 2007), de manera análoga, el Cu tiene como diana las alfa-amilasas e invertasas, lo que inhibe la movilización de nutrientes y finalmente la producción de energía para comenzar la germinación (Pena *et al.*, 2011; Sfazi-Bousbih *et al.*, 2010). Se pueden encontrar respuestas similares en semillas a otros metales pesados conocidos, por ejemplo, Ni además de la reacción descrita anteriormente también afecta a la actividad de la amilasa, la proteasa y la ribonucleasa lo que nuevamente lleva a impedir el uso de nutrientes de reserva (Ahmad y Ashraf, 2012; Ashraf *et al.*, 2011). Por otro lado, el Pb tiene como diana el proceso de producción de energía en la célula al interrumpir la absorción de elementos nutrientes (Fe y Mg) requeridos para la función de enzimas que participan en el ciclo de Calvin, inhibiendo consecuentemente el proceso de germinación o elongación de la raíz (Mohamed, 2011; Sethy y Ghosh, 2013), (para revisión ver Sethy y Ghosh (2013); Bae *et al.*, (2016)).

4.3.3 Etapas Vegetativas y Reproductivas

En general, el estrés abiótico afecta a los cultivos desde las etapas tempranas de crecimiento hasta la maduración, sin embargo, la germinación y su calidad son el pilar clave de la producción en cultivos con alta vulnerabilidad al estrés abiótico. El estrés abiótico interrumpe la producción de energía al generar una baja presión de turgencia, inhibiendo la actividad enzimática, lo que significa que incluso si la incidencia del estrés es después de las primeras etapas de establecimiento, detendrá el crecimiento y desarrollo hasta las fases de producción. Los efectos negativos del estrés por sequía con respecto al crecimiento y la productividad pueden observarse claramente en el estudio realizado por Colla *et al.*, (2010) en el que las respuestas de líneas híbridas de maíz bajo sequía resultaron en una reducción tremenda en la materia seca producida en tallo y raíz. En consecuencia, el rendimiento se redujo en 2–3 veces en comparación con el control bajo condiciones normales. La reducción en el crecimiento varía dentro de los órganos de la planta, en líneas de maíz se ha detectado un aumento en la relación raíz : tallo en respuesta al estrés por déficit hídrico (Rahul *et al.*, 2019), lo que posiblemente se deba a una menor sensibilidad en las raíces hacia el bajo potencial hídrico (Wu y Cosgrove, 2000). Una respuesta ubicua al estrés por sequía es disminuir la superficie foliar mediante plegado, que es un mecanismo de adaptación que lleva a una reducción en la absorción de la luz y a disminuir los compuestos necesario para mantener los procesos biológicos en curso, por supuesto, tales cambios disminuyen también los pigmentos fotosintéticos lo cual se refleja en una reducción del rendimiento (Flagella *et al.*, 2002; Hajibabae *et al.*, 2012). Lo más importante es la acción de

efectos aditivos de otros estreses abióticos, en particular la alta temperatura. La falta de agua en el suelo y en la propia planta conduce a un aumento de la temperatura en dichas plantas, lo que desencadena una disminución del área foliar o a una modificación estructural y funcional en las hojas, minimizando la conductividad estomática para mejorar la eficiencia del uso del agua (WUE), lo que termina con una reducción en la fotosíntesis neta. La asociación de sequía, calor y salinidad se ha observado con frecuencia, sin embargo, debido a la dificultad en su evaluación, los académicos tienden a su estudio individualmente. La respuesta de los cultivos a la salinidad a menudo comprende una disminución en el desarrollo del tallo y el enanismo al inhibir la formación de entrenudos, así como la aceleración de la caída de hojas (Kozłowski y Pallardy, 2002; Lacerda *et al.*, 2003). La inhibición del crecimiento y desarrollo puede atribuirse a la absorción de iones tóxicos que lleva a la eliminación de hojas (Hatfield y Prueger, 2015; Lacerda *et al.*, 2003). En portainjertos de pistacho sometidos a salinidad se exhibieron síntomas de necrosis en las hojas que tenían una alta correlación con la acumulación de Na^+ y Cl^- (Rahneshan *et al.*, 2018). En general, ya sea por una tasa de fijación de carbono baja, por la reducción en la función estomática como resultado de un bajo potencial hídrico (Hajiboland *et al.*, 2014) y daño a los pigmentos fotosintéticos (Ashraf, 2003), o por la influencia directa de la acumulación de iones tóxicos (y desequilibrio en la absorción de un ion esencial como K^+) (Munns, 2002; Rahneshan *et al.*, 2018) esto puede ser el factor responsable de la disminución en el crecimiento y la producción de biomasa bajo salinidad. La incidencia de estrés por enfriamiento durante el crecimiento puede causar, como se ha visto con frecuencia, daños en la actividad fotosintética. El frío es un fenómeno transitorio y la intensidad de su daño depende del momento en que ocurra, ya sea que los estomas estén abiertos o cerrados. En plantas de sandía expuestas a una reducción de 2 °C en la actividad del aparato fotosintético (Korkmaz y Dufault, 2001), posiblemente debido al daño en la cadena de producción de oxidación que conecta los dos fotosistemas (I y II) en estomas abiertos, se estudió que no pudieron recuperarse después del período de estrés (Markhart, 1986). La región árida y semiárida es propensa a provocar el efecto combinado del estrés abiótico como la alta intensidad lumínica y la alta temperatura, o esta última vs. salinidad. En algunos casos regionales paradigmáticos, se pueden estudiar los efectos combinados del déficit hídrico junto con estrés por baja temperatura como en viñedos del norte de China donde estos efectos resultaron en una influencia considerablemente negativa en la productividad (Su *et al.*, 2015). En otro ejemplo, se observan áreas mediterráneas cuyas condiciones ambientales facilitan la ocurrencia del efecto combinado de baja temperatura vs. estrés lumínico alto (Loreto y Bonghi, 1989). La variación estacional en los gases atmosféricos a veces también contribuye a hacer que los cultivos sean más sensibles al estrés abiótico (Xu *et al.*, 2007), en el caso del punto de concentración elevada de O_3 en invierno aumenta el daño del estrés por baja temperatura en trigo (Barnes y Davison 1988) y/o O_3 vs. la salinidad exacerbó la reducción en la productividad de *Oryza sativa* y *Cicer arietinum* (Welfare *et al.*, 2002).

Las fases productivas de los cultivos son las más susceptibles al estrés abiótico, el nivel de daños económicos que puede causar el estrés es incluso mucho mayor, ya que mantener una explotación en una región capaz de soportar el estrés abiótico requiere una gran cantidad de capital. Así, los daños en fases críticas de floración, fertilización o llenado en los cultivos de grano pueden ser catastróficos desde el punto de vista económico. Las respuestas de los cultivos de grano al estrés abiótico durante las fases de reproducción están bien documentadas. La formación y el desarrollo del polen, talón de Aquiles de la productividad de los cultivos de trigo, son muy vulnerables al estrés por déficit hídrico (Ashtox, 1948; Ji *et al.*, 2010), lo que favorece el cruzamiento, que a menudo está relacionado con una baja tasa de cuajado de los granos (Bingham, 1966). Asimismo, entre la célula madre del polen y el leptoteno en el sorgo se mostró la mayor vulnerabilidad al estrés por bajas temperaturas (Brooking, 1976). Las temperaturas extremas solas o en combinación con sequía y salinidad pueden ser terminales en la germinación del polen, ya que el estrés térmico en los cereales en general condujo a una reducción dramática en el tiempo de llenado del grano (Jagadish *et al.*, 2007; Wardlaw y Wrigley, 1994). Estas condiciones desfavorables afectan a la funcionalidad de las enzimas de producción de almidón, lo que resulta en un llenado incompleto del grano y un bajo rendimiento en los cereales (Zahedi *et al.*, 2003). Sin embargo, la principal vulnerabilidad responsable de la reducción en el número de granos se encuentra antes de la aparición de la espiga y el panojo fuera de la vaina de la hoja. Incluso después de la meiosis, como la etapa más sensible al estrés en arroz y trigo, la deficiencia hídrica y el estrés por bajas temperaturas causaron un grado significativo de infertilidad (Ji *et al.*, 2010; Oliver *et al.*, 2005). La esterilidad masculina también se incrementó bajo estrés por sequía (Saini, 1997). La influencia de la temperatura podría ser a veces muy específica, ya que la baja temperatura en arroz aumenta el número de granos pero reduce notablemente la fertilidad del polen (Dolferus *et al.*, 2011; Okada *et al.*, 2018). Desde una perspectiva evolutiva, el tamaño del grano en las plantas no domesticadas es más importante, ya que la fecundidad de las semillas más grandes es mayor, mientras que en los cultivos de granos, en realidad, es el número de granos lo que determina el rendimiento, un componente de la productividad que se ve afectado principalmente por el estrés biótico (Bingham, 1966). Curiosamente, aunque el ovario es relativamente tolerante al estrés y se ha visto que aún es fértil, la esterilidad del polen inducida por el estrés puede ocurrir en las primeras etapas de microspora. (Hayashi *et al.*, 2000).

Una de las respuestas fisiológicas relacionadas con el aumento de la esterilidad es la inducción y concentración de ABA en condiciones de estrés. Pruebas como la disminución del contenido de ABA en las anteras de las líneas transgénicas de arroz y su mayor tolerancia al estrés por bajas temperaturas indican el papel clave del ABA en la esterilidad de los cultivos sometidos a estrés. Del mismo modo, un alto nivel de esterilidad masculina en tomate bajo estrés por altas temperaturas y el aumento de ABA está proporcionando pruebas de sus efectos. Las etapas de

floración y grano de leche son las más vulnerables a la sequía en *Chenopodium quinoa* Willd (Blum, 2011), lo que coincide con el aumento de la concentración de ABA en los órganos de la planta (Jacobsen *et al.*, 2009; Razzaghi *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016). Incluso el estrés por frío aunque sea de manera transitoria deprimió la germinación del polen en el garbanzo (Srinivasan *et al.*, 1999). Esto posiblemente se deba a la baja energía que a menudo está vinculada a la influencia inhibitoria de ABA en la síntesis y suministro de azúcares y aminoácidos mediante la disminución de la presión de turgencia como parte esencial de la producción de energía, lo que finalmente lleva a obstaculizar el crecimiento del tubo de polen, la fertilización y la formación de la semilla (Clarke y Siddique, 2004; Shivanna, 1985; Thakur *et al.*, 2010). La participación de ABA en la regulación de la fuerza del sumidero de la antera atrajo recientemente la atención de los académicos como un marcador importante en la selección de germoplasmas para líneas potenciales (Dolferus *et al.*, 2011). Además, el uso de características fenotípicas distintivas como la fertilidad o esterilidad del polen puede proporcionar avances notables que conduzcan a explorar los mecanismos moleculares subyacentes.

4.3.4 Relaciones Hídricas de los Cultivos

Comprender cómo se comportan las plantas con respecto a las relaciones hídricas en períodos críticos de estrés abiótico continuo o transitorio requiere contar con índices fiables que transmitan realmente las respuestas de estas (Passioura, 2010). El estrés abiótico a menudo perturba las relaciones hídricas en los órganos aéreos y subterráneos de la planta, ya que el crecimiento y desarrollo están en gran medida vinculados a una relación hídrica estable. Los indicadores más citados de las relaciones hídricas en plantas bajo estrés son el contenido relativo de agua (RWC), el potencial hídrico de las hojas, el potencial osmótico, el potencial de presión y la tasa de transpiración (Kirkham, 2005; Lazar *et al.*, 2003; Okçu *et al.*, 2005). Además, la temperatura del dosel se ha visto que puede ser un indicador que permite reflejar adecuadamente el estado del potencial hídrico de la planta bajo estrés por calor, salinidad y sequía, ya que el aumento en el potencial hídrico implica un aumento de la actividad fotosintética, lo que automáticamente disminuye la temperatura del dosel (Ehrler *et al.*, 1978; Siddique *et al.*, 2000).

Las relaciones hídricas son un asunto delicado que marca el destino de las plantas que lidian con consecuencias a corto o largo plazo de estrés abiótico transitorio o permanente, con numerosos procesos involucrados en las respuestas de las plantas a los impactos impulsados por el estrés en el estado del agua; no obstante, son principalmente similares entre varios tipos de estrés abiótico. Debido a su efecto predominante en la productividad, los genotipos tolerantes y la aplicación de programas integrales para su selección en bancos de germoplasma pueden impulsar los programas de mejoramiento (Chavarria y dos Santos, 2012; Kirkham, 2005).

4.3.5 Estrés Hídrico

Aunque cada estrés abiótico sigue un mecanismo de daño específico, sus efectos en las características relacionadas con las relaciones hídricas son similares en gran medida. Similar a las respuestas de las plantas al estrés por temperatura extrema, someter a estrés por déficit hídrico a genotipos de soja cambió las relaciones hídricas al disminuir el potencial hídrico en las hojas, el RWC, intensificar la exudación y, esperadamente, aumentar la temperatura en el dosel; la reducción en estas características se retrasó o no ocurrió en genotipos tolerantes (Ouvrard *et al.*, 1996). De manera similar, el girasol manifestó una reducción en las características relacionadas con las relaciones hídricas, como el RWC y el potencial hídrico de las hojas cuando se expuso a la sequía (Tezara *et al.*, 2002). El cierre estomático, la reducción en la tasa de transpiración y el estrés osmótico pueden ser responsables de cambiar las relaciones hídricas en raíces y brotes de cultivos bajo estrés por sequía. Un gradiente hidráulico creado por la transpiración en las plantas que permite un flujo constante de agua desde las raíces hasta las hojas (Chavarria y dos Santos, 2012). Esta conexión depende de la disponibilidad de agua en la rizosfera que, mediante el aumento de la resistencia en la relación planta-suelo, conduce a la depleción del contenido de agua si los estomas no se cierran, lo que resulta en la reducción del potencial hídrico de las hojas y la deshidratación. Esto último varía según numerosos factores como la etapa de crecimiento, las condiciones atmosféricas, el microclima de las partes aéreas y el régimen de agua (Acosta-Motos *et al.*, 2017). Comúnmente, la respuesta a la duración del estrés por sequía es variable; sin embargo, el RWC, el potencial hídrico y la presión osmótica aumentan a medida que la intensidad de la sequía continúa (de Campos *et al.*, 2011). Para ahorrar en el contenido de agua, las plantas tienden a cerrar los estomas, lo que mejora la eficiencia en el uso del agua, aunque la tasa de fotosíntesis neta disminuye. La eficiencia en el uso del agua de los genotipos y los cultivos varía bajo sequía (Abebe *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2006). La dependencia de la etapa de crecimiento en la eficiencia en el uso del agua también se ha visto en girasol bajo estrés por déficit hídrico; durante las fases de reproducción, la eficiencia en el uso del agua disminuyó marcadamente en comparación con las etapas vegetativas (Hussain *et al.*, 2009). La ausencia de transpiración se acompaña de un aumento en la respiración, lo que significa desperdiciar recursos almacenados que eventualmente sería muy difícil o improbable recuperar después del riego (Franco *et al.*, 2011; Sánchez-Blanco *et al.*, 2004).

4.3.6 Temperaturas Extremas

La influencia de la temperatura en el estado hídrico de las plantas cultivadas puede ocurrir a varios niveles. Esto significa que los cambios en la temperatura más allá de lo óptimo afectan directamente la función enzimática mediante el aumento de la temperatura o indirectamente al imponer tensiones oxidativas que dañan la actividad de enzimas vitales o causando estrés osmótico, lo que conduce a la alteración de las relaciones hídricas (Bloom *et al.*, 2004; Chavarria

y dos Santos, 2012; Ehrler *et al.*, 1978; Kirkham, 2005). Las partes aéreas del tomate (*Lycopersicon esculentum* L. cv. T5) cuyas raíces fueron expuestas a estrés por baja temperatura (5 °C) mostraron signos de bajo potencial hídrico y marchitamiento. Mientras que otra especie de *Lycopersicon* (*L. hirsutum* LA 1778), conocida por su tolerancia al frío, mostró un mayor nivel de potencial hídrico en condiciones similares. La evaluación de la conductancia hidráulica en ambas especies resultó ser similar, mientras que el comportamiento estomático tuvo una diferencia notable. Además, el cierre estomático en especies tolerantes al frío ocurrió al contrario que en las sensibles, cuyos estomas permanecieron abiertos hasta que la temperatura en el sistema de raíces bajó a 5 °C, lo que provocó marchitez severa y daño. Curiosamente, mediante el uso de técnicas de injerto, la parte aérea de una injertada en las raíces de otra, la respuesta de los estomas cambió (Bloom *et al.*, 2004). El comportamiento estomático es una estrategia significativa de tolerancia al frío en los cultivos, en un estudio similar al anterior se vio que el maíz, como especie tropical vulnerable al frío, no pudo mantener la presión de agua lo cual causó una transpiración excesiva bajo esta situación de frío en el suelo. Sin embargo, esto no se debió a la reducción en el movimiento hidráulico del agua en las raíces (de Juan Javier *et al.*, 1997; Enders *et al.*, 2019). Principalmente, los efectos del estrés por frío en los cultivos son individuales, ya sea a través del cambio de turgencia o mediante la formación de hielo que estimula intracelularmente una condición similar a la sequía y drena el agua de la célula para alcanzar el equilibrio (Beck *et al.*, 2004; Hansen y Beck, 1988).

Las respuestas de los cultivos al estrés por calor son específicas de la especie y la duración de este estrés es importante, por ejemplo, se ha investigado extensamente sobre el efecto en el estado hídrico de los cultivos, en los olivos una ola de calor redujo la asimilación de CO₂ al dañar los fotosistemas y el cierre estomático (Fahad *et al.*, 2017; Haworth *et al.*, 2018). La coincidencia de altas temperaturas y estrés por sequía en condiciones de campo es común (Machado y Paulsen, 2001; Velikova *et al.*, 2009), la escasez de agua en la parte aérea, especialmente en las hojas durante el estrés por calor, se atribuye principalmente a la intensificación de la tasa de transpiración (es decir, durante el día) y la ausencia de una respuesta igual de las raíces. Todo esto conduce a la depleción de agua en las hojas y al estrés por sequía mientras hay agua disponible en el suelo. Se ha registrado un potencial hídrico desequilibrado en los cultivos bajo estrés por alta temperatura en tomate (Morales *et al.*, 2003), caña de azúcar (Wahid y Close, 2007) y papa (Naz *et al.*, 2018).

4.3.7 Salinidad

Las relaciones planta-agua explican el comportamiento como un reflejo real de las respuestas de las plantas a la deshidratación y la toxicidad de iones causada por la salinidad (Passioura, 2010). La salinidad del suelo y los recursos hídricos, especialmente en regiones áridas y semiáridas, puede reducir drásticamente el crecimiento y rendimiento de los cultivos. El nivel de intensidad

en el efecto en la planta varía según la especie, la temporada, el umbral de tolerancia, la duración de la exposición al estrés salino, el patrón de lluvias durante la temporada de crecimiento, la intensidad y tipo de salinidad y las propiedades físicas y químicas del suelo. La salinidad causada por el cloruro de sodio es significativamente mayor que la de otras sales y afecta a los tejidos de las plantas en mayor medida, las sales tienen un efecto negativo en el potencial hídrico, la absorción de agua, la tasa de transpiración, el potencial hídrico del tallo, el potencial osmótico y la conductividad estomática (Kirkham, 2005; Munns y Gilliam, 2015; Razzaghi *et al.*, 2011). La salinidad perturba las relaciones hídricas de una planta debido a la reducción en la disponibilidad de agua de la solución del suelo como resultado del potencial hídrico negativo iniciado por los efectos tóxicos de los iones de sodio y cloruro (Munns, 2005). Esta respuesta se ha observado en varias especies como *Euonymus japonica* L., *Phlomis purpurea* L., y *Rosmarinus officinalis* L. (Alarcón *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2012; Gómez-Bellot *et al.*, 2013).

Las respuestas a corto plazo de los cultivos a la salinidad son muy análogas al déficit hídrico, específicamente en relación con el estrés osmótico (Navarro *et al.*, 2008). Se observó una reducción significativa en el RWC, la presión de turgencia y la conductancia estomática de genotipos de trigo sometidos a 4 semanas de salinidad (150 mM) durante las etapas vegetativas. Sin embargo, mientras que el RWC se ve afectado por el estrés salino sin una modificación adicional durante el experimento, la función estomática cambió considerablemente (Rivelli *et al.*, 2002), lo que indica la influencia de la regulación hormonal del sistema de raíces (Kaur *et al.*, 2016; Passioura, 1988). En general, las respuestas de los cultivos (trigo y maíz) relacionadas con las relaciones hídricas a la alta concentración de sal en el suelo son tanto osmóticas como la aparición de iones tóxicos en partes aéreas (Azevedo Neto *et al.*, 2004; Azizian y Sepaskhah, 2014; Fortmeier y Schubert, 1995). Como se mencionó anteriormente, las respuestas a menudo son muy específicas de la situación y, dependiendo de la etapa de crecimiento, la reacción puede ser diferente (Alarcón *et al.*, 1999; Sánchez-Blanco *et al.*, 2004). La disminución en el número de canales de agua (o acuaporinas) probablemente sea responsable de la reducción de la turgencia y la conductividad del agua (Kaldenhoff *et al.*, 2008). *E. angustifolia*, con gran intolerancia a la salinidad, y *L. barbarum*, con una mayor capacidad para tolerarla, fueron tratadas con sal y mostraron una eficiencia en el uso del agua distinta, ya que la primera disminuyó drásticamente, mientras que en la segunda el estado del agua fue más estable (Acosta-Motos *et al.*, 2017).

4.3.8 Metales Pesados

Los efectos negativos del estrés por metales pesados en las relaciones hídricas se encuentran frecuentemente vinculados a un cambio en las acuaporinas como el principal paso para el flujo de agua desde las raíces, lo que causó una reducción en la conductividad hidráulica del agua. Esta disminución de las acuaporinas por los metales pesados ha sido respaldada por estudios experimentales en *Alium cepa* L. y *Lupinus luteus* L. sometidos a Pb (Przedpelska-Wasowicz y

Wierzbicka, 2011). La literatura sugiere que el estrés por metales pesados apunta principalmente al flujo de agua internamente, lo que en este caso se vio como una notable reducción en la transferencia de agua por el xilema en *Ace saccharinum* L. bajo estrés por Cd. Una posible explicación puede justificarse con la disminución de los tejidos del xilema capaces de transferir agua, así como la reducción en el tamaño de los vasos y la obstrucción del xilema por fracciones de gomas o restos celulares (Lamoreaux y Chaney, 1977). La interrupción de las relaciones hídricas en plantas tratadas con metales pesados a veces es causada por la acumulación de iones metálicos a un nivel letal en las células de la raíz, lo que condujo a la muerte celular y limitó la capacidad de las células funcionales para absorber agua, lo que fue como simular una sequía en las partes aéreas. Además, el RWC es un indicador sensible de cambios en el estado hídrico de los cultivos; sin embargo, su valor bajo estrés por metales pesados fue estable, lo que posiblemente se deba al fenómeno específico conocido como vacuolización en varios puntos de crecimiento de la planta (Gzyl *et al.*, 1997; Przymusiński y Woźny, 1985). Esta respuesta normal de tolerancia en las células de la raíz ayuda a mantener el RWC bajo estrés por metales pesados y mitiga la fluctuación del agua en dichas células expuestas a iones tóxicos. Este desarrollo se ha observado en células meristemáticas de *Festuca rubra* (Davies y Zhang, 1991) y maíz (Doncheva, 1998) expuestas a un alto nivel de Zn y Cu, respectivamente, además de células de epidermis y corteza de raíces de *Psidium guajava* estresadas con Ni (Bazihizina *et al.*, 2015). La inducción de vacuolización en *L. luteus* tratado con concentraciones de Pb también se observó de manera similar (Przedpelska-Wasowicz y Wierzbicka, 2011). También se ha apreciado un aumento en el número de estomas y una reducción en su tamaño claramente debido a la disminución de la presión de turgencia en la planta tratada con metales pesados, incluido *H. annuus* expuesto a varios niveles de Pb, Cd, Cu y Zn (Kastori *et al.*, 1992) y *Beta vulgaris* tratado con Cd (Greger y Johansson, 1992). Sin embargo, hay resultados contradictorios en *S. bicolor* y *B. vulgaris* expuestos a concentraciones de Cd y Cu (Kasim, 2006), y Zn (Sagardoy *et al.*, 2010), respectivamente, indicaron una reducción en el número de estomas. Aparentemente, las respuestas tienen una dependencia de la dosis y de la especie que pueden explicar en cierta medida la variación en los resultados (Bazihizina *et al.*, 2015; Doncheva, 1998).

4.3.9 Deficiencia de nitrógeno

El nitrógeno (N) es uno de los principales nutrientes que limitan la producción agrícola. Los rendimientos de los cultivos han aumentado drásticamente en los últimos 50 años debido al uso de fertilizantes de N (Jiao *et al.*, 2016). Actualmente para incrementar la producción de alimentos es necesario aumentar la cantidad de fertilizantes nitrogenados que se aplican a los cultivos. Así, en el 2018 la demanda mundial de fertilizantes N sintéticos supero los 200 millones de tn (FAO, 2019). Sin embargo, el uso desproporcionado de estos fertilizantes está causando un impacto

negativo en el medio ambiente tanto en ecosistemas terrestres y acuáticos no agrícolas (Kocira *et al.*, 2020a; Hamedani *et al.*, 2020).

La tasa media de recuperación de N en los cultivos es solo del 30 al 40 % durante la temporada de crecimiento (Chen *et al.*, 2014a). El N no absorbido por el cultivo puede fijarse en el suelo, lixiviarse hacia capas profundas del suelo o volatilizarse a la atmósfera en forma de amoníaco u óxidos de nitrógeno (Ju *et al.*, 2009). La pérdida de este macroelemento aumenta el coste de la producción agrícola y acelera la degradación del medio ambiente (Chen *et al.*, 2014b). El impacto más frecuente producido por un mal uso de los fertilizantes nitrogenados es el lixiviado de los NO_3^- a acuíferos subterráneos, lo cual provoca una eutrofización de ecosistemas dulceacuícolas y marinos. Además, se generan óxidos de N gaseosos que pueden alcanzar la troposfera y reaccionar con el ozono produciéndose emisiones tóxicas de amonio. Los fertilizantes nitrogenados convencionales tienen una eficiencia relativamente baja, siendo su eficiencia en el mejor de los casos entre el 70 y el 80 % (Dimkpa *et al.*, 2020). Bajo este contexto, es necesario desarrollar estrategias agronómicas que permitan realizar un manejo adecuado y sostenible de la fertilización nitrogenada en relación con la utilización de la dosis, momento de aplicación y elección de la forma química conveniente, y la utilización de técnicas agronómicas que conlleven un aumento y mejora de la eficiencia del uso de nitrógeno (NUE) por las plantas. NUE se define como la producción de biomasa por unidad de N disponible. Esto se puede dividir en dos procesos fundamentales: (i) la capacidad de la planta para absorber N del suelo (Eficiencia en la absorción de N – NUpE) y (ii) el uso eficiente del N absorbido, que se define como, la capacidad de la planta para transferir y utilizar este elemento en la producción de biomasa de los diferentes órganos vegetales (Eficiencia en la utilización de N – NUtE) (Xu *et al.*, 2012, Dimkpa *et al.*, 2020). Un mayor NUE podría reducir los costes económicos y disminuir la degradación ambiental causada por la aplicación de fertilizantes de N. En los últimos años, el enfoque para mejorar el NUE está consistiendo en la realización de estrategias de biotecnología y fitomejoramiento, y/o el uso de productos agroquímicos bioestimulantes. La optimización de la tecnología de aplicación de fertilizantes de N puede mejorar eficazmente la utilización de N. Además, la creación de nuevos cultivares más eficientes en la asimilación de N puede lograr rendimientos más altos con menor cantidad de este (Lammerts van Bueren y Struik, 2017), lo que promueve un desarrollo agrícola sostenible (Lynch, 2019).

4.4 Uso de bioestimulantes en la agricultura

4.4.1 Introducción

Los productos bioestimulantes son considerados como herramientas potenciales e innovadoras en el sector agrícola ya que estos contienen sustancias que ayudan a los cultivos agronómicos a soportar y adaptarse a ciertas limitaciones medioambientales bióticas y/o abióticas (Povero *et al.*,

2016). Los principales países que están potenciando estos productos dentro de la Unión Europea son Francia, Italia y España (Traon *et al.*, 2014). Según un informe de Grand View Research, Inc., del año 2019 se estima que el tamaño del mercado de bioestimulantes alcanzará los 4,14 mil millones de dólares para 2025, lo que indica la gran importancia que tendrán en un futuro cercana. Estos productos están formulados por ingredientes de naturaleza compleja cuya composición alberga una amplia gama de moléculas. Dada la importancia de estos productos en agricultura la nueva ley de fertilizantes de la UE Reglamento (UE) 2019/1009, recoge, además de los abonos inorgánicos y las enmiendas calizas, los productos bioestimulantes. Actualmente los fertilizantes se clasifican en siete Categorías (CFP), entre los que se incluyen los bioestimulantes, como se puede observar: CFP1, abonos o fertilizantes (se incluyen aquí los abonos inorgánicos, orgánicos y organominerales); CFP2, enmiendas calizas; CFP3, enmiendas del suelo; CFP4, sustrato del cultivo; CFP5, inhibidor; CFP6, bioestimulante de plantas; CFP7, mezcla de productos fertilizantes. Además, la nueva ley también define otra categoría en donde se definen los componentes materiales que pueden usarse para formular los fertilizantes: CMC 1: Sustancias y mezclas de materiales vírgenes, CMC 2: Plantas, partes de plantas o extractos vegetales, CMC 3: Compost, CMC 4: Digestato de cultivos frescos, CMC 5: Digestato distinto del digestato de cultivos frescos, CMC 6: Subproductos de la industria alimentaria, CMC 7: Microorganismos, CMC 8: Polímeros de nutrientes, CMC 9: Polímeros distintos de los polímeros de nutrientes, CMC 10: Productos derivados en el sentido del Reglamento (CE) n. o 1069/2009, CMC 11: Subproductos con arreglo a la Directiva 2008/98/CE: Adoptado/Escrutinio/pendiente de publicación, CMC 12: Sales de fosfato precipitado y derivados (Estruvita), CMC 13: Materiales de oxidación térmica y derivados (Cenizas), CMC 14: Materiales de pirólisis y gasificación (Biocarbón), CMC 15: Materiales de alta pureza recuperados. (Yakhin *et al.*, 2017; Caradonia *et al.*, 2019).

A nivel científico ha habido muchas definiciones de bioestimulantes de plantas, pero la más consensuada hoy en día es la siguiente: productos obtenidos a partir de diferentes sustancias orgánicas o inorgánicas y/o microorganismos, que son capaces de mejorar el crecimiento y la productividad de las plantas y aliviar los efectos negativos de los estreses abióticos (Du Jardin, 2015; Roupael y Colla, 2018). El modo de acción que tienen estos productos es difícil de conocer debido a su composición química que es muy compleja pero se han descrito diversos mecanismos como: -efectos directos en la fisiología y el metabolismo de las plantas y el suelo (Bulgari *et al.*, 2015; Caradonia *et al.*, 2019), - modificación de los procesos moleculares que regulan las rutas metabólicas primarias y secundarias relacionadas con el uso eficaz del agua y nutrientes, estimulación vegetativa de las plantas y adaptación a los estreses abióticos como sequía, salinidad, toxicidad por metales pesados y boro, etc (Van Oosten *et al.*, 2017; Yakhin *et al.*, 2017; Nardi *et al.*, 2009; Caradonia *et al.*, 2019).

Los materiales que se utilizan para la fabricación de los productos bioestimulantes son aquellos que contienen elementos minerales, vitaminas, aminoácidos y poli- y oligosacáridos, trazas de hormonas naturales de plantas, etc. Sin embargo, la tendencia actual es utilizar materiales complejos, procedentes de un gran abanico de industrias, que tienen una gran cantidad de compuestos orgánicos de muy diferente naturaleza. Según esta naturaleza química los bioestimulantes se clasifican en varios grupos como veremos en la siguiente sección.

4.4.2 Tipos de bioestimulantes

Durante años, diferentes autores han propuesto varias categorizaciones de productos bioestimulantes en función de su componente principal o modo de acción. La clasificación actual, consensuada por muchos países y científicos, utiliza las bases de la propuesta por Du Jardin (2015) basada en la naturaleza de la materia prima que se utiliza en la formulación del producto bioestimulante. Así, los bioestimulantes se clasifican en los siguientes grupos principales:

Sustancias húmicas (HSs): incluyen ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas. Las HSs son componentes naturales de la materia orgánica del suelo, resultado de los procesos de descomposición de plantas, animales y residuos microbianos, pero también de la actividad metabólica de los microorganismos del suelo (Rouphael y Colla, 2018). Se ha observado que los tratamientos con sustancias húmicas estimulan el crecimiento y desarrollo de las raíces de las plantas (Canellas *et al.*, 2002; Trevisan *et al.*, 2010). Esto se refleja en una mejor absorción de nutrientes y agua, y una mayor tolerancia a los estreses ambientales (Canellas *et al.*, 2015; Nardi *et al.*, 2016). Aún no se comprende completamente cómo afectan las HSs a la fisiología de las plantas, debido a la complejidad molecular de estas sustancias y a la abundancia y diversidad de respuestas de las plantas alteradas por su aplicación. Además, se ha informado de una fuerte relación entre las propiedades del medio y la bioactividad de las HSs (Canellas *et al.*, 2012). Los efectos positivos ejercidos por estos complejos agregados podrían atribuirse tanto a la actividad tipo hormona de algunos de sus componentes como a mecanismos independientes de las Auxinas (ácido indolacético, AIA) (Trevisan *et al.*, 2011). Por ejemplo, al igual que las Auxinas, las HSs pueden promover el crecimiento de las plantas e inducir la actividad de H⁺ATPasa en la membrana plasmática (Nardi *et al.*, 2000; Nardi *et al.*, 2002; Dobbss *et al.*, 2010).

Extractos de algas marinas: las algas marinas son un vasto grupo de algas multicelulares macroscópicas que pueden ser marrones, rojas y verdes. Son una fuente importante de materia orgánica y nutrientes para fertilizantes. Los extractos de algas marinas se han utilizado en agricultura como acondicionadores del suelo o estimulantes del crecimiento de las plantas. Se aplican como pulverización foliar y son capaces de mejorar el crecimiento de las plantas, la tolerancia a estreses abióticos, la actividad fotosintética y la resistencia a hongos, bacterias y virus, lo que mejora el rendimiento y la productividad de varios cultivos (Norrie y Keathley., 2006;

Gajc-Wolska *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2014). Las algas marinas utilizadas para la producción de bioestimulantes contienen citoquininas y auxinas u otras sustancias tipo hormonas (Hamza y Suggars, 2001). También contienen muchos compuestos minerales y orgánicos activos, incluidos polisacáridos complejos como la laminarina, fucoidan, alginatos y hormonas vegetales que contribuyen al crecimiento de las plantas (Battacharyya *et al.*, 2015). Recientemente, se ha considerado la posible aplicación de microalgas como bioestimulantes para las plantas (Oancea *et al.*, 2013; Mógor *et al.*, 2018; Chiaiese *et al.*, 2018).

Hidrolizados de proteínas y productos que contienen aminoácidos: los hidrolizados de proteínas son una mezcla de aminoácidos, péptidos, polipéptidos y proteínas desnaturalizadas que se pueden obtener mediante hidrólisis química, enzimática y térmica de proteínas (o mediante la combinación de estos diferentes tipos de hidrólisis) de fuentes vegetales y animales (Nardi *et al.*, 2016; Colla *et al.*, 2015). Se ha informado que las aplicaciones de algunos productos comerciales de hidrolizados de proteínas de origen animal fueron fitotóxicas, teniendo efectos negativos en el crecimiento de las plantas en comparación con un hidrolizado de proteínas de origen vegetal (Cerdán *et al.*, 2009; Lisiecka, 2011). En otro estudio, Botta (2012) observó que las plantas de lechuga tratadas con un hidrolizado de proteínas de origen animal tenían un peso fresco y seco mayor en comparación con el control. Por lo general, los hidrolizados de proteínas pueden inducir respuestas de defensa en las plantas y aumentar la tolerancia a muchos estreses abióticos, según lo informado por varios autores (Lucini *et al.*, 2015; Rouphael *et al.*, 2017; Colla *et al.*, 2017; Trevisan *et al.*, 2019).

Microorganismos: este grupo incluye bacterias, levaduras, hongos filamentosos y microalgas. Se aíslan del suelo, las plantas, el agua y los estiércoles compostados u otros materiales orgánicos. Se aplican al suelo para aumentar la productividad de los cultivos mediante actividades metabólicas. Mejoran la absorción de nutrientes mediante la fijación de nitrógeno y la solubilización de nutrientes, modifican el estado hormonal induciendo la biosíntesis de hormonas vegetales como auxinas, citoquininas, etc. También aumentan la tolerancia a estreses abióticos y producen compuestos orgánicos volátiles (COVs), que también pueden tener un efecto directo en las plantas. Las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) pueden mejorar las respuestas de las plantas a estreses abióticos estimulando actividades físicas, químicas y biológicas (Ruzzi y Aroca, 2015; Turan *et al.*, 2017). Los efectos positivos son proporcionados por los microorganismos que forman un biofilm protector en la superficie de las raíces, mejorando la absorción de nutrientes y agua.

Otra categoría de bioestimulantes incluye aquellos **derivados de extractos de subproductos** alimentarios o efluentes de desechos industriales, compost, extractos de compost, estiércoles, vermicompost, residuos y efluentes de acuicultura, y tratamientos de aguas residuales, entre otros (Xu y Geelen, 2018). Se ha informado que los bioestimulantes derivados de subproductos

agroindustriales son efectivos para mejorar la productividad de las plantas, aumentar la síntesis de compuestos secundarios involucrados en varias respuestas fisiológicas de las plantas y mejorar la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, E.C. 4.3.1.5) (Ertani *et al.*, 2011). El efecto de la aplicación de bioestimulantes en la actividad de PAL y en la expresión de genes que codifican para esta enzima ha sido observado por varios autores (Du Jardin, 2015; Trevisan *et al.*, 2019; Ruzzi y Aroca, 2015) y referencias citadas en ellos, aunque en la actualidad no es posible definir si este es un efecto directo o indirecto. Debido a la diversidad de materiales de origen y tecnologías de extracción, el modo de acción de estos productos no es fácilmente determinable (Yakhin *et al.*, 2017). El uso de subproductos como materia prima que puede transformarse en productos fertilizantes es la idea subyacente a la nueva regulación de fertilizantes y al Plan de Acción para la Economía Circular, que se centra en alcanzar una agricultura sostenible. Las directrices para la regulación de fertilizantes, la necesidad de producir en un sistema de cultivo más respetuoso con el medio ambiente manteniendo un buen rendimiento y calidad de cultivo, el aumento del precio de los fertilizantes sintéticos, la retirada de varios agroquímicos y los múltiples efectos de los bioestimulantes en las plantas o el suelo están favoreciendo la expansión de este mercado. En esta revisión queremos centrarnos en una materia activa con un gran potencial como bioestimulante y que sin embargo no ha sido mencionada hasta hace poco tiempo como es el extracto de licor de maíz fermentado, residuo que se obtiene de la industria del procesado de maíz y por lo tanto se introduciría dentro de esta sección.

Las **nanopartículas y nanomateriales**, es una de las nuevas categorías que se han introducido en esta clasificación. Fue propuesta por Juárez-Maldonado *et al.* (2019). Las nanopartículas y los nanomateriales se definen generalmente como partículas con dimensiones entre aproximadamente 1 nm y 100 nm que muestran propiedades que no se encuentran en su forma a granel. Son capaces de modificar la calidad de la producción y la tolerancia a estreses abióticos cuando se aplican en pequeñas cantidades como pulverización foliar o en solución de nutrientes, también en cultivos de vegetales (Qi *et al.*, 2013; Kiapour *et al.*, 2015; Lei *et al.*, 2008; Khan, 2016). Sus propiedades bioestimulantes parecen estar asociadas con la estructura y naturaleza de los materiales. La interacción entre las superficies de las plantas y las nanopartículas y nanomateriales puede afectar positivamente el transporte de iones y metabolitos y la actividad de los receptores mediante la modificación del entorno circundante en términos de energía y cargas. Esta actividad no depende de la composición química. Además, las nanopartículas y nanomateriales liberan elementos químicos como hierro o carbono que podrían ser útiles para las plantas cuando son metabolizados. Un estudio mostró que la aplicación de nanopartículas de óxido de zinc en tomate como enmienda del suelo o mediante pulverización foliar aumentó la altura de las plantas, el contenido de clorofila y proteínas solubles totales (Raliya *et al.*, 2015).

4.4.3 Extracto de licor de maceración de maíz (CSL)

4.3.3.1 Aspectos generales del CSL

La producción mundial de maíz es de más de mil millones de toneladas cada año, lo que representa aproximadamente el 35 % del total mundial de producción de cereales. En el proceso de producción de molienda húmeda del maíz, el principal subproducto se concentra para dar lugar al licor de maíz (CSL, por sus siglas en inglés). Según la Asociación de Refinadores de Maíz, "el licor de maíz es una mezcla viscosa líquida que contiene exclusivamente componentes solubles en agua (Wet, 2006). Dado que el grano de maíz es una mezcla compleja de almidón, proteína, aceite, agua, fibra, minerales y vitaminas, el proceso de molienda húmeda del maíz produce muchos productos ampliamente utilizados en diversas industrias, como el aceite de maíz, la harina de germen de maíz, el almidón de maíz y el jarabe de maíz de alta fructosa, y, el extracto acuoso que se obtiene como residuo en estos procesos es el que se puede utilizar como ingrediente en la fabricación de los productos bioestimulantes.

El proceso húmedo de manipulación industrial de los granos de maíz, descrito aquí brevemente, consiste en que el maíz se empapa o "remoja" durante 24-48 horas en agua, que contiene 0,1 %-0,2 % de dióxido de azufre, a 48 °C a 54 °C. El ácido sulfuroso formado induce cambios químicos y físicos en el grano, separando efectivamente el almidón y la proteína insoluble mediante la ruptura de los enlaces disulfuro de la matriz de proteínas del endospermo. El ácido sulfuroso también ayuda a controlar microorganismos indeseables y permite que los azúcares disueltos se conviertan en ácido láctico debido a fermentaciones espontáneas de bacterias lácticas, lo que ayuda a mantener un pH cercano a 4. Durante el proceso de remojo, se van separando los diferentes componentes, como almidón, gluten y fibra, quedando el agua de remojo, con una gran cantidad de compuestos, que se evapora produciendo el jarabe de maíz (Wet, 2006). El grano de maíz insoluble restante se procesa aún más para producir muchos productos utilizados en alimentos para animales y/o fertilizantes.

El CSL está compuesto principalmente por diversos aminoácidos y azúcares reductores (Cornejo-Villegas *et al.*, 2018; Martínez-Arcos *et al.*, 2021). Los resultados analíticos de este subproducto relativos a su contenido de aminoácidos libres y totales, azúcares totales, azúcares reductores, sulfitos totales y nitrógeno total verifican la importancia del CSL como sustrato de fermentación, aunque sus funciones físicas y químicas se ven afectadas por la diversidad de variedades de maíz utilizadas en el proceso (Chovatiya *et al.*, 2011). Debido a que es una matriz muy compleja, es un desafío desarrollar métodos analíticos para la identificación y cuantificación de cada uno de los compuestos activos que la forman. Dicha complejidad de esta matriz supone dos retos analíticos: el primer reto es encontrar métodos de ensayo fiables y el segundo es desarrollar procedimientos

de laboratorio que permitan el análisis preciso de las sustancias objetivo sin interferencias químicas (Xiao *et al.*, 2012).

El licor de maíz tiene una amplia variedad de usos industriales. A modo de ejemplos, puede mezclarse con fibra, deshidratado y secado como alimento para el ganado, o directamente como medio nutritivo para fermentación industrial (Chinta *et al.*, 2014; Zarei *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Históricamente, este subproducto se ha utilizado como fuente de nutrientes suplementarios en procesos de fermentación, alimento para el ganado, producción de antibióticos y como parte integral de fertilizantes, medios de crecimiento y reguladores del suelo (Lawford y Rousseau, 1997; Nisa *et al.*, 2004; Obayori *et al.*, 2010; Maddipati *et al.*, 2011). El CSL se utiliza ampliamente como aditivo en la producción biotecnológica de diversas sustancias como penicilina, ácido glutámico, ácido láctico y glucosa oxidasa. A menudo se agrega como una fuente económica de C-, N-, vitaminas o micronutrientes, como alternativa a ingredientes costosos y establecidos en los medios de cultivo tradicionales (Hofer *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016; Edwinoliver *et al.*, 2009; Kona *et al.*, 2001; Sekoai *et al.*, 2018). Además, el CSL es rico en vitaminas B y minerales, y también se puede utilizar como aglutinante de partículas nutricionales (Chovatiya *et al.*, 2011). Algunos investigadores han observado la presencia de compuestos fenólicos en el CSL que tienen actividad inhibitoria contra el daño oxidativo cuando se prueban *in vitro*, lo que sugiere que la ingestión de estos antioxidantes naturales puede ayudar a prevenir el daño oxidativo y que el CSL puede ser una fuente útil de antioxidantes fenólicos (Niwa *et al.*, 2001).

Debido al exceso de sulfitos, la mayoría de las industrias no pueden aprovechar completamente el CSL y lo consideran como aguas residuales que son necesarias tratar. Al ser considerado un residuo orgánico ácido de alta concentración, su tratamiento es complicado y costoso. Su consideración como aguas residuales no solo desperdicia recursos, sino que también causa una gran contaminación al medio ambiente en caso de vertidos. Cómo desarrollar y utilizar el CSL se ha convertido en un problema importante que deben afrontar las empresas y la sociedad. En los últimos años, se está usando el CSL como una materia activa en la formulación de los productos bioestimulantes.

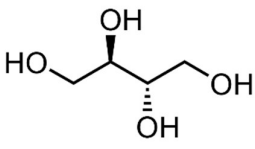
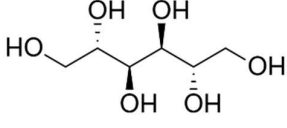
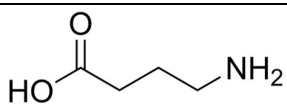
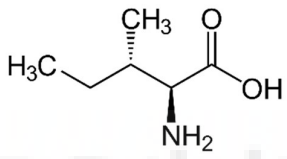
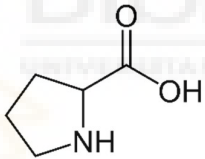
4.3.3.2 Compuestos activos y métodos de análisis en CSL

Debido a la matriz compleja del CSL, es difícil desarrollar métodos analíticos para su identificación y cuantificación, aunque los científicos ya empiezan a mostrar los primeros avances. En la década del 2010 se describieron diversas técnicas para analizar y cuantificar los ingredientes del CSL. Mediante espectrometría de masas se puede cuantificar en el CSL carbohidratos, ácido glicólico, ácido láctico, y ácidos grasos. La espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente y espectrometría de absorción atómica permite cuantificar los elementos metálicos (Zhang *et al.*, 2011). Mediante espectroscopía de infrarrojo

cercano se han conseguido cuantificar de forma sencilla y rutinaria la acidez total, los ácidos grasos totales, el azufre y el nitrógeno total (Xiao *et al.*, 2012). Mediante la selección de la longitud de onda y las variables más adecuadas, se ajustaron modelos de mínimos cuadrados parciales que muestran un buen poder predictivo en el análisis de muestras de CSL. Los datos experimentales muestran que la espectroscopía de infrarrojo cercano y los modelos de mínimos cuadrados parciales pueden reemplazar el método de análisis químico tradicional. También se observa que el total de aminoácidos libres en el CSL varía ligeramente en los lotes de muestras de diferentes fabricantes, pero los tipos y contenidos de aminoácidos libres no son muy diferentes, entre los cuales destacan Ile, Asn, Met, Lys, Pro y Asp. Establecer un modelo de análisis de componentes principales puede facilitar el control de la calidad del CSL (Xiao *et al.*, 2013). El equipo de Hofer y Herwiga (2017) investigó métodos para la determinación de vitaminas en el CSL y desarrolló un método para el análisis simultáneo de nueve vitaminas B diferentes mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Recientemente, Navarro-Morillo *et al.* (2024) llevaron a cabo el perfilado de los compuestos volátiles y no volátiles del CSL. El primero de ellos se realizó utilizando un equipo de Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC) acoplado a un Espectrómetro de Masas de Tiempo de Vuelo (LC/Q-TOF) operando en modo de ionización positiva y negativa. Los compuestos más representativos fueron el ácido 2-etil-2-hidroxi-butírico, ácido DL-3-fenil láctico, manitol, eritritol, GABA, isoleucina y prolina. Se sabe que estos compuestos tienen actividad biológica como promotores del crecimiento y protectores contra los estreses abióticos y bióticos, incluyendo el manitol, eritritol, GABA, isoleucina y prolina (tabla 4.2).

Tabla 4.2. Compuestos no volátiles identificados en el CSL cuya actividad biológica ha sido demostrada.

| Molécula Química | Estructura Química | Referencias |
|------------------|---|---|
| Eritritol |  | Scanga <i>et al.</i> , (2018) |
| Manitol |  | Godoy <i>et al.</i> , 2021 |
| GABA |  | Sita y Kumar, 2020 Zhao <i>et al.</i> , 2023 |
| Isoleucina |  | Li <i>et al.</i> , (2021) Gu <i>et al.</i> , (2019) |
| Prolina |  | Semida <i>et al.</i> , (2020) Hanif <i>et al.</i> , (2021) |

Los compuestos orgánicos volátiles son sustancias que se emiten en la atmósfera en forma de vapores o gases. Una proporción importante de los compuestos volátiles en la atmósfera se produce como metabolitos secundarios tanto de microorganismos como de macroorganismos, siendo las plantas las principales contribuyentes. Los compuestos volátiles que emiten las plantas incluyen sustancias de diversos orígenes metabólicos como alcaloides, fenoles, compuestos que contienen nitrógeno, terpenoides y volátiles derivados de ácidos grasos, conocidos como volátiles de hojas verdes. Los compuestos más representativos del estudio de los compuestos volátiles del CSL realizado por Navarro-Morillo *et al.*, (2024) fueron (Fig. 4.8) de las siguientes familias: Ácidos dicarboxílicos (1: Ácido 2-oxopentanoico; 2: 1,2-Propanodiol, diacetato); Ácidos grasos (3: Ácido 3-metil-butanoico; 4: Ácido hexanoico; 5: Ácido nonanoico); Alcanos (6: Tolueno; 7: D-limoneno; 8: Naftaleno, 1-metil-7-(1-metiletil)-; 9: Ciclohept[f]indeno, 1,2,3,5,6,7,8,9-octahidro-; 10: Camazuleno; 11: 4,4'-Dimetilbifenilo); Alcoholes (12: 2,3-Butanodiol, [R-(R*,R*)]-; 13: 1-Decanol; 14: 2-Naftalenotiol); Aldehídos (15: Butanal, 3-metil-; 16: Butanal, 2-metil-; 17: 2-Butenal, 2-etil-; 18: 1,3-Dioxolano, 4-metil-2-propil-; 19: Furfural;

20: 2-Tiofen-2-carbaldehído; 21: Nonanal; 22: 2-Isopropil-5-metilhex-2-enal; 23: 1,3-Ciclohexadieno-1-carbaldehído, 2,6,6-trimetil-; 24: Benzeneacetaldehído, alfa-etilideno-); Cetonas (25: 1-Furil-etanona; 26: 1-(2,5-Dihidroxifenil)-etanona; 27: Resorcinol, 2-acetil-; 28: 4-(2,6,6-Trimetilciclohexa-1,3-dienil)but-3-en-2-ona); Ciclohexanonas (29: 2,6,6-Trimetil-2-ciclohexen-1,4-diona); Ésteres (30: Acetato de etilo; 31: Acetato de 3-(metiltio)propilo; 32: Ácido acético, éster decílico); Fenoles (33: 2,4-Di-ter-butilfenol); Indanonas (34: 1H-Inden-1-ona, 2,3-dihidro-); Metoxibencenos (35: Benceno, 1-metoxi-4-metil-); Monoterpenoides (36: 2,4,6-Cicloheptatrien-1-ona, 2-hidroxi-4-(1-metiletil)-); Pirazinas (37: Pirazina, 2,6-dimetil-; 38: 2,3,5-Trimetil-6-etilpirazina). Las plantas intactas generalmente liberan volátiles para atraer polinizadores y dispersores de semillas (Raguso, 2008), pero también liberan volátiles inducibles después de tensiones bióticas y abióticas (Holopainen, 2004). En condiciones de estrés, las plantas inducen la emisión de un subconjunto de compuestos volátiles tanto sobre el suelo (Turlings *et al.*, 1990) como bajo el suelo (Rasmann *et al.*, 2005). Se sabe que la aplicación de compuestos volátiles en agricultura puede tener efectos beneficiosos para paliar los efectos negativos de los estreses abióticos y bióticos en plantas (Murali-Baskaran *et al.*, 2022; Maurya., 2020). Estos autores describen que el modo de acción que tienen los compuestos volátiles en las plantas puede incluir: - estabilizar la bicapa de fosfolípidos de las membranas de cloroplastos durante la exposición a altas temperaturas, - protege el aparato fotosintético y mejora la eficiencia en el uso del agua en condiciones de déficit hídrico, -regular el estrés oxidativo mediante la activación de las enzimas antioxidantes, -activan genes de protección contra el frío, etc.

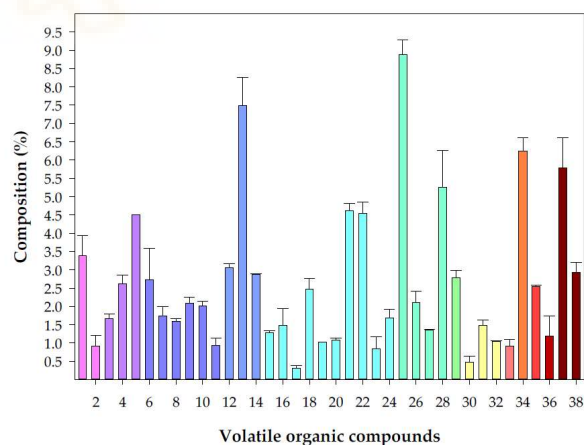


Figura 4.8. Perfil de componentes orgánicos volátiles del CSL. Fuente (Navarro-Morillo *et al.*, 2024).

En resumen, CSL es una fuente rica en aminoácidos libres, péptidos, macroelementos, ácidos orgánicos, polifenoles y vitaminas. Este producto tiene cierta variabilidad debido a su propia producción, por lo que el reto será conseguir cuantificar de forma exacta el mayor número posible

de compuestos para obtener toda la información científica posible para formular los productos bioestimulantes.

4.3.3.3 Uso de CSL como bioestimulante dirigido a paliar los estreses abióticos. Diferentes casos de estudio.

- *Mejora del estado de salud de los suelos*. Hoy en día la intensificación de la agricultura somete a grandes presiones a los recursos naturales como es el caso de los suelos. Estos sufren una serie de procesos que repercuten negativamente en su salud. La erosión y compactación del suelo, pérdida de nutrientes, salinización, contaminación química, y agotamiento de la capa orgánica afectan a la comunidad microbiana del suelo y su capacidad para retener agua y nutrientes, por lo que finalmente dejan de ser aptos para la agricultura. Pues bien, se han visto que la aplicación de productos bioestimulantes con CSL son capaces de regenerar el estado de los suelos al producir cambios notables en las condiciones físicoquímicas del suelo tratado y los nutrientes esenciales como fósforo, nitrógeno y potasio. El CSL promueve el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo. Al mismo tiempo, este subproducto actúa como agente de biocontrol para los patógenos *B. subtilis* y *Pseudomonas* sp. Ren *et al.*, (2021) hizo un estudio sobre como interaccionan los microorganismos del suelo cuando se aplica CSL. Los autores recolectaron 9 cepas reconocidas como especies de alto rendimiento en la industria de biofertilizantes, incluyendo cuatro bacilos, cuatro hongos y una especie de levadura. De estas se seleccionaron tres cepas dominantes según su capacidad para disolver fósforo, capacidad de hidrólisis de proteínas y crecimiento celular. Estas fueron *Bacillus subtilis* 3301, *Bacillus licheniformis* y *Aspergillus Niger*. Los procesos de fermentación de estos microorganismos fueron favorecidos cuando en el medio se ponía CSL, lo que da una idea de cómo los residuos del licor de maíz pueden tener un valor agregado aplicado al suelo. En sitios contaminados con hidrocarburos su aplicación ayuda a la degradación de hidrocarburos en suelos crónicamente contaminados, su aplicación es simple y económica, y tiene grandes perspectivas en términos de reutilización, sostenibilidad y compatibilidad ambiental (Salam e Ishaq, 2019). Estos autores estudiaron el efecto del licor de maíz (CSL) en la degradación de hidrocarburos y la estructura y función de la comunidad microbiana en el microcosmo de un suelo húmedo en campo. Se comparó un suelo crónicamente contaminado tratado con CSL (AB4) con un control no tratado (3S) durante un período de 6 semanas. En los suelos tratados con CSL se eliminó fracciones alifáticas y aromáticas de hidrocarburos incluyendo naftaleno, acetonaftileno, fluoreno, fenantreno, pireno, benzo(a)antraceno e indeno(123-cd)pireno, entre otros. El estudio metagenómico reveló que la aplicación del CSL permitió el desarrollo de bacterias con potencial para degradar estos compuestos como *Actinobacteria*, *Verticillium*, *Microbacterium*, *Laceyella*, *Methylosinus* y *Pedobacter*. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el CSL es un recurso potencial para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

- Estimulación del crecimiento de plantas en cultivos hidropónicos.

La aplicación de los productos de CSL no solo es beneficiosa para mejorar el estado de salud de los suelos y mejorar así el rendimiento del cultivo. Este tipo de productos se pueden aplicar en los modernos sistemas de cultivo conocidos como sistemas sin suelo tanto en sustrato como en sistemas de raíz flotante sin ningún tipo de sustrato. Obayori *et al.*, 2010, observó que el uso de CSL en hidroponía promueve la producción de vegetales más sanos en la parte aérea y controla e impide la aparición de enfermedades de las raíces. Parece ser que su acción está relacionada directamente con la promoción de ecosistemas microbianos y las interacciones entre ellos (Obayori *et al.*, 2015). Ejemplos de este tipo se pueden ver en el cultivo de lechuga en el que la aplicación de CSL inhibe la aparición y el desarrollo de la pudrición de las raíces (Chinta *et al.*, 2014). En esta tesis, se estudia el uso del CSL para estimular el crecimiento de las plantas de pimiento cultivadas en un sistema sin suelo.

Otro de las aplicaciones descritos del CSL es la mejora de la tasa de germinación de las semillas de soja (Zhu *et al.*, 2019). Estos investigadores observaron que después de 36 horas de la aplicación de CSL a una dosis del 1 % incrementó la tasa de germinación de las semillas de soja, alcanzando valores del 69 % frente a una tasa de germinación del 35 % de las planas no tratadas. Es más, después de 84 horas de aplicación la tasa de germinación alcanzo el 95 % de las semillas germinadas siendo más ala que la tasa del 83 % de las semillas control. En la fase de desarrollo vegetativo también se observaron efectos beneficiosos ya que se produjo un aumento del pH del suelo y se incrementó la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera, lo que condujo a un crecimiento vegetativo promovido y una floración más temprana de las plantas de soja. Estudios adicionales mostraron que los niveles en la expresión de algunos genes relacionados con la absorción y transporte de nutrientes en las raíces de soja tratadas con CSL al 1 % fueron significativamente más altos que en el control (Zhu *et al.*, 2019). Estudios adicionales revelaron que el nivel de expresión de algunos genes relacionados con la absorción y transporte de nutrientes en las raíces de las plantas de soja tratadas con un 1 % de CSL fue notablemente mayor que en las raíces de las plantas de control. Todos estos resultados demuestran que el CSL puede ser utilizado como un estimulante y fertilizante potencial para aumentar la tasa de crecimiento de las plantas de soja.

- Reducción del uso de fertilizantes nitrogenados convencionales

La fertilización excesiva de nitrógeno en los cultivos está causando graves problemas ambientales relacionados con la eutrofización de recursos naturales como mares, acuíferos, lagunas costeras como el Mar Menor (España), entre otros. Por lo tanto, es necesario diseñar estrategias agronómicas que permitan el cultivo de plantas por debajo de sus requisitos nutricionales, especialmente en cuanto al nitrógeno. En esta tesis se estudia si la aplicación de un producto

bioestimulantes formulado con CSL puede mejorar el crecimiento de los cultivos cuando estos crecen en condiciones limitantes de nitrógeno. La hipótesis de partida es que los compuestos que tiene el CSL pueden incrementar la absorción de nitratos por las raíces y potenciar sus funciones cuando este es asimilado en los diferentes tejidos de la planta.

- Protección contra quemaduras solares

Las quemaduras solares son un problema importante que afecta el rendimiento de muchos cultivos, principalmente en regiones áridas y semiáridas. La radiación solar excesiva y las altas temperaturas pueden reducir el crecimiento y causar clorosis foliar, estrés oxidativo e impedimentos en la fotosíntesis. En esta tesis se estudió si un producto formulado con CSL da protección al exceso de luz y calor en plantas de pepino. Se testó la hipótesis de que la presencia de ciertos ingredientes del CSL pueden tanto reflejar la luz incidente como desactivar las especies reactivas de oxígeno que se crean en las plantas cuando sufren algún tipo de estrés de este tipo.

- Incremento a la tolerancia a la salinidad.

La mayoría de los problemas de salinidad en agricultura son causados por el empleo en el riego de aguas que contienen altas concentraciones de sales, principalmente cloruro, sodio y sulfatos, el uso excesivo de los fertilizantes, o la pérdida de capacidad de lixiviación en algunos suelos. Su incidencia provoca efectos osmóticos y específicos, así como un desequilibrio en la absorción de nutrientes que dificulta el crecimiento de la mayoría de los cultivos. Los investigadores, Zhang *et al.* (2023) aplicaron una combinación de mio-inositol y CSL a plántulas de repollo (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) cultivadas bajo condiciones salinas con 150mM NaCl. Los autores observaron que esta concentración es muy tóxica en las plantas, pero la aplicación de mio-inositol y licor de maíz de forma combinada es capaz de contrarrestar los efectos de la salinidad de tal forma que se produce un aumento del crecimiento vegetativo. Y, esto se debió a que la aplicación del bioestimulante mejoró la fotosíntesis, y, mantuvo el equilibrio entre la componente osmótica e iónica de las células. Los efectos positivos más pronunciados se observaron en el tratamiento con 0,1 mL L⁻¹ de licor de maíz + 288 mg L⁻¹ de mio-inositol.

En esta tesis se usó un producto formulado con CSL para incrementar la tolerancia a la salinidad de plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cultivadas con aguas que contenían 100 mM NaCl. Se testó la hipótesis de que los compuestos que contienen el CSL son capaces de desactivar las especies reactivas del oxígeno que causan la toxicidad de los iones Na y/o Cl en los tejidos de las plantas.

5. OBJETIVOS



5. OBJETIVOS

La agricultura moderna se enfrenta a desafíos significativos, desde la creciente demanda mundial de alimentos hasta la necesidad imperante de adoptar prácticas agrícolas más sostenibles y de adaptar los cultivos a las condiciones de cambio climático en el que la sequía, salinidad, exceso de luz y temperatura producen pérdidas de producción y empeoramiento de la cosecha de tal manera que el rendimiento agronómico y económico de los sistemas agrícolas se ve reducido. En este contexto, los bioestimulantes han emergido como herramientas prometedoras para potenciar el rendimiento de los cultivos y mejorar la eficiencia de los sistemas agrícolas.

Los bioestimulantes son sustancias o microorganismos que, cuando se aplican a las plantas o al suelo, desencadenan respuestas fisiológicas y metabólicas que favorecen el crecimiento, desarrollo y resistencia de los cultivos. A diferencia de los fertilizantes convencionales, los bioestimulantes no proporcionan nutrientes directamente, sino que actúan como catalizadores para optimizar la absorción y utilización de los nutrientes disponibles.

En esta era de agricultura sostenible, los bioestimulantes se presentan como aliados cruciales para los agricultores que buscan aumentar la productividad de manera sostenible. Al promover la salud del suelo, mejorar la tolerancia a condiciones adversas y estimular respuestas inmunitarias en las plantas, estos productos ofrecen soluciones innovadoras para optimizar el uso de recursos y reducir la dependencia de insumos químicos.

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es obtener la base del conocimiento científico necesario para formular productos bioestimulantes formulados con Licor de Maceración de Maíz (CSL) destinados a cultivos hortícolas cuyo desarrollo se produce en situaciones limitantes tanto nutricionales como ambientales. Para alcanzar este objetivo principal nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

a) Evaluar la eficacia del producto protector Archer® Eclipse, formulado con CSL por la empresa Atlántica Agrícola S.A., contra quemaduras solares inducidas por situaciones de alta temperatura y radiación solar. La especie utilizada fue el pepino (*Cucumis sativus* L.), que es una especie sensible que generalmente se cultiva en el período de verano y, por lo tanto, está sujeta a condiciones de alta radiación solar y altas temperaturas durante su desarrollo.

b) Evaluar el efecto estimulante de dos productos CSL de la empresa Atlántica Agrícola SA, que difieren en el método de estabilización utilizado (CSL-B y CSL-H) aplicados vía radicular o foliar, en plantas de pimientos cultivadas en un sistema sin suelo con sustrato. Se determinaron

parámetros de crecimiento e indicadores de procesos fisiológicos básicos, como la fotosíntesis, el metabolismo del N, la composición hormonal y el estado nutricional.

c) Determinar si la aplicación del CSL puede estimular el crecimiento de las plantas de pimiento cuando estas se cultivan con limitaciones deficitarias de nitrógeno. Además, en este objetivo se realizó un análisis químico detallado de CSL y se analizaron varios parámetros fisiológicos relacionados con el metabolismo del nitrógeno.

d) Evaluar si la aplicación de productos formulados con CSL incrementa la tolerancia a la salinidad de plantas de pimiento. Se determinaron parámetros morfológicos, nutricionales, fisiológicos y bioquímicos para establecer el modo de acción de estos productos.



6. MATERIALES Y MÉTODOS



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estudio Fisiológico de la Eficacia de Archer® Eclipse en la Protección contra las Quemaduras Solares en Plantas de Pepino

6.1.1. Material Vegetal y Condiciones de Crecimiento

En este experimento se utilizaron plantas de pepino (*C. sativus* L. cv. Prior). Las semillas se germinaron y crecieron durante 35 días en un semillero. Posteriormente, las plántulas se transfirieron a una cámara de cultivo bajo condiciones controladas con una humedad relativa del 60 al 80 % (día/noche), una temperatura de 25 °C/15 °C (día/noche) y un fotoperiodo de 16 h/8 h con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de 350 $\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ (medido con un sensor quantum SB 190, LI-COR Inc., Lincoln, NE, EE. UU.). Bajo estas condiciones, las plantas se cultivaron en una bandeja con celdas de tamaño de 3 cm \times 3 cm \times 10 cm rellenas de una mezcla de turba y perlita. La fertirrigación consistió en una solución nutritiva completa tipo Hoagland, con modificaciones menores para el cultivo de pepino, que consiste en: 4 mM de KNO₃, 2 mM de Ca(NO₃)₂, 2 mM de MgSO₄, 1 mM de KH₂PO₄, 1 mM de NaH₂PO₄, 2 μM de MnCl₂, 1 μM de ZnSO₄, 0,25 μM de CuSO₄, 0,1 μM de Na₂MoO₄, 125 μM de Fe-EDDHA y 50 μM de H₃BO₃, con un pH de 5,8, aplicado según las necesidades de las plantas. Las plantas se regaron con 100 mL de agua cuando fue necesario.

6.1.2. Descripción de los Tratamientos y Diseño Experimental

Después de 35 días, el experimento comenzó con la implementación de la condición específica para generar "quemaduras solares". Esta condición consistió en iluminar las plantas con lámparas de vapor de sodio de alta presión (SONLIGHT HPS-TS 600W). Estas lámparas se colocaron a una altura aproximada de 60-90 cm de la planta para obtener un nivel de iluminación (PPFD) superior a 1.200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estas condiciones se establecieron diariamente durante un período de 5 horas, comenzando a las 12:00 p.m. y terminando a las 5:00 p.m.

Las plantas se separaron en dos grupos. Un grupo fue tratado con Archer® Eclipse (2 %, v/v) mediante pulverización foliar. La aplicación se realizó una solo vez con una cantidad de 50 mL en el momento que dio comienzo las condiciones estresantes de luz y temperatura. El otro grupo, que se consideró el grupo de control, las plantas no fueron tratadas con este producto pero si con agua destilada. El diseño experimental incluyó un bloque completo al azar con nueve plantas por tratamiento dispuestas en celdas individuales en bandejas, con los tratamientos distribuidos al azar en la cámara de cultivo.

Archer® Eclipse se formuló con sales de calcio (Ca) y zinc (Zn), así como un extracto vegetal procedente de subproductos de la industria del procesamiento de maíz (licor de maceración de maíz, CSL, como fuente de nitrógeno). CSL es una mezcla líquida viscosa que consiste

completamente en los componentes solubles en agua del maíz macerado en agua. El proceso de maceración comienza con el remojo de granos de maíz en tanques abiertos entre 45 a 52 °C durante 40 a 48 h. Se agrega dióxido de azufre (SO₂) para prevenir el crecimiento de hongos y ayudar a solubilizar el material. Las concentraciones iniciales de SO₂ están entre 0,1 y 0,2 % (pH 3,8 a 4,5) y disminuyen a 0,05 % y 0,01 % después de 5 y 10 horas, respectivamente. Ocurre una fermentación activa en el agua de maceración y las poblaciones de bacterias lácticas de ácido láctico aumentan a medida que disminuyen las concentraciones de SO₂. Esto separa el almidón del gluten, solubiliza y descompone las proteínas y ablanda el maíz para facilitar la molienda. El licor de maceración rico en aminoácidos y péptidos se recoge y concentra. Este extracto vegetal contiene (µg g⁻¹): 4-aminobutirato (33,20), alanina (311,58), asparagina (70,26), isoleucina (48,43), leucina (103,24), valina (76,99), 3-fenillactato (46,94), 4-hidroxifenilacetato (100,16), formiato (2,67), lactato (2.487,15), ácido indolacético (7,48), colina (28,96) y trigonelina (3,15). Este análisis se realizó mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR): Ascend 500 MHz AVANCE III HD H-NMR (Bremen, Alemania). Los espectros resultantes se evaluaron con el programa 'Chenomx NMR Suite', versión 8.3, y un LC/MSD Trap, versión 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania).

6.1.3 Muestreo de las Plantas

Al final del experimento, 15 días después de la aplicación de las condiciones que indujeron las quemaduras solares (DAS), se cosecharon submuestras de material vegetal justo después de que terminara el tratamiento diario de quemaduras solares. Estas submuestras se lavaron con agua Milli-Q y se secaron sobre papel de filtro para obtener el peso fresco (FW). Otras submuestras se congelaron a -40 °C y se utilizaron para el análisis bioquímico. Todas las plantas se cosecharon y se secaron en un horno de aire forzado para determinar el peso seco (DW).

6.1.4. Temperatura de las Hojas e Imágenes Termográficas

Tanto la temperatura de las hojas como las imágenes termográficas se tomaron directamente utilizando una cámara de imágenes térmicas HTi, modelo HT-19. Los datos que se muestran en esta tesis son del último día del experimento (Chandel *et al.*, 2018). La temperatura de las hojas se midió en una hoja de cada planta (9 plantas por tratamiento) y al azar en 6 hojas más para aumentar el tamaño de la muestra.

6.1.5. Mediciones de Intercambio Gaseoso

Las mediciones se registraron utilizando un analizador de gases de infrarrojo portátil LICOR 6800 (IRGA: LI-COR Inc. Lincoln, NE, EE. UU.). Las hojas intermedias se colocaron en condiciones óptimas de crecimiento. Antes de su uso, el equipo se calentó durante 30 minutos y se calibró. Las mediciones utilizaron condiciones óptimas de medida: 500 µmol m² s⁻¹ de radiación fotosintéticamente activa (PAR), 400 µmol mol⁻¹ de concentración de CO₂, y temperatura y

humedad relativa ambiental de las hojas. Se registraron simultáneamente la tasa neta de fotosíntesis, la tasa de transpiración y la resistencia estomática. Los datos se almacenaron en el dispositivo LICOR y se analizaron con el software "Photosyn Assistant". La eficiencia instantánea en el uso del agua (WUE) se calculó dividiendo la tasa neta de fotosíntesis (A_{CO_2}) por la tasa de transpiración correspondiente (Eleaf). Los datos informados son del último día del experimento (Ko *et al.*, 2020).

6.1.6. Análisis de la Fluorescencia de la Clorofila a (Chl a)

Para realizar este estudio las hojas se adaptaron a oscuridad durante 30 minutos, antes de tomar las medidas, utilizando una pinza especial para hojas. La cinética de la fluorescencia de la Chl a se determinó utilizando el Fluorímetro de Clorofila Handy PEA (Hansatech Ltd., King's Lynn, Norfolk, Reino Unido); las fases OJIP se indujeron mediante luz roja (650 nm), con una intensidad lumínica de $3.000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las fases de fluorescencia OJIP se analizaron mediante la prueba JIP (Padhi *et al.*, 2021). Las medidas se realizaron en hojas completamente desarrolladas en la posición media de la planta de cada una de las nueve plantas por tratamiento. Los parámetros siguientes obtenidos a partir de la prueba JIP se utilizaron para estudiar los flujos de energía y la actividad fotosintética: fluorescencia inicial (F_o), fluorescencia máxima (F_m), fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_o$), índice de rendimiento (PIABS), la relación de centros de reacción activos (RC) (RC/ABS) y el valor Ψ_{Eo} , que indica la salida de electrones principalmente del fotosistema II (PSII) (Padhi *et al.*, 2021).

6.1.7. Concentración de Clorofila (Chls) y Carotenoides

Las concentraciones de Chls y carotenoides se analizaron según Andrianto *et al.* (2018) con algunas modificaciones. El material vegetal, 0,1 g, se trituró con 1 mL de metanol. Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a $5.000 \times g$. La absorbancia se midió a tres longitudes de onda diferentes: 666 nm, 653 nm y 470 nm, y se realizaron los siguientes cálculos en función de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Chl a (Chl a)} = 15,65 \times A_{666\text{nm}} - 7,34 \times A_{653\text{nm}} \quad (1)$$

$$\text{Chl b (Chl b)} = 27,05 \times A_{653\text{nm}} - 11,21 \times A_{666\text{nm}} \quad (2)$$

$$\text{Carotenoides} = (1.000 \times A_{470\text{nm}} - 2,86 \times \text{Chl a} - 129,2 \times \text{Chl b})/221 \quad (3)$$

6.1.8. Fuga de Electrolitos

La estabilidad de la membrana celular se determinó realizando la prueba de conductividad eléctrica (CE) (Soloklui *et al.*, 2017). Para este propósito, se pesaron 0,3 g de material vegetal fresco, se cortaron en trozos, se lavaron ligeramente con agua desionizada y se colocaron en un tubo de ensayo, después de lo cual se agregaron 30 mL de agua desionizada. Los tubos se agitaron en un vórtex durante 1 minuto. La conductividad inicial (CE1) se midió utilizando un medidor de

conductividad (Cond 8; XS Instruments, Carpi, Italia). Posteriormente, los tubos se incubaron en un baño de agua a una temperatura de 100 °C durante 20 minutos para extraer los electrolitos liberados y se permitió que se enfriaran a temperatura ambiente. A continuación, se midió la conductividad final (CE2). El porcentaje de pérdida de electrolitos se calculó utilizando la siguiente fórmula: $(CE1/CE2) \times 100$.

6.1.9. Determinación de la Concentración de Indicadores Oxidativos (Malondialdehído (MDA), H_2O_2 y O_2^-)

La concentración de MDA se determinó de acuerdo con el método descrito por Morales and Munné-Bosch (2019). El material fresco se extrajo con TBA + TCA y, después de la extracción, se registró la absorbancia a 532 nm y 600 nm para corregir la turbidez. La concentración de H_2O_2 se midió colorimétricamente de acuerdo con el método descrito por Junglee *et al.*, (2014), basado en la reacción con KI y la lectura de absorbancia a 350 nm. Para la determinación de O_2^- , se siguió el método descrito por Barrameda-Medina *et al.*, (2014). El método se basó en la reacción con hidroxilamina, ácido sulfanílico y alfa-1-naftilamina. La intensidad del color se midió a 530 nm.

6.1.10. Determinación de la Concentración Total de Fenoles

Los fenoles totales del tejido vegetal se extrajeron con metanol. El contenido se cuantificó a una absorbancia de 765 nm utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteau (Alam *et al.*, 2019). La concentración de fenoles se obtuvo utilizando una curva estándar de ácido cafeico.

6.1.11. Análisis Estadístico

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA de un factor), con un intervalo de confianza del 95 %. Todos los análisis bioquímicos se repitieron tres veces y se consideró el promedio como una unidad experimental. Todas las mediciones fisiológicas se tomaron de una hoja por planta. Por lo tanto, el promedio se obtuvo a partir de nueve unidades experimentales ($n = 9$). Sin embargo, la temperatura de las hojas se midió en 15 hojas individuales por tratamiento ($n = 15$). Las diferencias entre las medias de los dos tratamientos se compararon utilizando la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de probabilidad del 95 %. Los niveles de significancia se expresaron como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; y NS no significativo. El experimento se replicó dos veces y no se encontraron diferencias significativas entre las dos repeticiones. Los datos provienen del primer experimento.

6.2 Efectos de la Aplicación Radicular y Foliar de Licor de Maceración de Maíz en Plantas de Pimiento: Un Estudio Fisiológico, Nutricional y Morfológico

6.2.1 Material Vegetal y Condiciones de Crecimiento

Para llevar a cabo este trabajo, se utilizaron plantas de pimiento (*Capsicum annuum* cv. Alycum). Después de la germinación, las plantas se cultivaron en una bandeja con celdas de 3 cm × 3 cm × 10 cm durante 45 días. Luego, se trasplantaron a macetas con 2 L de sustrato (una mezcla de perlita: turba, 1:3) y se colocaron en una cámara de crecimiento con una humedad relativa del 60/80 % (día/noche), una temperatura de 29/20 °C (día/noche) y un fotoperíodo de 16 h con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFP) de 450 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plantas se regaron una vez a la semana con una solución nutritiva de Hoagland (4 mM de KNO_3 , 2 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2 mM de MgSO_4 , 1 mM de KH_2PO_4 , 1 mM de NaH_2PO_4 , 2 μM de MnCl_2 , 1 μM de ZnSO_4 , 0,25 μM de CuSO_4 , 0,1 μM de Na_2MoO_4 , 125 μM de Fe-EDDHA y 50 μM de H_3BO_3), con un pH de 5,8, añadiendo de 50 a 100 mL, dependiendo del crecimiento de las plantas.

6.2.2 Diseño Experimental

Cincuenta y dos días después de la germinación, se llevó a cabo la aplicación de los tratamientos: T1: control, sin aplicación de CSL; T2: aplicación de CSL-B en la raíz a una dosis de 5 mL L^{-1} ; T3: aplicación de CSL-H en la raíz a una dosis de 5 mL L^{-1} ; T4: aplicación de CSL-B en el follaje a una dosis de 5 mL L^{-1} ; y T5: aplicación de CSL-H en el follaje a una dosis de 5 mL L^{-1} . El volumen utilizado tanto en la aplicación en la raíz como en el tratamiento foliar fue de 50 mL. Para asegurar que las aspersiones foliares no entraran en contacto con los tratamientos en la raíz, se utilizaron recintos de plástico para proteger la parte aérea y aislar también el sustrato. El CSL se obtuvo del maíz mediante un proceso de molienda húmeda y es rico en sustancias orgánicas y minerales, incluyendo aminoácidos libres, nutrientes minerales, compuestos fenólicos (ácidos vanílico, ferúlico, cumárico, sinapínico y cafeico) y azúcares solubles de bajo peso molecular.

Los dos productos CSL probados, CSL-B y CSL-H, incluyen en su composición (% g/100 g de producto fresco), respectivamente: aminoácidos libres (5,0–6,0 y 5,5–6,5), materia orgánica total (40,0 y 30,0), extracto húmico total (30,0 y 20,0), ácidos fúlvicos (30,0 y 20,0), nitrógeno total (3,0), nitrógeno amoniacal (0,3), nitrógeno orgánico (2,7), potasio (K_2O) (2,5) y fósforo (P_2O_5) (3,0). No se detectaron micronutrientes. Las diferencias entre los dos productos CSL se deben a que el CSL-H se obtiene directamente de la industria, mientras que el CSL-B pasa por una estabilización de los sólidos suspendidos, lo que aumenta su vida útil (mediante un método pendiente de la concesión de una patente a Atlántica Agrícola S.A.), permitiendo su adecuado manejo industrial sin problemas de sedimentación.

La aplicación de los diferentes tratamientos comenzó 7 días después de trasplantar las plantas a la cámara de crecimiento. Los productos CSL-B y CSL-H, tanto por la vía de la raíz como por la

vía foliar, se aplicaron cuatro veces, con 7 días entre aplicaciones. El diseño experimental consistió en un bloque completo al azar con ocho plantas por tratamiento, dispuestas en macetas individuales, con los tratamientos distribuidos al azar en la cámara de crecimiento.

6.2.3 Mediciones de Intercambio de Gases y Fluorescencia de Clorofilas

Al final del experimento, 7 días después de la última aplicación de los tratamientos, se midieron los parámetros de intercambio de gases y la fluorescencia de las clorofilas de las plantas.

6.2.4 Eficiencia Fotosintética

Las mediciones se realizaron con un Analizador de Gases Infrarrojo LICOR 6800 (IRGA: LICOR Inc., Lincoln, NE, EE. UU.) en una hoja en seis plantas por tratamiento. Las hojas intermedias, en condiciones óptimas de crecimiento, se introdujeron en las celdas de medición, y las mediciones se realizaron a $500 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa (PAR), una concentración de CO_2 de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$, una temperatura de hoja de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y una humedad relativa del 60 %. Se registraron simultáneamente la tasa de fotosíntesis neta, A; la tasa de transpiración, E; y la conductancia estomática, gs. Los datos se analizaron utilizando el software "Photosyn Assistant". La eficiencia instantánea en el uso del agua (WUE) se calculó dividiendo A por E (Strasser *et al.*, 2000).

6.2.5 Fluorescencia de Clorofila a

La cinética de fluorescencia de la Clorofila a (Chl a) se determinó con un Fluorímetro de Clorofila Handy PEA (Hansatech Ltd., King's Lynn, Norfolk, Reino Unido). Se utilizó luz roja (650 nm) con una intensidad lumínica de $3.000 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para inducir las fases OJIP. Las fases de fluorescencia OJIP se analizaron mediante la prueba JIP (Strasser *et al.*, 2000). Las mediciones se realizaron en hojas completamente desarrolladas en la parte central de la planta. Para estudiar los flujos de energía y la actividad fotosintética, se utilizaron los siguientes parámetros obtenidos de la prueba JIP: fluorescencia inicial (F_0); fluorescencia máxima (F_m); fluorescencia variable ($F_v = F_m - F_0$); valor de fluorescencia a $300 \mu\text{s}$ (pico K); producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria (F_v/F_m); índice de rendimiento (PIABS); relación de centros de reacción activos (RC) (RC/ABS); y el valor $1-V_j$, que indica la salida de electrones, principalmente del fotosistema II (Strasser *et al.*, 2000).

6.2.6 Análisis de Muestras de Plantas

Siete días después de la última aplicación de los tratamientos, y una vez realizadas las mediciones de intercambio de gases y fluorescencia de las clorofilas, se procesaron todas las plantas para el análisis. El material vegetal se pesó y luego se lavó con detergente no iónico DECON-90. Posteriormente, se lavó tres veces con agua desionizada y se secó con papel de filtro. Se tomaron muestras de hojas de cada planta y se mantuvieron frescas o congeladas a $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ para determinar

los indicadores oxidativos, el perfil hormonal, el aminograma, la actividad enzimática y la concentración de nitrato. También se tomaron hojas que, después de secarse en un horno de aire forzado, se utilizaron para determinar el peso seco (PD), así como para medir las concentraciones de nutrientes minerales y la eficiencia en el uso del nitrógeno de las plantas (ENU). Los parámetros incluidos en esta sección se determinaron según (Marcelis *et al.*, 1998). El área foliar se midió con un lector óptico LI-COR, modelo LI-3000A. El área foliar específica (SLA) es la relación entre el área foliar y el peso de las hojas.

6.2.7 Concentraciones de Indicadores Oxidativos (MDA, H_2O_2 y O_2^-)

Para la extracción de malondialdehído (MDA), el material vegetal fresco se homogeneizó con 5 mL de un buffer de 50 mM (0,07 % de $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ y 1,6 % de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) en un mortero y se centrifugó a $20.000 \times g$ durante 25 min. Posteriormente, se mezcló una alícuota de 1 mL del sobrenadante con 4 mL de ácido tricloroacético al 20 % que contenía 0,5 % de ácido tiobarbitúrico. La mezcla resultante se calentó a 95 °C durante 30 min y luego se enfrió rápidamente en un baño de hielo. Las muestras se centrifugaron a $10.000 \times g$ durante 10 min, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm. El valor de la absorbancia no específica a 600 nm se restó de la lectura obtenida a 532 nm. La concentración de MDA se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar de MDA de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Fu y Huang, 2001).

La concentración de H_2O_2 se midió colorimétricamente, de acuerdo con (Mukherjee y Choudhuri, 1983). El material vegetal fresco se homogeneizó en acetona fría. Se mezcló una alícuota de 1 mL del extracto con 200 μL de dióxido de titanio al 0,1 % en H_2SO_4 al 20 % (v/v), y la mezcla se centrifugó a $6.000 \times g$ durante 15 min. Se midió la intensidad del color amarillo del sobrenadante a 415 nm. La concentración de H_2O_2 se calculó a partir de una curva estándar de H_2O_2 .

La concentración de O_2^- se midió colorimétricamente, de acuerdo con (Barrameda-Medina *et al.*, 2014). Se maceró una muestra de 0,1 g de material vegetal fresco, se añadieron 300 μL de un buffer de fosfato de 50 mM y la mezcla se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 15 min. Se tomó una alícuota de 250 μL del sobrenadante, y se añadieron 1 mL de un buffer de fosfato de 50 mM y 250 μL de hidroxilamina al 10 mM. La mezcla se incubó durante 20 min a 25 °C. Posteriormente, se añadieron 180 μL de ácido sulfonílico al 17 mM y 180 μL de α -1-naftilamina al 7 mM a 60 μL del sobrenadante. La mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, y se midió la intensidad del color a 530 nm. La concentración de O_2^- se calculó a partir de una curva estándar de O_2^- .

6.2.8 Perfil Hormonal

Se analizaron el ácido indolacético (AIA), las giberelinas (GA, GA1 + GA3 + GA4), las citocininas (CKs: trans-zeatina (tZ) + isopentenil adenina (iP)) y la melatonina, de acuerdo con (Ghanem *et al.*, 2008) con algunas modificaciones. Se homogeneizó una muestra de 30 mg de

material liofilizado en 0,5 mL de una solución de metanol/agua fría (-20 °C) (80/20, v/v). Los sólidos se separaron por centrifugación (20.000× g, 15 min) y se volvieron a extraer durante 30 min a 4 °C en 0,5 mL adicionales de la misma solución de extracción. Los sobrenadantes combinados se pasaron a través de una columna Sep-Pak Plus-C18 (SepPak Plus, Waters, Bedford, MA, EE. UU.). Para eliminar los lípidos interferentes y parte de los pigmentos de la planta, se evaporaron a 40 °C bajo vacío o hasta que se eliminara el solvente orgánico. El residuo se disolvió en 1 mL de una solución de metanol/agua (20/80, v/v) en un baño ultrasónico. Las muestras disueltas se filtraron a través de filtros Millex de 13 mm de diámetro, con una membrana de nailon de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.). Se inyectó una muestra de 10 µL de cada extracto filtrado en un sistema U-HPLC-MS, que constaba de un U-HPLC de la serie Accela (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas Exact (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) mediante una interfaz de ionización por electrospray calentada (HESI). Los espectros de masas se obtuvieron con el software Xcalibur versión 2.2 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para la cuantificación de las hormonas vegetales, se construyeron curvas de calibración para cada componente analizado (1, 10, 50 y 100 µg L⁻¹), con corrección para 10 µg L⁻¹ de estándares internos deuterados. Los porcentajes de recuperación estuvieron entre el 92 y el 95 %.

6.2.9 Aminograma

Los aminoácidos solubles se extrajeron utilizando el método de (Bielecki y Turner, 1996) con algunas modificaciones. Se homogeneizó una muestra de 0,1 g de hojas frescas en 1 mL de una solución MCW (metanol:cloroformo:agua, 12:5:1); se añadieron 50 µL de ácido L-2-aminobutírico como estándar interno. La mezcla se centrifugó a 20.000 × g durante 10 min. Al sobrenadante se le añadieron 700 µL de agua Milli-Q y 1,2 mL de cloroformo, y esta mezcla se incubó durante 24 h a 4 °C. Posteriormente, se liofilizó la fase acuosa, y el extracto resultante se diluyó con HCl 0,1 M. El análisis instrumental de los aminoácidos solubles se realizó utilizando una precolumna del kit de derivatización Ultra AccQ Tag (Waters, Milford, MA, EE. UU.). La derivatización se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante: a 10 µL de la muestra se le añadieron 60 µL de tampón de borato, 10 µL de NaOH 0,1 N y 20 µL de reactivo AccQ Tag Ultra reconstituido. El análisis de LC de fluorescencia se realizó en un sistema UHPLC Waters Acquity® equipado con un detector de fluorescencia Acquity. La separación UHPLC se realizó en una columna Ultra AccQ Tag de Waters (2,1 × 100 mm, 1,7 µm). La velocidad de flujo fue de 0,7 mL min⁻¹ y la temperatura de la columna se mantuvo a 55 °C. El volumen de inyección fue de 1 µL y la detección se realizó a una longitud de onda de excitación de 266 nm y una longitud de onda de emisión de 473 nm. El sistema de disolventes consistió en dos eluyentes: una dilución de 1:20 de eluyente A de AccQ Tag Ultra y eluyente B de AccQ Tag Ultra. El perfil fue el siguiente: 0–0,54 min, 99,9 % A y 0,1 % B; 5,74 min, 90,9 % A y 9,1 % B; 7,74 min, 78,8 % A

y 21,2 % B; 8,04 min, 40,4 % A y 59,6 % B; 8,05–8,64 min, 10 % A y 90 % B; y 8,73–9,50 min, 99,9 % A y 0,1 % B.

6.2.10 Actividades Enzimáticas Involucradas en el Metabolismo del Nitrógeno

La actividad de la nitrato reductasa (NR) se determinó siguiendo el procedimiento descrito por (Navarro-León *et al.*, 2016). Se maceró material vegetal fresco (0,2 g) en un mortero con 1 mL de buffer de extracción que contenía 2 mM de EDTA-Na, 2 mM de DTT y 1 % (w/v) de PVPP en 100 mM de KH_2PO_4 (pH 7,5). La suspensión obtenida se centrifugó durante 20 min a $20.600\times g$, a 4 °C. El sobrenadante resultante se añadió a una mezcla de reacción que contenía: 100 mM de KNO_3 , 2 mM de NADH, 10 mM de cisteína y 10 mM de MgCl_2 en un tampón de KH_2PO_4 de 100 mM (pH 7,5). Esta mezcla se incubó a 30 °C durante 30 min. Posteriormente, se utilizó acetato de Zn al 1 mM para detener la reacción, y se añadió sulfanilamida al 1 % en HCl 1,5 M y 0,02 % (w/v) de NNEDA en HCl 0,2 M para la detección del NO^{2-} producido. Finalmente, la actividad de la NR se determinó midiendo la absorbancia del NO^{2-} a 540 nm.

La actividad de la glutamina sintetasa (GS) se determinó mediante la adaptación del ensayo de la hidroxamato sintetasa de (Navarro-León *et al.*, 2016). Se maceró una muestra de 0,1 g de hojas en un mortero con 1 mL de un buffer de extracción que contenía: 100 mM de sacarosa, 2 % (v/v) de β -mercaptoetanol y 20 % (v/v) de etilenglicol en ácido málico-KOH de 100 mM (pH 6,8). La suspensión se centrifugó durante 20 min a $20.600\times g$, a 4 °C. El extracto resultante se utilizó para medir la actividad de la GS. La mezcla de reacción utilizada consistió en 150 mM de glutamato de sodio, 30 mM de hidroxilamida y 10 mM de ATP como sustratos, junto con 45 mM de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 4 mM de EDTA-Na, todos ellos disueltos en un tampón de imidazol-HCl de 150 mM (pH 7,8). Después de incubarse a 28 °C durante 30 min, se determinó la formación de glutamilhidroxamato midiendo su absorbancia a 540 nm. La actividad específica de la GS se calculó dividiendo la cantidad de glutamato formado en 30 min por el contenido de proteína soluble en el extracto utilizado.

6.2.11 Concentraciones de Nutrientes Minerales y Eficiencia en el Uso del Nitrógeno

Para determinar las concentraciones de nutrientes minerales (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu y Mn), se tomaron muestras de 0,1 g de hojas secas de cada planta y se digirieron con una solución de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$. Las concentraciones de nutrientes se determinaron mediante espectroscopía de absorción atómica utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Varian SpectrAA-200 (Varian, Inc., Palo Alto, CA, EE. UU.) según los procedimientos estándar de (Wolf, 1982). La eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE) se calculó dividiendo la producción de biomasa (Bw) por la cantidad de nitrógeno total en la planta.

6.2.12 Análisis Estadísticos

Todos los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un análisis de comparaciones múltiples utilizando la prueba de Tukey-Kramer. Antes de realizar los análisis de ANOVA, se comprobó la normalidad y la homogeneidad de las varianzas de los datos. Se utilizaron las variables transformadas en logaritmo natural (ln) cuando fue necesario para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Los análisis se realizaron con el software STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EE. UU.). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los valores se presentan como medias \pm desviación estándar (DE).



6.3 La Aplicación de Licor de Maceración de Maíz Mejora la Tolerancia del Pimiento (*Capsicum annum L.*) a la Salinidad

6.3.1. Material Vegetal y Condiciones de Crecimiento

Se plantaron plantas de pimiento (*Capsicum annum* cv. *Alycum*) de 45 días de edad en macetas de 2 L llenas de un sustrato compuesto por perlita y turba en una proporción de 1:3. Las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento con una temperatura de 29 °C y una humedad relativa (HR) del 60 % durante el día (16 h), con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFF) de 450 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y 20 °C y 80 % de HR durante la noche. La fertirrigación se realizó utilizando una solución nutritiva Hoagland compuesta por 4 mM de KNO_3 , 2 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2 mM de MgSO_4 , 1 mM de KH_2PO_4 , 1 mM de NaH_2PO_4 , 2 μM de MnCl_2 , 1 μM de ZnSO_4 , 0,25 μM de CuSO_4 , 0,1 μM de Na_2MoO_4 , 125 μM de Fe-EDDHA y 50 μM de H_3BO_3 (pH 5,8). Se realizó un riego semanal con un volumen que variaba de 50 a 100 mL, según el tamaño de las plantas.

6.3.2. Diseño Experimental

Siete días después del trasplante, se aplicaron los siguientes tratamientos: T1: solución nutritiva Hoagland; T2: 100 mM de NaCl en la solución nutritiva Hoagland; T3: 100 mM de NaCl en la solución nutritiva Hoagland con la aplicación foliar de CSL a 5 mL L⁻¹; y T4: 100 mM de NaCl en la solución nutritiva Hoagland con la aplicación radicular de CSL a 5 mL L⁻¹. El producto CSL, tanto mediante la aplicación foliar como radicular, se aplicó cuatro veces cada 7 días desde el inicio de los tratamientos. En la cámara de crecimiento, se prepararon dos bloques con cuatro tratamientos en cada uno y ocho plantas por tratamiento con distribución aleatoria. Siete días después de la última aplicación de CSL, se determinó el crecimiento de las plantas, se evaluó el estado fisiológico, se analizaron los indicadores de estrés oxidativo y los componentes antioxidantes, y se estableció la toxicidad específica.

6.3.3. Biomasa Aérea y Área Foliar

La medición del área foliar se realizó utilizando un lector óptico LI-COR, modelo LI-3000A (IRGA: LICOR Inc., Lincoln, NE, EE. UU.). Para determinar la materia seca (DM), las hojas se secaron por radiación y convección forzada en un horno. Las muestras de hojas para determinar los indicadores oxidativos y los compuestos antioxidantes se almacenaron a -40 °C.

6.3.4. Mediciones del Intercambio Gaseoso

Las mediciones se realizaron utilizando el Sistema Portátil de Fotosíntesis LICOR 6800 (IRGA: LICOR Inc., Lincoln, NE, EE. UU.), un analizador de gases infrarrojo. Se seleccionó una hoja completamente desarrollada, en una situación intermedia, de cada ocho plantas por tratamiento. Las condiciones de calibración fueron 500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente

activa (PAR), una concentración de CO₂ de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, una temperatura de hoja de 30 °C y 60 % de HR. Se registraron simultáneamente la tasa neta de fotosíntesis (A), la tasa de transpiración (E) y la conductancia estomática (r). Los datos se analizaron utilizando el software Photosyn Assistant (IRGA: LICOR Inc., NE, EE. UU.). Para estimar la eficiencia instantánea del uso del agua (WUE), se utilizó la relación entre A y E (Strasser *et al.*, 2000).

6.3.5. Fluorescencia de la Clorofila a (Chl a)

Se determinaron las cinéticas de fluorescencia de Chl a utilizando un fluorímetro de clorofila Handy PEA (Hansatech Ltd., King's Lynn, Norfolk, Reino Unido) en hojas completamente desarrolladas del centro de la planta. Se utilizó luz roja (650 nm) con una intensidad de 3.000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para inducir las fases de fluorescencia, y se empleó la prueba JIP para el análisis (Strasser *et al.*, 2000). Los parámetros determinados fueron el rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica primaria (Fv/Fm), el índice de rendimiento (PIABS), la proporción de centros de reacción activos (RC/ABS) y la salida de electrones (1-Vj) (Strasser *et al.*, 2000).

6.3.6. Estrés Oxidativo

La extracción de malondialdehído (MDA), C₃H₄O₂, se realizó en material vegetal fresco homogeneizado en un mortero con 5 mL de tampón de 50 mM (0,07 % de NaH₂PO₄·2H₂O y 1,6 % de Na₂HPO₄·12H₂O). La mezcla se centrifugó luego a 20.000× g (Heraeus Sepatech Biofuge 17RS, Hanau, Alemania) durante 25 minutos. A continuación, se mezcló 1 mL del sobrenadante con 4 mL de ácido tricloroacético al 20 % (CCl₃COOH) que contenía un 0,5 % de ácido tiobarbitúrico (C₄H₂N₂O₂S). La mezcla resultante se calentó a 95 °C durante 30 minutos y luego se redujo rápidamente. Esta muestra se centrifugó luego a 10.000× g durante 10 minutos (Heraeus Sepatech Biofuge 17RS, Hanau, Alemania). Se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm. Se restó la absorción no específica a 600 nm de la lectura obtenida (Fu y Huang, 2001).

La concentración de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se midió por colorimetría según (Mukherjee y Choudhuri, 2006). Para ello, se homogeneizó material vegetal fresco en acetona fría (C₃H₆O). Se mezcló una alícuota de 1 mL del extracto con 200 μL de dióxido de titanio al 0,1 % (TiO₂) en ácido sulfúrico al 20 % (H₂SO₄) y la mezcla se centrifugó a 6.000× g durante 15 minutos (Heraeus Sepatech Biofuge 17RS, Hanau, Alemania). Se midió la intensidad del color amarillo del sobrenadante a 415 nm, y la concentración de H₂O₂ se calculó a partir de su curva estándar correspondiente.

La concentración de superóxido (O₂⁻) se determinó por colorimetría (Barrameda-Medina *et al.*, 2014), y se calculó a partir de una curva estándar.

6.3.7. Actividad Antioxidante

6.3.7.1 Compuestos Antioxidantes (Fenoles Totales, Ascorbato, Glutación)

Los fenoles totales se extrajeron del material vegetal con metanol, CH₄O. El contenido se determinó en función de la absorbancia a 765 nm utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu (Rivero *et al.*, 2001). La concentración de fenoles se derivó de una curva estándar de ácido cafeico, C₉H₈O₄.

Para la extracción y cuantificación del ascorbato (AsA), se utilizó el método descrito por (Law *et al.*, 1983), que se basa en la reducción de Fe³⁺ a Fe²⁺ por AsA en solución ácida. Se homogeneizó material vegetal congelado (0,5 g) en 5 mL de ácido metafosfórico al 5 %, HPO₃. La mezcla se centrifugó luego a 16.000× g a 4 °C durante 15 minutos (Heraeus Sepatech Biofuge 17RS, Hanau, Alemania). Luego, se agregaron 0,2 mL del sobrenadante a un tubo de ensayo junto con 0,5 mL de tampón fosfato sódico al 150 mM (pH 7,5) y 0,1 mL de agua destilada. La mezcla se agitó e incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 0,1 mL de maleimida N-etil, C₆H₇NO₂ al 0,5 % (p/v), 0,4 mL de ácido ortofosfórico, H₃PO₄ al 44 % (v/v), 0,4 mL de 2,2'-bipiridina al 4 % (p/v) en etanol al 70 %, C₂H₆O, y 0,2 mL de FeCl₃ al 3 %. Después de agitar, la mezcla se incubó a 40 °C en la oscuridad durante 40 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 525 nm frente a una curva estándar de ascorbato.

La concentración de glutación reducido (GSH), C₁₀H₇N₃O₆S, se determinó según lo detallado por (Law *et al.*, 1983), basado en la especificidad de la glutación reductasa (GR) para el glutación oxidado (GSSG). Primero, se realizó la extracción utilizando 0,5 g de material fresco homogeneizado en 5 mL de ácido metafosfórico, HPO₃ al 5 % (v/v). La muestra se filtró y centrifugó a 16.000× g durante 15 minutos a 0 °C (Heraeus Sepatech Biofuge 17RS, Hanau, Alemania). Para la cuantificación total de GSH, se preparó una mezcla de reacción con 50 µL del extracto y 250 µL de tampón de Heppes-HCl al 50 mM, pH 7,6, que contenía 330 mM de betaína, C₃H₁₁NO₂, y 150 µL de ácido sulfosalicílico al 10 % (p/v), C₇H₆O₆S. Luego, en un tubo de ensayo se añadieron 150 µL de la mezcla de reacción, 700 µL de NADPH al 0,3 mM y 100 µL de DTNB al 6 mM (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)). La mezcla se agitó y, después de una incubación de 4 minutos, se añadieron 50 µL de GR (10 U/mL). Finalmente, las muestras se leyeron a 412 nm frente a una curva estándar de GSH.

6.3.7.2. Pruebas Antioxidantes FRAP y TEAC

La prueba de potencial antioxidante de reducción de iones férricos (FRAP) se realizó utilizando el reactivo FRAP, compuesto por 1 mM de 2,4,6-tripiridil-2-triazina (TPTZ) y 20 mM de FeCl₃ en acetato de sodio al 0,25 M, CH₃COONa, pH 3,6. Se agregaron 100 µL del extracto obtenido al homogeneizar el material vegetal con 10 mL de metanol, CH₄O, a 2 mL del reactivo FRAP. Esta mezcla se mantuvo a 20 °C durante 5 minutos. La absorbancia se midió a 593 nm frente a

una curva estándar de 25-1.600 μM de Fe^{3+} obtenida a partir de una solución de sulfato ferroso al 25 mM, FeSO_4 (Benzie *et al.*, 1996).

La prueba de actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) se realizó utilizando una versión modificada del procedimiento descrito por Cai *et al.* (2004). Primero, se mezcló 7 mM de 2,2'-azinobis-(3-etilbenciotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) con 2,45 mM de persulfato de potasio, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, para generar el catión ABTS⁺. La mezcla resultante se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas. Luego, la solución de ABTS⁺ se diluyó con metanol, CH_4O , y se calibró a una longitud de onda de 734 nm. Se mezclaron vigorosamente 100 μL del extracto de hojas (0,5 g en 10 mL de CH_4O) con 3,9 mL de la solución de ABTS⁺ diluida y luego se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 6 minutos, seguido de la medición inmediata de la absorbancia a 734 nm. Las muestras se compararon con una curva estándar de Trolox de 0-15 μM sometido al mismo procedimiento.

6.3.8. Prolina

La concentración de prolina libre, $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$, en las hojas se determinó utilizando el método de Irigoyen *et al.* (2006).

6.3.9. Concentraciones de Na^+ , Cl^- y K^+

Las muestras de hojas se mineralizaron según el método descrito por Wolf (1982). La digestión de las hojas secas (0,2 g) se realizó en HNO_3 al 30 % y H_2O_2 a 300 °C. La determinación de las concentraciones de Na^+ , Cl^- y K^+ se realizó utilizando ICP-OES (Perkin-Elmer Optima 8300, Waltham, MA, EE. UU.).

6.3.10. Análisis Estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado, y los resultados se evaluaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95 %. No hubo diferencias entre los bloques. Las diferencias entre las medias de los tratamientos se compararon utilizando la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher con un nivel de probabilidad del 95 %. Los niveles de significación se expresaron como: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NS (no significativo).

6.4 La aplicación de Licor de Maceración de Maíz en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) estimula el crecimiento bajo condiciones de cultivo deficientes en nitrógeno

6.4.1. Análisis Químico del Producto Licor de Maceración de Maíz

En este experimento, se utilizó el producto denominado CSL-B en Navarro-Morillo *et al.* (2023). La identificación de metabolitos no volátiles se realizó utilizando una muestra de 1 g homogeneizada con agua Milli-Q en una proporción de 1:100, en un baño ultrasónico durante 10 minutos. Posteriormente, la muestra se filtró con un filtro de 0,22 μm e inyectada en un sistema de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) (LC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (LC/Q-TOF Agilent 6546, Santa Clara, CA, EE. UU.), operando en modo de ionización positiva y negativa. La separación cromatográfica se logró utilizando una columna Agilent Zorbax RRHD SB-C18, 2,1 \times 50 mm, 1,8 μm . La fase móvil A estaba compuesta por agua Milli-Q, y la fase móvil B se preparó utilizando acetonitrilo con una elución en gradiente: 0 min, B al 2 %; 22 min, B al 95 %; 25 min, B al 5 %. Ambas fases se acidificaron con ácido fórmico al 0,1 %. La columna se equilibró durante 3 minutos antes de cada análisis. La velocidad de flujo utilizada fue de 0,4 mL min^{-1} , y se inyectaron 5 μL de muestra para el análisis. Las condiciones de la fuente dual AJS ESI fueron las siguientes: temperatura del gas a 325 $^{\circ}\text{C}$; flujo de gas a 10 L min^{-1} ; presión de nebulización a 275,8 kPa; temperatura del gas cortina a 295 $^{\circ}\text{C}$; flujo de gas cortina a 12 L min^{-1} ; voltaje de capilar a 4000 V; voltaje de boquilla a 500 V; voltaje de fragmentador a 120 V; voltaje de desviador a 70 V; rango de escaneo de ion de producto de 50–1500 Da; velocidad de escaneo MS de 5 espectros/s; velocidad de escaneo MS/MS de 3 espectros/s; máximo de precursores por ciclo de 2; energía de colisión de 10, 20, 40 eV. El análisis de metabolitos se realizó por triplicado. La integración, procesamiento de datos e identificación de metabolitos se realizaron utilizando el software de análisis cualitativo MassHunter versión 10.0 y la biblioteca PCDL Manager B.08.00. La biblioteca utilizada contiene más de 200 compuestos bioactivos descritos durante los procesos de fermentación con microorganismos. La cuantificación de metabolitos se llevó a cabo utilizando una curva de calibración con un estándar de ácido fenil-láctico a una concentración entre 0,08–100 mg L^{-1} .

El análisis de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) se realizó siguiendo el método descrito por Xu *et al.* (2012). Para la extracción de espacio de cabeza, se homogeneizaron 5 g del producto con 10 mL de agua Milli-Q y se transfirieron a un vial de 20 mL. Los VOCs se extrajeron utilizando una fibra SPME (80 μm x 10 mm) recubierta con DVB/C-WR/PDMS durante 45 minutos a 50 $^{\circ}\text{C}$ en un baño de agua con agitación constante. El análisis de VOCs se realizó utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 7890A acoplado a un espectrómetro de masas cuádruplo triple Agilent 7000A equipado con una fuente de ionización de impacto electrónico

(EI). La separación cromatográfica se logró utilizando una columna ZB-624plus (30 m x 0,25 mm, 1,40 μm). El programa de rampa de temperatura se programó de la siguiente manera: 40 °C durante 2 minutos con un aumento a una velocidad de 15 °C min^{-1} hasta 220 °C, por debajo del aumento a una velocidad de 10 °C min^{-1} hasta 250 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 5 minutos. Helio (99,99 %) se utilizó como gas portador a una velocidad de flujo de 1 mL min^{-1} . La detección de compuestos se realizó en modo de escaneo completo, escaneando un rango de masas de m/z 50 a 450 amu.

Los datos recopilados con el software MassHunter G7000C se analizaron utilizando el software de análisis cualitativo MassHunter B.07.00, y se utilizó la biblioteca espectral NIST20 para identificar los componentes detectados. El análisis se realizó por triplicado.

6.4.2. Material Vegetal y Condiciones de Crecimiento

Se utilizaron plantas de pimiento (*Capsicum annuum* cv. Alycum) para este experimento. Las semillas de estas plantas se germinaron y crecieron durante 45 días en una bandeja con celdas (tamaño de la celda: 3 cm x 3 cm x 10 cm). Posteriormente, las plántulas se trasladaron a una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas con una humedad relativa del 60–80 %, temperatura de 29 °C / 20 °C (día/noche), y un fotoperíodo de 16/8 horas con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de 450 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (medido utilizando un sensor SB Quantum 190, LI-COR Inc., Lincoln, NE, EE. UU.). Bajo estas condiciones, las plantas se cultivaron en macetas individuales (diámetro superior de 13 cm, diámetro inferior de 10 cm, altura de 12,5 cm y un volumen de 2 L) llenas con una mezcla de perlita: turba (75:25). La fertilización se realizó utilizando una solución nutritiva tipo Hoagland compuesta por los siguientes compuestos: 8 mM NaNO_3 , 3 mM KCl , 4 mM CaCl_2 , 1,5 mM MgCl_2 , 2 mM MgSO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 2 μM MnCl_2 , 1 μM ZnSO_4 , 0,25 μM CuSO_4 , 0,1 μM Na_2MoO_4 , 125 μM Fe-EDDHA y 50 μM H_3BO_3 , con un pH de 5,8. Las plantas se regaron una vez cada 3–5 días con aproximadamente 50–100 mL de agua, dependiendo de su etapa de crecimiento vegetativo.

6.4.3. Diseño Experimental y Muestreo de Plantas

Después de 20 días de germinación, se aplicaron los tratamientos descritos en la Tabla 1. El volumen utilizado tanto en la aplicación radicular como en el tratamiento foliar fue de 50 mL.

| Tratamiento | Descripción | Compuestos |
|-------------|--------------------|----------------------------------|
| T1 | N-100 % | 8 mM N |
| T2 | N-100 % + CSL Leaf | 8 mM N + 5mL CSL L ⁻¹ |
| T3 | N-100 % + CSL Root | 8 mM N + 5mL CSL L ⁻¹ |
| T4 | N-50 % | 4 mM N |
| T5 | N-50 % + CSL Leaf | 4 mM N + 5mL CSL L ⁻¹ |
| T6 | N-50 % + CSL Root | 4 mM N + 5mL CSL L ⁻¹ |
| T7 | N-25 % | 2 mM N |
| T8 | N-25 % + CSL Leaf | 2 mM N + 5mL CSL L ⁻¹ |
| T9 | N-25 % + CSL Root | 2 mM N + 5mL CSL L ⁻¹ |

La reducción de N en los tratamientos de T4 a T9 se logró disminuyendo el suministro de NaNO₃. Los tratamientos se aplicaron cuatro veces, con un intervalo de siete días entre cada aplicación. Finalmente, el diseño experimental consistió en un bloque aleatorizado con ocho plantas por tratamiento, dispuestas en macetas individuales, con los tratamientos distribuidos aleatoriamente en la cámara de crecimiento.

Después de 7 días siguientes a la última aplicación de los tratamientos, todas las plantas fueron procesadas inmediatamente para análisis posteriores. El material vegetal fue lavado y luego secado sobre papel de filtro para obtener la masa fresca (FM). Se recolectaron muestras y se mantuvieron frescas o congeladas a -40 °C para el análisis de los siguientes parámetros: área foliar, actividad de enzimas del metabolismo del nitrógeno (nitrato reductasa y glutamina sintetasa), concentración de aminoácidos y proteínas solubles. Además, se recolectaron muestras y se secaron en un horno de aire forzado para determinar la masa seca (DM), así como la concentración de diferentes formas de N (N total, N orgánico y nitratos) para calcular la eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE).

6.4.4. Análisis del Material Vegetal

6.4.4.1. Biomasa de Hojas y Parte Aérea

Al final del experimento, se midió la biomasa de las partes aéreas de las plantas en términos de peso seco. La superficie foliar se midió utilizando un lector óptico de la marca LI-COR, modelo LI-3000A (IRGA: LI-COR Inc., Nebraska, EE. UU.).

6.4.4.2. Actividades Enzimáticas del Metabolismo del Nitrógeno

La actividad de la nitrato reductasa (NR) se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Navarro-León *et al.* (2016). Se maceraron 0,2 g de material vegetal fresco en un mortero con 1

mL de tampón de extracción que contenía 2 mM de EDTA-Na, 2 mM de DTT, 1 % (p/v) de PVPP en 100 mM de KH_2PO_4 (pH 7,5). La suspensión se centrifugó durante 20 min a 20.600 g a 4 °C (Heraeus Sepatech 132 Biofuge 17RS, Hanau, Alemania). El sobrenadante obtenido se agregó a la mezcla de reacción que contenía: 100 mM de KNO_3 , 2 mM de NADH, 10 mM de cisteína y 10 mM de MgCl_2 en 100 mM de tampón de KH_2PO_4 (pH 7,5), y la mezcla se incubó a 30 °C durante 30 min. Posteriormente, se utilizó acetato de zinc al 1 mM como agente de detención, y sulfanilamida al 1 % en 1,5 M de HCl y NNEDA al 0,02 % (p/v) en 0,2 M de HCl se utilizaron para la detección de NO_2^- formado. Finalmente, la actividad de la NR se determinó midiendo la absorbancia a 540 nm del NO_2^- producido.

La actividad de la glutamina sintetasa (GS) se determinó utilizando una adaptación del ensayo de hidroxamato sintetasa publicado por Navarro-León *et al.* (2016). Se maceraron 0,1 g de tejido foliar en un mortero con 1 mL de tampón de extracción que contenía: 100 mM de sacarosa, 2 % (v/v) de β -mercaptoetanol y 20 % (v/v) de etilenglicol en 100 mM de ácido málico-KOH (pH 6,8). La suspensión se centrifugó durante 20 min a 20.600 g a 4 °C (Heraeus Sepatech 132 Biofuge 17RS, Hanau, Alemania). El extracto resultante se utilizó para medir la actividad de la GS. La mezcla de reacción utilizada consistió en 150 mM de glutamato de sodio, 30 mM de hidroxilamina y 10 mM de ATP como sustratos, junto con 45 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 4 mM de EDTA-Na, todos disueltos en 150 mM de tampón de imidazol-HCl (pH 7,8). Después de incubarse a 28 °C durante 30 min, la formación de glutamilhidroxamato se determinó midiendo su absorbancia a 540 nm después de su complejación con cloruro férrico acidificado. Se realizaron seis mediciones de cada parámetro por tratamiento.

6.4.4.3. Concentración de aminoácidos y proteínas solubles

Para la determinación de aminoácidos solubles y proteínas, se pesaron aproximadamente 0,5 g de material vegetal y se homogeneizaron con 5 mL de tampón fosfato pH 7,0 de 50 mM. El homogeneizado se filtró con 4 capas de gasa y luego se centrifugó a 12.360 g (Heraeus Sepatech 132 Biofuge 17RS, Hanau, Alemania) durante 15 min. El sobrenadante se utilizó para cuantificar aminoácidos solubles y proteínas. La concentración de aminoácidos solubles se cuantificó utilizando el método de ninhidrina (Yemm y Cocking, 1955). En cuanto a las proteínas solubles, se mezclaron 0,1 mL del sobrenadante con 0,9 mL de tampón fosfato pH 7,0 de 50 mM y 5 mL de azul de coomassie. Después de 20 min, se midieron las muestras a una longitud de onda de 595 nm, utilizando una curva estándar de albúmina (Navarro-León *et al.*, 2016). Se realizaron seis mediciones de cada parámetro por tratamiento.

6.4.4.4. Concentración de Nitrógeno Total, Nitrógeno Orgánico y Nitratos, y Eficiencia en el Uso del Nitrógeno

Para la determinación del nitrógeno total, se molieron 0,2 g de hojas secas y se mineralizaron con H_2SO_4 al 98 % y H_2O_2 al 30 % a una temperatura de 300 °C, y la solución mineralizada resultante se utilizó para el análisis de nitrógeno. La concentración de nitrógeno total se determinó mediante colorimetría basada en la reacción de Berthelot, siguiendo el método descrito por Krom (1980). Para determinar la concentración de NO_3^- soluble, se realizó una extracción acuosa siguiendo (Cataldo *et al.*, 1975). La determinación de NO_3^- se basó en la reacción colorimétrica formada por la combinación de NO_3^- con ácido salicílico en medio básico (Cataldo *et al.*, 1975). El contenido de nitrógeno orgánico se obtuvo restando el contenido de nitrato soluble del nitrógeno total (Wolf, 1982). Se realizaron seis mediciones de cada parámetro por tratamiento.

Para el cálculo de la Eficiencia de Utilización del Nitrógeno (NUtE), la Eficiencia de Absorción de Nitrógeno (NUpE) y la Eficiencia en el Uso del Nitrógeno (NUE), se utilizaron las ecuaciones descritas por Xu *et al.* (2012). La NUtE se define como la relación entre la producción de biomasa y la cantidad de N en la planta; la NUpE se define como la relación entre el contenido de N en la planta y la cantidad de N aplicada en la fertilización; la NUE se obtiene como el producto de NUtE y NUpE.

6.4.5. Análisis Estadístico

Los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante un análisis de varianza, ANOVA simple, con un intervalo de confianza del 95 %. Las diferencias entre las medias de los tratamientos se compararon utilizando la prueba de Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher al nivel de probabilidad del 95 %. Los niveles de significancia se expresaron de la siguiente manera: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NS no significativo.

7. RESUMEN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES



| 7.1 PUBLICACIÓN 1 |
|---|
| Physiological Study of the Efficacy of Archer® Eclipse in the Protection against Sunburn in Cucumber Plants |
| Navarro-Morillo, I.; Garcia-Sanchez, F.; Camara-Zapata, J.M.; Navarro-León, E.; Izquierdo-Ramos, M.J.; Blasco, B.; Ruiz, J.M. |
| Horticulture 2022, 8, 500 |
| Factor de impacto: 2,923 Q1 (2022) (Categoría: Horticulture) |

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia del producto protector Archer® Eclipse, creado por la empresa Atlántica Agrícola S.A., formulado con CSL, para evitar daños en las plantas debido a condiciones medioambientales, luz y temperatura, inductoras de quemaduras solares. La especie de estudio utilizada fue el pepino (*Cucumis sativus* L.), que es una planta sensible a estas condiciones cuyo periodo de crecimiento es en verano y, por lo tanto, está sujeta a condiciones de alta radiación solar y altas temperaturas durante su desarrollo.

7.1.1 Resumen de resultados y discusión

Los cultivos agronómicos, como el pepino, cuyo período de crecimiento en el campo ocurre en la temporada de verano bajo condiciones ambientales estresantes, niveles altos de luz y temperaturas, suelen sufrir síntomas de quemaduras solares que aparecen en las partes vegetativas de las plantas. La aparición de estos síntomas en las hojas generalmente provoca una reducción en el crecimiento de la planta. En este experimento, se observó que las plantas de pepino son muy sensibles al exceso de luz y temperatura, ya que estas plantas expuestas a estas condiciones tuvieron daños severos en las hojas. Sin embargo, aquellas plantas sometidas a las condiciones estresantes de luz y temperatura que fueron tratadas foliarmente con Archer® Eclipse no presentaron un daño visual en las hojas y, además, mostraron mayor crecimiento de brotes, como lo demuestra el aumento del 43% en la biomasa en comparación con las plantas no tratadas. Por lo tanto, estos resultados demuestran claramente el efecto protector de Archer® Eclipse contra el estrés causado por altos niveles de luz y temperatura. Otra evidencia del efecto protector bajo condiciones de quemaduras solares que avala nuestra hipótesis, además de los síntomas visuales y la estimulación del crecimiento, es que la concentración de clorofilas en las hojas tratadas con Archer® Eclipse no se vieron afectadas. El contenido de clorofila en las hojas es una de las características fisiológicas más importantes que se altera bajo este tipo de estrés y se considera uno de los indicadores más importantes de las plantas que sufren quemaduras solares (Nyongesah

et al., 2015). Por lo tanto, basándonos en estos factores, síntomas visuales, crecimiento y concentración de clorofilas se puede decir que la aplicación del producto Archer® Eclipse formulado con CSL es capaz de proteger a las plantas de pepino del exceso simultaneo de calor y luz.

Los datos de las imágenes termográficas y las mediciones de la temperatura de las hojas, que se hicieron en el experimento, indican que uno de los modos de acción que tiene la aplicación de Archer® Eclipse en las plantas fue la de reducir la temperatura de las hojas bajo condiciones de quemaduras solares, manteniendo este efecto protector con el tiempo, evitando así el daño de las hojas y favoreciendo el crecimiento de la planta. Esta disminución de la temperatura con el producto Archer® Eclipse podría haberse debido a la reflexión de una parte de la luz directa incidente que llega a la superficie de los tejidos de la planta, evitando el sobrecalentamiento y el daño a las hojas. Las plantas de pepino son sensibles a la temperatura y los síntomas de quemaduras solares normalmente ocurren en plantas sometidas a temperaturas superiores a 35 °C. Por lo tanto, cualquier técnica agronómica que sea capaz de reducir la luz incidente bajo condiciones de alta luz ambiental podría favorecer el crecimiento de las plantas. La aplicación de Archer® Eclipse podría haber reducido la cantidad de radiación UVB y UVC que llega a las hojas debido a la presencia de ácido indolacético (AIA) y otros componentes presentes en los extractos vegetales del CSL (Tossi *et al.*, 2019).

En este experimento, nuestros estudios fisiológicos pusieron de manifiesto que la aplicación de Archer® Eclipse no contribuyó por sí mismo a la regulación de los parámetros de intercambio de gases como un mecanismo de protección contra estos estreses, como indica que A_{CO_2} y g_s fueron cercanos a cero tanto para las plantas tratadas como para las no tratadas. Esto podría ser explicado porque esta respuesta es intrínseca por naturaleza en las plantas de pepino. Este es un cultivo de carácter fuertemente termofílico que crece de manera óptima a 25 °C, pero las temperaturas por encima de 35-50 °C afectan drásticamente a las hojas. Se ha descrito en la bibliografía que la respuesta que tiene estas plantas a los estreses de temperatura/luz es la disminución de estos parámetros en el momento que se da el estrés. Sin embargo, lo que sí hizo la aplicación del producto Archer® fue favorecer la recuperación de los parámetros de intercambio gaseoso una vez que el estrés hubo desaparecido. Es decir que la aplicación de este producto hizo que las plantas de pepino pasaran de comportarse como termosensibles a termotolerantes. Las plantas de pepino se clasifican, según su comportamiento al estrés por luz/temperatura, como termotolerantes o termosensibles. Los dos tipos de plantas en el momento del estrés reducen drásticamente la A_{CO_2} , g_s y E_{leaf} , pero la diferencia entre termotolerantes y termosensibles reside en que las primeras restauran las funciones a un nivel relativamente saludable después de la exposición al estrés mientras que las termosensibles no llegan a recuperar estos valores. En nuestro experimento, se observa como la reducción de A_{CO_2} y g_s en las plantas tratadas se

recuperan a valores normales y además no se aprecian daños en la maquinaria fotosintética de las plantas, evaluada por los parámetros de fluorescencia de clorofilas Fv/Fm, PIABS, RC/ABS y Ψ_{EO} (Padhi *et al.*, 2021).

La hipótesis que queremos desarrollar con los datos de este ensayo basada en que el efecto protector del producto Archer® se debe principalmente a la reflexión de la luz incidente, también queda avalada con el estudio del estrés oxidativo. Mientras que las plantas no tratadas, bajo condiciones de alta luminosidad y temperatura, presentaron una alta actividad antioxidante como respuesta a la intensidad del estrés que están sufriendo, las plantas tratadas con Archer® Eclipse apenas activaron esta respuesta antioxidante (relación Chl a/b, y concentraciones de carotenoides y fenoles en las hojas). Esto sugiere que las plantas no tratadas sufrieron una intensidad de estrés mayor que las plantas con Archer® Eclipse. La relación Chl a/b, y la concentración de carotenoides y fenoles son indicadores del estrés ambiental. Valores altos indican que las plantas tienen activada sus respuestas contra el estrés oxidativo.

A pesar de que las plantas no tratadas activaron más intensamente la respecta contra el estrés oxidativo, esto no fue suficiente para evitar el daño oxidativo, como indican los valores altos de CE y concentración de MDA. Uno de los principales efectos de la presencia masiva de ROS en las células es el deterioro de las membranas celulares, lo que conduce a un aumento en la permeabilidad y, por lo tanto, a la pérdida de electrolitos. El porcentaje de CE y la concentración de MDA son dos parámetros que indican la degradación de la membrana y la peroxidación de lípidos, y el aumento de sus valores sugiere la presencia excesiva de ROS (Sahin *et al.*, 2018). La aplicación foliar de Archer® Eclipse evitó la formación de ROS y la pérdida de permeabilidad celular al reflejar una parte de la luz directa que llega a la superficie de los tejidos de la planta. Además, tampoco se puede descartar el modo de acción antioxidante que puede tener el producto Archer® Eclipse, ya que este contiene en su formulación carbohidratos y los aminoácidos con una alta capacidad para desactivar las ROS. Los aminoácidos y azúcares son potentes antioxidantes capaces de hacer frente a los factores de estrés abiótico (Tarkowski *et al.*, 2020).

7.1.2 Conclusiones

Este estudio confirma la eficacia de Archer® Eclipse en la protección de las plantas de pepino contra las condiciones que inducen quemaduras solares. Gracias a su composición se evidencia que el modo de acción de este producto está relacionado con el efecto protector producido por la reflexión de parte de la luz incidentes, no descartando de forma explícita tampoco su capacidad antioxidante con actividad para desactivar especies reactivas de oxígeno.

En un futuro experimento, será necesario abordar cómo optimizar el uso de Archer® Eclipse, principalmente aumentando el conocimiento sobre la respuesta de las plantas a su aplicación. Se deben realizar estudios complementarios para analizar detenidamente el sistema antioxidante de

las plantas, recopilar más información sobre los cultivos que podrían beneficiarse de esta tecnología, determinar el mejor momento y la frecuencia de aplicación. Además, se necesitan estudios que examinen las interacciones de la aplicación de Archer® Eclipse con otras prácticas agronómicas, como el uso de cultivos en invernadero y al aire libre, estrategias de riego deficitario, uso en condiciones de estrés aún más severo, etc, para mejorar la eficacia de Archer® Eclipse.



| 7.2 PUBLICACIÓN 2 |
|---|
| Effects of Root and Foliar Application of Corn Steep Liquor on Pepper Plants: A Physiological, Nutritional, and Morphological Study |
| Iván Navarro-Morillo, Valeria Navarro-Perez, Rafael Perez-Millan, Eloy Navarro-León, Begoña Blasco, Jose Maria Cámara-Zapata and Francisco Garcia-Sanchez |
| <i>Horticulturae</i> 2023, 9, 221 |
| Factor de impacto: 3,1 Q1 (2023) (Categoría Agricultural and Biological Sciences) |

El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar el efecto bioestimulante de dos productos CSL de la empresa Atlántica Agrícola SA, que difieren en el método de estabilización utilizado (CSL-B y CSL-H). También se pretendía determinar la forma de aplicación más adecuada, radicular frente a foliar, así como el mecanismo de su efecto en las plantas. Para ello, estos productos se aplicaron a plantas de pimiento y se determinaron parámetros de crecimiento e indicadores de procesos fisiológicos básicos, como la fotosíntesis, el metabolismo del N, la composición hormonal y el estado nutricional.

7.2.1 Resumen de resultados y discusión

El producto CSL, derivado de la industria del maíz, contiene compuestos con actividad fisiológica en las plantas y puede promover la acción de microorganismos beneficiosos. En nuestro estudio con plantas de pimiento tratadas con CSL, se observó un mayor crecimiento vegetativo en comparación con plantas no tratadas. El tratamiento CSL-B en la raíz fue el que produjo las plantas más vigorosas, con un aumento del 65% y 22% en el peso seco de las hojas y el área foliar, demostrando su capacidad para impulsar el potencial de crecimiento. En nuestro estudio, se concluye que la aplicación radicular de productos CSL es más efectiva que la foliar y que no hay diferencias significativas en el crecimiento entre diferentes productos CSL.

El CSL contiene una amplia gama de ingredientes activos que actúan sinérgicamente para mejorar su efectividad. Estos incluyen aminoácidos libres, ácidos húmicos y fúlvicos, nitrógeno orgánico, potasio y fósforo. Los aminoácidos más abundantes en el CSL son el ácido aspártico, el ácido glutámico, la serina, la glicina, la arginina, la alanina, la valina, la leucina y la prolina, junto con una mezcla de vitaminas (B2, B3, B5 y B6). Otros aminoácidos y compuestos bioactivos también están presentes en concentraciones más bajas, como la histidina, la metionina, la fenilalanina, la isoleucina y la hidroxiprolina, así como ácido acético, ácido láctico, ácido ferúlico, proteínas y otros compuestos. Los investigadores coinciden en la dificultad de analizar los compuestos del

CSL debido a la complejidad de la matriz, lo que dificulta la verificación de los resultados del análisis debido a la falta de materiales de referencia y pruebas interlaboratorios. Esta falta de conocimiento destaca la necesidad de comprender al menos el modo de acción de estos productos en las plantas para desarrollar nuevos bioestimulantes. Aunque los estudios previos se centraron en utilizar el CSL como fuente de fertilizante orgánico, aplicado en grandes cantidades para reemplazar los nutrientes suministrados por fertilizantes convencionales, en nuestro trabajo se buscó estimular los procesos fisiológicos de las plantas. Se aplicó una dosis baja de CSL (5 mL L^{-1}), que no aumentó significativamente las concentraciones de N, P, K y Ca en comparación con el tratamiento de control, pero produjo respuestas fisiológicas en las plantas. El estudio reveló varios efectos beneficiosos, como un aumento en la eficiencia en el uso del agua, incremento en las concentraciones de hormonas vegetales clave, aumento en los niveles de nutrientes foliares importantes sin alcanzar niveles tóxicos, modificaciones significativas en el aminograma con aumentos y disminuciones específicas en determinados aminoácidos, y un aumento en la actividad enzimática de la nitrato reductasa y la glutamina sintetasa.

Las respuestas descritas anteriormente indican que la aplicación de CSL, ya sea en las raíces o en el follaje, estimuló y mejoró todos los procesos relacionados con el metabolismo del carbono, incluidos los procesos de intercambio de gases y la eficiencia en el uso del agua. De todos los tratamientos con CSL, CSL-B radicular produjo los valores más altos de A y WUE. En cuanto al modo de aplicación, solo se observaron diferencias con el producto CSL-B, siendo la aplicación a través de las raíces más efectiva que la aplicación foliar para A y WUE.

Por otro lado, los valores de los índices de actividad fotoquímica RC/ABS y PIABS fueron más altos en las plantas que recibieron ciertos tratamientos de CSL que en las plantas de control. Así, las plantas que recibieron el tratamiento CSL-B radicular o CSL-H radicular tuvieron valores significativamente más altos de RC/ABS que las plantas de control, mientras que los valores más altos de PIABS se observaron en todas las plantas tratadas con CSL, excepto en las del tratamiento CSL-B radicular. Los valores de Fv/Fm y $1-V_j$ no mostraron diferencias significativas debido a los tratamientos. Esto indica que la maquinaria de captura y utilización de la luz de las plantas tratadas con CSL, especialmente la de las plantas CSL-B radicular, estaba en mejor estado que la de las plantas de control.

Este proceso fisiológico genera y suministra la energía y la asimilación de carbono necesarias para el crecimiento de las plantas (Cho *et al.*, 2015). Por lo tanto, el aumento del metabolismo del carbono y la absorción de CO_2 podrían ser responsables de la mayor biomasa de las plantas tratadas con CSL en comparación con las plantas no tratadas. Otro de los modos de acción de estos productos es la activación y regulación hormonal, ya que la aplicación de CSL-B o CSL-H, ya sea en las raíces o en el follaje, produjo aumentos significativos en las concentraciones de hormonas de crecimiento como auxinas (AIA), trans-zeatina (tZ) y giberelinas activas (GA1, GA3

y GA4), que están relacionadas con la elongación y división celular, lo que estimularía los procesos de intercambio de gases y, por lo tanto, el crecimiento de las plantas (Blázquez *et al.*, 2020).

Los resultados indican una activación del metabolismo del carbono, respaldada por los perfiles de aminoácidos en las hojas. Los aminoácidos desempeñan funciones vitales en el crecimiento vegetal, incluyendo la síntesis de clorofila, la actividad fotosintética, la regulación del equilibrio hídrico, la producción de hormonas de crecimiento como las auxinas, y la síntesis de proteínas, además de servir como precursores para otros aminoácidos. Los incrementos en alanina, fenilalanina y triptófano fueron consistentes en las plantas tratadas con CSL. La alanina participa en la vía del piruvato y tiene funciones relacionadas con la síntesis de clorofila, actividad fotosintética y protección contra tensiones abióticas. El triptófano, presente en la vía del shikimato, contribuye a la síntesis de precursores de auxinas, regulando el crecimiento, la síntesis de lignina y la defensa contra tensiones. La prolina, un componente estructural de proteínas, facilita el ajuste osmótico, protege las membranas celulares y neutraliza especies reactivas de oxígeno, además de servir como reserva de nitrógeno.

Además, cabe destacar que la aplicación de CSL-H en las raíces fue el único tratamiento que aumentó las concentraciones de arginina, isoleucina, leucina y cisteína. Estos aminoácidos, que pertenecen a la familia del ácido aspártico, forman parte de la vía del piruvato y del ciclo de Calvin, y, por lo tanto, están relacionados con el metabolismo del carbono y del nitrógeno (Van der Sar *et al.*, 2013). El tratamiento CSL-H Radicular mostró el mayor estímulo en el metabolismo de las plantas. Aunque no se evidenciaron diferencias significativas con los otros tratamientos de CSL, posiblemente debido a la corta duración del ensayo de 7 días. Las respuestas de las plantas a CSL sugieren su eficacia potencial para favorecer la adaptación a condiciones ambientales adversas, especialmente por el papel osmoprotector de aminoácidos como prolina e isoleucina. De hecho, Alfosea-Simón *et al.*, (2020) observó que la aplicación de prolina en plantas de tomate abastecidas con agua salina les permitió adaptarse a estas condiciones debido a una disminución del estrés oxidativo.

En términos de nutrición mineral, todas las plantas tratadas, incluidas las de control, mantuvieron valores dentro del rango normal para los macro y micronutrientes analizados. Sin embargo, los tratamientos con CSL aumentaron las concentraciones de ciertos nutrientes (P, K, Ca, Mg y S) en comparación con las plantas de control, sin provocar toxicidad. Dado que la aplicación de CSL a la solución nutritiva fue solo de 5 mL L⁻¹, estos aumentos no pueden atribuirse únicamente a la cantidad adicional de nutrientes proporcionados por el CSL. Esto sugiere que las sustancias activas del CSL podrían haber mejorado la absorción de elementos minerales por parte de las raíces, respaldando así la hipótesis de que la aplicación de CSL en dosis bajas estimula procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas.

7.2.2 Conclusiones

Nuestros resultados muestran que los productos CSL-B y CSL-H, independientemente de la forma de aplicación (radicular y/o foliar), pueden formar parte de formulaciones de bioestimulantes destinadas a mejorar el crecimiento de las plantas hortícolas. Estos productos CSL están compuestos por una amplia variedad de materiales activos, como aminoácidos libres, ácidos húmicos y fúlvicos, vitaminas, nitrógeno orgánico, potasio y fósforo, que pueden estimular el crecimiento de las plantas. Parece que su modo de acción está relacionado con la estimulación del metabolismo del carbono, el aumento de la síntesis de hormonas y una mayor tasa de asimilación neta de CO₂. Su aplicación a una concentración tan baja como 5 mL L⁻¹ resultó en un aumento en la concentración foliar de nutrientes, lo que respalda la idea de que sus efectos están relacionados con la estimulación de procesos fisiológicos.



| 7.3 PUBLICACIÓN 3 |
|--|
| Corn Steep Liquor Application Improves Pepper (<i>Capsicum annum</i> L.) Tolerance to Salinity |
| Iván Navarro-Morillo, Sofía Pardo-Pina, Francisco Garcia-Sánchez, Juan Manuel Ruiz, Santiago Laserna-Arcas, Felix Plasencia and José M. Cámara-Zapata |
| <i>Horticulturae</i> 2023, 9, 785 |
| Factor de impacto: 3,1 Q1 (2023) (Categoría Agricultural and Biological Sciences) |

A pesar de ser un producto ampliamente estudiado con muchas aplicaciones beneficiosas, se desconoce si la aplicación de CSL induce respuestas adaptativas en las plantas de pimiento cultivadas en condiciones desafiantes como el estrés salino. El objetivo de nuestro estudio es examinar los mecanismos de acción de este tipo de CSL en dicho cultivo en condiciones salinas y el efecto del método de aplicación, ya sea radicular o foliar.

7.3.1 Resumen de resultados y discusión

El tratamiento con licor de maceración de maíz (CSL), especialmente aplicado en las raíces, demostró mejorar significativamente el crecimiento de las plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) bajo estrés de 100 mM de NaCl en las condiciones experimentales. Esta observación se alinea con estudios previos que han encontrado mejoras en el crecimiento de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con la aplicación de CSL en las raíces. Asimismo, se ha visto que la aplicación de bioestimulantes con ácidos húmicos y fúlvicos en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo estrés salino promueve un mayor crecimiento. Otros estudios han demostrado que la aplicación de bioestimulantes de aminoácidos en albahaca resistente a la sal (*Ocimum basilicum* L.) y proteínas hidrolizadas en lechuga (*Lactuca sativa* L.) y espinaca (*Spinacia oleracea* L.) mejora la producción en condiciones de salinidad moderada, con variaciones en su efecto según la fracción molecular utilizada.

Bajo condiciones de estrés ambiental, se suele observar una notable inhibición de la fotosíntesis en diversas especies vegetales (Parida y Das, 2005). Sin embargo, la aplicación de bioestimulantes ha demostrado en algunos casos revertir esta inhibición y restaurar el crecimiento normal de las plantas. En ciertas circunstancias, estos tratamientos pueden incluso prevenir el cierre completo de los estomas bajo estrés, lo que promueve el mantenimiento de la actividad fotosintética. Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman que el producto CSL, especialmente cuando se

aplica en las raíces, actuaría de esta manera, ya que aumentó la asimilación de CO₂, la transpiración y la eficiencia en el uso del agua, al tiempo que redujo la resistencia estomática en comparación con las plantas sometidas a estrés salino. Este efecto también se observó, aunque en menor medida, en las plantas estresadas que recibieron la aplicación foliar de CSL. Hallazgos similares se reportaron en plántulas de tomate tratadas con un extracto hidroalcohólico de *Sargassum* spp. bajo condiciones salinas.

Cuando las plantas experimentan perturbaciones metabólicas, producen fluorescencia para disipar el exceso de energía y evitar daños. La eficiencia fotosintética se puede determinar mediante el rendimiento cuántico de la fotosíntesis primaria (Fv/Fm), con un valor típico de alrededor de 0.85 en plantas sanas. En las condiciones experimentales utilizadas, las plantas de control tenían un valor de Fv/Fm de 0.849, mientras que el tratamiento de salinidad provocó una disminución en estos valores, indicando un mayor estrés salino. El análisis de la fluorescencia de la clorofila proporciona varios índices que definen la vitalidad de la planta, donde la relación RC/ABS es esencial para evaluar la cadena de transporte de electrones en los fotosistemas, siendo valores altos indicativos de una mayor proporción de centros de reacción activos.

El índice PI_{ABS} refleja la funcionalidad del rendimiento fotosintético de los fotosistemas, mientras que el valor 1-Vj indica la pérdida de electrones, especialmente del fotosistema II. Las plantas tratadas con CSL bajo estrés salino muestran una disminución atenuada en Fv/Fm, con valores por encima de 0.8, sugiriendo una mejor adaptación. Esto se atribuye a una mayor protección y activación del proceso fotoquímico bajo estrés, así como a una mayor disponibilidad de CO₂ intracelular debido a la reducción del cierre estomático. Esto condujo a una mayor disponibilidad del aceptor de electrones endógeno, el NADP, y a una disminución en la transferencia de electrones a oxígeno, reduciendo así la formación de ROS. Además, la tasa de fotosíntesis neta aumentó, contribuyendo a un mayor crecimiento de la biomasa bajo estrés salino.

La aplicación del producto CSL, tanto foliar como a través de las raíces, mejoró el acoplamiento de los componentes de la etapa fotoquímica bajo estrés salino, aumentando la eficiencia de la conversión de la energía luminosa en energía química y, por ende, la vitalidad de la planta. Los índices RC/ABS y PI_{ABS} mostraron sus valores más altos en las plantas de control y tratadas con CSL bajo estrés salino, lo que sugiere una reducción en la pérdida de electrones y, por lo tanto, en la formación de especies reactivas de oxígeno (Strasser *et al.*, 2000).

El estrés salino conduce a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el anión superóxido (O₂⁻), que perturban la homeostasis metabólica y afectan la integridad de la membrana celular (Sariñana-Aldaco *et al.*, 2022). La reducción en la acumulación de ROS es crucial para la supervivencia de las plantas bajo estrés salino, y el metabolismo oxidativo se utiliza como indicador del daño resultante. Las plantas

poseen mecanismos de desintoxicación de ROS, que incluyen sistemas enzimáticos y no enzimáticos, como compuestos antioxidantes (fenoles, glutatión, flavonoides, ácido ascórbico, antocianinas, etc.). El aumento en enzimas y compuestos antioxidantes bajo estrés abiótico varía según la especie, cultivar, etapa de desarrollo de la planta, estado metabólico y la intensidad y duración del estrés.

Frente a los estreses abióticos, los bioestimulantes han demostrado reducir el daño oxidativo celular, incluida la peroxidación de los lípidos de la membrana celular, en diversas especies vegetales. Esto se logra mediante la regulación de las defensas antioxidantes y la disminución de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las plantas. En este contexto, la concentración de malondialdehído (MDA) sirve como indicador de la peroxidación de las membranas lipídicas celulares, y un aumento en sus valores sugiere la presencia excesiva de ROS (Navarro-León *et al.*, 2020). Las plantas de control mostraron los mayores valores de biomasa aérea y área foliar, junto con los niveles más bajos de malondialdehído (MDA). En contraste, las plantas tratadas con CSL bajo estrés salino exhibieron valores ligeramente más altos de MDA, mientras que los valores más elevados se observaron en las plantas estresadas sin tratamiento de CSL.

En nuestra investigación, se observó que el tratamiento salino provocó un aumento significativo en la presencia de compuestos antioxidantes, como fenoles, ascorbato y glutatión, especialmente en las plantas tratadas con CSL mediante aplicación foliar. Estos hallazgos sugieren un intento de las plantas de pimiento por mitigar el daño oxidativo inducido por las condiciones adversas de crecimiento, lo que indica el papel de los bioestimulantes en la inducción de defensas antioxidantes tanto enzimáticas como no enzimáticas para mejorar la resistencia a estreses abióticos.

Compuestos como la prolina a menudo son buenos indicadores de resistencia al estrés salino, ya que a menudo desempeñan un papel como osmoprotectores, osmorreguladores y antioxidantes que protegen contra la generación de ROS (He *et al.*, 2018). La aplicación de CSL a plantas sometidas a estrés salino puede haber reducido los niveles de ROS al degradar la prolina mediante la enzima prolina deshidrogenasa, lo que consume oxígeno y disminuye la generación de ROS. Esto sugiere que CSL podría regular la absorción y acumulación de iones como Na^+ y Cl^- en las raíces, reduciendo su translocación a la parte aérea y aumentando la acumulación de K^+ . Estos resultados indican que la prolina fue un indicador de estrés más que un inductor de resistencia al estrés salino.

Algunos estudios sugieren que el suministro adicional de componentes orgánicos, como aminoácidos u hormonas, puede mejorar la selectividad iónica en las raíces, reduciendo la toxicidad del NaCl en la parte aérea de las plantas. La aplicación de CSL en las hojas disminuye

las concentraciones de Na^+ y Cl^- , mientras que su aplicación en las raíces aumenta la concentración de K^+ , junto con la activación de otros procesos de resistencia, lo que explicaría el incremento en el crecimiento de las plantas bajo estrés salino.

7.3.2 Conclusiones

Nuestro trabajo demuestra que bajo estrés salino, la aplicación de licor de maceración de maíz (CSL) resultó en un notable aumento en la producción de biomasa y área foliar en plantas de pimiento. La reducción del estrés salino por CSL se atribuye a mecanismos fisiológicos que varían según el método de aplicación. La aplicación foliar indujo capacidad antioxidante y síntesis de compuestos antioxidantes, reduciendo la formación de ROS y el daño oxidativo. Por otro lado, la aplicación radicular mantuvo la actividad fotoquímica, estimuló la eficiencia fotosintética y redujo la generación de ROS, contrarrestando el efecto fitotóxico de los iones Na^+ . Este enfoque podría mejorar la producción de pimiento bajo estrés salino al reducir la fertilización con K^+ , aunque se requieren más estudios para evaluar su efecto en condiciones reales y comprender mejor su mecanismo de acción.



| 7.4 PUBLICACIÓN 4 |
|--|
| Corn Steep Liquor application on pepper plants (<i>Capsicum annum</i> L.) stimulates growth under nitrogen-deficient growing conditions |
| Iván Navarro-Morillo, Begoña Blasco, José M. Cámara-Zapata, Julia Muñoz-Acero, Silvia Simón-Grao, Marina Alfosea-Simón, Felix Plasencia and Francisco García-Sanchez |
| <i>Scientia Horticulturae</i> 2024, 328, 112955 |
| Factor de impacto: 4,3 Q1 (2024) (Categoría Horticulture) |

En nuestro artículo se evaluó la aplicación foliar y radicular de CSL en plantas de pimiento cultivadas bajo diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva. El objetivo era determinar si la aplicación de este extracto podía estimular el crecimiento de las plantas de manera que permitiera una concentración reducida de nitrógeno en los cultivos en comparación con los niveles actuales utilizados en la actualidad. La hipótesis se basaba en la presencia de ciertas sustancias en CSL, como aminoácidos libres, nutrientes minerales y compuestos fenólicos que incluyen ácidos vanílico, ferúlico, cumárico, sinápico y cafeico, que estimulan el crecimiento de las plantas al mejorar los procesos fisiológicos y metabólicos. Para probar esta hipótesis, se realizó un análisis químico detallado de CSL y se analizaron varios parámetros relacionados con el metabolismo del nitrógeno.

7.4.1 Resumen de resultados y discusión

En el contexto de los desafíos actuales en la agricultura, como el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados y sus impactos ambientales negativos, surge la necesidad de desarrollar estrategias agronómicas más sostenibles. En este experimento, se exploró el potencial del producto CSL como un bioestimulante para reducir la dependencia de los fertilizantes nitrogenados convencionales. Esta investigación apunta a encontrar alternativas que permitan cultivar plantas de manera más eficiente y sostenible, mitigando así los efectos adversos de la agricultura en el medio ambiente.

Nuestro estudio se centró en evaluar el efecto bioestimulante del producto CSL mediante la medición de la concentración de nitrógeno como bioindicador (Emamverdian *et al.*, 2023), debido a su influencia directa en los parámetros de crecimiento vegetativo. Se observó que niveles deficientes de nitrógeno redujeron significativamente la biomasa seca de la parte aérea de las plantas, destacando la importancia de mantener niveles óptimos de nitrógeno en la solución de

nutrientes para riego. Estas reducciones drásticas en la disponibilidad de nitrógeno pueden ser problemáticas en la agricultura, dada la esencialidad de este elemento para el crecimiento de las plantas.

La aplicación radicular del producto CSL mostró una recuperación parcial del crecimiento de las plantas afectadas por la reducción en los niveles de nitrógeno en los tratamientos de N-50 % y N-25 %. Sin embargo, este efecto positivo no alcanzó los niveles de crecimiento observados en el tratamiento con niveles óptimos de nitrógeno (N-100 %). Por otro lado, la aplicación foliar de CSL no resultó efectiva para estimular el crecimiento en ninguno de los niveles deficientes de nitrógeno. Aunque la recuperación no fue completa, estos resultados sugieren un potencial prometedor para CSL en estimular el crecimiento vegetal bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, destacando la necesidad de investigaciones adicionales con niveles de reducción de nitrógeno más altos para comprender mejor su efectividad en condiciones de estrés.

La disminución en los parámetros de crecimiento vegetativo en plantas sometidas a niveles deficientes de nitrógeno, N-50 % y N-25 %, se relacionó con una reducción en la concentración total de nitrógeno en diversas formas en la planta, así como una disminución en el contenido total de nitrógeno en la parte aérea y en las actividades enzimáticas como Nitrato Reductasa, Glutamina Sintetasa, aminoácidos y proteínas. Esto sugiere que una reducción del nitrógeno que excede el 50 % en la solución de nutrientes afecta la distribución de nitrógeno en la planta y todos los procesos asociados con su metabolismo, absorción y asimilación. En las plantas de pimiento, al igual que en la mayoría de las plantas, el NO_3^- es la fuente preferida de nitrógeno, y su asimilación implica una serie de reacciones enzimáticas que son esenciales para la producción de biomasa y otros compuestos importantes para el crecimiento vegetal (Wang *et al.*, 2022). Los resultados de nuestra investigación indican que bajo deficiencia de nitrógeno, los procesos de absorción y asimilación de nitrógeno se ven significativamente afectados.

Los beneficios observados tras la aplicación radicular del producto CSL podrían relacionarse con una mejora en la absorción y asimilación de nitrógeno por parte de las raíces o su efecto en los procesos fisiológicos y metabólicos de las plantas. Aunque las concentraciones de nitrógeno en las hojas fueron similares entre los tratamientos de CSL aplicados en raíz con reducciones del 50 % y 25 % de nitrógeno, las plantas tratadas con CSL mostraron un mayor contenido total de nitrógeno en la parte aérea. Esto sugiere que la aplicación de CSL aumenta la cantidad de nitrógeno acumulado en las plantas, posiblemente debido a la estimulación de procesos fisiológicos y metabólicos, como se evidencia en las mayores concentraciones de aminoácidos y proteínas en las plantas tratadas con CSL. Estos compuestos desempeñan roles cruciales en el crecimiento vegetativo y el metabolismo, contribuyendo a funciones del metabolismo primario y secundario (Cheng *et al.*, 2022), lo que puede explicar los efectos observados.

El producto CSL aplicado contiene una variedad de metabolitos, como ácido 2-etil-2-hidroxi-butírico, eritritol, manitol, GABA, isoleucina, prolina y ácido DL-3-fenil láctico, que se sabe que tienen efectos estimulantes en las plantas y brindan protección contra tensiones ambientales. Estos metabolitos pueden mejorar la asimilación de nutrientes esenciales, como el nitrógeno, al inducir enzimas clave como Nitrato Reductasa y Glutamina Sintetasa, así como la síntesis de compuestos orgánicos nitrogenados, como aminoácidos y proteínas solubles (Wang *et al.*, 2023).

En resumen, la aplicación foliar del producto CSL en condiciones de deficiencia de nitrógeno no solo aumenta la síntesis de aminoácidos y proteínas solubles, sino que también mejora el estado nutricional de nitrógeno al estimular mayores concentraciones de nitrógeno total y orgánico en las hojas. Este efecto puede explicarse por el potencial estimulante de CSL al aplicarse a través de las raíces, mejorando la absorción de nitrógeno en condiciones limitadas de este elemento en el medio de cultivo. Además, la aplicación de CSL mejora la eficiencia del uso de nitrógeno (NUE), con un aumento significativo en la eficiencia de absorción de nitrógeno (NUPE) bajo condiciones deficientes y un aumento en la eficiencia de utilización de nitrógeno (NUTE) y NUE. Tanto las aplicaciones radiculares como foliares de CSL mejoran todos los parámetros de NUE bajo condiciones de limitación de nitrógeno, lo que explica su efecto bioestimulante en el aumento de la producción de biomasa en la parte aérea, especialmente cuando se aplica a través de las raíces.

7.4.2 Conclusiones

Nuestro experimento demuestra que las plantas de pimiento son sensibles a la concentración de nitrógeno en la solución de nutrientes, y la aplicación de Licor de Maíz (CSL), especialmente a través de la aplicación radicular, puede mitigar la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo. Bajo condiciones de escasez de nitrógeno, el uso de CSL mediante la aplicación radicular mejora significativamente el crecimiento de las plantas al mejorar la asimilación de nitrógeno y aumentar la síntesis de aminoácidos y proteínas. Se observa un incremento notable en la eficiencia de uso de nitrógeno, especialmente en la eficiencia de utilización de nitrógeno y NUE. Por lo tanto, la aplicación de CSL, particularmente a través de las raíces, puede ser una estrategia valiosa para el cultivo en áreas con limitaciones de nitrógeno. La aplicación foliar de CSL también ofrece beneficios, aunque menos pronunciados que la aplicación radicular. Futuras investigaciones deben determinar el nivel en el cual la fertilización nitrogenada puede ser reducida con la aplicación de CSL sin comprometer el desarrollo vegetativo, así como profundizar en los procesos metabólicos activados por los componentes de CSL y su impacto en el rendimiento agronómico de las plantas.

8. CONCLUSIONES GENERALES



8. CONCLUSIONES GENERALES

Para cada uno de los ensayos realizados en esta Tesis se han obtenido una serie de conclusiones que fueron expuestas previamente en los correspondientes capítulos de esta memoria. En este apartado se exponen de forma muy resumida las conclusiones globales:

Physiological Study of the Efficacy of Archer® Eclipse in the Protection against Sunburn in Cucumber Plants.

- Este estudio confirma la alta eficacia que presenta Archer® Eclipse en la protección de las plantas de pepino contra las condiciones que inducen quemaduras solares. La aplicación de este producto previno la aparición de daños en las hojas, estimuló el crecimiento vegetativo, y favoreció, una vez desaparecido el estrés, la recuperación de los parámetros de intercambio gaseoso.
- El modo de acción que tiene este producto, según el estudio de parámetros fisiológicos y termográfico, parece ser que está relacionado con el efecto protector producido por la reflexión de parte de la luz incidente. Las plantas tratadas con Archer® Eclipse reflejan parte de la luz incidente de tal forma que la temperatura foliar que se alcanza es mucho menor que las plantas no tratadas. Esto hace que las plantas tratadas sufran menos estrés oxidativo y se pueden recuperar en los momentos del día en el que las condiciones ambientales no son estresantes. Tampoco se debería descartar la alta capacidad antioxidante que tiene el producto para combatir estos estreses al contener una alta riqueza de carbohidratos y aminoácidos.
- En futuros experimentos, será necesario abordar cómo optimizar aún más el uso de Archer® Eclipse. Se deben realizar estudios complementarios para analizar detenidamente el sistema antioxidante de las plantas, recopilar más información sobre los cultivos que podrían beneficiarse de esta tecnología, determinar el mejor momento y la frecuencia de aplicación. Además, se necesitan estudios que examinen las interacciones de la aplicación de este producto con otras prácticas agronómicas, como el uso de cultivos en invernadero y al aire libre, estrategias de riego deficitario o uso del producto en condiciones de estrés aún más severo para mejorar la eficacia de Archer® Eclipse.

Effects of root and foliar application of Corn Steep Liquor on pepper plants: a physiological, nutritional, and morphological study.

- Este estudio confirma que los productos derivados del Licor de Maceración de Maíz (CSL), CSL-B y CSL-H, independientemente del modo de aplicación mejoran el estado fisiológico, nutricional y morfológico de las plantas de pimienta. Se observó un incremento en el desarrollo vegetativo, un aumento en la eficiencia en el uso del agua, incremento en las concentraciones de hormonas vegetales clave, aumento en los niveles de nutrientes foliares importantes sin alcanzar niveles tóxicos, modificaciones significativas en el aminograma con aumentos y disminuciones específicas en determinados aminoácidos, y un aumento en la actividad enzimática de la nitrato reductasa y la glutamina sintetasa
- Los productos CSL contienen una amplia variedad de compuestos activos, como aminoácidos libres, ácidos húmicos y fúlvicos, vitaminas, nitrógeno orgánico, potasio y fósforo, que pueden actuar en sinergia como bioestimulante. Su modo de acción parece estar relacionado con la estimulación que dichos compuestos ejercen en el metabolismo del carbono, el aumento de la síntesis de hormonas y una mayor tasa de asimilación neta de CO₂. Lo que sugiere la idea de que los efectos de los productos CSL están relacionados con la activación de procesos fisiológicos.
- En futuros experimentos será importante profundizar en la comprensión de cómo los compuestos activos en los productos CSL interactúan entre sí, con los procesos fisiológicos de las plantas y con los microorganismos del suelo para optimizar su uso en la agricultura. Además, se deben realizar investigaciones adicionales para determinar la dosis y la frecuencia óptimas de aplicación de los productos CSL, así como su efecto en diferentes tipos de cultivos y condiciones de crecimiento. Estos estudios podrían ayudar a maximizar la eficacia y el potencial de los productos CSL como bioestimulantes en la agricultura.

Corn Steep Liquor Application Improves Pepper (*Capsicum annum L.*) Tolerance to Salinity.

- El estudio revela que el tratamiento con licor de maceración de maíz (CSL), especialmente aplicado en las raíces, mejora significativamente el crecimiento de las plantas de pimiento bajo estrés salino. Además, se observó que las plantas tratadas con CSL mostraron una disminución atenuada en la eficiencia fotosintética bajo dicho estrés, lo que sugiere una mejor adaptación y una mayor vitalidad de las plantas.
- El modo de acción del CSL, tanto aplicado radicular como foliarmente, está relacionado con la protección y activación del proceso fotoquímico bajo estrés, así como con una mayor disponibilidad de CO₂ intracelular debido a la reducción del cierre estomático. Esto conduce a una mayor tasa de fotosíntesis neta y una mayor eficiencia en la conversión de energía luminosa en energía química. Además, la aplicación de CSL parece reducir la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el daño oxidativo celular, lo que contribuye a una mejor adaptación de las plantas al estrés salino.
- En futuros experimentos será necesario optimizar el uso del CSL en condiciones de estrés salino. Es importante realizar investigaciones complementarias para comprender mejor el mecanismo de acción del CSL, su efecto en diferentes especies vegetales y condiciones de crecimiento bajo diverso grado de severidad por salinidad. Además, se deben evaluar la eficacia y el impacto del CSL en condiciones de campo y en diferentes etapas de desarrollo de las plantas. Estudios adicionales podrían ayudar a determinar la dosis y la frecuencia óptimas de aplicación del CSL, así como su efecto en la selectividad iónica en las raíces y la translocación de iones en la parte aérea de las plantas bajo estrés salino.

Corn Steep Liquor application on pepper plants (*Capsicum annum L.*) stimulates growth under nitrogen-deficient growing conditions.

- En este estudio, se ha demostrado que la aplicación del producto CSL puede tener efectos beneficiosos en el crecimiento vegetativo de plantas de pimiento cultivadas bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno. Específicamente, la aplicación radicular de CSL pudo restaurar parcialmente la pérdida de crecimiento causada por la reducción en los niveles de nitrógeno en los tratamientos de N-50 % y N-25 %.
- El modo de acción de CSL, según el estudio del metabolismo del nitrógeno, parece estar relacionada con la capacidad del producto para mejorar la absorción y asimilación de nitrógeno. Las plantas tratadas muestran una mejor asimilación de nitrógeno, en concreto se observa un aumento significativo en la eficiencia de uso de nitrógeno, NUtE y NUE, particularmente. Posiblemente debido a un aumento en la actividad enzimática de la nitrato reductasa y la glutamina sintetasa, que ocasiona un incremento en la síntesis y acumulación de aminoácidos y proteínas.
- En futuros experimentos, será necesario evaluar el potencial de CSL en condiciones de reducción de nitrógeno en diferentes niveles a los probados en este estudio. Además, es importante determinar la dosis y la frecuencia óptimas de aplicación de CSL para maximizar sus efectos beneficiosos en estas condiciones estresantes. Se requieren investigaciones adicionales para comprender completamente los mecanismos metabólicos activados por los componentes de CSL y su impacto en el desarrollo vegetativo. Además, es fundamental estudiar el rendimiento agronómico de las plantas tratadas con CSL en condiciones de campo y evaluar su efecto en la productividad de los cultivos. Estos estudios futuros ayudarán a mejorar nuestra comprensión de cómo aprovechar al máximo el potencial de CSL como una herramienta para el cultivo sostenible de plantas en áreas con limitaciones de nitrógeno.

9. INVESTIGACIONES FUTURAS



9. INVESTIGACIONES FUTURAS

La convergencia de bioestimulantes, cambio climático y agricultura representa un campo de investigación esencial para abordar los desafíos actuales y futuros en la producción de alimentos y la sostenibilidad agrícola. En medio de un escenario de cambio climático, caracterizado por eventos extremos, variaciones en las precipitaciones y temperaturas, la agricultura enfrenta una presión sin precedentes a la vez que es una causa principal del cambio climático y potencia los efectos del cambio climático. Las investigaciones futuras buscan no solo entender estos desafíos, sino también desarrollar soluciones innovadoras que fortalezcan la resiliencia de los sistemas agrícolas. En este sentido los bioestimulantes adquieren particular importancia en el mundo de los fertilizantes. Los productos agroquímicos bioestimulantes se caracterizan por estar formulados por materias activas que incluyen aminoácidos, péptidos, extractos de algas, extractos botánicos como el CSL, etc., a excepción de los fertilizantes minerales clásicos convencionales. Estas materias activas son capaces de mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas bajo condiciones climáticas y nutricionales adversas.

Para el desarrollo de estos nuevos productos bioestimulantes se necesita generar una gran cantidad de conocimiento científico en el que se incluye:

- Conocer con detalle la composición química de las materias primas con las que se formulan los bioestimulantes.
- Conocer el modo de acción de los ingredientes que forman estas materias primas en las plantas a diferentes niveles: fisiológico, bioquímico, genético, transcriptómico, etc., teniendo en cuenta efectos sinérgicos, antagónicos y neutros entre los diferentes ingredientes.
- Conocer la tolerancia de los cultivos a los estreses, y, delimitar el grado en el que se pueden paliar ya que en casos de estrés severo los productos bioestimulantes no tienen mucho margen de acción.
- Conocer qué procesos fisiológicos de las plantas se quieren estimular/potenciar/inducir para combatir un tipo de estrés determinado.

Las futuras investigación se centrarán, siguiendo este modo de trabajo descrito anteriormente, en el uso del CSL para otros estreses como sequía, limitaciones nutricionales de P, toxicidad por metales pesados, estrés por calor, etc. La hipótesis que seguiremos será que el CSL tiene una gran cantidad de péptidos capaces de interactuar con las plantas. Por lo que, nos centraremos exclusivamente en los péptidos de cadena corta que puede aportar este extracto a los productos bioestimulantes. Para ello, será necesario abordar los temas que hemos comentado anteriormente con técnicas de análisis potentes basadas en las ómicas, utilizar plataformas de fenotipado rápidas

y precisas, y, no menos importante abordar técnicas químicas de transformación de CSL para obtener a la carta aquellos péptidos de cadena corta de interés agrícola.

Para optimizar el CSL y maximizar su eficacia como bioestimulante en la agricultura, es necesario recurrir a técnicas químicas avanzadas que permitan manipular su composición con precisión y mejorar su capacidad para promover el crecimiento y desarrollo de las plantas. Una de estas técnicas es la hidrólisis controlada, que consiste en la ruptura de enlaces peptídicos específicos dentro de las proteínas presentes en el CSL mediante la acción de enzimas proteolíticas o sustancias químicas. Este proceso permite obtener péptidos de cadena corta con estructuras y secuencias aminoácidas específicas, que pueden exhibir propiedades bioestimulantes más pronunciadas que las proteínas originales. Además, la separación por cromatografía de alta resolución o procesos de ultrafiltración se utilizan para purificar y concentrar los péptidos bioactivos obtenidos mediante dicha hidrólisis. Esta técnica permite separar los componentes del CSL en función de sus características fisicoquímicas, lo que facilita la identificación y el aislamiento de los péptidos de interés.

Por otro lado, la síntesis química selectiva es otra estrategia clave para la optimización del CSL como bioestimulante. Mediante esta técnica, es posible diseñar y producir péptidos sintéticos con secuencias aminoácidas específicas que se sabe que poseen actividades bioestimulantes deseables. La síntesis química selectiva permite la creación de péptidos diseñados a medida, lo que ofrece la oportunidad de modificar y mejorar sus propiedades funcionales para adaptarlos a las necesidades agronómicas específicas. Esta capacidad de diseño a medida es fundamental para desarrollar bioestimulantes altamente eficaces y específicos para diferentes cultivos y condiciones de crecimiento. Además, en la era de la biotecnología avanzada, técnicas como el “molecular farming” o la síntesis de péptidos en biofactorías mediante herramientas moleculares como CRISPR también representan prometedoras vías de exploración. Estas metodologías permiten no solo la producción escalable y sostenible de péptidos bioestimulantes, sino también la ingeniería precisa de sus estructuras para potenciar sus efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La combinación de la síntesis química selectiva y las técnicas de biotecnología molecular abre un amplio abanico de posibilidades para la optimización de los bioestimulantes como el CSL, llevando la agricultura hacia un futuro más resiliente y sostenible.

En el contexto actual de avances tecnológicos, el uso de inteligencia artificial (IA) emerge como una herramienta inestimable en el diseño y desarrollo de péptidos bioestimulantes. La IA, mediante algoritmos de aprendizaje automático y modelado molecular, puede analizar grandes conjuntos de datos estructurales y funcionales para identificar patrones y relaciones que conduzcan a la selección de péptidos con características agronómicas óptimas. Esto incluye la capacidad de predecir la interacción entre los péptidos y los receptores de las plantas, así como

su resistencia a condiciones ambientales adversas. La integración de la IA en el proceso de mejora del CSL permite un enfoque quimiométrico con una optimización más precisa y eficiente de los bioestimulantes formulados. En resumen, el uso combinado de técnicas químicas avanzadas y herramientas de inteligencia artificial representa un enfoque prometedor para mejorar el CSL y su aplicación en la agricultura sostenible del futuro.

En conclusión, las investigaciones futuras en bioestimulantes, cambio climático y agricultura se sumergen en un terreno multidisciplinario, buscando soluciones integradas que fortalezcan la resiliencia de los sistemas alimentarios frente a los desafíos climáticos. Desde el desarrollo de bioestimulantes innovadores hasta la adaptación de cultivos y la promoción de prácticas agrícolas sostenibles, esta área de estudio está destinada a desempeñar un papel crucial en la construcción de un futuro agrícola más resiliente y sostenible.



10. REFERENCIAS



10. REFERENCIAS

- Aazami, M. A., Maleki, M., Rasouli, F., & Gohari, G. (2023). Protective effects of chitosan based salicylic acid nanocomposite (CS-SA NCs) in grape (*Vitis vinifera* cv. 'Sultana') under Salinity Stress. *Sci. Rep*, 13, 883.
- Abebe, T., Guenzi, A. C., & B, M. (2003). Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol*, 131, 1748–1755.
- Acosta-Motos, J. R., Ortuño, M. F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M. J., & Hernandez, J. A. (2017). Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy*, 7(1), 18.
- Aggarwal, P. K., & Mall, R. (2002). Climate change and rice yields in diverse agro-environments of India. II. Effect of uncertainties in scenarios and crop models on impact assessment. *Clim Change*, 52, 331–343.
- Ahmad, M. S. A., & Ashraf, M. (2012). *Essential roles and hazardous effects of nickel in plants* (pp. 125–167; D. Whitacre, Ed.). New York: Springer.
- Ahmad, S., Ahmad, R., & My, A. (2009). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to drought stress at germination and seedling growth stages. *Pak J Bot*, 41, 647–654.
- Ahsan, N., Lee, S. H., & Dg, L. (2007). Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. *CR Biol*, 330, 735–746.
- Al, W., Orking, G., & Clima, O. (2008). *Climate change and food security: a framework document*. FAO Rome.
- Alam, M. K., Rana, Z. H., Islam, S. N., & Akhtaruzzaman, M. (2019). Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Methanolic Extract of Selected Wild Leafy Vegetables

- Grown in Bangladesh: A Cheapest Source of Antioxidants. *Potr. S. J. F. Sci*, 13, 287–293.
- Alarcón, J., Morales, M., & A, T. (1999). Growth, water relations and accumulation of organic and inorganic solutes in the halophyte *Limonium latifolium* cv. *Avignon* and its interspecific hybrid *Limonium caspia* x *Limonium latifolium* cv. *Beltlaard* during Salt Stress. *J Plant Physiol*, 154, 795–801.
- Alarcón, J., Morales, M., & T, F. (2006). Effects of water and salt stresses on growth, water relations and gas exchange in *Rosmarinus officinalis*. *J Hortic Sci Biotech*, 81, 845–853.
- Alfosea-Simón, M., Simón-Grao, S., Zavala-Gonzalez, E. A., Cámara-Zapata, J. M., Simón, I., Martínez-Nicolás, J. J., ... García-Sánchez, F. (2020). Application of biostimulants containing amino acids to tomatoes could favor sustainable cultivation: Implications for tyrosine, lysine, and methionine. *Sustainability*, 12, 9729.
- Alfosea-Simón, M., Zavala-Gonzalez, E. A., Cámara-Zapata, J. M., Martínez-Nicolás, J. J., Simón, I., Simón-Grao, S., & Garcia-Sánchez, F. (2020). Effect of foliar application of amino acids on the salinity tolerance of tomato plants cultivated under hydroponic system. *Sci. Hortic*, 272, 109509.
- Allen, M., Dube, O., & W, S. (2018). Framing and context. *Global Warming Of*, 1, 49–91.
- Álvarez, S., Gómez-Bellot, M. J., & M, C. (2012). Osmotic and saline effect on growth, water relations, and ion uptake and translocation in *Phlomis purpurea* plants. *Environ Exp Bot*, 78, 138–145.
- Amiri, A., & Bundur, Z. B. (2018). Use of corn-steep liquor as an alternative carbon source for biomineralization in cement-based materials and its impact on performance. *Constr. Build. Mater*, 165, 655–662.

- Andrianto, H., Suhardi, F., & A. (2018, October 22). Detection of Chlorophyll Content Based on Spectral Properties at Leaf Level: A Meta-Analysis. *Proceedings of the 2018 International Conference on Information Technology Systems and Innovation (ICITSI)*, 364–369. Bandung-Padang, Indonesia.
- Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A., & Hayat, S. (2020). Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiol. Biochem*, 156, 64–77.
- Ashraf, M. (2003). Relationships between leaf gas exchange characteristics and growth of differently adapted populations of Blue panicgrass (*Panicum antidotale* Retz.) under salinity or waterlogging. *Plant Sci*, 165, 69–75.
- Ashraf, M. Y., Sadiq, R., & M, H. (2011). Toxic effect of nickel (Ni) on growth and metabolism in germinating seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biol Trace Elem Res*, 143, 1695–1703.
- Ashtox, T. (1948). *Technique of breeding for drought resistance in crops. Technique of breeding for drought resistance in crops*. Cambridge, London.
- Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2021). Reclamation of Arid and Semi-Arid Soils: The Role of Plant Growth-Promoting Archaea and Bacteria. *Curr. Plant Biol*, 25, 100173.
- Azevedo Neto, A. D. D., Prisco, J. T., Enéas-Filho, J., Lacerda, C. F. D., Silva, J. V., Costa, P. H. A. D., & Gomes-Filho, E. (2004). Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 16, 31-38.
- Azizian, A., & Sepaskhah, A. (2014). Maize response to different water, salinity and nitrogen levels: agronomic behavior. *Int J Plant Prod*, 8, 107–130.

- Badmus, U. O., Ač, A., Klem, K., Urban, O., & Jansen, M. A. K. (2022). A Meta-Analysis of the Effects of UV Radiation on the Plant Carotenoid Pool. *Plant Physiol. Biochem*, *183*, 36–45.
- Bae, J., Benoit, D. L., & Watson, A. K. (2016). Effect of heavy metals on seed germination and seedling growth of common ragweed and roadside ground cover legumes. *Environ Pollut*, *213*, 112–118.
- Barnes, J., & Davison, A. (1988). The influence of ozone on the winter hardiness of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *New Phytol*, *108*, 159–166.
- Barrameda-Medina, Y., Montesinos-Pereira, D., Romero, L., Blasco, B., & Ruiz, J. M. (2014). Role of GSH homeostasis under Zn toxicity in plants with different Zn tolerance. *Plant Sci*, *227*, 110–121.
- Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., & Prithiviraj, B. (2015). Seaweed Extracts as Biostimulants in Horticulture. *Scientia Horticulturae*, *196*, 39–48.
- Bazihizina, N., Colzi, I., & E, G. (2015). Photosynthesizing on metal excess: copper differently induced changes in various photosynthetic parameters in copper tolerant and sensitive *Silene paradoxa* L. Populations. *Plant Sci*, *232*, 67–76.
- Beck, E. H., Heim, R., & Hansen, J. (2004). Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *J Biosci*, *29*, 449–459.
- Benzie, I. F., & Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Ann. Biochem*, *239*, 70–76.
- Bieleski, R. L., & Turner, N. A. (1996). Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem*, *17*, 278–293.

- Bingham, J. (1966). Varietal response in wheat to water supply in the field, and male sterility caused by a period of drought in a glasshouse experiment. *Ann Appl Biol*, 57, 365–377.
- Blázquez, M. A., Nelson, D. C., & Weijers, D. (2020). Evolution of plant hormone response pathways. *Annu. Rev. Plant Biol*, 71, 327–353.
- Bloom, A., Zwieniecki, M., & J, P. (2004). Water relations under root chilling in a sensitive and tolerant tomato species. *Plant, Cell Environ*, 27, 971–979.
- Blum, A. (2011). Drought resistance—is it really a complex trait? *Funct Plant Biol*, 38, 753–757.
- Bohnert, H. J., Gong, Q., & P, L. (2006). Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms—getting genomics going. *Curr Opin Plant Biol*, 9, 180–188.
- Botta, A. (2012). Enhancing Plant Tolerance to Temperature Stress with Amino Acids: An Approach to Their Mode of Action. *Acta Horticulturae*, 1009, 29–36.
- Bouman, B., Peng, S., & A, C. (2005). Yield and water use of irrigated tropical aerobic rice systems. *Agri Water Manag*, 74, 87–105.
- Bray, E. A. (2000). *Response to abiotic stress. Biochem Mol Biol Plant* 1158–1203.
- Brito, C., Dinis, L.-T., Moutinho-Pereira, J., & Correia, C. (2019). Kaolin, an Emerging Tool to Alleviate the Effects of Abiotic Stresses on Crop Performance. *Sci. Hortic*, 250, 310–316.
- Brooking, I. (1976). Male sterility in *Sorghum bicolor* (L.) Moench induced by low night temperature. I. Timing of the stage of sensitivity. *Funct Plant Biol*, 3, 589–596.
- Budhathoki, N. K., & Zander, K. K. (2019). Socio-economic impact of and adaptation to extreme heat and cold of farmers in the Food Bowl of Nepal. *Int J Environ Res Public Health*, 16(1578).

- Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, A., Vernieri, P. A. O. L. O., & Ferrante, A. (2015). Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture & Horticulture*, *31*(1), 1–17.
- Bulgari, R., Franzoni, G., & Ferrante, A. (2019). Biostimulants Application in Horticultural Crops under Abiotic Stress Conditions. *Agronomy*, *9*, 306.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*, *74*, 2157–2184.
- Campobenedetto, C., Grange, E., Mannino, G., Arkel, J., Beekwilder, J., Karlova, R., ... Berteau, C. M. (2020). A biostimulant seed treatment improved heat stress tolerance during cucumber seed germination by acting on the antioxidant system and glyoxylate cycle. *Front. Plant Sci*, *11*, 836.
- Canellas, L. P., Dobbss, L. B., Oliveira, A. L., Chagas, J. G., Aguiar, N. O., Rumjanek, V. M., ... Piccolo, A. (2012). Chemical Properties of Humic Matter as Related to Induction of Plant Lateral Roots. *European Journal of Soil Science*, *63*, 315–324.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Jones, D. L., Nebbioso, A., Mazzei, P., & Piccolo, A. (2015). Humic and Fulvic Acids as Biostimulants in Horticulture. *Scientia Horticulturae*, *196*, 15–27.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Okorokova-Facanha, A. L., & Facanha, A. R. (2002). Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiology*, *130*, 1951–1957.

- Caradonia, F., Battaglia, V., Righi, L., Pascali, G., & Torre, A. (2019). Plant biostimulant regulatory framework: prospects in Europe and current situation at international level. *Journal of Plant Growth Regulation*, *38*, 438–448.
- Caradonia, F., Ronga, D., Flore, A., Barbieri, R., Moulin, L., Terzi, V., & Francia, E. (2020). Biostimulants and cherry rootstock increased tomato fruit yield and quality in sustainable farming systems. *Ital. J. Agron*, *15*, 121–131.
- Carrizo García, C., Barfuss, M. H., Sehr, E. M., Barboza, G. E., Samuel, R., Moscone, E. A., & Ehrendorfer, F. (2016). Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Annals of botany*, *118*(1), 35-51.
- Cataldo, D. A., Maroon, M., Schrader, L. E., & Youngs, V. L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plan*, *6*, 71–80.
- Cerdán, M., Sánchez-Sánchez, A., Oliver, M., Juárez, M., & Sánchez-Andreu, J. J. (2009). Effect of Foliar and Root Applications of Amino Acids on Iron Uptake by Tomato Plants. *Acta Horticulturae*, *830*, 481–488.
- Chanda, M., Rachidi, F., Hachimi Alaoui, M., Mernissi, N., Aasfar, A., Mustapha, B., ... El Arroussi, H. (2021). Microalgae-cyanobacteria-based biostimulant effect on salinity tolerance mechanisms, nutrient uptake, and tomato plant growth under salt stress. *J. Appl. Phycol*, *33*, 3779–3795.
- Chandel, A. K., Khot, L. R., Osroosh, Y., & Peters, T. R. (n.d.). Thermal-RGB Imager Derived in-Field Apple Surface Temperature Estimates for Sunburn Management. *Agric. For. Meteorol*, *2018*, 253–254, 132–140.

- Chavarria, G., & dos Santos, H. P. (2012). Plant water relations: absorption, transport and control mechanisms. In G. Montanaro (Ed.), *Advances in selected plant physiology aspects. Intechopen*.
- Chen, X., Cui, Z., Fan, M., Vitousek, P., Zhao, M., Ma, W., ... & Zhang, F. (2014a). Producing more grain with lower environmental costs. *Nature*, *514*(7523), 486-489.
- Chen, Y., Xiao, C., Chen, X., Li, Q., Zhang, J., Chen, F., ... & Mi, G. (2014b). Characterization of the plant traits contributed to high grain yield and high grain nitrogen concentration in maize. *Field Crops Research*, *159*, 1-9.
- Cheng, M., Cui, Y., Yan, X., Zhang, R., Wang, J., & Wang, X. (2022). Effect of dual-modified cassava starches on intelligent packaging films containing red cabbage extracts. *Food Hydrocolloid*, *124*, 107225.
- Chiaiese, P., Corrado, G., Colla, G., Kyriacou, M. C., & Roupheal, Y. (2018). Renewable Sources of Plant Biostimulation: Microalgae as a Sustainable Means to Improve Crop Performance. *Frontiers in Plant Science*, *9*.
- Chinta, Y. D., Kano, K., Widiastuti, A., Fukahori, M., Kawasaki, S., Eguchi, Y., ... & Sato, T. (2014). Effect of corn steep liquor on lettuce root rot (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactuca*) in hydroponic cultures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(11), 2317-2323.
- Cho, M.-H., Park, H. L., & Hahn, T.-R. (2015). Engineering leaf carbon metabolism to improve plant productivity. *Plant Biotechnol. Rep*, *9*, 1–10.
- Chovatiya, S. G., Bhatt, S. S., & Shah, A. R. (2011). Evaluation of corn steep liquor as a supplementary feed for *Labeo rohita* (Ham.) fingerlings. *Aquaculture International*, *19*(1), 1–12.

- Clarke, H., & Siddique, K. (2004). Response of chickpea genotypes to low temperature stress during reproductive development. *Field Crops Res*, *90*, 323–334.
- Colla, G., Hoagland, L., Ruzzi, M., Cardarelli, M., Bonini, P., Canaguier, R., & Roupael, Y. (2017). Biostimulant Action of Protein Hydrolysates: Unraveling Their Effects on Plant Physiology and Microbiome. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 2202.
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., & Roupael, Y. (2015). Protein Hydrolysates as Biostimulants in Horticulture. *Scientia Horticulturae*, *196*, 28–38.
- Colla, G., Roupael, Y., & C, L. (2010). Role of grafting in vegetable crops grown under saline conditions. *Sci Hortic*, *127*, 147–155.
- Conesa, M. R., Espinosa, P. J., Pallarés, D., & Pérez-Pastor, A. (2020). Influence of plant biostimulant as technique to harden citrus nursery plants before transplanting to the field. *Sustainability*, *12*, 6190.
- Conesa, M., Rosa, J., & R, D. (2016). Changes induced by water stress on water relations, stomatal behaviour and morphology of table grapes (cv. *Crimson seedless*) grown in pots. *Sci Hortic*, *202*, 9–16.
- Cong Dien, D., & Yamakawa, T. (2019). Phenotypic variation and selection for cold-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) at germination and seedling stages. *Agriculture*, *9*(8), 162.
- Cornejo-Villegas, M., Rincón-Londoño, N., Real-López, D., & Rodríguez-García, M. E. (2018). The effect of Ca²⁺ ions on the pasting, morphological, structural, vibrational, and mechanical properties of corn starch-water system. *Journal of Cereal Science*, *79*, 174–182.

- Cozzolino, E., Giordano, M., Fiorentino, N., El-Nakhel, C., Pannico, A., Mola, I., ... Roupael, Y. (2020). Appraisal of biodegradable mulching films and vegetal-derived biostimulant application as eco-sustainable practices for enhancing lettuce crop performance and nutritive value. *Agronomy*, *10*, 427.
- D’Mello, J. P. F. (Ed.). (2015). In *Amino Acids in Higher Plants; CABI International*. Edinburgh, UK.
- Dalal, A., Bourstein, R., Haish, N., Shenhar, I., Wallach, R., & Moshelion, M. (2019). Dynamic physiological phenotyping of drought-stressed pepper plants treated with “productivity-enhancing” and “survivability-enhancing” biostimulants. *Front. Plant Sci*, *10*, 905.
- Davies, W. J., & Zhang, J. (1991). Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Ann Rev Plant Biol*, *42*, 55–76.
- Dawood, M. F. A., Tahjib-Ul-Arif, M., Sohag, A. A. M., Abdel Latef, A. A. H., & Ragaey, M. M. (2020). Mechanistic Insight of Allantoin in Protecting Tomato Plants Against Ultraviolet C Stress. *Plants*, *10*, 11.
- de Campos, M. K. F., de Carvalho, K., de Souza, F. S., Marur, C. J., Pereira, L. F. P., Bespalhok Filho, J. C., & Vieira, L. G. E. (2011). Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic ‘Swingle’citrumelo plants over-accumulating proline. *Environmental and experimental botany*, *72*(2), 242-250.
- de Juan Javier, P., José, I. J., & Manuel, S. D. (1997). Chilling of drought-hardened and non-hardened plants of different chilling-sensitive maize lines changes in water relations and ABA contents. *Plant Science*, *122*(1), 71-79.
- Del Amor, F. M., Gálvez, A., Romero, M., Otalora, G., & López-Marín, J. (2020). Preliminary Study of the Behaviour of a Courgette Crop Grown under Photosensitive Shade Nets. *Acta Horti*, 341–345.

- Dey, S., Ram, K., & A, C. (2018). Aerobic rice: smart technology of rice cultivation. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 7, 1799–1804.
- Di Mola, I., Cozzolino, E., Ottaiano, L., Nocerino, S., Rouphael, Y., Colla, G., ... & Mori, M. (2020). Nitrogen use and uptake efficiency and crop performance of baby spinach (*Spinacia oleracea* L.) and Lamb's Lettuce (*Valerianella locusta* L.) grown under variable sub-optimal N regimes combined with plant-based biostimulant application. *Agronomy*, 10(2), 278.
- Dimkpa, C. O., Fugice, J., Singh, U., & Lewis, T. D. (2020). Development of fertilizers for enhanced nitrogen use efficiency—Trends and perspectives. *Science of the Total Environment*, 731, 139113.
- Ding, W., Fang, W., & S, S. (2016). Wheat WRKY type transcription factor gene TaWRKY1 is essential in mediating drought tolerance associated with an ABA-dependent pathway. *Plant Mol Biol Rep*, 34, 1111–1126.
- Dobbss, L. B., Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Peres, L. E. P., Azevedo, M., ... Façanha, A. R. (2010). Bioactivity of Chemically Transformed Humic Matter from Vermicompost on Plant Root Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3681–3688.
- Dolferus, R., Ji, X., & Richards, R. A. (2011). Abiotic stress and control of grain number in cereals. *Plant Sci*, 181, 331–341.
- Doncheva, S. (1998). Copper-induced alterations in structure and proliferation of maize root meristem cells. *J Plant Physiol*, 153, 482–487.
- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14.

- Edwinoliver, N. G., Thirunavukarasu, K., Purushothaman, S., Rose, C., Gowthaman, M. K., & Kamini, N. R. (2009). Corn steep liquor as a nutrition adjunct for the production of *Aspergillus niger* lipase and hydrolysis of oils thereof. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10658–10663.
- Ehrler, W., Idso, S., & Rd, J. (1978). Wheat canopy temperature: relation to plant water potential 1. *Agron J*, 70, 251–256.
- El-Nakhel, C., Cozzolino, E., Ottaiano, L., Petropoulos, S. A., Nocerino, S., Pelosi, M. E., ... Mola, I. (2022). Effect of Biostimulant Application on Plant Growth, Chlorophylls and Hydrophilic Antioxidant Activity of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Grown under Saline Stress. *Horticulturae*, 8, 971.
- El-Nakhel, C., Cristofano, F., Colla, G., Pii, Y., Lucini, L., & Rouphael, Y. A. (2023). Graminaceae-derived protein hydrolysate and its fractions provide differential growth and modulate qualitative traits of lettuce grown non-saline and mild salinity conditions. *Sci. Hortic*, 319, 112130.
- Elzaawely, A. A., Ahmed, M. E., Maswada, H. F., & Xuan, T. D. (2017). Enhancing growth, yield, biochemical, and hormonal contents of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sprayed with moringa leaf extract. *Arch. Agron. Soil Sci*, 63, 687–699.
- Emamverdian, A., Ghorbani, A., Li, Y., Pehlivan, N., Barker, J., Ding, Y., ... Zargar, M. (2023). Responsible Mechanisms for the Restriction of Heavy Metal Toxicity in Plants via the Co-Foliar Spraying of Nanoparticles. *Agronomy*, 13, 1748. Retrieved from <https://www.fao.org/news/story/es/item/277654/icode/>
- Enders, T. A., Dennis, S., & J, O. (2019). Classifying cold-stress responses of inbred maize seedlings using RGB imaging. *Plant Direct*, 3:e00104.

- Ennoury, A., BenMrid, R., Nhhala, N., Roussi, Z., Latique, S., Zouaoui, Z., & Nhiri, M. (2022). River's *Ulva intestinalis* extract protects common bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) against salt stress. *S. Afr. J. Bot*, *150*, 334–341.
- Epstein, E., & Bloom, A. J. (2005). *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives* (2nd ed.). Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
- Ertani, A., Schiavon, M., Altissimo, A., Franceschi, C., & Nardi, S. (2011). Phenol-Containing Organic Substances Stimulate Phenylpropanoid Metabolism in *Zea mays*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *174*, 496–503.
- Fahad, S., Bajwa, A. A., & U, N. (2017). Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Front Plant Sci*, *8*(1147).
- FAO. (2019). World fertilizer trends and outlook to 2022. Available online: <https://www.fao.org/3/ca6746en/ca6746en.pdf> (accessed on 8 November 2023).
- FAO. (2022). Agricultural production statistics. Available online: <https://www.fao.org/3/cc3751en/cc3751en.pdf> (accessed on 26 July 2023).
- FDA. (2018). Recuperado el 23 de mayo de 2018, de <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/LabelingNutrition/ucm064928.htm>
- Fernandez-Salvador, J., Strick, B. C., & Bryla, D. R. (2015). Liquid Corn and Fish Fertilizers Are Good Options for Fertigation in Blackberry Cultivars Grown in an Organic Production System. *HortScience*, *50*, 225–233.
- Flagella, Z., Rotunno, T., & E, T. (2002). Changes in seed yield and oil fatty acid composition of high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids in relation to the sowing date and the water regime. *Eur J Agron*, *17*, 221–230.

- Fortmeier, R., & Schubert, S. (1995). *Salt tolerance of maize (Zea mays L.): the role of sodium exclusion*.
- Francesca, S., Arena, C., Hay Mele, B., Schettini, C., Ambrosino, P., Barone, A., & Rigano, M. M. (2020). The use of a plant-based biostimulant improves plant performances and fruit quality in tomato plants grown at elevated temperatures. *Agronomy, 10*, 363.
- Franco, J., Bañón, S., & M, V. (2011). Root development in horticultural plants grown under abiotic stress conditions—a review. *J Hortic Sci Biotech, 86*, 543–556.
- Fu, J., & Huang, B. (2001). Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environ. Exp. Bot, 45*, 105–114.
- Gajc-Wolska, J., Spiewski, T., & Grabowska, A. (2013). The Effect of Seaweed Extracts on the Yield and Quality Parameters of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *cymosa* L.) in Open Field Production. *Acta Horticulturae, 1009*, 83–90.
- Gambetta, J. M., Holzapfel, B. P., Stoll, M., & Friedel, M. (2021). Sunburn in Grapes: A Review. *Front. Plant Sci, 11*, 604691.
- Gedeon, S., Ioannou, A., Balestrini, R., Fotopoulos, V., & Antoniou, C. (2022). Application of Biostimulants in Tomato Plants (*Solanum lycopersicum*) to Enhance Plant Growth and Salt Stress Tolerance. *Plants, 11*, 3082.
- Ghanem, M. E., Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Romero-Aranda, R., Dodd, I. C., ... Pérez-Alfocea, F. (2008). Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L). *J. Exp. Bot, 59*, 3039–3050.
- Gharaghani, A., Mohammadi Javarzari, A., & Vahdati, K. (2018). Kaolin Particle Film Alleviates Adverse Effects of Light and Heat Stresses and Improves Nut and Kernel Quality in Persian Walnut. *Sci. Hortic, 239*, 35–40.

- Glenn, D. M. (2009). Particle Film Mechanisms of Action That Reduce the Effect of Environmental Stress in ‘Empire’ Apple. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*, 134, 314–321.
- Godoy, F., Olivos-Hernández, K., Stange, C., & Handford, M. (2021). Abiotic stress in crop species: improving tolerance by applying plant metabolites. *Plants*, 10(2), 186.
- Gómez-Bellot, M. J., Alvarez, S., & M, C. (2013). Water relations, nutrient content and developmental responses of euonymus plants irrigated with water of different degrees of salinity and quality. *J Plant Res*, 126, 567–576.
- Gómez-García, M.R. & Ochoa-Alejo, N. (2013). Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp). *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 19025–19053.
- Greger, M., & Johansson, M. (1992). Cadmium effects on leaf transpiration of sugar beet, *Beta vulgaris*. *Physiol Plant*, 86, 465–473.
- Gu, C., Mao, X., Chen, D., Yu, B., & Yang, Q. (2019). Isoleucine plays an important role for maintaining immune function. *Current Protein and Peptide Science*, 20(7), 644–651.
- Gzyl, J., Przymusiński, R., & Woźny, A. (1997). Organospecific reactions of yellow lupin seedlings to lead. *Acta Soc Bot Pol*, 66, 61–66.
- Hajibabae, M., Azizi, F., & Zargari, K. (2012). Effect of drought stress on some morphological, physiological and agronomic traits in various foliage corn hybrids. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 12, 890–896.
- Hajiboland, R., Norouzi, F., & Poschenrieder, C. (2014). Growth, physiological, biochemical and ionic responses of pistachio seedlings to mild and high salinity. *Trees*, 28, 1065–1078.

- Hamedani, S. R., Roupahel, Y., Colla, G., Colantoni, A., & Cardarelli, M. (2020). Biostimulants as a tool for improving environmental sustainability of greenhouse vegetable crops. *Sustainability*, *12*, 5101.
- Hampson, C. R., & Simpson, G. (1990). Effects of temperature, salt, and osmotic potential on early growth of wheat (*Triticum aestivum*) I. Germination. *Can J Bot*, *68*, 524–528.
- Hamza, B. B., & Suggars, A. (2001). Biostimulants: Myths and Realities. *TurfGrass Trends*, *8*, 6–10.
- Han, S. G., Selvakumar, G., Yi, P. H., & Lee, S. E. (2018). Effect of Sprinkler, Surface Drip and Subsurface Drip Irrigation Methods on ‘Fuji’/M9 and ‘Fuji’/M26 Apple Orchards Growth, Soil Properties, and Water Consumption. *Korean J. Soil. Sci. Fert*, *51*, 608–615.
- Hanif, S., Saleem, M. F., Sarwar, M., Irshad, M., Shakoor, A., Wahid, M. A., & Khan, H. Z. (2021). Biochemically triggered heat and drought stress tolerance in rice by proline application. *Journal of Plant Growth Regulation*, *40*, 305–312.
- Hansen, J., & Beck, E. (1988). Evidence for ideal and non-ideal equilibrium freezing of leaf water in frosthardy ivy (*Hedera helix*) and winter barley (*Hordeum vulgare*). *Bot Acta*, *101*, 76–82.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2013). Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. In K. Vahdati & L. Ch (Eds.), *Abiotic stress-plant responses and applications in agriculture*. Intechopen.
- Hasanuzzaman, M., Raihan, M. R. H., Masud, A. A. C., Rahman, K., Nowroz, F., Rahman, M., ... Fujita, M. (2021). Regulation of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Salinity. *Int. J. Mol. Sci*, *22*, 9326.

- Hatfield, J. L., & Prueger, J. H. (2015). Temperature extremes: effect on plant growth and development. *Weather Clim Extremes*, *10*, 4–10.
- Haworth, M., Marino, G., & C, B. (2018). The impact of heat stress and water deficit on the photosynthetic and stomatal physiology of olive (*Olea europaea* L.)—A case study of the 2017 heat wave. *Plants*, *7*(76).
- Hayashi, T., Kashiwabara, K., & T, Y. (2000). Effects of high nitrogen supply on the susceptibility to coolness at the young microspore stage in rice (*Oryza sativa* L. *Plant Prod Sci*, *3*, 323–327.
- Hayat, S., Ahmad, H., Ali, M., Hayat, K., Khan, M., & Cheng, Z. (2018). Aqueous garlic extract as a plant biostimulant enhances physiology, improves crop quality and metabolite abundance, and primes the defense responses of receiver plants. *Appl. Sci*, *8*, 1505.
- He, M., He, C. Q., & Ding, N. Z. (2018). Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Front. Plant Sci*, *9*, 1771.
- Hellequin, E., Monard, C., Chorin, M., Lebris, N., Daburon, V., Klarzynski, O., & Binet, F. (2020). Responses of active soil microorganisms facing to a soil biostimulant input compared to plant legacy effects. *Sci. Rep*, *10*, 13727.
- Hochman, Z., Gobbett, D. L., & Horan, H. (2017). Climate trends account for stalled wheat yields in Australia since 1990. *Glob Chang Biol*, *23*, 2071–2081.
- Hofer, A., & Herwiga, C. (2017). Quantitative determination of nine water-soluble vitamins in the complex matrix of corn steep liquor for raw material quality assessment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *92*(8), 2106–2113.

- Hofer, A., Hauer, S., Kroll, P., Fricke, J., & Herwig, C. (2018). In-depth characterization of the raw material corn steep liquor and its bioavailability in bioprocesses of *Penicillium chrysogenum*. *Process Biochemistry*, *70*, 20–28.
- Holopainen, J. K. (2004). Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science*, *9*(11), 529–533.
- Howard, L. R., & Wildman, R. E. (2007). Antioxidant vitamin and phytochemical content of fresh and processed pepper fruit (*Capsicum annuum*). *Handbook of nutraceuticals and functional foods* (2nd ed., Boca Raton: CRC Press. pp. 165-191.
- Hull, S. R., Yang, B. Y., Venzke, D., Kulhavy, K., & Montgomery, R. (1996). Composition of corn steep water during steeping. *J. Agr. Food Chem*, *44*, 1857–1863.
- Hussain, M., Malik, M., & M, F. (2009). Exogenous glycinebetaine and salicylic acid application improves water relations, allometry and quality of hybrid sunflower under water deficit conditions. *J Agron Crop Sci*, *195*, 98–109.
- Hussein, N. M., Hussein, M. I., Gadel Hak, S. H., & Hammad, M. A. (2014). Effect of two plant extracts and four aromatic oils on tuta absoluta population and productivity of tomato cultivar gold Stone. *Nat. Sci*, *12*, 108–118.
- Iqbal, A., Qiang, D., Alamzeb, M., Xiangru, W., Huiping, G., Hengheng, Z., ... Meizhen, S. (2020). Untangling the molecular mechanisms and functions of nitrate to improve nitrogen use efficiency. *J. Sci. Food Agr*, *100*, 904–914.
- Irigoyen, J., Einerich, D., & Sanchez-Díaz, M. (2006). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant*, *84*, 55–60.

- Jacobsen, S. E., Liu, F., & Jensen, C. R. (2009). Does root-sourced ABA play a role for regulation of stomata under drought in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Sci Hortic*, *122*, 281–287.
- Jagadish, S., Craufurd, P., & Wheeler, T. (2007). High temperature stress and spikelet fertility in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot*, *58*, 1627–1635.
- Jain, M., Kataria, S., & M, H. (2019). *Water deficit stress effects and responses in maize* (pp. 129–151; M. Hasanuzzaman, K. Hakeem, K. Nahar, & H. Alharby, Eds.). Cham: Springer.
- Ji, X., Shiran, B., & J, W. (2010). Importance of pre-anthesis anther sink strength for maintenance of grain number during reproductive stage water stress in wheat. *Plant, Cell Environ*, *33*, 926–942.
- Jiao, X., Lyu, Y., Wu, X., Li, H., Cheng, L., Zhang, C., ... & Shen, J. (2016). Grain production versus resource and environmental costs: towards increasing sustainability of nutrient use in China. *Journal of experimental botany*, *67*(17), 4935-4949.
- Joshi, S., Goyal, S., & Reddy, M. S. (2018). Corn steep liquor as a nutritional source for biocementation and its impact on concrete structural properties. *J. Ind. Microbiol. Biot*, *45*, 657–667.
- Jovović, M., Tunguz, V., & M, M. (2018). Effect of salinity and drought stress on germination and early seedlings growth of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetika*, *50*, 285–298.
- Ju, X. T., Xing, G. X., Chen, X. P., Zhang, S. L., Zhang, L. J., Liu, X. J., ... & Zhang, F. S. (2009). Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(9), 3041-3046.

- Juárez-Maldonado, A., Ortega-Ortíz, H., Morales-Díaz, A., González-Morales, S., Morelos-Moreno, Á., Fuente, M., ... Benavides-Mendoza, A. (2019). Nanoparticles and Nanomaterials as Plant Biostimulants. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*, 162.
- Junglee, S., Urban, L., Sallanon, H., & Lopez-Lauri, F. (2014). Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide. *AJAC*, *5*, 730–736.
- Kaldenhoff, R., Ribas-Carbo, M., & Jf, S. (2008). Aquaporins and plant water balance. *Plant, Cell Environ*, *31*, 658–666.
- Kano, K., Kitazawa, H., Suzuki, K., Widiastuti, A., Odani, H., Zhou, S., ... Sato, T. (2021). Effects of Organic Fertilizer on Bok Choy Growth and Quality in Hydroponic Cultures. *Agronomy*, *11*, 491.
- Kasim, W. A. (2006). Changes induced by copper and cadmium stress in the anatomy and grain yield of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Int J Agri Biol*, *8*, 123–128.
- Kastori, R., Petrović, M., & Petrović, N. (1992). Effect of excess lead, cadmium, copper, and zinc on water relations in sunflower. *J Plant Nutr*, *15*, 2427–2439.
- Katano, K., Honda, K., & Suzuki, N. (2018). Integration between ROS Regulatory Systems and Other Signals in the Regulation of Various Types of Heat Responses in Plants. *IJMS*, *19*, 3370.
- Kaur, R., Bhardwaj, R., & R, S. (2016). Hormonal regulation of drought stress in plants. In P. Ahmad (Ed.), *Water stress and crop plants: a sustainable approach* (Vol. 2, pp. 582–599). New York: Wiley.

- Khan, M. N. (2016). Nano-Titanium Dioxide (Nano-TiO₂) Mitigates NaCl Stress by Enhancing Antioxidative Enzymes and Accumulation of Compatible Solutes in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Plant Sciences*, *11*, 1–11.
- Khan, N., Ali, S., Zandi, P., Mehmood, A., Ullah, S., Ikram, M., ... Babar, M. A. (2020). Role of Sugars, Amino Acids and Organic Acids in Improving Plant Abiotic Stress Tolerance. *Pak. J. Bot*, *52*, 355–363.
- Kiapour, H., Moaveni, P., Habibi, D., & Sani, B. (2015). Evaluation of the Application of Gibberellic Acid and Titanium Dioxide Nanoparticles under Drought Stress on Some Traits of Basil (*Ocimum basilicum* L.). *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, *6*, 138–150.
- Kirkham, M. (2005). *Principles of soil and plant water relations*. Massachusetts: Elsevier.
- Ko, S.-S., Jhong, C.-M., Lin, Y.-J., Wei, C.-Y., Lee, J.-Y., & Shih, M.-C. (2020). Blue Light Mediates Chloroplast Avoidance and Enhances Photoprotection of Vanilla Orchid. *IJMS*, *21*, 8022.
- Kocira, S., Szparaga, A., Findura, P., & Treder, K. (2020). Modification of yield and fiber fractions biosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with biostimulants containing amino acids and seaweed extract. *Agronomy*, *10*, 1338.
- Kocira, S., Szparaga, A., Hara, P., Treder, K., Findura, P., Bartoš, P., & Filip, M. (2020a). Biochemical and economical effect of application biostimulants containing seaweed extracts and amino acids as an element of agroecological management of bean cultivation. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–16.
- Köhler, H., Contreras, R. A., Pizarro, M., Cortés-Antiquera, R., & Zúñiga, G. E. (2017). Antioxidant Responses Induced by UVB Radiation in *Deschampsia antarctica* Desv. *Front. Plant Sci*, *8*, 921.

- Kona, R. P., Qureshi, N., & Pai, J. S. (2001). Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technology*, 78(2), 123–126.
- Korkmaz, A., & Dufault, R. J. (2001). Developmental consequences of cold temperature stress at transplanting on seedling and field growth and yield. *I Watermelon. J Am Soc Hortic Sci*, 126, 404–409.
- Kozłowski, T., & Pallardy, S. (2002). Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *Bot Rev*, 68, 270–334.
- Krom, M. D. (1980). Spectrophotometric determination of ammonia: A study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analysis*, 105, 305–316.
- Kurepin, L. V., Zaman, M., & Pharis, R. P. (2014). Phytohormonal basis for the plant growth promoting action of naturally occurring biostimulators. *J. Sci. Food Agric*, 94, 1715–1722.
- Lacerda, C. F. D., Cambraia, J., Oliva, M. A., & Ruiz, H. A. (2003). Osmotic adjustment in roots and leaves of two sorghum genotypes under NaCl stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 15, 113-118.
- Lal, N., & Sahu, N. (2017). Management Strategies of Sun Burn in Fruit Crops-A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6, 1126–1138.
- Lal, R. (2018). Urban agriculture in the 21st century. In R. Lal & B. A. Stewart (Eds.), *Urban soils* (pp. 1–13). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Lammerts van Bueren, E. T., & Struik, P. C. (2017). Diverse concepts of breeding for nitrogen use efficiency. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37, 1-24.
- Lamoreaux, R. J., & Chaney, W. R. (1977). Growth and water movement in silver maple seedlings affected by cadmium. *J Environ Qual*, 6, 201–205.

- Law, M. Y., Charles, S. A., & Halliwell, B. (1983). Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. *Biochem. J*, 210, 899–903.
- Lawford, H. G., & Rousseau, J. D. (1997). Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance *Zymomonas* ethanol fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63–65(1), 287–304.
- Lazar, T., Taiz, L., & Zeiger, E. (2003). Plant physiology. In *Ann Bot* 91:750–751 (3rd edn).
- Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2006). Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Ann. App. Biol*, 149, 243–247.
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., & Rentsch, D. (2010). Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids*, 39, 949–962.
- Lei, Z., Mingyu, S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., Liang, C., & Fashui, H. (2008). Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. *Biological Trace Element Research*, 121, 69–79.
- Li, X. X., Xu, W. B., Yang, J. S., Zhao, H. B., Pan, C. F., Ding, X., & Zhang, Y. G. (2016). Effects of applying lactic acid bacteria to the fermentation on a mixture of corn steep liquor and air-dried rice straw. *Animal Nutrition*, 2(3), 229–233.
- Li, Y., Li, S., Du, R., Wang, J., Li, H., Xie, D., & Yan, J. (2021). Isoleucine enhances plant resistance against *Botrytis cinerea* via jasmonate signaling pathway. *Frontiers in Plant Science*, 12, 628328.
- Lim, C. W., Baek, W., & Sw, H. (2013). Arabidopsis PYL8 plays an important role for ABA signaling and drought stress responses. *Plant Pathol J*, 29, 471–476.

- Lisiecka, J. (2011). The Effect of Animal Protein Hydrolysate on Quantity and Quality of Strawberry Daughter Plants cv. 'Elsanta'. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus, 10*, 31–40.
- Liu, Y., Dong, S., Wei, S., Wang, W., Miao, H., Bo, K., ... Zhang, S. (2021). QTL Mapping of Heat Tolerance in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) at Adult Stage. *Plants, 10*, 324.
- Liu, Z., Jiao, X., Zhu, C., Katul, G. G., Ma, J., & Guo, W. (2021). Micro-Climatic and Crop Responses to Micro-Sprinkler Irrigation. *Agric. Water Manag, 243*, 106498.
- López-Prieto, A., Martínez-Padrón, H., Rodríguez-López, L., Moldes, A. B., & Cruz, J. M. (2019). Isolation and characterization of a microorganism that produces biosurfactants in corn steep water. *CyTA-J. Food, 17*, 509–516.
- Loreto, F., & Bonghi, G. (1989). Combined low temperature-high light effects on gas exchange properties of jojoba leaves. *Plant Physiol, 91*, 1580–1585.
- Lucini, L., Roupahel, Y., Cardarelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., & Colla, G. (2015). The Effect of a Plant-Derived Biostimulant on Metabolic Profiling and Crop Performance of Lettuce Grown under Saline Conditions. *Scientia Horticulturae, 182*, 124–133.
- Lynch, J. P. (2019). Root phenotypes for improved nutrient capture: an underexploited opportunity for global agriculture. *New phytologist, 223*(2), 548-564.
- Lyons, J. M. (1973). Chilling injury in plants. *Ann Rev Plant Physiol, 24*, 445–466.
- Machado, S., & Paulsen, G. M. (2001). Combined effects of drought and high temperature on water relations of wheat and sorghum. *Plant Soil, 233*, 179–187.
- Maddipati, P., Atiyeh, H. K., Bellmer, D. N., & Huhnke, R. L. (2011). Ethanol production from Syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. *Bioresource Technology, 102*(11), 6494–6501.

- Mahmoudian, M., Rahemi, M., Karimi, S., Yazdani, N., Tajdini, Z., Sarikhani, S., & Vahdati, K. (2021). Role of Kaolin on Drought Tolerance and Nut Quality of Persian Walnut. *J. Saudi Soc. Agric. Sci*, *20*, 409–416.
- Manja, K., & Aoun, M. (2019). The Use of Nets for Tree Fruit Crops and Their Impact on the Production: A Review. *Sci. Hortic*, *246*, 110–122.
- MAPA. (2023). Cuaderno de estadísticas agrarias. Recuperado de https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/cuaderno_enero2023_tcm30-648045.pdf
- MAPA. (2024). Pepino. Recuperado de https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/pepino_tcm30-102409.pdf
- Marcelis, D. F. M., Heuvelink, E., & Goudriaan, J. (1998). Modelling biomass production and yield of horticultural crops: A review. *Sci. Hortic*, *74*, 83–111.
- Marini, E., Magi, G., Mingoia, M., Pungaloni, A., & Facinelli, B. (2015). Antimicrobial and anti-virulence activity of capsaicin against erythromycin-resistant, cell-invasive group a streptococci. *Frontiers in microbiology*, *6*, 1281.
- Markhart, A. H. (1986). Chilling injury: a review of possible causes. *HortScience*, *21*, 1329–1333.
- Martínez-Arcos, A., Moldes, A. B., & Vecino, X. (2021). Adding value to secondary streams of corn wet milling industry. *CyTA-Journal of Food*, *19*(1), 675–681.
- Maurya, A. K. (2020). Application of plant volatile organic compounds (VOCs) in agriculture. In *New Frontiers in Stress Management for Durable Agriculture* (pp. 369–388).
- Mógor, Á. F., Ördög, V., Lima, G. P. P., Molnár, Z., & Mógor, G. (2018). Biostimulant Properties of Cyanobacterial Hydrolysate Related to Polyamines. *Journal of Applied Phycology*, *30*, 453–460.

- Mohamed, H. I. (2011). Molecular and biochemical studies on the effect of gamma rays on lead toxicity in cowpea (*Vigna sinensis*) plants. *Biol Trace Elem Res*, *144*, 1205–1218.
- Morales, D., Rodríguez, P., & J, D. (2003). High-temperature preconditioning and thermal shock imposition affects water relations, gas exchange and root hydraulic conductivity in tomato. *Biol Plant*, *47*, 203–208.
- Morales, M., & Munné-Bosch, S. M. (2019). Facts and Artifacts. *Plant Physiol*, *180*, 1246–1250.
- Mourtzinis, S., Specht, J. E., & Le, L. (2015). Climate-induced reduction in US-wide soybean yields underpinned by region-and in-season-specific responses. *Nature Plants*, *1*.
- Mukherjee, S. P., & Choudhuri, M. A. (1983). Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiol. Plant*, *58*, 166–170.
- Mukherjee, S., & Choudhuri, M. (2006). Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiol. Plant*, *58*, 166–170.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ*, *25*, 239–250.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol*, *167*, 645–663.
- Munns, R., & Gilliham, M. (2015). Salinity tolerance of crops—what is the cost? *New Phytol*, *208*, 668–673.
- Murali-Baskaran, R. K., Mooventhan, P., Das, D., Dixit, A., Sharma, K. C., Senthil-Nathan, S., & Ghosh, P. K. (2022). The future of plant volatile organic compounds (pVOCs) research: advances and applications for sustainable agriculture. *Environmental and Experimental Botany*, *200*, 104912.

- Mustafa, A., Hussain, A., Naveed, M., Ditta, A., Nazli, Z. E. H., & Sattar, A. (2016). Response of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) to soil and foliar applied L-tryptophan. *Soil Environ*, 35, 76–84.
- Nardi, S., Carletti, P., Pizzeghello, D., & Muscolo, A. (2009). Biological activities of humic substances. In *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Non-living Organic Matter in Environmental Systems*. John Wiley & Sons, Inc.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., & Vianello, A. (2002). Physiological Effects of Humic Substances on Higher Plants. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 1527–1536.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Reniero, F., & Rascio, N. (2000). Chemical and Biochemical Properties of Humic Substances Isolated from Forest Soils and Plant Growth. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 639.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., & Ertani, A. (2016). Plant Biostimulants: Physiological Responses Induced by Protein Hydrolyzed-Based. *Scientia Agricola*, 73, 18–23.
- Navarro, A., Bañón, S., & W, C. (2008). Ornamental characters, ion accumulation and water status in *Arbutus unedo* seedlings irrigated with saline water and subsequent relief and transplanting. *Environ Exp Bot*, 62, 364–370.
- Navarro-León, E., Barrameda-Medina, Y., Lentini, M., Esposito, S., Ruiz, J. M., & Blasco, B. (2016). Comparative study of Zn deficiency in *L. sativa* and *B. oleracea* plants: NH₄⁺ assimilation and nitrogen derived protective compounds. *Plant Sci*, 248, 8–16.
- Navarro-León, E., López-Moreno, F., Torre-González, A., Ruiz, J., Esposito, S., & Blasco Leon, M. B. (2020). Study of salt-stress tolerance and defensive mechanisms in *Brassica rapa* CAX1a TILLING mutants. *Environ. Exp. Bot*, 175, 104061.

- Navarro-Morillo, I., Blasco, B., Cámara-Zapata, J. M., Muñoz-Acero, J., Simón-Grao, S., Alfosea-Simón, M., ... García-Sánchez, F. (2024). Corn Steep Liquor application on pepper plants (*Capsicum annum* L.) stimulates growth under nitrogen-deficient growing conditions. *Scientia Horticulturae*, 328, 112955.
- Navarro-Morillo, I., Garcia-Sanchez, F., Camara-Zapata, J. M., Navarro-León, E., Izquierdo-Ramos, M. J., Blasco, B., & Ruiz, J. M. (2022). Physiological Study of the Efficacy of Archer® Eclipse in the Protection against Sunburn in Cucumber Plants. *Horticulturae*, 8(6), 500.
- Navarro-Morillo, I., Navarro-Perez, V., Perez-Millan, R., Navarro-León, E., Blasco, B., Cámara-Zapata, J. M., & Garcia-Sanchez, F. (2023). Effects of Root and Foliar Application of Corn Steep Liquor on Pepper Plants: A Physiological, Nutritional, and Morphological Study. *Horticulturae*, 9(2), 221.
- Navarro-Morillo, I., Pardo-Pina, S., Garcia-Sánchez, F., Ruiz, J. M., Laserna-Arcas, S., Plasencia, F., & Cámara-Zapata, J. M. (2023). Corn Steep Liquor Application Improves Pepper (*Capsicum annum* L.) Tolerance to Salinity. *Horticulturae*, 9(7), 785.
- Naz, N., Durrani, F., & Z, S. (2018). Influence of heat stress on growth and physiological activities of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Phyton*, 87, 225–230.
- Negrao, S., Schmöckel, S., & Tester, M. (2016). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Ann. Bot*, 119, 1–11.
- Nisa, M., Sarwar, M., & Khan, M. A. (2004). Influence of ad libitum feeding of urea treated wheat straw with or without corn steep liquor on intake, in situ digestion kinetics, nitrogen metabolism, and nutrient digestion in Nili-Ravi buffalo bulls. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55(2), 229–233.

- Niwa, T., Doi, U., Kato, Y., & Osawa, T. (2001). Antioxidative properties of phenolic antioxidants isolated from corn steep liquor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 49(1), 177–182.
- Norrie, J., & Keathley, J. P. (2006). *Benefits of Ascophyllum Nodosum Marine-Plant Extract Applications to ‘Thompson Seedless’ Grape Production* (pp. 243–248). Acta Horticulturae.
- Nyongesah, M. J., Wang, Q., & Li, P. (2015). Effectiveness of Photochemical Reflectance Index to Trace Vertical and Seasonal Chlorophyll a/b Ratio in *Haloxylon ammodendron*. *Acta Physiol. Plant*, 37, 2.
- Oancea, F., Velea, S., Mincea, C., & Ilie, L. (2013). Micro-algae Based Plant Biostimulant and Its Effect on Water Stressed Tomato Plants. *Romanian Journal of Plant Protection*, VI, 104–117.
- Obayori, O. S., Ilori, M. O., Adebusoye, S. A., Oyetibo, G. O., Omotayo, A. E., & Amund, O. O. (2010). Effects of corn steep liquor on growth rate and pyrene degradation by *Pseudomonas* strains. *Current Microbiology*, 60(6), 407–411.
- Obayori, O. S., Salam, L. B., Anifowoshe, W. T., Odunewu, Z. M., Amosu, O. E., & Ofulue, B. E. (2015). Enhanced degradation of petroleum hydrocarbons in corn-steep-liquor-treated soil microcosm. *Soil and Sediment Contamination*, 24(7), 731–743.
- Okada, T., Jayasinghe, J., & M, N. (2018). Unfertilized ovary pushes wheat flower open for cross-pollination. *J Exp Bot*, 69, 399–412.
- Okçu, G., Kaya, M. D., & Atak, M. (2005). Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Turk J Agric Forest*, 29, 237–242.

- Oliver, S. N., Dongen, J. T., & Sc, A. (2005). Cold-induced repression of the rice anther-specific cell wall invertase gene OSINV4 is correlated with sucrose accumulation and pollen sterility. *Plant, Cell Environ*, *28*, 1534–1551.
- Ouvrard, O., Cellier, F., & K, F. (1996). Identification and expression of water stress-and abscisic acid-regulated genes in a drought-tolerant sunflower genotype. *Plant Mol Biol*, *31*, 819–829.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., et al. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, *22*, 18–35.
- Padhi, B., Chauhan, G., Kandoi, D., Stirbet, A., Tripathy, B. C., & Govindjee, G. (2021). A Comparison of Chlorophyll Fluorescence Transient Measurements, Using Handy PEA and FluorPen Fluorometers. *Photosynthetica*, *59*, 399–408.
- Panuccio, M. R., Jacobsen, S. E., & Ss, A. (2014). Effect of saline water on seed germination and early seedling growth of the halophyte quinoa. *AoB Plants*, *6*.
- Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, *60*, 324–349.
- Passioura, J. (1988). Root signals control leaf expansion in wheat seedlings growing in drying soil. *Funct Plant Biol*, *15*, 687–693.
- Passioura, J. (2010). Scaling up: the essence of effective agricultural research. *Funct Plant Biol*, *37*, 585–591.
- Pena, L. B., Azpilicueta, C. E., & Gallego, S. M. (2011). Sunflower cotyledons cope with copper stress by inducing catalase subunits less sensitive to oxidation. *J Trace Elem Med Biol*, *25*, 125–129.

- Peng, S., Huang, J., & Je, S. (2004). Rice yields decline with higher night temperature from global warming. *Proc Natl Acad Sci*, *101*, 9971–9975.
- Pervaiz, A., Iqbal, A., Khalid, A., Manzoor, A., Noreen, S., Ayaz, A., ... Ashraf, M. (2019). Proline induced modulation in physiological responses in wheat plants. *J. Agric. Environ. Sci*, *8*, 112–119.
- Pintó-Marijuan, M., Turon-Orra, M., González-Betancort, A., Muñoz, P., & Munné-Bosch, S. (2023). Improved production and quality of peppers irrigated with regenerated water by the application of 24-epibrassinolide. *Plant Sci*, *334*, 111764.
- Poberezny, J., Szczepanek, M., Wszelaczynska, E., & Prus, P. (2020). The quality of carrot after field biostimulant application and after storage. *Sustainability*, *12*, 1386.
- Povero, G., Mejia, J. F., Tommaso, D., Piaggese, A., & Warrior, P. (2016). A systematic approach to discover and characterize natural plant biostimulants. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 435.
- PROFECO. (2020). *Pepino, fresco y saludable*. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/profeco/documentos/pepino-fresco-y-saludable>
- Przedpelska-Wasowicz, E. M., & Wierzbicka, M. (2011). Gating of aquaporins by heavy metals in *Allium cepa* L. epidermal cells. *Protoplasma*, *248*, 663–671.
- Przymusiński, R., & Woźny, A. (1985). The reactions of lupin roots on the presence of lead in the medium. *Biochem Physiol Pflanz*, *180*, 309–318.
- Qi, M., Liu, Y., & Li, T. (2013). Nano-TiO₂ Improves the Photosynthesis of Tomato Leaves under Mild Heat Stress. *Biological Trace Element Research*, *156*, 323–328.

- Rady, M. M., Desoky, E. S., Elrys, A. S., & Boghdady, M. S. (2019). Can licorice root extract be used as an effective natural biostimulant for salt-stressed common bean plants? *S. Afr. J. Bot*, *121*, 294–305.
- Raguso, R. A. (2008). Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *39*, 549–569.
- Rahnesan, Z., Nasibi, F., & Moghadam, A. A. (2018). Effects of salinity stress on some growth, physiological, biochemical parameters and nutrients in two pistachio (*Pistacia vera* L.) rootstocks. *J Plant Interact*, *13*, 73–82.
- Rahul, V. D., Panda, R. K., & D, L. (2019). A study on the root characters of maize hybrid germplasm lines under moisture deficit stress. *Int J Curr Microbiol App Sci*, *8*, 2836–2845.
- Rajabi Hamedani, S., Roupheal, Y., Colla, G., Colantoni, A., & Cardarelli, M. (2020). Biostimulants as a Tool for Improving Environmental Sustainability of Greenhouse Vegetable Crops. *Sustainability*, *12*, 5101.
- Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W.-N., & Biswas, P. (2015). Mechanistic Evaluation of Translocation and Physiological Impact of Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles on the Tomato (*Solanum lycopersicum* L. *Plant. Metallomics*, *7*, 1584–1594.
- Rasmann, S., Köllner, T. G., Degenhardt, J., Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., & Turlings, T. C. (2005). Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, *434*(7034), 732–737.
- Rauf, M., Munir, M., & M, H. (2007). Performance of wheat genotypes under osmotic stress at germination and early seedling growth stage. *Afri J Biotechnol*, *6*, 971–975.

- Ray, D. K., West, P. C., & M, C. (2019). Climate change has likely already affected global food production. *Plos One*, *14*.
- Razzaghi, F., Ahmadi, S. H., Adolf, V. I., Jensen, C. R., Jacobsen, S. E., & Andersen, M. N. (2011). Water relations and transpiration of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under salinity and soil drying. *Journal of agronomy and crop science*, *197*(5), 348-360.
- Ren, X., He, Z., Peng, H., Zhang, J., Wang, S., Zhao, Y., ... Ma, C. (2021). Biocon of Corn Steep Liquor to Biofertilizer by Symbiotic Fermentation. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, *17*(4), 478–489.
- Rivelli, A. R., James, R. A., & R, M. (2002). Effect of salinity on water relations and growth of wheat genotypes with contrasting sodium uptake. *Funct Plant Biol*, *29*, 1065–1074.
- Rivero, R. M., Ruiz, J. M., Garcia, P. C., López-Lefebvre, L. R., Sánchez, E., & Romero, L. (2001). Resistance to cold and heat stress: Accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci*, *160*, 315–321.
- Rouphael, Y., & Colla, G. (2018). Synergistic biostimulatory action: Designing the next generation of plant biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1655.
- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., & Colla, G. (2017). Synergistic Action of a Microbial-Based Biostimulant and a Plant-Derived Protein Hydrolysate Enhances Lettuce Tolerance to Alkalinity and Salinity. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 131.
- Rouphael, Y., Giordano, M., Cardarelli, M., Cozzolino, E., Mori, M., Kyriacou, M., ... Colla, G. (2018). Plant-and seaweed-based extracts increase yield but differentially modulate nutritional quality of greenhouse spinach through biostimulant action. *Agronomy*, *8*, 126.

- Ruzzi, M., & Aroca, R. (2015). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Act as Biostimulants in Horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 124–134.
- Safdar, H., Amin, A., Shafiq, Y., Ali, A., Yasin, R., Sarwar, M. I. A. S., & Hussan, M. U. (2019). Impact of salinity on plant growth: A review. *Nat. Sci*, 1, 34–40.
- Sagardoy, R., Vázquez, S., & I, F.-S. (2010). Stomatal and mesophyll conductances to CO₂ are the main limitations to photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*) plants grown with excess zinc. *New Phytol*, 187, 145–158.
- Sahin, U., Ekinci, M., Ors, S., Turan, M., Yildiz, S., & Yildirim, E. (2018). Effects of Individual and Combined Effects of Salinity and Drought on Physiological, Nutritional and Biochemical Properties of Cabbage (*Brassica Oleracea* Var. *Capitata*). *Sci. Hortic*, 240, 196–204.
- Saini, H. S. (1997). Effects of water stress on male gametophyte development in plants. *Sex Plant Reprod*, 10, 67–73.
- Salam, L. B., & Ishaq, A. (2019). Biostimulation potentials of corn steep liquor in enhanced hydrocarbon degradation in chronically polluted soil. *3 Biotech*, 9(2), 46.
- Sánchez-Blanco, M. J., Rodríguez, P., & E, O. (2004). Differences in the effects of simulated sea aerosol on water relations, salt content, and leaf ultrastructure of rock-rose plants. *J Environ Qual*, 33, 1369–1375.
- Sar, S., Kim, H. K., Meissner, A., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy for plant metabolite profiling. In ed., W. Weckwerth, & G. Kahl (Eds.), *The Handbook of Plant Metabolomics* (pp. 57–76). Wiley-VCH: Weinheim.

- Sariñana-Aldaco, O., Benavides-Mendoza, A., Robledo-Olivo, A., & González-Morales, S. (2022). The Biostimulant Effect of Hydroalcoholic Extracts of *Sargassum* spp. in Tomato Seedlings under Salt Stress. *Plants*, *11*, 3180.
- Savitch, L. V., Ivanov, A. G., & L, G.-S. (2011). Cold stress effects on PSI photochemistry in *Zea mays*: differential increase of FQR-dependent cyclic electron flow and functional implications. *Plant Cell Physiol*, *52*, 1042–1054.
- Scanga, S. E., Hasanspahić, B., Zvorničanin, E., Samardžić Koženjić, J., Rahme, A. K., & Shinn-Thomas, J. H. (2018). Erythritol, at insecticidal doses, has harmful effects on two common agricultural crop plants. *PLoS One*, *13*(4), 0192749.
- Sekoai, P. T., Ayeni, A. O., & Daramola, M. O. (2018). Parametric optimization of citric acid production from apple pomace and corn steep liquor by a wild type strain of *Aspergillus niger*: A response surface methodology approach. *International Journal of Engineering Research in Africa*, *36*, 98–113.
- Semida, W. M., Abdelkhalik, A., Rady, M. O., Marey, R. A., & Abd El-Mageed, T. A. (2020). Exogenously applied proline enhances growth and productivity of drought stressed onion by improving photosynthetic efficiency, water use efficiency and up-regulating osmoprotectants. *Scientia Horticulturae*, *272*, 109580.
- Sethy, S. K., & Ghosh, S. (2013). Effect of heavy metals on germination of seeds. *J Nat Sci Biol Med*, *4*, 272–275.
- Sfaxi-Bousbih, A., Chaoui, A., & El Ferjani, E. (2010). Cadmium impairs mineral and carbohydrate mobilization during the germination of bean seeds. *Ecotoxicol Environ Saf*, *73*, 1123–1129.
- Sgroppo, S. C., & Sosa, C. A. (2021). Zapallo anco (*Cucurbita moschata*, D.) fresco cortado tratado con luz UV-C. *FacENA*, *25*, 7–19.

- Shahid, M. A., Sarkhosh, A., Khan, N., Balal, R. M., Ali, S., Rossi, L., ... Garcia-Sanchez, F. (2020). Insights into the Physiological and Biochemical Impacts of Salt Stress on Plant Growth and Development. *Agronomy*, *10*, 938.
- Sharma, H. S. S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. R., & Martin, T. (2014). Plant Biostimulants: A Review on the Processing of Macroalgae and Use of Extracts for Crop Management to Reduce Abiotic and Biotic Stresses. *Journal of Applied Phycology*, *26*, 465–490.
- Sharma, R. R., Datta, S. C., & Varghese, E. (2018). Effect of Surround WP®, a Kaolin-Based Particle Film on Sunburn, Fruit Cracking and Postharvest Quality of ‘Kandhari’ Pomegranates. *Crop Prot*, *114*, 18–22.
- Shin, H. D., McClendon, S., Le, T., Taylor, F., & Chen, R. R. (2006). A complete enzymatic recovery of ferulic acid from corn residues with extracellular enzymes from *Neosartorya spinosa* NRRL 185. *Biotechnol. Bioeng*, *95*, 1108–1115.
- Shivanna, K. (1985). The role of the pistil in screening compatible pollen. *Theor Appl Genet*, *70*, 684–686.
- Siddique, M., Hamid, A., & Islam, M. (2000). Drought stress effects on water relations of wheat. *Bot Bull Acad Sinica*, *41*.
- Singh, M., Kumar, J., & S, S. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Rev Environ Sci Bio/Technol*, *14*, 407–426.
- Singh, S., Prasad, S., & V, Y. (2018). Effect of drought stress on yield and yield components of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, *7*, 2752–2759.
- Sita, K., & Kumar, V. (2020). Role of Gamma Amino Butyric Acid (GABA) against abiotic stress tolerance in legumes: a review. *Plant Physiology Reports*, *25*, 654–663.

- Smiri, M., Chaoui, A., & N, R. (2011). Cadmium affects the glutathione/glutaredoxin system in germinating pea seeds. *Biol Trace Elem Res*, *142*, 93–105.
- Soleimani, A., Ahmadikhah, A., & Soleimani, S. (2009). Performance of different greenhouse cucumber cultivars (*Cucumis sativus* L.) in southern Iran. *African Journal of Biotechnology*, *8*(17).
- Soloklui, A. A. G., Ershadi, A., & Fallahi, E. (2012). Evaluation of Cold Hardiness in Seven Iranian Commercial Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars. *HortScience*, *47*, 1821–1825.
- Soppelsa, S., Kelderer, M., Testolin, R., Zanutelli, D., & Andreotti, C. (2020). Effect of biostimulants on apple quality at harvest and after storage. *Agronomy*, *10*, 1214.
- Srinivasan, A., Saxena, N., & Johansen, C. (1999). Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): genetic variation in gamete development and function. *Field Crops Res*, *60*, 209–222.
- Stewart Jr, C., Mazourek, M., Stellari, G. M., O'Connell, M., & Jahn, M. (2007). Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *Journal of Experimental Botany*, *58*(5), 979-991.
- Strasser, R., Srivastava, A., & Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In ed., M. Yunus, U. Pathre, & P. Mohanty (Eds.), *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation* (pp. 443–480). Taylor: Francis.
- Su, L., Dai, Z., & S, L. (2015). A novel system for evaluating drought–cold tolerance of grapevines using chlorophyll fluorescence. *BMC Plant Biol*, *15*(82).

- Subramanian, K., Santhanakrishnan, P., & Balasubramanian, P. (2006). Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Sci Horti*, *107*, 245–253.
- Syvertsen, J., & Garcia-Sanchez, F. (2014). Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus. *Environ. Exp. Bot*, *103*, 128–137.
- Tack, J., Barkley, A., & Nalley, L. L. (2015). Effect of warming temperatures on US wheat yields. *Proc Natl Acad Sci*, *112*, 6931–6936.
- Takshak, S., & Agrawal, S. B. (2017). Exogenous Application of IAA Alleviates Effects of Supplemental Ultraviolet-B Radiation in the Medicinal Plant *Withania somnifera* Dunal. *Plant Biol. J*, *19*, 904–916.
- Talanova, V. V., Topchieva, L. V., & Titov, A. F. (2006). Effect of Abscisic Acid on the Resistance of Cucumber Seedlings to Combined Exposure to High Temperature and Chloride. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci*, *33*, 619–622.
- Tarkowski, Ł. P., Signorelli, S., & Höfte, M. (2020). Γ -Aminobutyric Acid and Related Amino Acids in Plant Immune Responses: Emerging Mechanisms of Action. *Plant Cell Environ*, *43*, 1103–1116.
- Tewksbury, J. J., Reagan, K. M., Machnicki, N. J., Carlo, T. A., Haak, D. C., Penaloza, A. L. C., & Levey, D. J. (2008). Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *105*, 11808–11811.
- Tezara, W., Mitchell, V., & S, D. (2002). Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *J Exp Bot*, *53*, 1781–1791.

- Thakur, P., Kumar, S., Malik, J. A., Berger, J. D., & Nayyar, H. (2010). Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, *67*(3), 429-443.
- The, S. V., Snyder, R., & Tegeder, M. (2021). Targeting nitrogen metabolism and transport processes to improve plant nitrogen use efficiency. *Front. Plant Sci*, *11*, 628366.
- Torre-González, A., Navarro-León, E., Albacete, A., Blasco, B., & Ruiz, J. M. (2017). Study of Phytohormone Profile and Oxidative Metabolism as Key Process to Identification of Salinity Response in Tomato Commercial Genotypes. *J. Plant Physiol*, *216*, 164–173.
- Tossi, V. E., Regalado, J. J., Iannicelli, J., Laino, L. E., Burrieza, H. P., Escandón, A. S., & Pitta-Álvarez, S. I. (2019). Beyond Arabidopsis: Differential UV-B Response Mediated by UVR8 in Diverse Species. *Front. Plant Sci*, *10*, 780.
- Traon, D., Amat, L., Zotz, F., & Jardin, P. (2014). *A Legal Framework for Plant Biostimulants and Agronomic Fertiliser Additives in the EU-Report to the European Commission*. DG Enterprise & Industry.
- Trevisan, S., Botton, A., Vaccaro, S., Vezzaro, A., Quaggiotti, S., & Nardi, S. (2011). Humic Substances Affect Arabidopsis Physiology by Altering the Expression of Genes Involved in Primary Metabolism, Growth and Development. *Environmental and Experimental Botany*, *74*, 45–55.
- Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., & Nardi, S. (2010). Humic Substances Biological Activity at the Plant-Soil Interface: From Environmental Aspects to Molecular Factors. *Plant Signaling & Behavior*, *5*, 635–643.
- Trevisan, S., Manoli, A., & Quaggiotti, S. (2019). A Novel Biostimulant, Belonging to Protein Hydrolysates, Mitigates Abiotic Stress Effects on Maize Seedlings Grown in Hydroponics. *Agronomy*, *9*, 28.

- Turan, M., Yildirim, E., Kitir, N., Unek, C., Nikerel, E., Ozdemir, B. S., ... Mokhtari, N. E. P. (2017). Beneficial Role of Plant Growth-Promoting Bacteria in Vegetable Production Under Abiotic Stress. In A. Zaidi & M. S. Khan (Eds.), *Microbial Strategies for Vegetable Production* (pp. 151–166). Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- Turlings, T. C., Tumlinson, J. H., & Lewis, W. J. (1990). Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*, *250*(4985), 1251–1253.
- Van Oosten, M. J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S., & Maggio, A. (2017). The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *4*, 1-12.
- Velikova, V., Tsonev, T., & C, B. (2009). BVOC emissions, photosynthetic characteristics and changes in chloroplast ultrastructure of *Platanus orientalis* L. exposed to elevated CO₂ and high temperature. *Environ Pollut*, *157*, 2629–2637.
- Velmurugan, A., Swarnam, P., Subramani, T., Meena, B., & Kaledhonkar, M. (2020). Water Demand and Salinity. *Desalination-Challenges and Opportunities*, *3*, 1–12.
- Wahid, A., & Close, T. (2007). Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biol Plant*, *51*, 104–109.
- Wang, G. N., Shi, B. Y., Zhang, P., Zhao, T. B., Yin, H. S., & Qiao, C. S. (2020). Effects of corn steep liquor on β -poly(l-malic acid) production in *Aureobasidium melanogenum*. *AMB Express*, *10*(1), 211.
- Wang, L., Li, X., Gao, F., Liu, Y., Lang, S., Wang, C., & Zhang, D. (2023). Effect of ultrasound combined with exogenous GABA treatment on polyphenolic metabolites and antioxidant activity of mung bean during germination. *Ultrason Sonochem*, *94*, 106311.

- Wang, W. B., Kim, Y. H., & Hs, L. (2009). Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiol Biochem*, *47*, 570–577.
- Wang, Y., Liu, S., Yang, X., Zhang, J., Zhang, Y., Liu, X., ... Wang, H. (2022). Effect of germination on nutritional properties and quality attributes of glutinous rice flour and dumplings. *J. Food Compos. Anal*, *108*, 104440.
- Wani, S., Kumar, V., & V, S. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop J*, *4*, 162–176.
- Waqas, M. A., Kaya, C., & A, R. (2019). Potential mechanisms of abiotic stress tolerance in crop plants induced by thiourea. *Front Plant Sci*, *10*(1336).
- Wardlaw, I., & Wrigley, C. (1994). Heat tolerance in temperate cereals: an overview. *Funct Plant Biol*, *21*, 695–703.
- Welfare, K., Yeo, A. R., & Flowers, T. J. (2002). Effects of salinity and ozone, individually and in combination, on the growth and ion contents of two chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties. *Environ Pollut*, *120*, 397–403.
- Wet, C. (2006). Corn Wet Milled Feed Products. *J. Corn Refiners Assoc*, *5*, 1–33.
- Wijewardana, C., Reddy, K. R., & Lj, K. (2019). *Drought stress has transgenerational effects on soybean seed germination and seedling vigor*.
- Wolf, B. (1982). A comprehensive system of leaf analyses and its use for diagnosing crop nutrient status. *Commun. Soil Sci. Plan*, *13*, 1035–1059.
- Wu, Y., & Cosgrove, D. J. (2000). Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *J Exp Bot*, *51*, 1543–1553.

- Xi, Y. L., Chen, K. Q., Dai, W. Y., Ma, J. F., Zhang, M., Jiang, M., ... Ouyang, P. K. (2013). Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 using corn steep liquor powder as nitrogen source. *Bioresour. Technol*, *136*, 775–779.
- Xiao, X., Hou, Y. Y., Du, J., Liu, Y., Liu, Y. J., Dong, L. Y. L., & A, G. (2012). Determination of main categories of components in corn steep liquor by near-infrared spectroscopy and partial least-squares regression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(32), 7830–7835.
- Xiao, X., Hou, Y. Y., Liu, Y., Liu, Y. J., Zhao, H. Z., Dong, L. Y. L., & A, G. (2013). Classification and analysis of corn steep liquor by UPLC/Q-TOF MS and HPLC. *Talanta*, *107*, 344–348.
- Xu, G., Fan, X., & Miller, A. J. (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual review of plant biology*, *63*, 153-182.
- Xu, H., Biswas, D., & Wd, L. (2007). Photosynthesis and yield responses of ozone-polluted winter wheat to drought. *Photosynthetica*, *45*, 582–588.
- Xu, L., & Geelen, D. (2018). Developing Biostimulants from Agro-Food and Industrial By-Products. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1567.
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in Plant Science*, *7*.
- Yan, L., Shah, T., & Y, C. (2019). Physiological and molecular responses to cold stress in rapeseed (*Brassica napus* L.). *J Integ Agric*, *18*, 2742–2752.
- Yang, A., Akhtar, S., & M, A. (2016). Growth and physiological responses of quinoa to drought and temperature stress. *J Agron Crop Sci*, *202*, 445–453.

- Yemm, E. W., & Cocking, E. C. (1955). The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, *80*, 209–213.
- Younis, A., Akhtar, M. S., Riaz, A., Zulfiqar, F., Qasim, M., Farooq, A., ... Bhatti, Z. M. (2018). Improved cut flower and corm production by exogenous moringa leaf extract application on gladiolus cultivars. *Acta Sci. Pol*, *17*, 25–38.
- Yu, B., Ming, F., Liang, Y., Wang, Y., Gan, Y., Qiu, Z., ... & Cao, B. (2022). Heat stress resistance mechanisms of two cucumber varieties from different regions. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1817.
- Zahedi, M., Sharma, R., & Jenner, C. F. (2003). Effects of high temperature on grain growth and on the metabolites and enzymes in the starch-synthesis pathway in the grains of two wheat cultivars differing in their responses to temperature. *Funct Plant Biol*, *30*, 291–300.
- Zamljem, T., Medic, A., Veberic, R., Hudina, M., Grohar, M. C., & Slatnar, A. (2023). Influence of hydrolyzes animal protein-based biostimulant on primary, soluble and volatile secondary metabolism of Genovese and Greek-type basil grown under salt stress. *Sci. Horti*, *319*, 112178.
- Zarei, S., Khodaiyan, F., Hosseini, S. S., & Kennedy, J. F. (2020). Pullulan production using molasses and corn steep liquor as agroindustrial wastes: Physiochemical, thermal and rheological properties. *Applied Food Biotechnology*, *7*(4), 263–272.
- Zarzecka, K., Gugala, M., Mystkowska, I., & Sikorska, A. (2020). Total and true protein content in potato tubers depending on herbicides and biostimulants. *Agronomy*, *10*, 1106.
- Zhang, J., Zhou, J. W., Liu, J., Chen, K. J., Liu, L. M., & Chen, J. A. (2011). Development of chemically defined media supporting high cell density growth of *Ketogulonicigenium vulgare* and *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, *102*(7), 4807–4814.

- Zhang, X., Wang, X., Zhang, W., & Chen, Q. (2023). Combined Application of Myo-Inositol and Corn Steep Liquor from Agricultural Waste Alleviate Salt Stress in *Brassica rapa*. *Plants*, *12*(24), 4110.
- Zhao, Q., Ma, Y., Huang, X., Song, L., Li, N., Qiao, M., & Cheng, Y. (2023). GABA application enhances drought stress tolerance in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L. *Plants*, *12*(13), 2495.
- Zhou, K., Yu, J., Ma, Y., Cai, L., Zheng, L., Gong, W., & Liu, Q. A. (2022). Corn Steep Liquor: Green Biological Resources for Bioindustry. *Appl. Biochem. Biotechnol*, *194*, 3280–3295.
- Zhu, M. M., Liu, E. Q., Bao, Y., Duan, S. L., She, J., Liu, H., & Guo, X. T. (2019). Low concentration of corn steep liquor promotes seed germination, plant growth, biomass production and flowering in soybean. *Plant Growth Regulation*, *87*, 29–37.
- Zou, P., Yang, X., Yuan, Y., Jing, C., Cao, J., Wang, Y., ... Li, Y. (2021). Purification and characterization of a fucoidan from the brown algae *Macrocystis pyrifera* and the activity of enhancing salt-stress tolerance of wheat seedlings. *Int. J. Biol. Macromol*, *180*, 547–558.
- Zulfiqar, F., Casadesús, A., Brockman, H., & Munné-Bosch, S. (2020). An overview of plant-based natural biostimulants for sustainable horticulture with a particular focus on moringa leaf extracts. *Plant Sci*, *295*, 110194.

11. ANEXO (PUBLICACIONES)



| 11.1. PUBLICACIÓN 1 |
|---|
| Physiological Study of the Efficacy of Archer® Eclipse in the Protection against Sunburn in Cucumber Plants |
| Iván Navarro-Morillo, Francisco Garcia-Sanchez, Jose Maria Camara-Zapata, Eloy Navarro-León, María José Izquierdo-Ramos, Begoña Blasco and Juan Manuel Ruiz |
| <i>Horticulturae</i> 2022, 8, 500 |
| Factor de impacto: 2,923 Q1 (2022) (Categoría Agricultural and Biological Sciences) |

Physiological Study of the Efficacy of Archer® Eclipse in the Protection against Sunburn in Cucumber Plants

Iván Navarro-Morillo¹, Francisco Garcia-Sanchez^{2,*}, Jose Maria Camara-Zapata³, Eloy Navarro-León⁴, María José Izquierdo-Ramos⁴, Begoña Blasco⁴ and Juan Manuel Ruiz⁴

1. R + D Department of Atlántica Agrícola, 03400 Villena, Spain; inavarro@atlanticaagricola.com
2. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 30100 Murcia, Spain
3. Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH),
4. Miguel Hernández University, 03312 Orihuela, Spain; jm.camara@umh.es
5. Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain; enleon@ugr.es (E.N.-L.); mariajoseir@correo.ugr.es (M.J.I.-R.); bblasco@ugr.es (B.B.); jmrs@ugr.es (J.M.R.)

*Correspondence: fgs@cebas.csic.es

Abstract

Sunburn is an important issue affecting the yield of many crops, mainly in arid and semi-arid regions. Excessive solar radiation and high temperatures can reduce growth and cause leaf chlorosis, oxidative stress, and photosynthesis impairment. It is thus necessary to develop agricultural techniques to protect plants in a cost-effective and reproducible manner. A potential method is through the spray of protective compounds based on particulate films, such as those based on kaolin. The objective of this study is to evaluate the effects of spraying the protective product Archer® Eclipse, created by Atlántica Agrícola S.A. (Alicante, Spain), on sunburn damage in a sensitive species such as the cucumber plants (*Cucumis sativus* L.). To evaluate the effects of sunburn on the plants, parameters related to biomass, leaf temperature, photosynthesis, and oxidative stress were analysed. Plants sprayed with Archer® Eclipse showed fewer sunburn symptoms and obtained 43 % more shoot biomass than those that were not treated. In addition, plants sprayed with Archer® Eclipse showed 3 °C lower leaf temperatures, higher photosynthesis

performance, 88 % more water use efficiency, and 21 % more chlorophyll concentration. Finally, plants treated with Archer® Eclipse presented 6 % less accumulations of carotenoids and 67 % less total phenols, but lower oxidative stress indicators. In conclusion, this study confirms the efficiency of Archer® Eclipse in protecting a sensitive vegetable plant such as the cucumber from sunburn-inducing conditions.

Keywords: *Cucumis sativus*; kaolin; sun protector; reactive oxygen species; photo-oxidative stress

1. INTRODUCTION

Injuries caused by what is commonly referred to as “sunburn” on many plants are major problems that affect the yield of many crops, mainly in arid and semi-arid regions [1]. These areas are characterised by high solar radiation and elevated temperatures during the crops’ growing season [2]. In addition, in the coming years, climate change will increase both temperature and drought and this, in turn, will increase the frequency of sunburn in plants, bringing about a loss in terms of production and profits in agricultural systems [2].

Solar damage in plant tissues, caused by excessively high temperatures and light irradiation, generates photo-oxidative stress due to the high accumulation of ROS (a phenomenon called photo-oxidation) and leads to the manifestation of typical sunburn symptoms [3]. These symptoms include tissue discoloration, yellowing, browning, and necrosis in cases of severe damage [4]. Chlorophyll (Chl) concentrations decrease, while other pigments, such as xanthophyll carotenoids, increase, leading to the symptoms being visualised [4]. Indeed, the Chl content of leaves was one of the most important physiological characteristics that were altered under this type of stress, and it is considered one of the most important indicators of sunburn in plants [4]. Furthermore, under environmental conditions of sunburn, a loss of Chl causes a reduction in light absorption by the plant and, therefore, the generation of ROS and photo-oxidative stress [1]. On the other hand, some defence mechanisms against photo-oxidative stress described in plants have been: (i) a change in the redox state and (ii) the regulation and induction of antioxidant metabolites by increasing the activity of antioxidant enzymes and the accumulation of phenolic compounds that act as protectors [5].

To mitigate “sunburn” effects, it is necessary to develop and implement the use of agricultural techniques to protect plants from both extreme solar radiation and high temperatures, doing so at a low financial cost. Some solutions include the use of coloured nets to cast shade on crops and sprinkler irrigation systems that cool the crops to counteract the effects of high summer temperatures [6,7,8]. However, some problems with these systems are that they require a large amount of technology, the availability of good quality water, and they are expensive, as well as having a secondary effect on the spread and appearance of some diseases.

In recent years, the direct application to plants of protective compounds, mostly based on the use of particle films, has been proposed as a new tool that is useful and effective in the prevention of sunburn [9]. Thus, several studies have delved into this technique in different crops, confirming the effectiveness of these compounds in protecting plant tissues, leaves, and fruits from extreme solar radiation and high temperatures [10].

In terms of the protective compounds based on the use of particulate films, one of the most widely used is kaolin, which consists of a crumbly clay that is rich in the mineral kaolinite, whose chemical composition is $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$. Once sprayed as a suspension on the leaf surface, water evaporates to leave behind a protective particle film. To obtain the desired results on plant tissue, an effective particle film must have certain characteristics. In particular, the mineral particle must have a diameter $< 2 \mu\text{m}$, it must be formulated to spread and create a uniform film, it should transmit photosynthetically active radiation but exclude ultraviolet and infrared radiation to some extent, it should not interfere with gas exchange from plant organs, and, of fundamental importance, it must be removable from harvested commodities [11].

Foliar spraying of kaolin on different woody plants improved their growth rate and increased their leaf Chl content, as compared to non-treated plants [12]. Overall, the protective effect of kaolin is due to an increase in reflected light reaching the surface of plant tissues, which prevents overheating, thus significantly reducing damage by severe sunburn [12]. Moreover, kaolin should be applied before high temperatures are experienced and it must be reapplied to protect new growth or after a heavy rain [11].

The use of protective compounds against sunburn could prove to be an essential and low-cost tool to improve the yield and quality of crops subjected to long periods of extreme solar radiation and high temperatures. Therefore, the objective of this study was to evaluate the efficacy of the protective product Archer® Eclipse, created by the company Atlántica Agrícola S.A., against experimentally induced sunburn conditions. The species used was the cucumber (*Cucumis sativus* L.), which is a sensitive species that is usually grown in the summer period and is, therefore, subjected to conditions of high solar radiation and high temperatures during its development.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant Material and Growth Conditions

Cucumber plants (*C. sativus* L. cv. Prior) were used for the experiment. The seeds were germinated and grown for 35 days in a seedbed. Subsequently, the seedlings were transferred to a culture chamber under controlled conditions with a relative humidity of 60–80 % (day/night), temperature of 25 °C/15 °C (day/night), and a 16 h/8 h photoperiod with a PPF (photosynthetic photon-flux density) of $350 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ (measured with an SB quantum 190 sensor, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). Under these conditions, the plants were grown in a tray with cells (cell size,

3 cm × 3 cm × 10 cm) filled with a peat:perlite mixture. Fertigation consisted in a complete Hoagland-type nutrient solution, with minor modifications for cucumber cultivation, consisting of: 4 mM KNO₃, 2 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 2 μM MnCl₂, 1 μM ZnSO₄, 0.25 μM CuSO₄, 0.1 μM Na₂MoO₄, 125 μM Fe-EDDHA, and 50 μM H₃BO₃, with a pH of 5.8, applied when needed, according to the requirements of the plants. The plants were watered with 100 mL of water each, when needed.

2.2. Description of the Treatments and Experimental Design

After 35 days, the experiment began with the implementation of the specific condition to generate “sunburn”. This condition consisted of illuminating the plants with high-pressure sodium vapor lamps (SONLIGHT HPS-TS 600W). These lamps were placed at a height of about 60–90 cm from the plant to obtain a level of illumination (PPFD) higher than 1200 μmol m⁻² s⁻¹. These conditions were set daily for a period of 5 h, starting at 12:00 p.m. and ending at 5:00 p.m. The plants were separated into two groups. One group was sprayed with a homogenous layer of Archer[®] Eclipse (2 %, v/v) via a foliar spraying technique just one time, and each plant in this group was treated with an amount of 50 mL of spraying solution once the high light and temperature conditions had started. The other group, which was considered the control group, was not sprayed. The experimental design included a complete randomised block with nine plants per treatment arranged in individual cells on trays, with the treatments being randomly distributed in the culture chamber. Archer[®] Eclipse was formulated with calcium (Ca) and zinc (Zn) salts, as well as vegetal extract coming from co-products from the corn processing industry (corn steep liquor, CSL, as a nitrogen source). CSL is a viscous liquid mixture consisting entirely of the water-soluble components of corn steeped in water. The steeping process starts with soaking corn grain in open tanks at 45 to 52 °C for 40 to 48 h. Sulphur dioxide (SO₂) is added to prevent fungi growth and to aid in solubilising the material. Initial concentrations of SO₂ are between 0.1 and 0.2 % (pH 3.8 to 4.5) and decrease to 0.05 % and 0.01 % after 5 and 10 h, respectively. Active fermentation occurs in the steep water, and lactic acid bacterial populations increase as SO₂ concentrations decrease. This separates the starch from the gluten, solubilises and breaks down proteins, and softens the corn to facilitate grinding. The amino acid and peptide rich steep liquor is collected and concentrated. This vegetal extract contains (μg g⁻¹): 4-aminobutyrate (33.20), alanine (311.58), asparagine (70.26), isoleucine (48.43), leucine (103.24), valine (76.99), 3-phenyllactate (46.94), 4-hydroxyphenylacetate (100.16), formate (2.67), lactate (2487.15), indoleacetic acid (7.48), choline (28.96), and trigonelline (3.15). This analysis was performed via nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR): Ascend 500 MHz AVANCE III HD H–NMR (Bremen, Germany). The resulting spectra were evaluated with the programme ‘Chenomx NMR Suite’, version 8.3, and a LC/MSD Trap, version 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

2.3. Plant Sampling

At the end of the experiment, 15 days after the application of sunburn-inducing conditions (das) (when the appearance of sunburn symptoms on leaves was clearly detected), subsamples of plant material were harvested just after daily sunburn treatment was finished. These subsamples were then washed with Milli-Q water and dried on filter paper to obtain fresh weight (FW). Other subsamples were frozen at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ and used for the biochemical analysis. All the plants were harvested and dried in a forced-air oven to determine the dry weight (DW).

2.4. Leaf Temperature and Thermographic Images

Both leaf temperature and thermographic images were taken directly using the HTi Thermal Imaging Camera, model HT-19. The data reported are from the last day of the experiment [13]. Leaf temperature was measured in one leaf of every plant (9 plants per treatment) and randomly in 6 more leaves to increase sample size.

2.5. Gas Exchange Measurements

Measurements were recorded using a LICOR 6800 Portable Photosynthesis System infrared gas analyser (IRGA: LI-COR Inc. Lincoln, NE, USA). Intermediate leaves were placed in the measuring cuvettes under optimal growth conditions. Prior to use, the instrument was warmed for 30 min and calibrated. Measurements used standard optimum cuvette conditions at $500\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation (PAR) and $400\text{ }\mu\text{mol mol}^{-1}$ of CO_2 concentration, and ambient leaf temperature and relative humidity. Net photosynthetic rate, transpiration rate, and stomatal resistance were recorded simultaneously. The data were stored in the LICOR device and analysed using the “Photosyn Assistant” software. Instantaneous water use efficiency (WUE) was calculated by dividing the net photosynthetic rate (A_{CO_2}) by the corresponding transpiration rate (E_{leaf}). The data reported are from the last day of the experiment [14].

2.6. Chl a Fluorescence Analysis

Plants were adapted to 30 min of darkness before taking the measurements, using a special leaf clip placed on each leaf. The kinetics of Chl a fluorescence were determined using the Handy PEA Chlorophyll Fluorimeter (Hansatech Ltd., King’s Lynn, Norfolk, UK); OJIP phases were induced by red light (650 nm), with a light intensity of $3000\text{ }\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. OJIP fluorescence phases were analysed using the JIP test [15]. Measurements were performed on fully developed leaves at the mid-plant position of nine plants per treatment. The following parameters obtained from the JIP test were used to study energy fluxes and photosynthetic activity: initial fluorescence (F_0), maximum fluorescence (F_m), variable fluorescence ($F_v = F_m - F_0$), performance index (PI_{ABS}), the ratio of active reaction centres (RC) (RC/ABS), and the Ψ_{E_0} value, indicating electron output primarily from photosystem II (PSII) [15].

2.7. Concentration of Chls and Carotenoids

The concentrations of Chls and carotenoids were analysed according to [16] with some modifications. Plant material, 0.1 g, was ground with 1 mL of methanol. Subsequently, it was centrifuged for 5 min at 5000× g. The absorbance was measured at three different wavelengths: 666 nm, 653 nm, and 470 nm, and the following calculations were performed based on the following equations:

$$\text{Chl a (Chl a)} = 15.65 \times A_{666\text{nm}} - 7.34 \times A_{653\text{nm}} \quad (1)$$

$$\text{Chl b (Chl b)} = 27.05 \times A_{653\text{nm}} - 11.21 \times A_{666\text{nm}} \quad (2)$$

$$\text{Carotenoids} = (1000 \times A_{470\text{nm}} - 2.86 \times \text{Chl a} - 129.2 \times \text{Chl b})/221 \quad (3)$$

2.8. Electrolyte Leakage

Cell membrane stability was determined by performing the electrical conductivity (EC) test [17]. For this purpose, 0.3 g of fresh plant material was weighed, cut into pieces, lightly washed with deionised water, and placed in a test tube, after which 30 mL of deionised water was added. The tubes were shaken in a vortex for 1 min. The initial conductivity (EC1) was measured using a conductivity meter (Cond 8; XS Instruments, Carpi, Italy). Subsequently, the tubes were incubated in a water bath at a temperature of 100 °C for 20 min to extract the released electrolytes and they were allowed to cool to room temperature. Next, the final conductivity (EC2) was measured. The percentage of electrolyte loss was calculated using the following formula: $(\text{EC1}/\text{EC2}) \times 100$.

2.9. Determination of the Concentration of Oxidative Indicators (Malondialdehyde (MDA), H_2O_2 , and O_2^-)

MDA concentration was determined in accord with [18]. Fresh material was extracted with TBA + TCA and, after extraction, absorbance was recorded at 532 nm and 600 nm to correct for turbidity. The H_2O_2 concentration was measured colorimetrically according to [19], based on the reaction with KI and reading absorbance at 350 nm. For O_2^- determination, the method described by [20] was followed. The method was based on the reaction with hydroxylamine, sulfanilic acid, and α -1-naphthylamine. Colour intensity was measured at 530 nm.

2.10. Determination of Total Phenol Concentration

Total phenols from plant tissue were extracted with methanol. The content was quantified at an absorbance of 765 nm using the Folin–Ciocalteu reagent [21]. The phenol concentration was obtained using a caffeic acid standard curve.

2.11. Statistical Analysis

The results were statistically evaluated with an analysis of variance (one-way ANOVA), with a 95 % confidence interval. All the biochemical analyses were repeated three times and their average was considered one experimental unit. All physiological measurements were taken from one leaf per plant. Thus, the average was obtained from nine experimental units ($n = 9$). Leaf temperature, however, was measured on 15 single leaves per treatment ($n = 15$). Differences between the means of the two treatments were compared using Fisher's least significant difference (LSD) test at a 95 % probability level. Significance levels were expressed as: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; and NS not significant. The experiment was replicated twice and no significant differences were found between the two replications. Data were from the first experiment.

3. RESULTS

3.1. Visual Symptoms and Biomass

High light treatment ($1.200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 5 h per day caused sunburn symptoms in the leaves of both treated and non-treated plants. Thus, cucumber plants from both treatments showed leaf margin chlorosis and chlorotic spots. However, these symptoms were much more severe in the plants that did not receive the sunblock treatment. Indeed, Archer® Eclipse plants showed leaves that were greener than those from non-treated plants (Figure 1). In addition, the average shoot biomass per plant was significantly higher in plants treated with Archer® Eclipse when compared to the control plants (Figure 2).

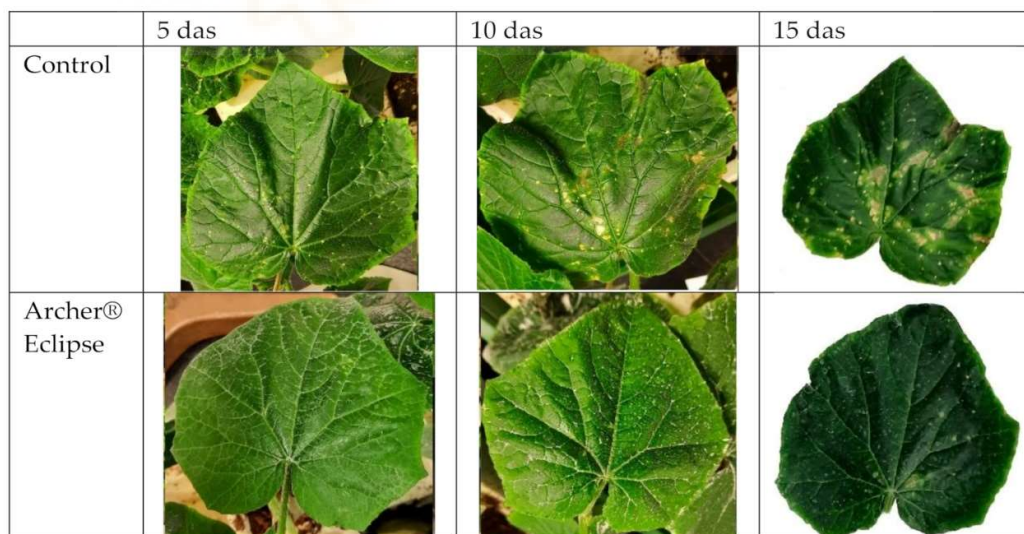


Figure 1. Appearance of leaves in the different treatments, in sampling days, after the application of sunburn-inducing conditions.

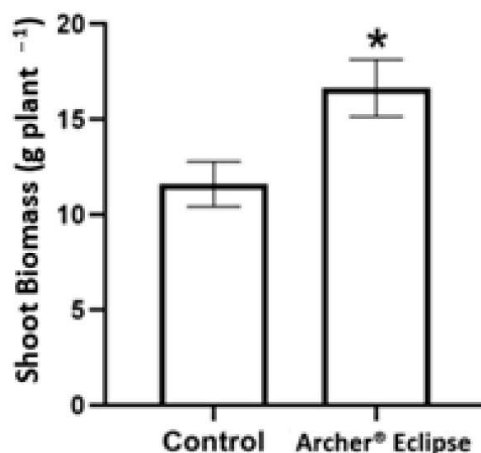


Figure 2. Average shoot biomass of control plants and plants treated with Archer® Eclipse. Values are means \pm standard error ($n = 9$). Differences between means were compared with Fisher's least significant difference test (LSD; $p = 0.05$). The levels of significance were represented by $p < 0.05$ (*).

3.2. Leaf Temperature

The thermographic study showed that, before the application of high light intensity (time 0 h), the recorded temperature was similar in the plants from both treatments (17–18 °C). When light intensity increased, there was an increase in cucumber plant leaf temperature in the treated and non-treated plants. However, plants treated with Archer® Eclipse showed a lower average temperature in comparison with control plants. Indeed, in the treated plants, the temperature was, on average, 3 °C lower at 2.5 h, and 3.5 °C lower at 5 h, as compared to the control plants (Figure 3). The maximum leaf temperature reached values of 47 °C in the non-treated plants at 5 h after the application of high light intensity had started.

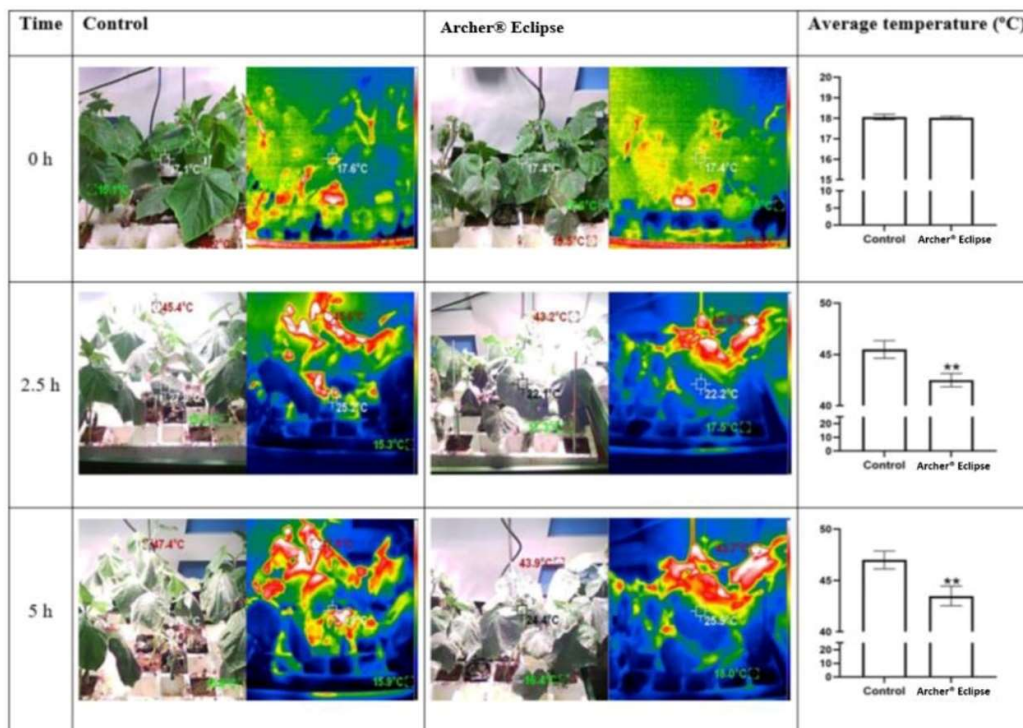


Figure 3. Thermographic images and average temperature at 0 h, 2.5 h, and 5 h from the beginning of the application of sunburn conditions. Values are means \pm standard error ($n = 15$). Differences between means were compared with Fisher's least significant difference test (LSD; $p = 0.05$). The levels of significance were represented by $p < 0.01$ (**).

3.3. Photosynthetic Parameters

The leaf gas exchange parameters showed that the Archer® Eclipse treatment reduced stomatal conductance (g_s) and E_{leaf} values in comparison with the control plants. However, no differences regarding A nor C_i were observed between plants from either treatment. The WUE was higher in plants treated with Archer® Eclipse (Table 1). Considering the Chl a fluorescence parameters, Archer® Eclipse application enhanced the values of all analysed parameters in comparison with the values of the control plants (Table 2). Furthermore, the concentration of total Chl and the Chl a/b ratio was higher in plants treated with Archer® Eclipse, although these plants registered lower carotenoid concentrations, as compared to the control plants (Table 3).

Table 1. Gas exchange parameters of control plants and plants treated with Archer® Eclipse.

| | Gs (mol m ⁻² s ⁻¹) | Eleaf (mmol m ⁻² s ⁻¹) | C_i (μmol mol ⁻¹) | A_{CO2} (μmol m ⁻² s ⁻¹) | WUE (μmol mol ⁻¹) |
|-----------------|---|---|---|---|---|
| Control | 0.016 ± 0.002 | 0.56 ± 0.07 | 330.16 ± 62.52 | 0.61 ± 0.12 | 1.09 ± 0.09 |
| Treatment | 0.010 ± 0.004 | 0.33 ± 0.11 | 312.99 ± 47.32 | 0.67 ± 0.17 | 2.05 ± 0.24 |
| <i>p</i> -value | * | * | NS | NS | ** |

Table 2. Chl a fluorescence parameters of control plants and plants treated with Archer® Eclipse.

| | Fv/Fm | PI_{ABS} | RC/ABS | Ψ_{Eo} |
|-----------------|--------------|-------------------------|---------------|-----------------------|
| Control | 0.34 ± 0.11 | 2.52 ± 1.20 | 0.38 ± 0.22 | 0.47 ± 0.08 |
| Treatment | 0.83 ± 0.01 | 10.23 ± 1.09 | 1.00 ± 0.04 | 0.67 ± 0.01 |
| <i>p</i> -value | *** | *** | *** | *** |

Table 3. Total Chls and carotenoid concentrations in control plants and plants treated with Archer® Eclipse.

| | Total Chls (mg g ⁻¹ FW) | Chl <i>a/b</i> Ratio (-) | Carotenoids (mg g ⁻¹ PF) |
|-----------------|--|------------------------------------|---|
| Control | 0.373 ± 0.007 | 1.40 ± 0.03 | 0.169 ± 0.003 |
| Treatment | 0.454 ± 0.008 | 1.78 ± 0.01 | 0.159 ± 0.002 |
| <i>p</i> -value | *** | *** | ** |

3.4. Oxidative Stress Indicators and Total Phenol Concentration

Plants treated with Archer® Eclipse showed significantly lower EC percentage values, MDA, O₂⁻, and H₂O₂ concentrations, as compared to the control plants (Table 4). In addition, cucumber plants treated with Archer® Eclipse showed lower total phenol concentrations than the control plants (Figure 4).

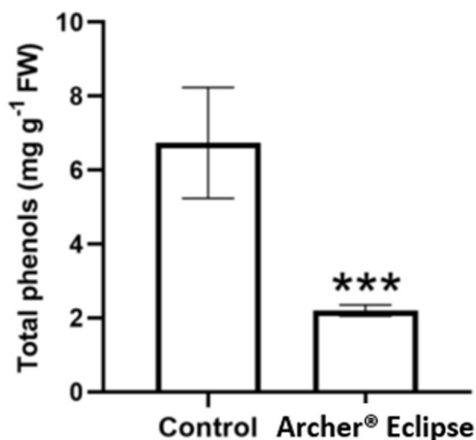


Figure 4. Total phenol concentrations in control plants and plants treated with Archer® Eclipse. Values are means \pm standard error ($n = 9$) and differences between means were compared with Fisher's least significant difference test (LSD; $p = 0.05$). The levels of significance were represented by $p < 0.05$ (*).

Table 4. EC percentage and MDA, O_2^- , and H_2O_2 concentrations in control plants and plants treated with Archer® Eclipse.

| | EC (%) | MDA ($\mu M g^{-1}$ FW) | O_2^- ($\mu g g^{-1}$ FW) | H_2O_2 ($\mu g g^{-1}$ FW) |
|-----------------|------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Control | 31.59 \pm 0.46 | 19.46 \pm 0.92 | 31.44 \pm 0.27 | 53.83 \pm 11.11 |
| Treatment | 17.26 \pm 0.57 | 5.61 \pm 0.38 | 16.27 \pm 0.44 | 10.97 \pm 4.35 |
| <i>p</i> -value | *** | *** | *** | *** |

4. DISCUSSION

Agronomic crops, such as the cucumber, whose growing period in the field occurs in the summer season under stressful conditions such as high degrees of light and temperatures, usually suffer sunburn symptoms that appear in the vegetative parts of the plants. The appearance of these symptoms on leaves generally causes a reduction in plant growth [1,22]. Indeed, biomass reductions under these stressful conditions have been well characterised in various plant types and organs [23,24]. In this experiment, it was reported that cucumber plants are very sensitive to simultaneous excess amounts of light and temperature, as the plants exposed to these conditions had damage in their leaves (Figure 1). However, the plants subjected to sunburn-inducing conditions and treated with Archer® Eclipse had no visual damage and presented the greatest shoot growth, as evidenced by the 43 % increase in biomass when compared with the non-treated plants. Hence, these results clearly prove the protective effect of Archer® Eclipse against high amounts of light and temperature stress. Another piece of evidence of the protective effect under

sunburn conditions was observed in the leaf Chl concentration. The plants treated with Archer® Eclipse had a higher total Chl concentration than the non-treated plants. The Chl content in leaves is one of the most important physiological characteristics that is altered under this type of stress, and it is considered one of the most important indicators of plants suffering sunburn [25].

The data from the thermographic images and leaf temperature measurements suggest that the application of Archer® Eclipse was effective in reducing leaf temperature under sunburn conditions, and this protective effect was maintained over time, thus avoiding leaf damage and favouring plant growth. One of the possible mechanisms of action of Archer® Eclipse is the reflection of a portion of the direct incident light that reaches the surface of plant tissues, preventing overheating and leaf damage. Cucumber plants are sensitive to temperature, and sunburn symptoms normally occur in plants subjected to temperatures above 35 °C [26]. Therefore, any agronomical techniques that are able to reduce the incident light under conditions of high environmental light could favour the growth of the plants. Several studies have also reported that some products formulated with kaolin and calcium sulphate are able to reflect a portion of the direct light radiation that reaches the surface of the plant tissue, preventing overheating and thereby sunburn symptoms [5,12]. In addition, Archer® Eclipse application could have reduced the quantity of UVB and UVC reaching the leaf due to the presence of indoleacetic acid (AIA) from the vegetal extracts that the product has. The authors in [27] report that AIA is a natural protector against these types of radiation, which damage DNA molecules by instigating dimerisation and ionisation of pyrimidines, resulting in disturbance of protein synthesis and disrupting of their structures [28,29]. Despite this temperature and light reduction in the leaves, Archer® Eclipse application had no effect on gas exchange regulation mechanisms, as A_{CO_2} and g_s were close to zero for both treated and non-treated plants. The daily stress period could have drastically decreased the A_{CO_2} and g_s , as cucumber plants are a thermophilic crop that grows optimally at 25 °C [30], but temperatures above 35–50 °C can lead to leaf damage and even dead tissue [31]. Under these conditions, it has been reported that both thermo-tolerant and thermo-sensitive cucumber species show decreased leaf gas exchange parameters, but only thermo-tolerant cucumber species restore functions to a relatively healthy level after high-temperature exposure [32]. Nevertheless, A_{CO_2} and g_s reduction in treated plants could be due to an adaption mechanism to high light and temperature favoured by Archer® Eclipse's application, since leaf damage was not observed and F_v/F_m , PIABS, RC/ABS, and Ψ_{EO} values were higher than in non-treated plants [15].

Non-treated plants, under high light and temperature conditions, increased their antioxidant response relative to plants treated with Archer® Eclipse, as suggested by the data from the Chl a/b ratio and the concentrations of carotenoids and phenols in the leaves. This could all suggest that non-treated plants suffered a greater stress intensity than the Archer® Eclipse plants. The Chl a/b

ratio, an indicator of environmental stress [25], was higher in treated than in non-treated plants, confirming that the treated plants suffered less stress. A decrease in this ratio indicates that the plants suffered a strong degree of oxidative stress and activated their antioxidant system to reduce ROS and turn part of Chl a into Chl b, as this is an O₂ consumption process which removes the aforementioned from the chloroplast. Carotenoids are another set of pigments related to light in plants. Non-treated plants had higher leaf carotenoid concentrations than the plants treated with Archer Eclipse. Changes in leaf carotenoid concentrations could be triggered by ROS accumulation [1,33]. Some of the most important antioxidant compounds in plants are phenols. These compounds appear to be essential as physiological mechanisms for protection against sunburn, as they are capable of absorbing excess light radiation, avoiding or reducing the photo-oxidation process, and directly detoxifying ROS [34]. Non-treated plants had a higher leaf phenol concentration than treated plants, indicating once again that the non-treated plants strongly activated their antioxidant system to cope with high light and temperature conditions. Therefore, non-treated plants, when compared with treated Archer® Eclipse plants, suffered from more intense stress, which led to an increase in the activity of antioxidant systems (lowered Chl a/b ratio and increased carotenoids and phenols). However, this was not enough to avoid oxidative damage, as indicated by high values of EC and MDA. One of the main effects of the massive presence of ROS in cells is the deterioration of the cell membranes, which leads to an increase in permeability and therefore the loss of electrolytes. The EC percentage and the MDA concentration are two parameters that are indicative of membrane degradation and lipid peroxidation, and the increase in their values suggests the excessive presence of ROS [35]. Thus, Archer® Eclipse foliar application avoided ROS formation and loss of cell permeability by reflecting a portion of the direct light that reaches the surface of the plant tissues. In addition, it can also not be ruled out that ROS scavenging could have been increased by the Archer® Eclipse product due to the direct action of sugar and amino acids contained in the botanical extract of its formulation. Amino acids and sugars are powerful antioxidants that are able to cope with abiotic stresses [30,36].

In a future experiment, it will be necessary to address how to optimise Archer® Eclipse use, mainly by increasing knowledge on the plant's response to its application. More specifically, complementary studies should be carried out to analyse the antioxidant system of the plants in detail, collect more information about crops that could benefit from this technology, and determine the best time and frequency of application. Moreover, studies examining the interactions of Archer® Eclipse application with other agronomic practices, such as the use of cover crops and deficit irrigation strategies, are needed to improve the effectiveness of Archer® Eclipse under more severe stress conditions.

5. CONCLUSIONS

This study confirms the efficiency of Archer® Eclipse in protecting the cucumber plant from sunburn-inducing conditions. Furthermore, due to its composition, a protective effect of the pit-dye mechanism is evident. Having said that, more studies are needed in order to fully understand the protective role of the organic compounds in the Archer® Eclipse vegetal extract and their synergies with each other.

Author Contributions

Conceptualisation, F.G.-S., I.N.-M. and J.M.C.-Z.; methodology, J.M.R.; software, E.N.-L.; validation, B.B.; formal analysis, M.J.I.-R.; investigation, J.M.C.-Z.; resources, J.M.R.; data curation, E.N.-L.; writing—original draft preparation, I.N.-M.; writing—review and editing, F.G.-S.; visualisation, B.B.; supervision, M.J.I.-R.; project administration, F.G.-S.; funding acquisition, J.M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was supported by the PAI programme (Plan Andaluz de Investigación, Grupo de Investigación AGR282).

Institutional Review Board Statement

Not applicable.

Informed Consent Statement

Not applicable.

Data Availability Statement

Not applicable.

Acknowledgments

We thank Enrique Pérez Sánchez-Cañete and Sergio Aranda-Barranco for their help with the gas exchange measurements.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study nor in the collection, analysis, and interpretation of data. They, likewise, had no role in the writing of the manuscript nor in the decision to publish the results.

References

1. Gambetta, J.M.; Holzapfel, B.P.; Stoll, M.; Friedel, M. Sunburn in Grapes: A Review. *Front. Plant Sci.* **2021**, *11*, 604691. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
2. Ayangbenro, A.S.; Babalola, O.O. Reclamation of Arid and Semi-Arid Soils: The Role of Plant Growth-Promoting Archaea and Bacteria. *Curr. Plant Biol.* **2021**, *25*, 100173. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
3. Dawood, M.F.A.; Tahjib-Ul-Arif, M.; Sohag, A.A.M.; Abdel Latef, A.A.H.; Ragaey, M.M. Mechanistic Insight of Allantoin in Protecting Tomato Plants Against Ultraviolet C Stress. *Plants* **2020**, *10*, 11. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Katano, K.; Honda, K.; Suzuki, N. Integration between ROS Regulatory Systems and Other Signals in the Regulation of Various Types of Heat Responses in Plants. *IJMS* **2018**, *19*, 3370. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)][[Green Version](#)]
5. Lal, N.; Sahu, N. Management Strategies of Sun Burn in Fruit Crops-A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **2017**, *6*, 1126–1138. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
6. Manja, K.; Aoun, M. The Use of Nets for Tree Fruit Crops and Their Impact on the Production: A Review. *Sci. Hortic.* **2019**, *246*, 110–122. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
7. Liu, Z.; Jiao, X.; Zhu, C.; Katul, G.G.; Ma, J.; Guo, W. Micro-Climatic and Crop Responses to Micro-Sprinkler Irrigation. *Agric. Water Manag.* **2021**, *243*, 106498. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Han, S.G.; Selvakumar, G.; Yi, P.H.; Lee, S.E. Effect of Sprinkler, Surface Drip and Subsurface Drip Irrigation Methods on ‘Fuji’/M9 and ‘Fuji’/M26 Apple Orchards Growth, Soil Properties, and Water Consumption. *Korean J. Soil. Sci. Fert.* **2018**, *51*, 608–615. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
9. Glenn, D.M. Particle Film Mechanisms of Action That Reduce the Effect of Environmental Stress in ‘Empire’ Apple. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2009**, *134*, 314–321. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)][[Green Version](#)]
10. Gharaghani, A.; Mohammadi Javarzari, A.; Vahdati, K. Kaolin Particle Film Alleviates Adverse Effects of Light and Heat Stresses and Improves Nut and Kernel Quality in Persian Walnut. *Sci. Hortic.* **2018**, *239*, 35–40. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
11. Brito, C.; Dinis, L.-T.; Moutinho-Pereira, J.; Correia, C. Kaolin, an Emerging Tool to Alleviate the Effects of Abiotic Stresses on Crop Performance. *Sci. Hortic.* **2019**, *250*, 310–316. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

12. Mahmoudian, M.; Rahemi, M.; Karimi, S.; Yazdani, N.; Tajdini, Z.; Sarikhani, S.; Vahdati, K. Role of Kaolin on Drought Tolerance and Nut Quality of Persian Walnut. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **2021**, *20*, 409–416. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
13. Chandel, A.K.; Khot, L.R.; Osroosh, Y.; Peters, T.R. Thermal-RGB Imager Derived in-Field Apple Surface Temperature Estimates for Sunburn Management. *Agric. For. Meteorol.* **2018**, *253–254*, 132–140. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
14. Ko, S.-S.; Jhong, C.-M.; Lin, Y.-J.; Wei, C.-Y.; Lee, J.-Y.; Shih, M.-C. Blue Light Mediates Chloroplast Avoidance and Enhances Photoprotection of Vanilla Orchid. *IJMS* **2020**, *21*, 8022. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Padhi, B.; Chauhan, G.; Kandoi, D.; Stirbet, A.; Tripathy, B.C.; Govindjee, G. A Comparison of Chlorophyll Fluorescence Transient Measurements, Using Handy PEA and FluorPen Fluorometers. *Photosynthetica* **2021**, *59*, 399–408. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
16. Andrianto, H.; Suhardi; Faizal, A. Detection of Chlorophyll Content Based on Spectral Properties at Leaf Level: A Meta-Analysis. In Proceedings of the 2018 International Conference on Information Technology Systems and Innovation (ICITSI), Bandung-Padang, Indonesia, 22–26 October 2018; pp. 364–369. [[Google Scholar](#)]
17. Soloklui, A.A.G.; Ershadi, A.; Fallahi, E. Evaluation of Cold Hardiness in Seven Iranian Commercial Pomegranate (*Punica Granatum L.*) Cultivars. *HortScience* **2012**, *47*, 1821–1825. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)][[Green Version](#)]
18. Morales, M.; Munné-Bosch, S. Malondialdehyde: Facts and Artifacts. *Plant Physiol.* **2019**, *180*, 1246–1250. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)][[Green Version](#)]
19. Junglee, S.; Urban, L.; Sallanon, H.; Lopez-Lauri, F. Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide. *AJAC* **2014**, *5*, 730–736. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)][[Green Version](#)]
20. Barrameda-Medina, Y.; Montesinos-Pereira, D.; Romero, L.; Blasco, B.; Ruiz, J.M. Role of GSH Homeostasis under Zn Toxicity in Plants with Different Zn Tolerance. *Plant Sci.* **2014**, *227*, 110–121. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Alam, M.K.; Rana, Z.H.; Islam, S.N.; Akhtaruzzaman, M. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Methanolic Extract of Selected Wild Leafy Vegetables Grown in Bangladesh: A Cheapest Source of Antioxidants. *Potr. S. J. F. Sci.* **2019**, *13*, 287–293. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)][[Green Version](#)]

22. Del Amor, F.M.; Gálvez, A.; Romero, M.; Otalora, G.; López-Marín, J. Preliminary Study of the Behaviour of a Courgette Crop Grown under Photosensitive Shade Nets. *Acta Hortic.* **2020**, 341–345. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
23. De la Torre-González, A.; Navarro-León, E.; Albacete, A.; Blasco, B.; Ruiz, J.M. Study of Phytohormone Profile and Oxidative Metabolism as Key Process to Identification of Salinity Response in Tomato Commercial Genotypes. *J. Plant Physiol.* **2017**, 216, 164–173. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sharma, R.R.; Datta, S.C.; Varghese, E. Effect of Surround WP[®], a Kaolin-Based Particle Film on Sunburn, Fruit Cracking and Postharvest Quality of ‘Kandhari’ Pomegranates. *Crop Prot.* **2018**, 114, 18–22. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
25. Nyongesah, M.J.; Wang, Q.; Li, P. Effectiveness of Photochemical Reflectance Index to Trace Vertical and Seasonal Chlorophyll a/b Ratio in Haloxylon Ammodendron. *Acta Physiol. Plant* **2015**, 37, 2. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
26. Liu, Y.; Dong, S.; Wei, S.; Wang, W.; Miao, H.; Bo, K.; Gu, X.; Zhang, S. QTL Mapping of Heat Tolerance in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) at Adult Stage. *Plants* **2021**, 10, 324. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Takshak, S.; Agrawal, S.B. Exogenous Application of IAA Alleviates Effects of Supplemental Ultraviolet-B Radiation in the Medicinal Plant *Withania Somnifera* Dunal. *Plant Biol. J.* **2017**, 19, 904–916. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
28. Tossi, V.E.; Regalado, J.J.; Iannicelli, J.; Laino, L.E.; Burrieza, H.P.; Escandón, A.S.; Pitta-Álvarez, S.I. Beyond Arabidopsis: Differential UV-B Response Mediated by UVR8 in Diverse Species. *Front. Plant Sci.* **2019**, 10, 780. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
29. Sgroppo, S.C.; Sosa, C.A. Zapallo anco (*Cucurbita moschata*, D.) fresco cortado tratado con luz UV-C. *FaCENA* **2021**, 25, 7–19. [[Google Scholar](#)]
30. Khan, N.; Ali, S.; Zandi, P.; Mehmood, A.; Ullah, S.; Ikram, M.; Ismail, I.; Shahid, M.A.; Babar, M.A. Role of Sugars, Amino Acids and Organic Acids in Improving Plant Abiotic Stress Tolerance. *Pak. J. Bot.* **2020**, 52, 355–363. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
31. Talanova, V.V.; Topchieva, L.V.; Titov, A.F. Effect of Abscisic Acid on the Resistance of Cucumber Seedlings to Combined Exposure to High Temperature and Chloride. *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci.* **2006**, 33, 619–622. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
32. Yu, B.; Ming, F.; Liang, Y.; Wang, Y.; Gan, Y.; Qiu, Z.; Yan, S.; Cao, B. Heat Stress Resistance Mechanisms of Two Cucumber Varieties from Different Regions. *IJMS* **2022**, 23, 1817. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Badmus, U.O.; Ač, A.; Klem, K.; Urban, O.; Jansen, M.A.K. A Meta-Analysis of the Effects of UV Radiation on the Plant Carotenoid Pool. *Plant Physiol. Biochem.* **2022**, *183*, 36–45. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Köhler, H.; Contreras, R.A.; Pizarro, M.; Cortés-Antíquera, R.; Zúñiga, G.E. Antioxidant Responses Induced by UVB Radiation in *Deschampsia Antarctica* Desv. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 921. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)][[Green Version](#)]
35. Sahin, U.; Ekinci, M.; Ors, S.; Turan, M.; Yildiz, S.; Yildirim, E. Effects of Individual and Combined Effects of Salinity and Drought on Physiological, Nutritional and Biochemical Properties of Cabbage (*Brassica Oleracea* Var. *Capitata*). *Sci. Hortic.* **2018**, *240*, 196–204. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
36. Tarkowski, Ł.P.; Signorelli, S.; Höfte, M. Γ -Aminobutyric Acid and Related Amino Acids in Plant Immune Responses: Emerging Mechanisms of Action. *Plant Cell Environ.* **2020**, *43*, 1103–1116. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]



| 11.2. PUBLICACIÓN 2 |
|---|
| Effects of Root and Foliar Application of Corn Steep Liquor on Pepper Plants: A Physiological, Nutritional, and Morphological Study |
| Iván Navarro-Morillo, Valeria Navarro-Perez, Rafael Perez-Millan, Eloy Navarro-León, Begoña Blasco, Jose Maria Cámara-Zapata and Francisco Garcia-Sanchez |
| <i>Horticulturae</i> 2023, 9, 221 |
| Factor de impacto: 3,1 Q1 (2023) (Categoría Agricultural and Biological Sciences) |

Effects of Root and Foliar Application of Corn Steep Liquor on Pepper Plants: A Physiological, Nutritional, and Morphological Study

Iván Navarro-Morillo¹, Valeria Navarro-Perez², Rafael Perez-Millan¹, Eloy Navarro-León³, Begoña Blasco³, Jose Maria Cámara-Zapata^{4,*} and Francisco Garcia-Sanchez²

1. R + D Department of Atlántica Agrícola, 03400 Villena, Spain
2. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 30100 Murcia, Spain
3. Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain
4. Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández, 03312 Orihuela, Spain

*Correspondence: jm.camara@umh.es

Abstract

The industrial washing of corn grain during its milling generates a residue known as “corn steep liquor (CSL)”. This residue is rich in amino acids, carbohydrates, vitamins, and mineral nutrients that can stimulate the vegetative growth when applied to plants. However, the mode of action of this product is not yet known. This work involved the foliar and root application to pepper plants, at a dose of 5 mL L⁻¹, of two CSL products (CSL-H and CSL-B), which differ in the way they have been stabilized. In both cases, the size of the plants was increased, root application being more efficient than foliar. According to the studies carried out, this was because the CSL products increased the synthesis of hormones related to cell division and elongation, the net assimilation rate of CO₂, and the concentrations of the amino acids alanine, proline, and tryptophan. In addition, root application of CSL-H also increased the concentrations of arginine, isoleucine, leucine, and cysteine. These data suggest that the mode of action of these products is related to

regulation, synthesis of hormones, and the stimulation of carbon and nitrogen metabolism, the CSL-H treatment being the one that produced the most changes in the amino acids analyzed.

Keywords: biostimulants; agrifood residues; CSL; Zea; metabolomics; organic fertilization; plant mineral nutrition; *Capsicum*

1. INTRODUCTION

Global maize production exceeds one billion tonnes per year and represents approximately 35 % of the total cereal production. One of the uses of maize is the industrial production of starch. In this process, a by-product known as “corn macerated liquor (CSL)” is obtained. This residue is generated when the corn is washed during its milling. CSL is a soluble solid, representing 40–50 % (w/w) of the dry weight of corn, which is composed mainly of amino acids, sugars, sulfites, proteins, vitamins, and mineral macro- and micronutrients [1,2]. Its composition has led to the use of this by-product for different industrial purposes. Historically, CSL has been used as a source of supplemental nutrients in fermentation processes, livestock feed, antibiotic production, and culture media for microorganisms, and as an integral part of fertilizers and soil regulators [3,4]. CSL is widely used as an additive medium in the production of important compounds, such as penicillin, glutamic acid, lactic acid, and glucose oxidase. It is often a cheap source of C, N, vitamins, or micronutrients [5,6]. The most relevant example of the use of CSL is as a supplement in culture media in the production of antibiotics by *Penicillium chrysogenum*. Another of its commercial uses is in the manufacture of biosurfactants [7] that are used in industries such as the dairy sector. However, CSL is considered a waste in primary industry, since it has high concentrations of sulfites and organic matter, which make it difficult to treat, and existing treatments have a high economic cost. Its discharge as wastewater pollutes the environment greatly. Managing the large amounts of CSL generated by the corn industry has become a major problem. In recent years, research has been focused on its use: (i) in manufacturing industries as a component of culture media for microorganisms; (ii) in the production of cellulose, enzymes, organic acids, alcohols, and biosurfactants; (iii) in low-cost animal feed; and (iv) as an ingredient in biostimulant agrochemicals.

CSL contains a wide variety of proteins and other compounds that promote plant growth. In addition, it contains acetic acid, lactic acid, ferulic acid, vanillic acid, umaric acid, sinapinic acid, caffeic acid, and other bioactive molecules, and so it has the potential to combat plant pathogens [8,9,10]. When applied to the soil, changes are produced in its physicochemical properties, altering the concentrations of phosphorus, nitrogen, and potassium. In the case of hydroponic crops, the use of CSL promotes the production of healthy plants and prevents root diseases [11]. CSL also supports the growth of nitrogen-fixing bacteria and phosphorus-solubilizing bacteria. Therefore, CSL can be used as a biocontrol agent. Under hydroponic conditions, the use of CSL

favors the establishment of microbial ecosystems and is an adequate means to promote microbial interactions [12]. Further, the inclusion of CSL in the hydroponic nutrients could inhibit the onset and development of lettuce root rot. Therefore, within the framework of the circular economy, the use of CSL in agriculture should be promoted since it disposes of this waste, while reducing the use of inputs such as fertilizers and phytosanitary products and improving the health and nutritional status of crop plants.

The increase in the world population entails a growing demand for food that has forced the improvement of crop productivity, linked to an excessive consumption of fertilizers. These production models have led to a loss of soil quality and deterioration of terrestrial and aquatic ecosystems [13]. Among the current challenges of agriculture, the need to develop sustainable production strategies that allow the growing world population to be fed, with a parallel use of fewer resources, stands out [14]. Among these strategies, alternatives are being promoted to replace conventional fertilizers, but this has to happen in the face of adverse environmental conditions as a consequence of climate change.

Biostimulants (BSs) are products that can be applied to crops, with the aim of increasing the availability of nutrients in the soil or the rhizosphere, improving efficiency in the use of nutrients, favoring plant tolerance of abiotic stress, and/or improving the quality of the harvested product [15,16,17,18,19]. Among the BSs, there is a great variation in composition, and they are available in various forms, both solid and liquid [20]. Their mode of action is independent of their nutrient content, which distinguishes them from conventional fertilizers [21], and includes the activation of N metabolism, the solubilization of soil P, the stimulation of soil microbial activity, the incorporation of active PGPR materials, and the improvement of root growth. Some BSs favor plant growth by activating physiological processes, such as photosynthesis, metabolic pathways, and nutrient uptake from the soil, thereby increasing crop productivity and harvest quality, and they can prolong the postharvest shelf life of agricultural products. BSs can also mitigate the effects of drought, heat, salinity, cold, frost, oxidative stress, and damage caused by mechanical and chemical factors [18].

Depending on their composition, BSs can consist of organic substances based on humic and fulvic acids; protein hydrolysates of animal or vegetable origin; amino acids or other compounds containing N, poly- and oligosaccharides [22], vitamins, chitins, and chitosan; seaweed extracts; inorganic substances, such as silicon [23]; plant extracts (seeds, leaves, roots, and fruits); and/or microorganisms, mycorrhizal fungi, and rhizobacteria that promote plant growth (strains belonging to the genera *Azospirillum*, *Azotobacter*, and *Rhizobium*) [17,24,25]. In addition, BSs can be by-products of sectors, such as the food industry and paper production [26].

One of the solutions to the problem created in the corn industry due to the high amount of CSL produced is its application in agriculture. It has been demonstrated that its application can improve plant growth. Ref. [27] applied to bean plants concentrations of 1 %, 2 %, 5 %, and 10 % CSL in the irrigation solution. The authors concluded that the application of 1 % CSL improved germination, plant growth (height and fresh weight of the aerial part), and early flowering. In addition, they observed increases in the foliar concentrations of the nutrients N, P, K, Mn, and Cu, which could explain the results obtained. Therefore, the objective of this work was to evaluate the biostimulant effect of two CSL products from the company Atlántica Agrícola SA, which differ in the stabilization method used (CSL-B and CSL-H). It was also intended to determine the most appropriate form of application, root versus foliar, as well as the mechanisms of their effects on plants. For this, these products were applied to pepper plants, and growth parameters and indicators of basic physiological processes, such as photosynthesis, N metabolism, hormonal composition, and nutritional status, were determined.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant Material and Growth Conditions

To carry out this work, pepper plants (*Capsicum annuum* cv. Alycum) were used. After germination, the plants were grown in a tray with 3 cm × 3 cm × 10 cm cells for 45 days. Next, they were transplanted into pots with 2 L of substrate (a mix of perlite:peat, 1:3) and placed in a growth chamber with 60/80 % relative humidity (day/night), a temperature of 29/20 °C (day/night), and a photoperiod of 16 h with a photosynthetic photon-flux density (PPFD) of 450 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The plants were irrigated once a week with Hoagland nutrient solution (4 mM KNO_3 , 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 2 μM MnCl_2 , 1 μM ZnSO_4 , 0.25 μM CuSO_4 , 0.1 μM Na_2MoO_4 , 125 μM Fe-EDDHA, and 50 μM H_3BO_3), with a pH of 5.8, adding 50–100 mL, depending on the growth of the plants.

2.2. Experimental Design

Fifty-two days after germination, the application of the treatments was carried out—T1: control, without application of CSL; T2: root application of CSL-B at a dose of 5 mL L⁻¹; T3: root application of CSL-H at a dose of 5 mL L⁻¹; T4: foliar application of CSL-B at a dose of 5 mL L⁻¹; and T5: foliar application of CSL-H at a dose of 5 mL L⁻¹. The volume used in both root application and foliar treatment was 50 mL. To ensure foliar sprays did not get on root treatments, plastic enclosures were used to protect the aerial part and also to isolate the substrate. The CSL came from the wet milling of corn kernels. It is rich in organic and mineral substances, including free amino acids, mineral nutrients, phenolic compounds (vanillic, ferulic, coumaric, sinapinic, and caffeic acids), and low-molecular-weight soluble sugars.

The two CSL products tested, CSL-B and CSL-H, include in their composition (% g/100 g on fresh product), respectively: free amino acids (5.0–6.0 and 5.5–6.5), total organic matter (40.0 and 30.0), total humic extract (30.0 and 20.0), fulvic acids (30.0 and 20.0), total nitrogen (3.0), ammoniacal nitrogen (0.3), organic nitrogen (2.7), potassium (K_2O) (2.5), and phosphorus (P_2O_5) (3.0). Micronutrients were not detected. The differences between the two CSL products are due to the fact that CSL-H is obtained directly from industry, whereas CSL-B undergoes a stabilization of the suspended solids, and its useful life is increased (using a method that is pending the award of a patent to Atlántica Agrícola SA), allowing its proper industrial handling without settling problems.

The application of the different treatments began 7 days after transplanting the plants to the growth chamber. The CSL-B and CSL-H products, by both the root and foliar routes, were applied four times, with 7 days between applications. The experimental design consisted of a complete randomized block with eight plants per treatment, arranged in individual pots, with the treatments randomly distributed in the growth chamber.

2.3. Measurements of Gas Exchange and Chlorophylls Fluorescence

At the end of the experiment, 7 days after the last treatment application, the gas exchange parameters and chlorophyll fluorescence of the plants were measured.

2.3.1. Photosynthetic Efficiency

Measurements were made with a LICOR 6800 Portable Photosynthesis System Infrared Gas Analyzer (IRGA: LICOR Inc., Lincoln, NE, USA) on one leaf of six plants per treatment. The intermediate leaves, under optimal growth conditions, were introduced into the measurement cuvettes, and measurements were made at $500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation (PAR), a CO_2 concentration of $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$, a leaf temperature of $30 \text{ }^\circ\text{C}$, and 60 % relative humidity. The net photosynthetic rate, A; the transpiration rate, E; and the stomatal conductance, g_s , were recorded simultaneously. The data were analyzed using “Photosyn Assistant” software. The instantaneous water use efficiency (WUE) was calculated by dividing A by E [28].

2.3.2. Fluorescence of Chlorophyll a

The fluorescence kinetics of Chl a were determined with a Handy PEA Chlorophyll Fluorimeter (Hansatech Ltd., King’s Lynn, Norfolk, UK). Red light (650 nm) with a light intensity of $3000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ was used to induce the OJIP phases. The OJIP fluorescence phases were analyzed using the JIP test [28]. Measurements were made on fully developed leaves in the middle of the plant. To study the energy fluxes and photosynthetic activity, the following parameters obtained from the JIP test were used: initial fluorescence (F_0); maximum fluorescence (F_m); variable fluorescence ($F_v = F_m - F_0$); fluorescence value at $300 \mu\text{s}$ (K peak); maximum quantum

product of primary photochemistry (F_v/F_m); performance index (PIABS); ratio of active reaction centers (RC) (RC/ABS); and the value $1-V_j$, which indicates the electron output, mainly from photosystem II [28].

2.4. Analysis of Plant Samples

Seven days after the last application of the treatments, and once the gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements had been made, all the plants were processed for analysis. Plant material was weighed and then washed with DECON-90 nonionic soap. Afterwards, it was washed three times with deionized water and then dried with filter paper. Leaf samples were taken from each plant and were kept fresh or frozen at $-40\text{ }^\circ\text{C}$ to determine the oxidative indicators, hormonal profile, aminogram, enzymatic activity, and nitrate concentration. Leaves were also taken, which, after drying in a forced-air oven, were used to determine the dry weight (DW), as well as to measure the concentrations of mineral nutrients and the N use efficiency of the plants (NUE). The parameters included in this section were determined according to [29]. The leaf area was measured with an optical reader LI-COR, model LI-3000A. The specific leaf area (SLA) is the relationship between leaf area and leaf weight.

2.4.1. Concentrations of Oxidative Indicators (MDA , H_2O_2 , and O_2^-)

For malondialdehyde (MDA) extraction, fresh plant material was homogenized with 5 mL of 50 mM buffer (0.07 % $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ and 1.6 % $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) in a mortar and centrifuged at $20,000 \times g$ for 25 min. Subsequently, a 1 mL aliquot of the supernatant was mixed with 4 mL of 20 % trichloroacetic acid containing 0.5 % thiobarbituric acid. The resulting mixture was heated at $95\text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min and then quickly cooled in an ice bath. The samples were then centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min, and the absorbance of the supernatant was measured at 532 nm. The value for non-specific absorption at 600 nm was subtracted from the reading obtained at 532 nm. The MDA concentration was calculated using the MDA molar extinction coefficient of $155\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [30].

The H_2O_2 concentration was measured colorimetrically, according to [31]. Fresh plant material was homogenized in cold acetone. A 1 mL aliquot of the extract was mixed with 200 μL of 0.1 % titanium dioxide in 20 % H_2SO_4 (v:v), and the mixture was centrifuged at $6000 \times g$ for 15 min. The intensity of the yellow color of the supernatant was measured at 415 nm. The H_2O_2 concentration was calculated from an H_2O_2 standard curve.

The O_2^- concentration was measured colorimetrically, according to [32]. A 0.1 g sample of fresh plant material was macerated, 300 μL of 50 mM phosphate buffer were added, and the mixture was centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min. A 250 μL sample of the supernatant was taken, and 1 mL 50 mM phosphate buffer and 250 μL of 10 mM hydroxylamine were added. The mixture was incubated for 20 min at $25\text{ }^\circ\text{C}$. Subsequently, 180 μL of 17 mM sulfonylic acid and 180 μL of 7

mM α -1-naphthylamine were added to 60 μ L of supernatant. The mixture was incubated for 1 h at room temperature, and the intensity of the color was measured at 530 nm. The O_2^- concentration was calculated from an O_2^- standard curve.

2.4.2. Hormonal Profile

Indoleacetic acid (IAA), gibberellins (GA, GA1 + GA3 + GA4), cytokinins (CKs: trans-zeatin (tZ) + isopentenyl adenine (iP)), and melatonin were analyzed, according to [33] with some modifications. A 30 mg sample of lyophilized material was homogenized in 0.5 mL of cold (-20 °C) methanol/water (80/20, v/v) solution. The solids were separated by centrifugation (20,000 \times g, 15 min) and re-extracted for 30 min at 4 °C into an additional 0.5 mL of the same extraction solution. The pooled supernatants were passed through a Sep-Pak Plus-C18 cartridge (SepPak Plus, Waters, Bedford, MA, USA). To remove the interfering lipids and part of the plant pigments, they were evaporated at 40 °C under vacuum or until the organic solvent was eliminated. The residue was dissolved in 1 mL of methanol/water (20/80, v/v) solution in an ultrasonic bath. The dissolved samples were filtered through 13 mm-diameter Millex filters, having a nylon membrane with a pore size of 0.22 μ m (Millipore, Bedford, MA, USA). A 10 μ L sample of each filtered extract was injected into a U-HPLC-MS system, consisting of an Accela Series U-HPLC (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) coupled to an Exact mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) using a heated electrospray ionization interface (HESI). Mass spectra were obtained with Xcalibur version 2.2 software (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). For the quantification of plant hormones, calibration curves were constructed for each component analyzed (1, 10, 50, and 100 μ g L⁻¹), with correction for 10 μ g L⁻¹ of deuterated internal standards. The recovery percentages were between 92 and 95 %.

2.4.3. Aminogram

Soluble amino acids were extracted, using the method of [34] with some modifications. A 0.1 g sample of fresh leaves was homogenized in 1 mL of MCW (methanol:chloroform:water, 12:5:1); 50 μ L of L-2 aminobutyric acid were added as internal standard. The mixture was centrifuged at 20,000 \times g for 10 min. To the supernatant were added 700 μ L of Milli-Q water and 1.2 mL of chloroform, and this mixture was incubated for 24 h at 4 °C. Subsequently, the aqueous phase was lyophilized, and the resulting extract was diluted with 0.1 M HCl. Instrumental analysis of soluble amino acids was carried out using an AccQ Tag Ultra Derivatization Kit precolumn (Waters, Milford, MA, USA). Derivatization was performed, according to the manufacturer's protocol: to 10 μ L of the sample were added 60 μ L of borate buffer, 10 μ L of 0.1 N NaOH, and 20 μ L of reconstituted AccQ Tag Ultra reagent. LC fluorescence analysis was performed on a Waters Acquity® UHPLC system equipped with an Acquity fluorescence detector. UHPLC separation was performed on a Waters AccQ Tag Ultra column (2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m). The flow

rate was 0.7 mL min^{-1} and the column temperature was maintained at $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The injection volume was $1 \text{ }\mu\text{L}$, and detection was established at an excitation wavelength of 266 nm and an emission wavelength of 473 nm . The solvent system consisted of two eluents: a 1:20 dilution of concentrated AccQ Tag Ultra eluent A and AccQ Tag Ultra eluent B. The profile was as follows: 0–0.54 min, 99.9 % A and 0.1 % B; 5.74 min, 90.9 % A and 9.1 % B; 7.74 min, 78.8 % A and 21.2 % B; 8.04 min, 40.4 % A and 59.6 % B; 8.05–8.64 min, 10 % A and 90 % B; and 8.73–9.50 min, 99.9 % A and 0.1 % B.

2.4.4. Enzymatic Activities Involved in Nitrogen Metabolism

Nitrate reductase (NR) activity was determined by following the procedure described by [35]. Fresh plant material (0.2 g) was macerated in a mortar with 1 mL of extraction buffer containing 2 mM EDTA-Na, 2 mM DTT, and 1% (w/v) PVPP in 100 mM KH_2PO_4 (pH 7.5). The suspension obtained was centrifuged for 20 min at $20,600\times g$, at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The resulting supernatant was added to a reaction mixture containing: 100 mM KNO_3 , 2 mM NADH, 10 mM cysteine, and 10 mM MgCl_2 in 100 mM KH_2PO_4 buffer (pH 7.5). This mixture was incubated at $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min . Subsequently, 1 mM Zn acetate was used to stop the reaction, and 1% sulfanilamide in 1.5 M HCl and 0.02% (w/v) NNEDA in 0.2 M HCl were added for the detection of the NO_2^- produced. Finally, the NR activity was determined by measuring the absorbance of NO_2^- at 540 nm .

Glutamine synthetase (GS) activity was determined by adapting the hydroxamate synthetase assay of [35]. A 0.1 g sample of leaves was macerated in a mortar with 1 mL of extraction buffer containing: 100 mM sucrose, 2% (v/v) β -mercaptoethanol, and 20% (v/v) ethylene glycol in 100 mM maleic acid-KOH (pH 6.8). The suspension was centrifuged for 20 min at $20,600\times g$, at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The resulting extract was used to measure GS activity. The reaction mixture used consisted of 150 mM sodium glutamate, 30 mM hydroxylamide, and 10 mM ATP as substrates, together with 45 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 4 mM EDTA-Na, all of them dissolved in 150 mM imidazole-HCl buffer (pH 7.8). After incubation at $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min , glutamylhydroxamate formation was determined by measuring its absorbance at 540 nm , after binding with acidified ferric chloride.

2.4.5. Concentrations of Total Nutrients and Nitrate and Nitrogen Use Efficiency

The determination of the concentrations of the nutrients P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Mn, Zn, Mo, and B was performed using ICP-OES. Leaf samples were subjected to a mineralization process, following the method of [36]. A sample of 0.2 g of dry leaves was subjected to digestion with HNO_3 and 30% H_2O_2 at $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and the mineralized extract obtained was used for the analysis of ionic elements. Another 0.2 g sample of dry leaves was ground and mineralized with 98% H_2SO_4 and 30% H_2O_2 , at a temperature of $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and the mineralized material was used for total N analysis. The concentration of total N was determined by colorimetry based on the Berthelot reaction, according to the method described by [37]. To determine the soluble NO_3^- concentration,

an aqueous extraction was carried out, and the colorimetric reaction of NO_3^- with salicylic acid in a basic medium was used [38]. Finally, the nitrogen use efficiency (NUE) was estimated as the relationship between the biomass production (Bw) and the amount of N in the leaves (NI).

2.5. Statistical Analysis

All the analyses were performed in triplicate, and the results were statistically evaluated using an analysis of variance, ANOVA, with a 95 % confidence interval. The differences between the means of the treatments were analyzed using the least significant difference test of Fisher (LSD) at a probability level of 95 %. Significance levels were expressed as: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS not significant.

3. RESULTS

3.1. Biomass and Leaf Area

For the dry weight of the aerial part and the leaf area (Table 1, Figure 1), regardless of the mode of application, the CSL-B and CSL-H products gave an increase in these parameters compared to control plants. The CSL-B root treatment was the one that produced the most vigorous plants, with an increase of 65 % and 22 % in the leaf dry weight and leaf area, respectively, in comparison to control plants, although the dry weight did not differ from that of the root CSL-H treatment. Regarding the mode of application, the products applied via the roots were more effective (Table 1), although there were no significant differences between the root and foliar CSL-H treatments. The SLA value was reduced in the plants treated with CSL, except for the CSL-B foliar treatment, which had values similar to those of the control.



Figure 1. Appearance of the plants at the end of the experiment.

Table 1. Biomass of the aerial part, 7 days after the last application of the treatments to the plants.

| Treatment | Biomass of the Aerial Part (Dry Weight) (g Plant ⁻¹) | Leaf Area (dm ²) | Specific Leaf Area (dm ² g ⁻¹) |
|-----------------|---|---------------------------------|--|
| Control | 4.1 ± 0.7 c | 10.4 ± 0.1 d | 0.23 ± 0.01 a |
| CSL-B Root | 6.7 ± 0.7 a | 12.6 ± 0.3 a | 0.12 ± 0.01 c |
| CSL-B Foliar | 5.1 ± 0.3 b | 11.0 ± 0.1 c | 0.22 ± 0.01 a |
| CSL-H Root | 6.4 ± 0.9 a | 12.1 ± 0.2 b | 0.13 ± 0.01 c |
| CSL-H Foliar | 5.3 ± 0.7 b | 11.4 ± 0.2 c | 0.16 ± 0.01 b |
| <i>p</i> -value | *** | *** | *** |

These results indicate that the products analyzed have positive effects on the growth of pepper plants under adequate conditions and do not have phytotoxic effects. In particular, the CSL-B treatment applied via the roots induced a greater production of leaf biomass and a greater leaf area of the pepper plants. Other authors, such as [27], found that the root application of the CSL product improved the growth of bean plants.

3.2. Gas Exchange Parameters

The application of the CSL-B and CSL-H products, both root and foliar, increased the net CO₂ assimilation rate (A), but did not affect the stomatal conductance (gs) or foliar transpiration (E). This response caused the water use efficiency (WUE = A/E) to be significantly higher in CSL-treated plants than in control plants (Table 2). Of all the CSL treatments, CSL-B Root produced the highest values of A and WUE. Regarding the mode of application, differences were only observed with the CSL-B product, with root application being more effective than foliar application for A and WUE.

Table 2. Gas exchange parameters of the plants according to the treatment. A: net assimilation of CO₂, E: leaf transpiration, gs: stomatal conductance, WUE: water use efficiency.

| Treatment | A (mmol m ⁻² s ⁻¹) | E (mmol m ⁻² s ⁻¹) | gs (mmol m ⁻² s ⁻¹) | WUE (μmol mmol ⁻¹) |
|-----------------|--|--|---|-----------------------------------|
| Control | 3.8 ± 0.3 c | 0.28 ± 0.03 ab | 24 ± 3 ab | 13.5 ± 0.3 d |
| CSL-B Root | 6.6 ± 0.9 a | 0.29 ± 0.05 ab | 24 ± 5 ab | 22.6 ± 0.8 a |
| CSL-B Foliar | 5.1 ± 0.4 b | 0.25 ± 0.05 b | 21 ± 6 b | 20.5 ± 1.6 b |
| CSL-H Root | 5.9 ± 0.7 ab | 0.35 ± 0.02 a | 29 ± 2 a | 16.8 ± 1.3 c |
| CSL-H Foliar | 5.1 ± 0.6 b | 0.29 ± 0.03 ab | 32 ± 4 ab | 17.7 ± 0.8 c |
| <i>p</i> -value | ** | * | * | *** |

3.3. Chl a Fluorescence

The values of the RC/ABS and PI_{ABS} photochemical activity indices were higher in plants receiving certain CSL treatments than in control plants. Thus, plants receiving the CSL-B Root or CSL-H Root treatment had significantly higher RC/ABS values than control plants, while the highest PI_{ABS} values were observed in all CSL-treated plants, except those of the CSL-B Root treatment (Table 3). The values of Fv/Fm and 1-V_j did not exhibit significant differences due to the treatments. This indicates that the light capture and utilization machinery of the plants treated with CSL, especially that of the CSL-B Root plants, was in better condition than that of the control plants.

Table 3. Plant photochemical activity measured, 7 days after the last application of the treatments, as Chl a fluorescence: Fv/Fm, quantum yield of primary photosynthesis; RC/ABS, active reaction centers of photosystems; PI_{ABS}, photosynthetic performance index; 1-V_j, electron output from photosystem II.

| Treatment | Fv/Fm | RC/ABS | PI _{ABS} | 1-V _j |
|-----------------|---------------|----------------|-------------------|------------------|
| Control | 0.809 ± 0.009 | 0.74 ± 0.05 b | 4.7 ± 0.8 b | 0.70 ± 0.02 |
| CSL-B Root | 0.820 ± 0.005 | 0.85 ± 0.04 a | 8.5 ± 1.3 a | 0.69 ± 0.02 |
| CSL-B Foliar | 0.811 ± 0.003 | 0.77 ± 0.07 ab | 6.0 ± 1.0 b | 0.66 ± 0.02 |
| CSL-H Root | 0.814 ± 0.003 | 0.83 ± 0.06 a | 8.2 ± 1.3 a | 0.69 ± 0.02 |
| CSL-H Foliar | 0.816 ± 0.004 | 0.81 ± 0.05 ab | 7.7 ± 1.1 a | 0.67 ± 0.03 |
| <i>p</i> -value | NS | * | ** | NS |

3.4. Study of Oxidative Stress

The plants treated with CSL did not have altered concentrations of MDA, H₂O₂, or O₂⁻ with respect to those of the control plants (Table 4). The values recorded following root application of the products did not differ from those for foliar application.

Table 4. Oxidative stress indicators, 7 days after the last application of the treatments.

| Treatment | MDA (μmol g ⁻¹ FW) | Concentration of O ₂ ⁻ (μg g ⁻¹ FW) | Concentration of H ₂ O ₂ (μg g ⁻¹ FW) |
|-----------------|----------------------------------|---|---|
| Control | 3.2 ± 0.2 | 5.5 ± 0.6 | 124 ± 9 |
| CSL-B Root | 3.4 ± 0.4 | 5.2 ± 0.6 | 117 ± 9 |
| CSL-B Foliar | 3.4 ± 0.6 | 5.4 ± 0.3 | 114 ± 13 |
| CSL-H Root | 3.1 ± 0.1 | 5.9 ± 0.9 | 117 ± 6 |
| CSL-H Foliar | 3.6 ± 0.5 | 5.4 ± 0.2 | 121 ± 15 |
| <i>p</i> -value | NS | NS | NS |

3.5. Hormonal Profile

The application of CSL-B or CSL-H, to the roots or foliage, produced significant increases in the concentrations of auxin growth hormones (AIAs), trans-zeatin (tZ), and active gibberellins (GA1, GA3, and GA4), compared to those found in the control plants ([Table 5](#)). For AIA, tZ, GA1, and GA4, root application increased the concentration more than foliar application, in such a way that the CSL-B and CSL-H root treatments gave higher concentrations than the respective foliar applications. For GA3, foliar and root applications gave rise to similar concentrations.

Table 5. Hormonal profile, 7 days after the last application of the treatments. IAA: indoleacetic acid (auxin); tZ: trans-zeatin; Ip: isopentenyl adenine; GA: gibberellin; ABA: abscisic acid; ACC: aminocyclopropane carboxylic acid; JA: jasmonic acid; SA: salicylic acid.

| | Control | CSL-B Root | CSL-B Foliar | CSL-H Root | CSL-H Foliar | p-Value |
|-----|---------------|----------------|-----------------|---------------|-----------------|---------|
| AIA | 1.5 ± 0.1 c | 2.2 ± 0.4 a | 1.8 ± 0.2 b | 2.0 ± 0.2 a | 1.9 ± 0.3 b | *** |
| tZ | 480 ± 10 d | 820 ± 20 a | 710 ± 20 b | 820 ± 20 a | 680 ± 20 c | *** |
| iP | 0.58 ± 0.03 | 0.62 ± 0.03 | 0.61 ± 0.02 | 0.62 ± 0.05 | 0.61 ± 0.07 | NS |
| GA1 | 0.31 ± 0.03 c | 0.52 ± 0.03 a | 0.40 ± 0.02 b | 0.50 ± 0.02 a | 0.41 ± 0.02 b | *** |
| GA3 | 0.13 ± 0.03 d | 0.21 ± 0.03 bc | 0.18 ± 0.02 c | 0.23 ± 0.03 a | 0.18 ± 0.02 c | *** |
| GA4 | 0.22 ± 0.01 c | 0.46 ± 0.06 a | 0.30 ± 0.02 b | 0.41 ± 0.03 a | 0.32 ± 0.01 b | *** |
| ABA | 57 ± 3 | 60 ± 2 | 62 ± 2 | 60 ± 2 | 59 ± 2 | NS |
| ACC | 14.5 ± 0.2 | 14.7 ± 0.1 | 15.2 ± 0.2 | 14.9 ± 0.6 | 15.3 ± 0.6 | NS |
| JA | 410 ± 6 | 403 ± 6 | 400 ± 4 | 393 ± 4 | 409 ± 6 | NS |
| SA | 3300 ± 300 | 3300 ± 200 | 3300 ± 200 | 3400 ± 300 | 3300 ± 200 | NS |

3.6. Enzymatic Activities Associated with Nitrogen Metabolism (Nitrate Reductase, NR, and Glutamine Synthetase, GS)

The application of CSL-B to the roots or foliage produced a significant increase in the NR and GS activities ([Figure 2](#)), relative to the rest of the treatments. Root application of CSL-H produced significantly higher values than the CSL-H foliar treatment and the control.

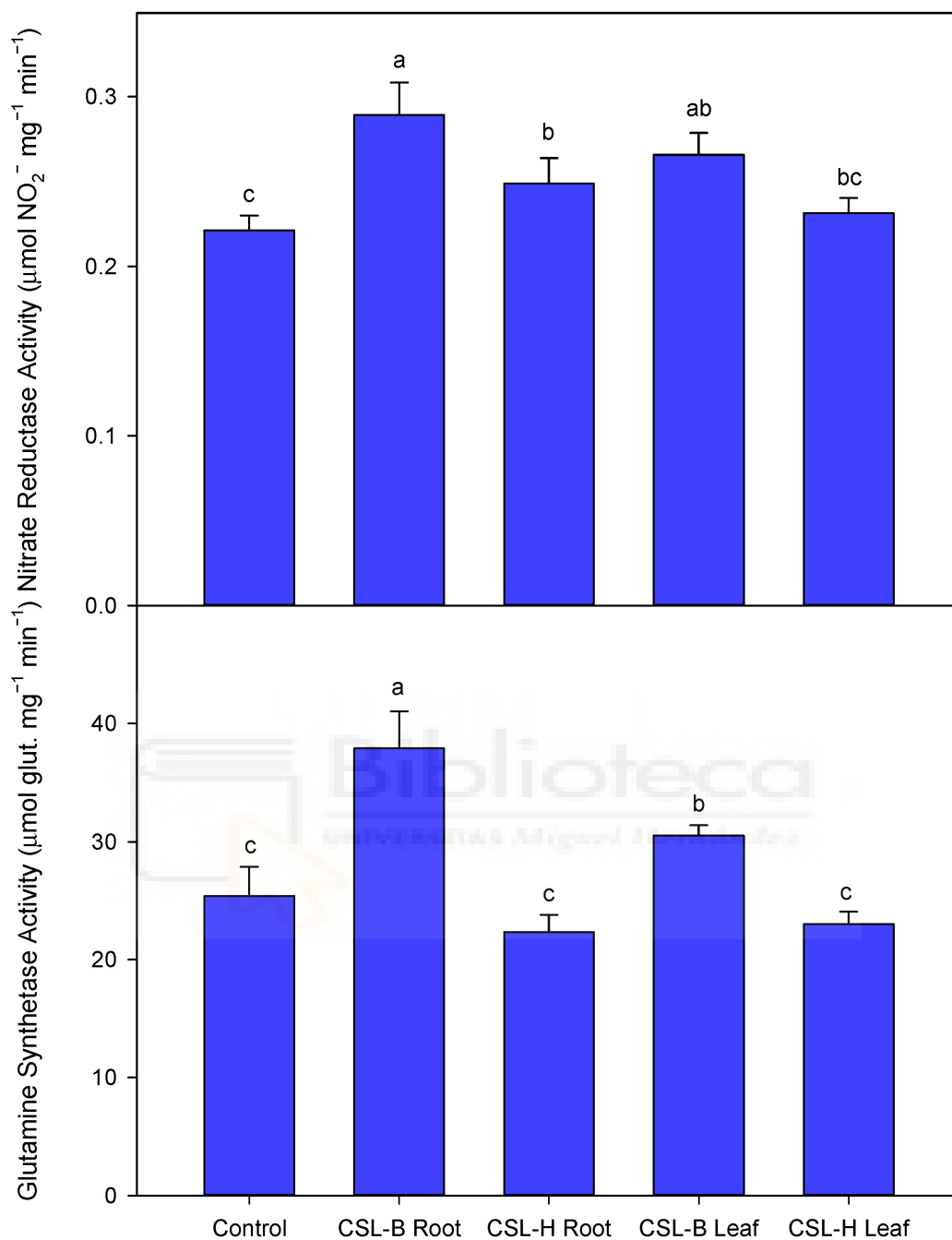


Figure 2. Activity of nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS). The values represent the means \pm standard deviation (SD) for $n = 3$. The differences between the treatments were analyzed with Fisher's least significant difference test (LSD; $p = 0.05$); in each graph, significant differences between treatments at $p < 0.05$ are indicated. In the ANOVA, the significance level is represented by $p < 0.001$ (***)

3.7. Aminogram

The CSL treatments gave rise to total amino acid concentrations higher than those of control plants (Table 6). Specifically:

Table 6. Aminogram of each of the treatments tested in this experiment. The data are from the last sampling, 7 days after the last application of the treatments.

| | Control | CSL-B Root | CSL-H Root | CSL-B Foliar | CSL-H Foliar | p-Value |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
| Alanine | 20 ± 1 d | 47 ± 2 b | 51 ± 3 b | 31 ± 2 c | 71 ± 4 a | *** |
| Arginine | 3.2 ± 0.2 b | 2.7 ± 0.1 c | 4.7 ± 0.2 a | 1.3 ± 0.1 d | 1.3 ± 0.1 d | *** |
| Asparagine | 4.7 ± 0.2 b | Nd | Nd | 6.3 ± 0.3 a | Nd | *** |
| Aspartate | 53 ± 3 b | 56 ± 3 b | 61 ± 3 a | 31 ± 2 c | 57 ± 3 ab | *** |
| Glutamate | 236 ± 12 b | 275 ± 13 a | 238 ± 12 b | 69 ± 3 d | 186 ± 9 c | *** |
| Glycine | Nd | Nd | 42 ± 2 b | Nd | 58 ± 3 a | *** |
| Histidine | 3.2 ± 0.2 c | 4.2 ± 0.2 b | 3.5 ± 0.2 c | 2.0 ± 0.1 d | 5.9 ± 0.2 a | *** |
| Isoleucine | 560 ± 30 d | 630 ± 30 c | 810 ± 40 a | 720 ± 40 b | 670 ± 30 bc | *** |
| Leucine | 820 ± 40 d | 920 ± 50 c | 1180 ± 60 a | 1060 ± 50 b | 970 ± 50 bc | *** |
| Lysine | 1.41 ± 0.07 b | 0.84 ± 0.04 d | 0.59 ± 0.03 e | 1.03 ± 0.05 c | 2.0 ± 0.1 a | *** |
| Phenylalanine | 179 ± 9 b | 187 ± 9 b | 220 ± 10 a | 220 ± 10 a | 220 ± 10 a | *** |
| Proline | 80 ± 4 d | 210 ± 10 a | 210 ± 10 a | 190 ± 10 b | 170 ± 9 c | *** |
| Serine | 14.8 ± 0.7 c | 23 ± 1 a | 17.4 ± 0.9 b | 12.4 ± 0.6 d | 24 ± 1 a | *** |
| Threonine | 7.4 ± 0.4 c | 11.9 ± 0.6 a | 10.0 ± 0.5 b | 4.7 ± 0.2 d | 10.1 ± 0.5 b | *** |
| Tryptophan | 244 ± 12 c | 336 ± 17 b | 327 ± 16 b | 510 ± 30 a | 520 ± 30 a | *** |
| Tyrosine | 331 ± 17 a | 148 ± 7 c | 176 ± 9 b | 134 ± 7 c | 184 ± 9 b | *** |
| Valine | 111 ± 6 e | 155 ± 5 c | 200 ± 10 a | 136 ± 7 d | 176 ± 9 b | *** |
| Methionine | 25 ± 1 a | 18 ± 1 b | 12 ± 1 c | 9 ± 1 d | 18 ± 1 b | *** |
| Cysteine | 1.16 ± 0.06 b | 1.03 ± 0.05 c | 1.53 ± 0.08 a | Nd | Nd | *** |
| 4-OH Proline | 6.1 ± 0.3 c | 9.7 ± 0.5 a | 8.7 ± 0.4 b | 4.7 ± 0.2 d | 8.4 ± 0.4 b | *** |
| Total | 270 ± 100 d | 3000 ± 200 c | 3600 ± 200 a | 3200 ± 200 bc | 3400 ± 200 ab | *** |

- Root application of CSL-B produced the highest values of proline, serine, and threonine;
- Root application of CSL-H gave the highest concentrations of asparagine, aspartate, isoleucine, leucine, phenylalanine, proline, valine, and cysteine;

- Foliar application of CSL-B produced the highest values of asparagine, phenylalanine, and tryptophan;
- The foliar CSL-H treatment produced the highest values of alanine, glycine, histidine, lysine, phenylalanine, serine, and tryptophan.

3.8. Concentrations of Nutrients

The total nitrogen concentration was not altered by the treatments. The concentration of nitrate was highest for the plants to which the CSL-H Root treatment was applied and was lowest for the plants of the CSL-B Root and CSL-B Foliar treatments (Table 7).

Table 7. Foliar concentrations of macronutrients (mg g⁻¹ DW) and micronutrients (µg g⁻¹ DW), for each of the treatments tested.

| Treatment | P | K | Ca | Mg | S | N | NO ₃ ⁻ |
|-----------------|--------------|----------|--------------|-------------|---------------|------------|------------------------------|
| Control | 4.6 ± 0.2 d | 41 ± 2 c | 17.5 ± 0.7 c | 4.5 ± 0.2 c | 4.01 ± 0.2 e | 65 ± 2 b | 14.2 ± 0.3 b |
| CSL-B Root | 5.3 ± 0.2 bc | 47 ± 2 b | 19.2 ± 0.8 b | 6.7 ± 0.3 a | 5.2 ± 0.2 a | 65 ± 2 c | 12.8 ± 0.6 c |
| CSL-H Root | 5.1 ± 0.2 c | 50 ± 2 a | 19.3 ± 0.8 b | 5.7 ± 0.2 b | 4.5 ± 0.2 b | 63 ± 2 a | 16 ± 1 a |
| CSL-B Foliar | 5.6 ± 0.2 b | 46 ± 2 b | 21.3 ± 0.9 a | 6.3 ± 0.3 a | 4.2 ± 0.2 d | 63 ± 2 c | 12.9 ± 0.7 c |
| CSL-H Foliar | 6.0 ± 0.2 a | 51 ± 2 a | 21.2 ± 0.9 a | 6.7 ± 0.3 a | 4.8 ± 0.2 c | 64 ± 2 b | 14.9 ± 0.3 b |
| <i>p</i> -value | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| | Fe | Cu | Mn | Zn | Mo | B | |
| Control | 88 ± 4 d | 59 ± 2 | 106 ± 4 | 55 ± 2 c | 0.58 ± 0.02 c | 12.4 ± 0.4 | |
| CSL-B Root | 106 ± 4 a | 55 ± 1 | 108 ± 4 | 73 ± 3 a | 1.12 ± 0.04 a | 11.1 ± 0.5 | |
| CSL-H Root | 95 ± 4 bc | 59 ± 2 | 103 ± 4 | 64 ± 3 b | 0.91 ± 0.04 b | 14.0 ± 0.6 | |
| CSL-B Foliar | 90 ± 4 cd | 58 ± 2 | 112 ± 4 | 63 ± 3 b | 0.89 ± 0.04 b | 12.6 ± 0.5 | |
| CSL-H Foliar | 100 ± 4 ab | 57 ± 2 | 111 ± 4 | 73 ± 3 a | 0.66 ± 0.03 c | 13.1 ± 0.5 | |
| <i>p</i> -value | ** | NS | NS | *** | *** | NS | |

The foliar concentrations of P, K, Ca, and Mg were significantly higher for the plants to which CSL was applied, regardless of the treatment. The foliar application of CSL-H produced the highest concentrations of P, K, Ca, and Mg, although in some cases there were no significant differences with respect to the other CSL treatments, as in the case of K, where the concentration

was not significantly different for CSL-H Root, and Mg, for CSL-B Root and CSL-B Foliar. The concentration of sulfur was highest for the CSL-B Root treatment.

The concentrations of the micronutrients Fe, Zn, and Mo were influenced significantly by the treatments. For these nutrients, the root application of CSL-B gave the highest concentrations, although they did not differ significantly from those of the CSL-H Foliar treatment for Fe and Zn.

4. DISCUSSION

The CSL product derived from the corn industry is rich in a large number of compounds that have physiological activity in plants and that can, in turn, promote the action of microorganisms that are beneficial for plants [39]. In this work the pepper plants treated with the CSL products had greater vegetative growth (biomass of the aerial part, [Table 1](#) and [Figure 1](#)) than the control plants to which no product was applied, revealing that these types of products can help plants reach their full growth potential. In other work, it has been seen that these products can act as biostimulants in different growing conditions and for very different types of plant. Ref. [40] used two fertilizers made with residues in a blackberry crop cultivated in soil under organic production conditions. One of them was made with CSL and the other with waste from the fish industry. The CSL fertilizer was stabilized through a biological fermentation process, giving rise to a biostimulant. The results show that the application of these products supplied the mineral nutrients necessary for the crop to develop. Ref. [41] compared organic fertilization in the form of CSL with conventional organic fertilization for Chinese cabbage plants grown in a floating hydroponic system. The most relevant effects were seen in the quality of the harvested product; the application of CSL increased the concentrations of aspartate, threonine, serine, glycine, valine, and ascorbic acid. There were no differences in the fresh and dry weights of the leaves or in the mineral concentrations. Ref. [42] observed that the application of CSL to a lettuce crop, growing in rockwool floating in a hydroponic nutrient solution, prevented the proliferation of *Fusarium* sp. and had a biostimulant effect by stimulating the beneficial microorganisms that grew in the substrate. Based on our experiment and the results of these researchers, we can conclude, based on the growth parameters ([Table 1](#) and [Figure 1](#)), that application of the CSL products via the roots is more effective than foliar application, and that there are no differences in the growth of the plants between the CSL-B and CSL-H products, which differ due to the stabilization process to which they were subjected.

The beneficial effects of the application of CSL are due to the fact that it contains a wide variety of active ingredients with synergistic effects among themselves that enhance its action. Among the substances that it has been possible to quantify in the tested products, CSL-B and CSL-H, are free amino acids, humic and fulvic acids, organic nitrogen, potassium, and phosphorus. Among the free amino acids, those with the highest concentrations are aspartic acid, glutamic acid, serine,

glycine, arginine, alanine, valine, leucine, and proline and the vitamin cocktail (B2, B3, B5, and B6). Other amino acids found at lower concentrations are histidine, methionine, phenylalanine, isoleucine, and hydroxyproline. Yet, in addition, other researchers have also detected acetic acid, lactic acid, ferulic acid, proteins, and other bioactive molecules [43,44,45]. All researchers, however, agree on the difficulty of analyzing these compounds due to the complexity of the matrix, and there are no reference materials or inter-laboratory tests to verify the results of the analysis. This lack of knowledge makes it necessary to know at least the mode of action of these products on plants in order to develop new biostimulants from them. The studies carried out on the use of CSL in agriculture have been focused on supplying this product as a source of organic fertilizer to replace the N, P, and K supplied by conventional fertilizers [40,41,42], and so it has been applied in large quantities. In our work, however, the application of these products was carried out to stimulate the physiological processes of the plants—directly, through the action of their compounds on the plants, or indirectly, through their effects on soil microorganisms. Thus, a low dose (5 mL L^{-1}) was applied, which did not significantly increase the concentrations of N, P, K, and Ca of the Hoagland nutrient solution with respect to the control treatment, but did produce a series of physiological responses in the plants, including:

- An increase in ACO_2 without changes in E_{leaf} ; therefore, there was an increase in the water use efficiency. There were no changes in the parameter F_v/F_m (Table 2 and Table 3).
- An increase in the hormones AIA, tZ, GA1, GA3, and GA4 (Table 5).
- An increase in the foliar concentrations of P, K, Ca, Mg, and S of 19, 19, 16, 41, and 15 %, respectively, without reaching values toxic for plants (Table 7).
- Changes in the aminogram, with increases in the concentrations of alanine, proline, and tryptophan of more than 30 %, and a decrease of more than 30 % for tyrosine and methionine, for the 4 CSL treatments. There were also differences among the treatments, with the concentrations of 7, 10, 4, and 9 amino acids increasing by more than 30 % for the treatments CSL-B Root, CSL-H Root, CSL-B Foliar, and CSL-H Foliar, respectively (Table 6).
- Increased NR and glutamine synthetase activity in the CSL-B Root treatment.

The responses described above indicate that the application of CSL, to the roots or foliage, stimulated and improved all the processes related to C metabolism, including gas exchange processes and the water use efficiency. This physiological process generates and supplies the energy and carbon assimilation necessary for plant growth [46]. Therefore, the increased metabolism of C and absorption of CO_2 could be responsible for the greater biomass of the plants that were treated with CSL, with respect to the plants that were not. Another of the modes of

action of these products is hormonal activation and regulation, since a strong increase in gibberellins and cytokinins, which are related to cell elongation and division, was observed, and this would stimulate gas exchange processes and, therefore, plant growth [47]. These results, implying the activation of C metabolism, are also supported by the aminograms of the leaves. Amino acids are essential due to their roles in plant growth, with functions in primary metabolism—such as chlorophyll synthesis; photosynthetic activity; control of water relations in the plant; synthesis of growth hormones, such as auxin; and protein synthesis—while also acting as precursors of other amino acids [48,49]. Increases in alanine, phenylalanine, and tryptophan were the common response for CSL-treated plants. Alanine is an amino acid that intervenes in the pyruvate pathway, and in plants, it can have physiological functions related to the synthesis of chlorophylls, photosynthetic activity, and the protection of plants against different abiotic stresses [50]. Tryptophan belongs to the shikimate pathway. Its functions within plants are related to the synthesis of auxin precursors, which favors plant growth through stomatal regulation and ion transport, lignin synthesis, signaling processes, and the defense against abiotic and biotic stresses [51]. Proline is an amino acid that acts as a structural component of proteins. It is involved in osmotic adjustment, protection of cell membranes, and deactivation of reactive oxygen species (ROS), and acts as a nitrogen reserve compound [52].

In addition, it should be noted that the application of CSL-H to the roots was the only treatment that increased the concentrations of arginine, isoleucine, leucine, and cysteine. These amino acids, belonging to the aspartic family, form part of the pyruvate pathway and the Calvin cycle, and are, thus, related to the metabolism of C and N [53]. This indicates that the CSL-H Root treatment was the one that most stimulated the metabolism of the plants. However, no significant differences from the other CSL treatments were seen, probably because the length of the assay, 7 days, was not enough to observe differences among the plants. The responses of the plants to CSL indicate that its application could be effective in helping plants to adapt to adverse environmental conditions, since the amino acids proline and isoleucine have a strong osmoprotective character [54]. In fact, ref. [55] observed that the application of proline to tomato plants supplied with saline water enabled them to adapt to these conditions due to a decrease in oxidative stress.

Regarding mineral nutrition (macro and micronutrients), the plants of all the treatments showed values within the normal range for each of the elements analyzed [56] (Table 7). The CSL treatments increased the concentrations of some nutrients (P, K, Ca, Mg, and S), with respect to control plants, without producing toxicities. Taking into account that the application of CSL to the nutrient solution was only 5 mL L⁻¹, these increases cannot be explained solely by the amount of extra mineral nutrients provided by the CSL. This indicates that the active substances of the CSL could have increased the uptake of mineral elements by the roots. Therefore, this increase in foliar nutrient concentrations could be related to the stimulation capacity of the CSL products

with regard to plants and/or to their effect on soil microorganisms, thus supporting our hypothesis that the application of CSL at low doses stimulates physiological and biochemical processes.

5. CONCLUSIONS

The results obtained show that the CSL-B and CSL-H products, regardless of the form of application (root and/or foliar), can be part of biostimulant formulations aimed at improving the growth of horticultural plants. These CSL products are made up of a wide variety of active materials—such as free amino acids, humic and fulvic acids, vitamins, organic nitrogen, potassium, and phosphorus—that can stimulate plant growth. It seems that their mode of action is related to the stimulation of C metabolism, increased hormone synthesis, and an increased net CO₂ assimilation rate. Their application at a concentration as low as 5 mL L⁻¹ resulted in an increase in the foliar concentration of nutrients, supporting the idea that their effects are related to the stimulation of physiological processes.

Author Contributions

Conceptualization, E.N.-L., J.M.C.-Z. and F.G.-S.; methodology, E.N.-L., J.M.C.-Z. and F.G.-S.; software, I.N.-M., V.N.-P. and R.P.-M.; validation, R.P.-M., E.N.-L. and B.B.; formal analysis, I.N.-M., V.N.-P. and R.P.-M.; investigation, I.N.-M., V.N.-P. and R.P.-M.; resources, I.N.-M., R.P.-M., J.M.C.-Z. and F.G.-S.; data curation, E.N.-L. and B.B.; writing—original draft preparation, I.N.-M., V.N.-P. and R.P.-M.; writing—review and editing, E.N.-L., B.B., J.M.C.-Z. and F.G.-S.; visualization, I.N.-M., V.N.-P., R.P.-M., E.N.-L. and B.B.; supervision, J.M.C.-Z. and F.G.-S.; project administration, J.M.C.-Z. and F.G.-S.; funding acquisition, J.M.C.-Z. and F.G.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research received no external funding.

Data Availability Statement

No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cornejo-Villegas, M.; Rincón-Londoño, N.; Real-López, D.; Rodríguez-García, M.E. The effect of Ca²⁺ ions on the pasting, morphological, structural, vibrational, and mechanical properties of corn starch-water system. *J. Cereal Sci.* **2018**, *79*, 174–182. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

2. Martínez-Arcos, A.; Moldes, A.B.; Vecino, X. Adding value to secondary streams of corn wet milling industry. *CyTA-J. Food* **2021**, *19*, 675–681. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
3. Lawford, H.G.; Rousseau, J.D. Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance *Zymomonas ethanol* fermentation. *Appl. Biochem. Biotech.* **1997**, *63–65*, 287–304. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
4. Maddipati, P.; Atiyeh, H.K.; Bellmer, D.N.; Huhnke, R.L. Ethanol production from Syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 6494–6501. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hofer, A.; Hauer, S.; Kroll, P.; Fricke, J.; Herwig, C. In-depth characterization of the raw material corn steep liquor and its bioavailability in bioprocesses of *Penicillium chrysogenum*. *Process Biochem.* **2018**, *70*, 20–28. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
6. Sekoai, P.T.; Ayeni, A.O.; Daramola, M.O. Parametric optimization of citric acid production from apple pomace and corn steep liquor by a wild type strain of *Aspergillus niger*: A response surface methodology approach. *Int. J. Eng. Res. Afr.* **2018**, *36*, 98–113. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
7. López-Prieto, A.; Martínez-Padrón, H.; Rodríguez-López, L.; Moldes, A.B.; Cruz, J.M. Isolation and characterization of a microorganism that produces biosurfactants in corn steep water. *CyTA-J. Food* **2019**, *17*, 509–516. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Hull, S.R.; Yang, B.Y.; Venzke, D.; Kulhavy, K.; Montgomery, R. Composition of corn steep water during steeping. *J. Agr. Food Chem.* **1996**, *44*, 1857–1863. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
9. Shin, H.D.; McClendon, S.; Le, T.; Taylor, F.; Chen, R.R. A complete enzymatic recovery of ferulic acid from corn residues with extracellular enzymes from *Neosartorya spinosa* NRRL 185. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95*, 1108–1115. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
10. Amiri, A.; Bundur, Z.B. Use of corn-steep liquor as an alternative carbon source for biomineralization in cement-based materials and its impact on performance. *Constr. Build. Mater.* **2018**, *165*, 655–662. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
11. Obayori, O.S.; Ilori, M.O.; Adebuseye, S.A.; Oyetibo, G.O.; Omotayo, A.E.; Amund, O.O. Effects of corn steep liquor on growth rate and pyrene degradation by *Pseudomonas* strains. *Curr. Microbiol.* **2010**, *60*, 407–411. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

12. Obayori, O.S.; Salam, L.B.; Anifowoshe, W.T.; Odunewu, Z.M.; Amosu, O.E.; Ofulue, B.E. Enhanced degradation of petroleum hydrocarbons in corn-steep-liquor-treated soil microcosm. *Soil Sediment Contam.* **2015**, *24*, 731–743. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
13. Hamedani, S.R.; Roupheal, Y.; Colla, G.; Colantoni, A.; Cardarelli, M. Biostimulants as a tool for improving environmental sustainability of greenhouse vegetable crops. *Sustainability* **2020**, *12*, 5101. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
14. Kocira, S.; Szparaga, A.; Findura, P.; Treder, K. Modification of yield and fiber fractions biosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with biostimulants containing amino acids and seaweed extract. *Agronomy* **2020**, *10*, 1338. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
15. Caradonia, F.; Ronga, D.; Flore, A.; Barbieri, R.; Moulin, L.; Terzi, V.; Francia, E. Biostimulants and cherry rootstock increased tomato fruit yield and quality in sustainable farming systems. *Ital. J. Agron.* **2020**, *15*, 121–131. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
16. Poberezny, J.; Szczepanek, M.; Wszelaczynska, E.; Prus, P. The quality of carrot after field biostimulant application and after storage. *Sustainability* **2020**, *12*, 1386. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
17. Francesca, S.; Arena, C.; Hay Mele, B.; Schettini, C.; Ambrosino, P.; Barone, A.; Rigano, M.M. The use of a plant-based biostimulant improves plant performances and fruit quality in tomato plants grown at elevated temperatures. *Agronomy* **2020**, *10*, 363. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Du Jardin, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hort.* **2015**, *196*, 3–14. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
19. Zarzecka, K.; Gugala, M.; Mystkowska, I.; Sikorska, A. Total and true protein content in potato tubers depending on herbicides and biostimulants. *Agronomy* **2020**, *10*, 1106. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
20. Conesa, M.R.; Espinosa, P.J.; Pallarés, D.; Pérez-Pastor, A. Influence of plant biostimulant as technique to harden citrus nursery plants before transplanting to the field. *Sustainability* **2020**, *12*, 6190. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Soppelsa, S.; Kelderer, M.; Testolin, R.; Zanutelli, D.; Andreotti, C. Effect of biostimulants on apple quality at harvest and after storage. *Agronomy* **2020**, *10*, 1214. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
22. Dalal, A.; Bourstein, R.; Haish, N.; Shenhar, I.; Wallach, R.; Moshelion, M. Dynamic physiological phenotyping of drought-stressed pepper plants treated with “productivity-enhancing” and “survivability-enhancing” biostimulants. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 905. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

23. Cozzolino, E.; Giordano, M.; Fiorentino, N.; El-Nakhel, C.; Pannico, A.; Di Mola, I.; Mori, M.; Kyriacou, M.C.; Colla, G.; Roupael, Y. Appraisal of biodegradable mulching films and vegetal-derived biostimulant application as eco-sustainable practices for enhancing lettuce crop performance and nutritive value. *Agronomy* **2020**, *10*, 427. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
24. Roupael, Y.; Giordano, M.; Cardarelli, M.; Cozzolino, E.; Mori, M.; Kyriacou, M.; Bonini, P.; Colla, G. Plant-and seaweed-based extracts increase yield but differentially modulate nutritional quality of greenhouse spinach through biostimulant action. *Agronomy* **2018**, *8*, 126. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
25. Hellequin, E.; Monard, C.; Chorin, M.; Lebris, N.; Daburon, V.; Klarzynski, O.; Binet, F. Responses of active soil microorganisms facing to a soil biostimulant input compared to plant legacy effects. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 13727. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
26. Campobenedetto, C.; Grange, E.; Mannino, G.; van Arkel, J.; Beekwilder, J.; Karlova, R.; Garabello, C.; Contartese, V.; Berteà, C.M. A biostimulant seed treatment improved heat stress tolerance during cucumber seed germination by acting on the antioxidant system and glyoxylate cycle. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 836. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Zhu, M.-M.; Liu, E.-Q.; Bao, Y.; Duan, S.-L.; She, J.; Liu, H.; Wu, T.-T.; Cao, X.-Q.; Zhang, J.; Li, B.; *et al.* Low concentration of corn steep liquor promotes seed germination, plant growth, biomass production and flowering in soybean. *Plant Growth Regul.* **2019**, *87*, 29–37. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
28. Strasser, R.; Srivastava, A.; Tsimilli-Michael, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*, 1st ed.; Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P., Eds.; Taylor & Francis: London, UK, 2000; pp. 443–480. [[Google Scholar](#)]
29. Marcelis, D.F.M.; Heuvelink, E.; Goudriaan, J. Modelling biomass production and yield of horticultural crops: A review. *Sci. Hortic.* **1998**, *74*, 83–111. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Fu, J.; Huang, B. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environ. Exp. Bot.* **2001**, *45*, 105–114. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
31. Mukherjee, S.P.; Choudhuri, M.A. Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiol. Plant.* **1983**, *58*, 166–170. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

32. Barrameda-Medina, Y.; Montesinos-Pereira, D.; Romero, L.; Blasco, B.; Ruiz, J.M. Role of GSH homeostasis under Zn toxicity in plants with different Zn tolerance. *Plant Sci.* **2014**, *227*, 110–121. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ghanem, M.E.; Albacete, A.; Martínez-Andújar, C.; Acosta, M.; Romero-Aranda, R.; Dodd, I.C.; Lutts, S.; Pérez-Alfocea, F. Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 3039–3050. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bielecki, R.L.; Turner, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* **1996**, *17*, 278–293. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Navarro-León, E.; Barrameda-Medina, Y.; Lentini, M.; Esposito, S.; Ruiz, J.M.; Blasco, B. Comparative study of Zn deficiency in *L. sativa* and *B. oleracea* plants: NH_4^+ assimilation and nitrogen derived protective compounds. *Plant Sci.* **2016**, *248*, 8–16. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
36. Wolf, B. A comprehensive system of leaf analyses and its use for diagnosing crop nutrient status. *Commun. Soil Sci. Plan.* **1982**, *13*, 1035–1059. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
37. Krom, M.D. Spectrophotometric determination of ammonia: A study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analysis* **1980**, *105*, 305–316. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
38. Cataldo, D.A.; Maroon, M.; Schrader, L.E.; Youngs, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plan.* **1975**, *6*, 71–80. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
39. Zhou, K.; Yu, J.; Ma, Y.; Cai, L.; Zheng, L.; Gong, W.; Liu, Q. Corn Steep Liquor: Green Biological Resources for Bioindustry. *Appl. Biochem. Biotech.* **2022**, *194*, 3280–3295. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
40. Fernandez-Salvador, J.; Strick, B.C.; Bryla, D.R. Liquid Corn and Fish Fertilizers Are Good Options for Fertigation in Blackberry Cultivars Grown in an Organic Production System. *HortScience* **2015**, *50*, 225–233. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
41. Kano, K.; Kitazawa, H.; Suzuki, K.; Widiastuti, A.; Odani, H.; Zhou, S.; Chinta, Y.D.; Eguchi, Y.; Shinohara, M.; Sato, T. Effects of Organic Fertilizer on Bok Choy Growth and Quality in Hydroponic Cultures. *Agronomy* **2021**, *11*, 491. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
42. Chinta, Y.D.; Kano, K.; Widiastuti, A.; Fukahori, M.; Kawasaki, S.; Eguchi, Y.; Misu, H.; Odani, H.; Zhou, S.; Narisawa, K.; *et al.* Effect of corn steep liquor on lettuce root rot

- (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*) in hydroponic cultures. *J. Sci. Food Agr.* **2014**, 94, 2317–2323. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zhang, J.; Zhou, J.W.; Liu, J.; Chen, K.J.; Liu, L.M.; Chen, J.A. Development of chemically defined media supporting high cell density growth of *Ketogulonigenium vulgare* and *Bacillus megaterium*. *Bioresour. Technol.* **2011**, 102, 4807–4814. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Xiao, X.; Hou, Y.Y.; Liu, Y.; Liu, Y.J.; Zhao, H.Z.; Dong, L.; Du, J.; Wang, Y.; Bai, G.; Luo, G.A. Classification and analysis of corn steep liquor by UPLC/Q-TOF MS and HPLC. *Talanta* **2013**, 107, 344–348. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hofer, A.; Herwiga, C. Quantitative determination of nine water-soluble vitamins in the complex matrix of corn steep liquor for rawmaterial quality assessment. *J. Chem. Technol. Biot.* **2017**, 92, 2106–2113. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
46. Cho, M.-H.; Park, H.L.; Hahn, T.-R. Engineering leaf carbon metabolism to improve plant productivity. *Plant Biotechnol. Rep.* **2015**, 9, 1–10. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
47. Blázquez, M.A.; Nelson, D.C.; Weijers, D. Evolution of plant hormone response pathways. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2020**, 71, 327–353. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
48. Iqbal, A.; Qiang, D.; Alamzeb, M.; Xiangru, W.; Huiping, G.; Hengheng, Z.; Nianchang, P.; Xiling, Z.; Meizhen, S. Untangling the molecular mechanisms and functions of nitrate to improve nitrogen use efficiency. *J. Sci. Food Agr.* **2020**, 100, 904–914. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. The, S.V.; Snyder, R.; Tegeder, M. Targeting nitrogen metabolism and transport processes to improve plant nitrogen use efficiency. *Front. Plant Sci.* **2021**, 11, 628366. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
50. D’Mello, J.P.F. (Ed.) *Amino Acids in Higher Plants*; CABI International: Edinburgh, UK, 2015. [[Google Scholar](#)]
51. Mustafa, A.; Hussain, A.; Naveed, M.; Ditta, A.; Nazli, Z.E.H.; Sattar, A. Response of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) to soil and foliar applied L-tryptophan. *Soil Environ.* **2016**, 35, 76–84. [[Google Scholar](#)]
52. Lehmann, S.; Funck, D.; Szabados, L.; Rentsch, D. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* **2010**, 39, 949–962. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
53. Van der Sar, S.; Kim, H.K.; Meissner, A.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy for plant metabolite profiling. In *The Handbook of Plant*

- Metabolomics, 1st ed.; Weckwerth, W., Kahl, G., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2013; pp. 57–76. [[Google Scholar](#)]
54. Pervaiz, A.; Iqbal, A.; Khalid, A.; Manzoor, A.; Noreen, S.; Ayaz, A.; Zafar, Z.U.; Athar, H.; Ashraf, M. Proline induced modulation in physiological responses in wheat plants. *J. Agric. Environ. Sci.* **2019**, *8*, 112–119. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
55. Alfosea-Simón, M.; Simón-Grao, S.; Zavala-Gonzalez, E.A.; Cámara-Zapata, J.M.; Simón, I.; Martínez-Nicolás, J.J.; Lidón, V.; Rodríguez-Ortega, W.M.; García-Sánchez, F. Application of biostimulants containing amino acids to tomatoes could favor sustainable cultivation: Implications for tyrosine, lysine, and methionine. *Sustainability* **2020**, *12*, 9729. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
56. Epstein, E.; Bloom, A.J. *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*, 2nd ed.; Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA, 2005. [[Google Scholar](#)]



| 11.3. PUBLICACIÓN 3 |
|---|
| Corn Steep Liquor Application Improves Pepper (<i>Capsicum annum</i> L.) Tolerance to Salinity |
| Iván Navarro-Morillo, Sofia Pardo-Pina, Francisco Garcia-Sánchez, Juan Manuel Ruiz, Santiago Laserna-Arcas, Felix Plasencia and José M. Cámara-Zapata |
| <i>Horticulturae</i> 2023, 9, 785 |
| Factor de impacto: 3,1 Q1 (2023) (Categoría Agricultural and Biological Sciences) |

Corn Steep Liquor Application Improves Pepper (*Capsicum annum* L.) Tolerance to Salinity

Iván Navarro-Morillo¹, Sofia Pardo-Pina², Francisco Garcia-Sánchez³, Juan Manuel Ruiz⁴, Santiago Laserna-Arcas¹, Felix Plasencia⁵ and José M. Cámara-Zapata^{2,*}

1. Research + Development Department of Atlántica Agrícola, 03400 Villena, Spain
2. Institute for Agro-Food and Agro-Environmental Research and Innovation (CIAGRO-UMH), Miguel Hernández University, 03312 Orihuela, Spain
3. Center for Edaphology and Applied Biology of Segura, Higher Council for Scientific Research, 30100 Murcia, Spain
4. Department of Plant Physiology, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain
5. EFA El Campico School, El Campico s/n, 03310 Jacarilla, Spain

*Correspondence: jm.camara@umh.es

Abstract

Salinity, caused by irrigation with water containing high salt concentrations, excessive fertilization, or the loss of leaching capacity in some soils, is a serious problem on a global scale. Its incidence leads to osmotic and specific effects, as well as an imbalance in nutrient uptake that hinders the growth of most crops. Biostimulants can improve salt tolerance by reducing the uptake and accumulation of toxic ions. Corn steep liquor (CSL) is a byproduct of corn cleaning and maceration. This study investigates whether CSL application induces adaptive responses in pepper (*Capsicum annum* L.) plants cultivated under saline conditions. Four treatments were carried out with pepper plants in a culture chamber: irrigation with Hoagland nutrient solution; irrigation with 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution; irrigation with 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution and the foliar application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days; and irrigation with 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution and root application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days. The beneficial effect of CSL in reducing the phytotoxicity of salt stress was

found to be due to an improvement in the photosynthetic efficiency and a reduction in the generation of reactive oxygen species. Thus, the increase in MDA concentration due to saline treatment is less when applying CSL, which is 3.5 times less when it is performed via the foliar route and 4.6 times if the treatment is on the root. The results show that CSL application increased the aerial biomass and leaf area under saline conditions through physiological mechanisms that varied depending on the application method.

Keywords: antioxidant activity; biostimulant; ionic toxicity; oxidative stress; proline

1. INTRODUCTION

Salinity is a serious problem in global agriculture, affecting nearly 1 billion hectares of land, which is approximately 20 %, almost half of the irrigated arable land worldwide [1]. The low quantity and quality of water available for irrigation makes it necessary to use groundwater and unconventional sources with high concentration of salts. As such, a progressive salinization of the soil develops, especially in arid areas with irrigated crops [2]. The excessive use of fertilizers and the reduced leaching capacity of certain soils have also contributed to this problem [3]. The salinity of irrigation water and soil hinders the growth of most crops due to the inhibition of water uptake through the osmotic effects caused by the increased salt concentration in the root zone. It also leads to an excessive uptake of Na^+ and Cl^- , resulting in specific ionic toxicity [4]. Furthermore, the high concentrations of these ions, Na^+ and Cl^- , in the root zone, disrupt the uptake of cations such as K^+ and Ca^{2+} , as well as anions such as NO_3^- and PO_4^{3-} [5]. The high concentrations of Na^+ and Cl^- also affect other processes, including water relations, light capture, CO_2 assimilation and antioxidant capacity, among others, ultimately resulting in reduced growth, biomass, and crop yield [6,7,8,9,10,11].

The use of biostimulants could prove to be an effective tool in reducing the toxic effect of salinity in plants, partly due to a reduction in the uptake and accumulation of Na^+ and Cl^- ions [12]. Thus, the application of chitosan-based salicylic acid nanocomposite in a vineyard (*Vitis vinifera* cv ‘Sultana’) [13], the foliar application of 24-epibrassinolide to pepper (*Capsicum annuum* L.) [14], the treatment of basil (*Ocimum basilicum* L.) with a hydrolyzed animal protein-based biostimulant [15], the application of a graminaceae-derived protein hydrolysate and its fractions to lettuce (*Lactuca sativa* L.) [16], the addition of a protein hydrolysate of plant origin to spinach (*Spinacia oleracea* L.) [17], the application of the hydroalcoholic extracts of brown algae (*Sargassum* spp.) to tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [18], and the addition of *Ulva intestinalis* (L.) extract to bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [19] have been found to improve production and quality under saline conditions. Corn steep liquor (CSL) is a byproduct obtained from the cleaning and maceration of corn during wet milling. Although its use requires appropriate treatment to avoid environmental issues [20], it holds great promise in terms of the circular economy and sustainability [21]. It

contains high amounts of proteins, amino acids, minerals, vitamins, reducing sugars, organic acids, enzymes, and other substances that promote plant growth. Its application to soil improves the utilization of macronutrients by promoting the growth of bacteria that contribute to nitrogen (N) fixation and phosphorus (P) solubilization [22]. In lettuce hydroponics, the use of CSL favored microbial development that protected the root system [23,24]. In soybean (*Glycine max*) crops, treatment with 1 % CSL favored germination, growth and precocity due to an increase in the uptake and transport of nutrients [25].

To meet the expectations generated by the biostimulant sector, it is necessary to establish the composition and mechanism of action of each product. In a previous study on the role of two CSL products, with different stabilization methods, in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants, a better response was found with the so-called CSL-B, which undergoes filtration to remove suspended solids and stabilization [26]. Its composition (% g⁻¹ fresh product) includes free amino acids (5.0–6.0), total organic matter (40), total humic extract (30), fulvic acids (30), total N (3.0), ammoniacal N (0.3), organic N (2.7), potassium, K₂O, (2.5) and P, P₂O₅, (3.0). Its mode of action is related to regulation, hormone synthesis, and the stimulation of C and N metabolism [26]. Despite being a widely studied product with many beneficial applications, it is unknown whether the application of CSL induces adaptive responses in pepper plants grown under challenging conditions such as salt stress. This study examines the mechanisms of action of this type of CSL in this crop under saline conditions and the effect of the application method, either root or foliar.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant Material and Growth Conditions

Pepper plants (*Capsicum annuum* cv. Alycum) that were 45 days old were planted in 2 L pots filled with a substrate comprising perlite and peat at a ratio of 1:3. The plants were placed in a growth chamber with a temperature of 29 °C and a relative humidity (RH) of 60 % during the day (16 h), with a photosynthetic photon flux density (PPFD) of 450 μmol photons m⁻² s⁻¹, and 20 °C and 80 % RH during the night. Fertigation was carried out using a Hoagland nutrient solution composed of 4 mM KNO₃, 2 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 2 μM MnCl₂, 1 μM ZnSO₄, 0.25 μM CuSO₄, 0.1 μM Na₂MoO₄, 125 μM Fe-EDDHA, and 50 μM H₃BO₃ (pH 5.8). A weekly irrigation was performed with a volume ranging from 50 to 100 mL, according to the size of the plants.

2.2. Experimental Design

Seven days after transplantation, the following treatments were applied: T1: Hoagland nutrient solution; T2: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution; T3: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the foliar application of CSL at 5 mL L⁻¹; and T4: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with a root application of CSL at 5 mL L⁻¹. The CSL product, both via

foliar and root application, was applied four times at 7-day intervals from the beginning of the treatments. In the growth chamber, two blocks were prepared with four treatments in each one and eight plants per treatment with random distribution. Seven days after the last CSL application, plant growth was determined, physiological status was evaluated, indicators of oxidative stress and antioxidant components were analyzed, and the specific toxicity was established.

2.3. Aerial Biomass and Leaf Area

The measurement of the leaf area was carried out using a LI-COR optical reader, model LI-3000A (IRGA: LICOR Inc., Lincoln, NE, USA). For the determination of dry matter (DM), the leaves were dried by radiation and forced convection in an oven. Leaf samples for determining oxidative indicators and antioxidant compounds were stored at -40 °C.

2.4. Gas Exchange Measurements

The measurements were performed using the LICOR 6800 Portable Photosynthesis System (IRGA: LICOR Inc., Lincoln, NE, USA), an infrared gas analyzer. A fully developed leaf, in an intermediate situation, was selected from every eight plants per treatment. The calibration conditions were 500 mol photons m⁻² s⁻¹ of photosynthetically active radiation (PAR), a CO₂ concentration of 400 mol mol⁻¹, a leaf temperature of 30 °C, and 60 % RH. Net photosynthetic rate (A), transpiration rate (E), and stomatal conductance (r) were simultaneously recorded. The data were analyzed using the Photosyn Assistant software (IRGA: LICOR Inc., NE, USA). To estimate the instantaneous water use efficiency (WUE), the relationship between A and E was used [27].

2.5. Fluorescence of Chlorophyll a (Chl a)

The fluorescence kinetics of Chl a were determined, using a Handy PEA Chlorophyll Fluorimeter (Hansatech Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK), for completely developed leaves from the center of the plant. Red light (650 nm) with an intensity of 3000 μmol photons m⁻² s⁻¹ was used to induce the fluorescence phases, and the JIP test was employed for analysis [27]. The parameters determined were the maximum quantum yield of primary photochemistry (F_v/F_m), performance index (PI_{ABS}), proportion of active reaction centers (RC/ABS), and electron output (1-V_j) [27].

2.6. Oxidative Stress

The extraction of malondialdehyde (MDA), C₃H₄O₂, was performed on homogenized fresh plant material in a mortar with 5 mL of 50 mM buffer (0.07 % NaH₂PO₄·2H₂O and 1.6 % Na₂HPO₄·12H₂O). The mixture was then centrifuged at 20,000× g (Heraeus Sepatech Biofuge 17RS, Hanau, Germany) for 25 min. Next, 1 mL of the supernatant was mixed with 4 mL of 20 % trichloroacetic acid (CCl₃COOH) containing 0.5 % thiobarbituric acid (C₄H₂N₂O₂S). The resulting mixture was heated at 95 °C for 30 min and then rapidly reduced. This sample was then

centrifuged at $10,000\times$ g for 10 min (Heraeus Sepatech Biofuge 17RS, Hanau, Germany). The absorbance of the supernatant was measured at 532 nm. The non-specific absorption at 600 nm was subtracted from the obtained reading [28].

The concentration of hydrogen peroxide (H_2O_2) was measured by colorimetry according to [29]. For this, fresh plant material was homogenized in cold acetone ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$). A 1 mL aliquot of the extract was mixed with 200 μL of 0.1 % titanium dioxide (TiO_2) in 20 % H_2SO_4 (v:v) and the mixture was centrifuged at $6000\times$ g for 15 min (Heraeus Sepatech Biofuge 17RS, Hanau, Germany). The intensity of the yellow color of the supernatant was measured at 415 nm, and the concentration of H_2O_2 was calculated from its corresponding standard curve.

The superoxide (O_2^-) concentration was determined by colorimetry [30], and was calculated from a standard curve.

2.7. Antioxidant Activity

2.7.1. Antioxidant Compounds (Total Phenols, Ascorbate, Glutathione)

Total phenols were extracted from plant tissue with methanol, CH_4O . The content was determined based on the absorbance at 765 nm using the Folin–Ciocalteu reagent [31]. The phenol concentration was derived from a standard curve of caffeic acid, $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$.

For the extraction and quantification of ascorbate (AsA), the method described by [32] was used, which is based on the reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} by AsA in acidic solution. Frozen plant material (0.5 g) was homogenized in 5 mL of 5 % (w/v) metaphosphoric acid, HPO_3 . The mixture was then centrifuged at $16,000\times$ g at 4 °C for 15 min (Heraeus Sepatech Biofuge 17RS, Hanau, Germany). Then, 0.2 mL of the supernatant was added to a test tube along with 0.5 mL of 150 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) and 0.1 mL of distilled water. The mixture was shaken and incubated at room temperature in darkness for 10 min. Subsequently, 0.1 mL of 0.5 % (w/v) N-ethylmaleimide, $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2$, 0.4 mL of 44 % (v/v) orthophosphoric acid, H_3PO_4 , 0.4 mL of 4 % (w/v) 2,2'-bipyridine, $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2$, in 70 % ethanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, and 0.2 mL of 3 % (w/v) FeCl_3 were added to the tube. After shaking, the mixture was incubated at 40 °C in darkness for 40 min. Finally, the absorbance was measured at 525 nm against an ascorbate standard curve.

The concentration of reduced glutathione (GSH), $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, was determined as detailed by [32], based on the specificity of glutathione reductase (GR) for oxidized glutathione (GSSG). First, extraction was carried out using 0.5 g of fresh material homogenized in 5 mL of 5 % (v/v) metaphosphoric acid, HPO_3 . The sample was filtered and centrifuged at $16,000\times$ g for 15 min at 0 °C (Heraeus Sepatech Biofuge 17RS, Hanau, Germany). For the quantification of total GSH, a reaction mixture was prepared with 50 μL of the extract and 250 μL of 50 mM Heppes-HCl buffer, pH 7.6, containing 330 mM betaine, $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$, and 150 μL of 10 % (v/v) sulfosalicylic acid, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S}$. Subsequently, in a test tube, 150 μL of the reaction mixture, 700 μL of 0.3 mM

NADPH, and 100 μL of 6 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were added. The mixture was shaken, and after a 4 min incubation, 50 μL of GR (10 U/mL) were added. Finally, the samples were read at 412 nm against a GSH standard curve.

2.7.2. Antioxidant Tests FRAP and TEAC

The ferric ion reducing antioxidant potential (FRAP) assay was performed using the FRAP reagent, composed of 1 mM 2,4,6-tripyridyl-2-triazine (TPTZ) and 20 mM FeCl_3 in 0.25 M sodium acetate, CH_3COONa , pH 3.6. One hundred microliters of the extract obtained by homogenizing leaf material with 10 mL of methanol, CH_4O , was added to 2 mL of the FRAP reagent. This mixture was maintained at 20 °C for 5 min. The absorbance was measured at 593 nm against a standard curve of 25–1600 μM Fe^{3+} obtained from a 25 mM solution of ferrous sulfate, FeSO_4 [33].

The Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) test was conducted using a modified version of the procedure described by [34]. First, 7 mM 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) was mixed with 2.45 mM potassium persulfate, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, to generate the ABTS^+ cation. The resulting mixture was incubated in the dark at room temperature for 16 h. Then, the ABTS^+ solution was diluted with methanol, CH_4O , and calibrated at a wavelength of 734 nm. A 100 μL aliquot of leaf extract (0.5 g in 10 mL of CH_4O) was vigorously mixed with 3.9 mL of diluted ABTS^+ solution and then kept in the dark at room temperature for 6 min, followed by the immediate measurement of the absorbance at 734 nm. The samples were compared to a standard curve of 0–15 μM Trolox subjected to the same procedure.

2.8. Proline

The concentration of free proline, $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$, in the leaves was determined using the method of [35].

2.9. Na^+ , Cl^- , and K^+ Concentrations

Leaf samples were mineralized according to the method described by [36]. Digestion of dried leaves (0.2 g) was carried out in 30 % HNO_3 and H_2O_2 at 300 °C. The determination of the Na^+ , Cl^- , and K^+ concentrations was performed using ICP-OES (Perkin-Elmer Optima 8300, Waltham, MA, USA).

2.10. Statistical Analysis

All analyses were carried out in triplicate, and the results were statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA) with a 95 % confidence interval. There were no differences between blocks. Differences between the treatment means were compared using Fisher's least significant difference (LSD) test at a probability level of 95 %. The levels of significance were expressed as: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS—not significant.

3. RESULTS

3.1. Aerial Biomass and Leaf Area in Pepper Plants (*Capsicum annuum*, cv. *Alycum*)

The salinity treatment caused a reduction in aerial biomass and leaf area. Plants treated with 100 mM NaCl exhibited a lower aerial biomass (35 % of fresh weight and 48 % of dry weight) and leaf area (43 %) compared to the control plants. The application of the corn steep liquor (CSL) product to plants treated with 100 mM NaCl, either via foliar or root application, was beneficial in minimizing the decrease in aerial biomass and leaf area due to salinity. Thus, the values of aerial biomass, fresh or dry, and leaf area in these CSL treatments, ranged from 50 % to 70 % of the values of the control plants. Although the results did not differ significantly among the CSL treatments, the root application of CSL led to higher values of biomass and leaf area than the foliar treatment did ([Table 1](#)).

Table 1. Aerial biomass production and leaf area in pepper plants (*Capsicum annuum*, cv. *Alycum*), 7 days after the treatments commenced. T1: Hoagland nutrient solution; T2: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution; T3: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the foliar application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days; and T4: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the root application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days.

| Treatments | Aerial Fresh Biomass (g plant ⁻¹) | Aerial Dry Biomass (g plant ⁻¹) | Leaf Area (cm ²) |
|-----------------|---|---|------------------------------|
| T1 | 55 ± 7 a | 5.2 ± 0.7 a | 1200 ± 200 a |
| T2 | 19 ± 2 c | 2.5 ± 0.2 c | 510 ± 50 c |
| T3 | 27 ± 2 b | 3.1 ± 0.3 b | 780 ± 60 b |
| T4 | 30 ± 2 b | 3.2 ± 0.2 b | 830 ± 40 b |
| <i>p</i> -value | *** | *** | *** |

[Figure 1](#) displays plants corresponding to the different treatments. The growth reduction caused by the salinity treatment can be observed, as well as the recovery effect due to the application of CSL, particularly through root application.

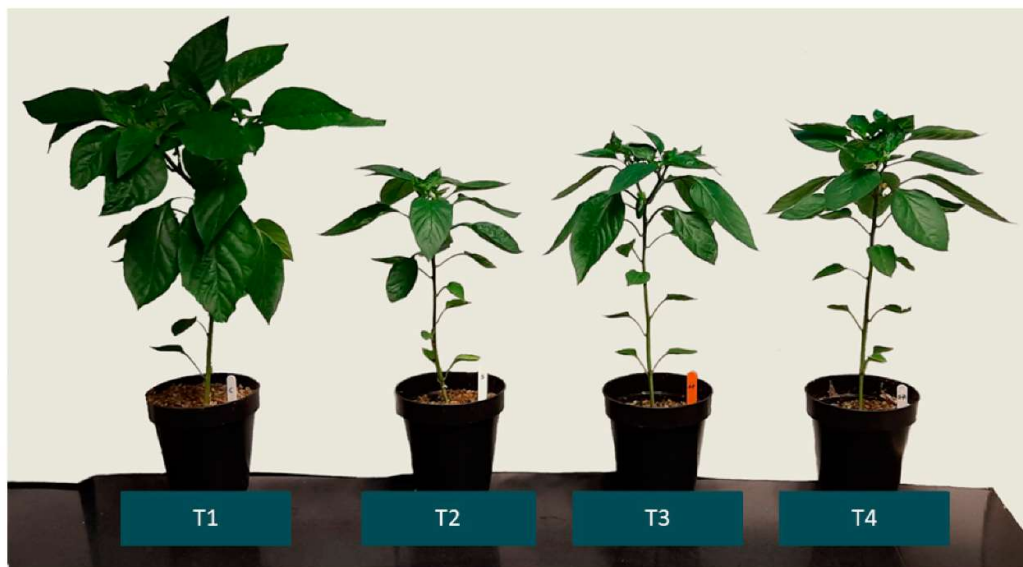


Figure 1. Pepper plants (*Capsicum annuum*, cv. Alycum) subjected to different treatments at the end of the experiment. T1: Hoagland nutrient solution; T2: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution; T3: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the foliar application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days; and T4: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the root application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days.

3.2. Gas Exchange Parameters in Pepper Plants (*Capsicum annuum*, cv. Alycum)

The values of the rate of photosynthesis (A), the rate of transpiration (E), and the water use efficiency (WUE) were significantly reduced in plants exposed to 100 mM NaCl under the experimental conditions used. The greatest reduction occurred in the case of A, its value under saline conditions being 20 % of that of the control plants. The CSL treatments, particularly the root application, mitigated this effect, with the value of A being 56 % of that of the control plants. Plants subjected to salt stress experienced a significant increase in stomatal resistance (r; value equal to 141 % of that of the control plants) due to a generalized stomatal closure, to prevent excessive water loss. The CSL treatments limited the magnitude of this increase, especially when applied to the roots, with the value being equal to 127 % of the control plants (Table 2). Stomatal closure is thought to be a fast mechanism of adaptation to water stress and is vital for water conservation in plants. However, in this study, as time passed, a considerable reduction in the net rate of photosynthesis (Table 2) resulted in a significant decrease in biomass production in these stressed plants (Table 1).

Table 2. Parameters of photosynthetic efficiency in pepper plants (*Capsicum annuum*, cv. Alycum), 7 days after the treatments commenced. A: net assimilation of CO₂; E: leaf transpiration; r: stomatal resistance; WUE: water use efficiency. T1: Hoagland nutrient solution; T2: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution; T3: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with

the foliar application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days; and T4: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the root application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days.

| Treatments | A ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | r (s cm^{-1}) | WUE |
|------------|--|--|--------------------------|-------------|
| T1 | 6.1 ± 0.7 a | 0.67 ± 0.05 a | 6.6 ± 0.4 c | 9.0 ± 0.5 a |
| T2 | 1.3 ± 0.3 d | 0.34 ± 0.04 c | 9.3 ± 0.3 a | 4.0 ± 0.6 d |
| T3 | 2.2 ± 0.2 c | 0.40 ± 0.04 bc | 8.8 ± 0.4 ab | 5.3 ± 0.2 c |
| T4 | 3.4 ± 0.2 b | 0.44 ± 0.06 b | 8.4 ± 0.5 b | 7.7 ± 1.4 b |
| p-value | *** | *** | *** | *** |

3.3. Chl a Fluorescence in Pepper Plants (*Capsicum annuum*, cv. *Alycum*)

The control plants had an Fv/Fm value of 0.849. The salinity treatment caused a reduction in the Fv/Fm value to 93 % of the value of the control plants (Table 3). The application of the CSL product mitigated this reduction and the values were equal to 98 % of that of the control plants. The rest of the indices determined showed a similar behaviour, except for the 1-Vj value. In this case, no significant differences were found among the treatments.

Table 3. Chl a fluorescence in pepper plants (*Capsicum annuum*, cv. *Alycum*) 7 days after the treatments commenced. Fv/Fm, quantum yield of primary photosynthesis; RC/ABS, active reaction centers of photosystems; PI_{ABS}, photosynthetic performance index; 1-Vj, electron output from photosystem II. T1: Hoagland nutrient solution; T2: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution; T3: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the foliar application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days; and T4: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the root application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days.

| Treatments | Fv/Fm | RC/ABS | PI _{ABS} | 1-Vj |
|------------|-----------------|---------------|-------------------|---------------|
| T1 | 0.849 ± 0.010 a | 0.94 ± 0.10 a | 9.9 ± 1.1 a | 0.69 ± 0.01 a |
| T2 | 0.793 ± 0.013 c | 0.71 ± 0.10 b | 7.2 ± 1.2 b | 0.70 ± 0.01 a |
| T3 | 0.830 ± 0.006 b | 0.86 ± 0.04 a | 9.2 ± 0.5 a | 0.70 ± 0.01 a |
| T4 | 0.829 ± 0.006 b | 0.87 ± 0.04 a | 9.9 ± 1.2 a | 0.72 ± 0.02 a |
| p-value | *** | * | * | NS |

3.4. Oxidative Stress

The values of the oxidative stress indicators analyzed, MDA, O₂⁻, and H₂O₂, were significantly greater for the plants exposed to 100 mM NaCl than for the control plants under the experimental conditions employed, especially the values of O₂⁻ (equal to 350 % of that the control plants) and

MDA (180 %). The application of CSL reduced the values of these parameters, especially those of MDA (124 % of the control plants in the foliar treatment and 118 % in the root treatment) (Table 4).

Table 4. Oxidative stress indicators in peppers plants (*Capsicum annuum*, cv. Alycum) 7 days after the treatments commenced. T1: Hoagland nutrient solution; T2: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution; T3: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the foliar application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days; and T4: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the root application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days.

| Treatments | MDA ($\mu\text{M g}^{-1}$ FW) | O ₂ ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW) | H ₂ O ₂ ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW) |
|------------|--------------------------------|---|--|
| T1 | 3.4 ± 0.2 c | 4 ± 1 c | 32 ± 3 c |
| T2 | 6.2 ± 0.4 a | 14 ± 1 a | 45 ± 4 a |
| T3 | 4.2 ± 0.1 b | 8 ± 1 b | 39 ± 4 b |
| T4 | 4.0 ± 0.2 b | 8 ± 1 b | 39 ± 3 b |
| p-value | *** | *** | *** |

3.5. Antioxidant Compounds in Pepper Plants (*Capsicum annuum*, cv. Alycum)

The salinity treatment increased the concentrations of the antioxidant compounds, especially phenols (180 % of the value of the control plants) and ascorbate (175 %) (Table 5). Under saline conditions, the foliar application of CSL increased the levels of these compounds, while the root application decreased them.

Table 5. Antioxidant compounds in pepper plants (*Capsicum annuum*, cv. Alycum) 7 days after the treatments commenced. T1: Hoagland nutrient solution; T2: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution; T3: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the foliar application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days; and T4: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the root application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days.

| Treatments | Phenols (mg g^{-1} FW) | Ascorbate (mg g^{-1} FW) | Glutathione (mg g^{-1} FW) |
|------------|----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| T1 | 2.1 ± 0.1 c | 0.04 ± 0.01 c | 0.08 ± 0.01 c |
| T2 | 5.9 ± 1.1 b | 0.11 ± 0.01 b | 0.10 ± 0.01 b |
| T3 | 7.0 ± 1.1 a | 0.14 ± 0.01 a | 0.14 ± 0.02 a |
| T4 | 4.8 ± 1.1 b | 0.09 ± 0.01 b | 0.10 ± 0.01 b |
| p-value | *** | *** | *** |

The concentrations of these antioxidant compounds show a trend similar to that of the antioxidant capacity determined by the ferric ion reducing antioxidant potential (FRAP) and Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) tests, which indicate the overall antioxidant activity of the plants. The values yielded by these tests were the highest for the plants subjected to salinity and those receiving the foliar application of CSL under saline conditions, especially for the FRAP test. The values of the TEAC antioxidant test for the plants exposed to CSL applied via the roots are lower than those of the plants grown under saline conditions without CSL treatment (Figure 2).

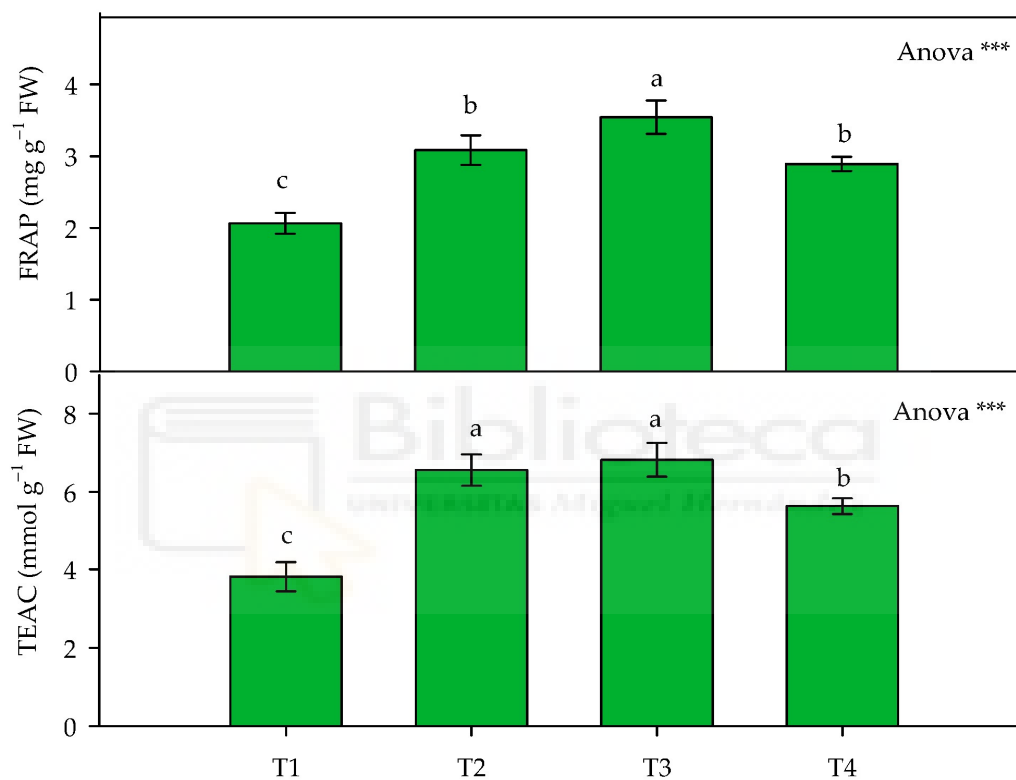


Figure 2. Values of the ferric ion reducing antioxidant potential (FRAP) and Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) tests for pepper plants (*Capsicum annuum*, cv. Alycum), 7 days after the treatments commenced. T1: Hoagland nutrient solution; T2: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution; T3: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the foliar application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days; and T4: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the root application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days. In the ANOVA, the significance level is represented by $p < 0.001$ (***). The different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means, as established by Fisher's least test (LSD). The values indicate the means \pm standard deviations (SDs) ($n = 8$).

3.6. Proline Concentration in Pepper Plants (*Capsicum annuum*, cv. *Alycum*)

Proline levels were significantly higher under saline conditions, underlining that proline is an indicator of this type of stress (Figure 3). Control plants and those treated with CSL under saline conditions, especially via the root, showed the lowest proline concentrations.

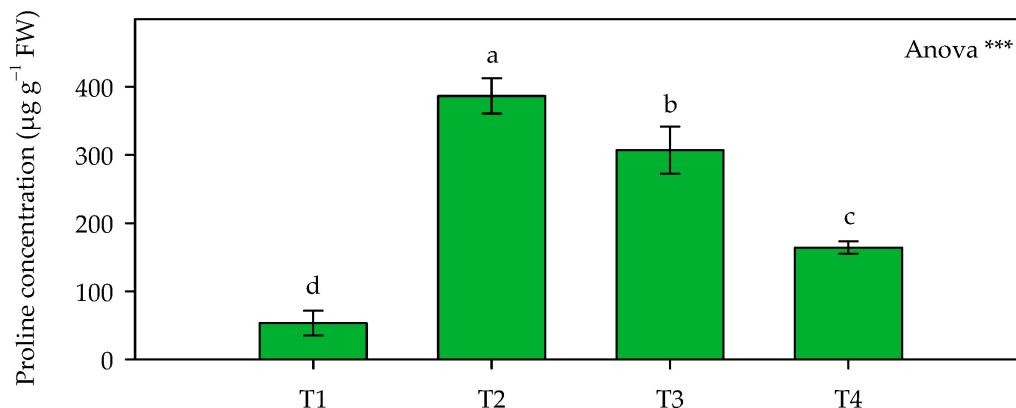


Figure 3. Foliar proline concentrations in pepper plants (*Capsicum annuum*, cv. *Alycum*), 7 days after the treatments commenced. T1: Hoagland nutrient solution; T2: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution; T3: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the foliar application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days; and T4: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the root application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days. In the ANOVA, the significance level is represented by $p < 0.001$ (***). The different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means, as established by Fisher's least test (LSD). The values indicate the means \pm standard deviations (SDs) ($n = 8$).

3.7. Specific Toxicity in Pepper Plants (*Capsicum annuum*, cv. *Alycum*)

The salinity treatment raised the leaf concentrations of Na⁺ and Cl⁻, and decreased that of K⁺. The foliar application of CSL under saline conditions diminished the leaf concentrations of Na⁺ and Cl⁻. The root applications of CSL raised the leaf concentration of K⁺ (Table 6).

Table 6. Foliar concentrations of the Na⁺, Cl⁻, and K⁺ ions in peppers plants (*Capsicum annuum*, cv. *Alycum*), 7 days after the treatments commenced. T1: Hoagland nutrient solution; T2: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution; T3: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with the foliar application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days; and T4: 100 mM NaCl in the Hoagland nutrient solution with root application of CSL at 5 mL L⁻¹ every 7 days.

| Treatments | Na ⁺ (mg g ⁻¹ DW) | Cl ⁻ (mg g ⁻¹ DW) | K ⁺ (mg g ⁻¹ DW) |
|-----------------|---|---|--|
| T1 | 2.4 ± 0.5 c | 2.3 ± 0.5 c | 64.3 ± 2.4 a |
| T2 | 35.9 ± 3.2 a | 36.1 ± 4.6 a | 44.8 ± 1.2 c |
| T3 | 15.6 ± 1.9 b | 16.9 ± 2.0 b | 44.8 ± 0.6 c |
| T4 | 34.7 ± 4.6 a | 37.0 ± 3.3 a | 55.3 ± 3.1 b |
| <i>p</i> -value | *** | *** | *** |

4. DISCUSSION

The corn steep liquor (CSL) treatment, especially via root application, significantly improved the growth of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants treated with 100 mM NaCl under the prevailing experimental conditions. The application of CSL to the roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants was found to enhance plant growth [25]. The application of biostimulants with different proportions of humic acids and fulvic acids in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under saline stress conditions improves growth, increasing fresh and dry matter [37]. The application of a biostimulant amino acid to a salt-resistant variety of basil (*Ocimum basilicum* L.) improved production under saline conditions [15]. Treatment with a hydrolyzed protein of plant origin enhanced the lettuce (*Lactuca sativa* L.) and spinach (*Spinacia oleracea* L.) production under moderate salinity, although its effect varied depending on its molecular fraction [16,17].

Under environmental stress, the significant inhibition of photosynthesis is commonly observed [6,7,9,10,11]. However, in some plant species, the application of biostimulants can reverse this inhibition and restore normal plant growth [12,13,38,39]. In certain cases, these treatments with biostimulants can prevent the complete closure of stomata under stress conditions, thereby promoting the maintenance of photosynthetic activity in plants [38]. The results obtained here verify that the CSL product, particularly via root application, would act in this manner, as its use increased A, E, and WUE, while reducing stomatal resistance (*r*) compared to plants under salinity stress (Table 2). This effect can also be observed, although to a lesser extent and with less significance, in stressed plants receiving the foliar application of CSL (Table 2). Similar findings were reported for tomato seedlings treated with a hydroalcoholic extract of *Sargassum* spp. under saline conditions [18].

When there is metabolic disturbance, the plants produce fluorescence to dissipate excess energy and prevent damage [27]. The photosynthetic efficiency can be deduced from the value of the quantum yield of primary photosynthesis (Fv/Fm). In healthy plants or those not subjected to intense stress, the Fv/Fm value is typically around 0.85 [27]. In the experimental conditions used here, the control plants had an Fv/Fm value of 0.849. The salinity treatment caused a reduction in the Fv/Fm values, indicating increased chlorophyll a fluorescence and thus high salt stress [27].

The analysis of chlorophyll a fluorescence provides several indices that define plant vitality. The RC/ABS ratio is an essential parameter to evaluate the electron transport chain in photosystems. High values of this indicator correspond to a higher proportion of active reaction centers [27]. The PI_{ABS} index represents the photosynthetic performance functionality of the photosystems. The $1-V_j$ value denotes electron leakage, particularly from photosystem II [27]. Plants treated with CSL under saline conditions show a mitigated decrease in F_v/F_m , with values above 0.8, suggesting improved adaptation (Table 3). This is due to the enhanced protection and activation of the photochemical process under stress conditions. Intracellular CO_2 availability would have also increased due to reduced stomatal closure, leading to the greater availability of the endogenous electron acceptor, NADP, and thereby reducing the electron transfer to oxygen and, consequently, ROS formation. Additionally, the net photosynthesis rate increased, which contributed to increased biomass production under these stress conditions (Table 1). The rest of the photochemical activity and vitality indices of the plants suggest that, under saline stress conditions, the application of the CSL product, both foliar and via the roots, improved the coupling of the different components of the photochemical stage, hence improving the efficiency of the conversion of light energy into chemical energy, therefore increasing plant vitality. Thus, the RC/ABS and PI_{ABS} indices had their highest values in the control plants and those treated with CSL under saline conditions (Table 3). These results also indicate that the electron loss in the photochemical phase of photosynthesis was reduced by CSL application to plants suffering salt stress, decreasing the formation of reactive oxygen species (ROS) [27].

Saline stress also results in the accumulation of ROS, such as H_2O_2 and O_2^- , which drastically disrupt metabolic homeostasis and affect the integrity of the cell membrane [6,8,10,18]. The reduction in ROS accumulation is crucial for plant survival under saline stress conditions; thus, oxidative metabolism has long been used as an indicator of the resulting damage [6,7,8,9,10,11]. Plants possess ROS detoxification mechanisms to prevent damage, which can be categorized into enzymatic systems and non-enzymatic systems consisting of antioxidant compounds (phenols, glutathione, flavonoids, ascorbic acid, anthocyanins, etc.) The increase in antioxidant enzymes and compounds under abiotic stress, such as water and salinity stress, depends on the species, cultivar, plant development stage, and metabolic state, as well as on the intensity and length of the stress [7,9,11]. In the face of the abiotic stresses, biostimulants have been shown to reduce cellular oxidative damage, including the peroxidation of cell membrane lipids, in many plant species. This is achieved through the regulation of antioxidant defenses and the decrease in ROS levels in plants [12,38,39]. In this regard, the concentration of MDA serves as an indicator of lipid membrane peroxidation, and an increase in its values suggests the excessive presence of ROS [7,9,11]. The control plants exhibited the highest values of aerial biomass and leaf area, as well as the lowest levels of leaf MDA (Table 1 and Table 4). The plants treated with CSL under saline

conditions had slightly higher MDA values, while the highest values were found in the plants experiencing saline stress without CSL application. These findings are in agreement with the foliar concentrations of H_2O_2 and O_2^- (Table 4). When different proportions of humic acids and fulvic acids were applied to tomato plants suffering saline stress, it was found that a reduction in the MDA content improved the response to salinity [37].

One of the mechanisms by which biostimulants improve resistance to abiotic stresses is the induction of the plant's antioxidant defenses, both enzymatic and non-enzymatic [12,38,39]. In this study, the salt treatment induced a significant rise in the abundance of the analyzed antioxidant compounds (phenols, ascorbate, glutathione), especially for plants that received the CSL product via foliar application (Table 5). These results can be interpreted as an attempt to mitigate the oxidative damage caused by adverse growth conditions in pepper plants [7,9,11].

Compounds such as proline are often good indicators of resistance to saline stress, as they frequently play a role as osmoprotectants, osmoregulators, and antioxidants that protect against the generation of ROS [7]. The degradation of proline by the enzyme proline dehydrogenase involves oxygen (O_2) consumption, which reduces the likelihood of ROS generation. This may have happened when CSL was applied to salt-stressed plants, as the levels of ROS were lower than when CSL was not applied (Table 4). Therefore, CSL could act at the root level, enhancing ion selectivity by regulating the uptake of Na^+ and Cl^- and/or their accumulation in root tissues. As such, the translocation of these ions to the aerial part would be reduced, leading to an increased accumulation of K^+ (Table 6). These results suggest that, under the conditions of this experiment, proline was an indicator of plant stress, rather than inducing resistance to saline stress. In a study conducted with tomato and commercial formulations of biostimulants containing different proportions of humic and fulvic acids, an increase in the proline content was observed under salinity [37]. Similar results were obtained for wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings treated with the extracts of the brown alga *Macrocystis pyrifera* [40] and in tomato seedlings treated with a hydroalcoholic extract of *Sargassum* spp. under saline conditions [18].

According to some authors, the additional supply of organic constituents (e.g., amino acids) and/or hormones (e.g., cytokinins) may enhance ionic selectivity in roots, leading to a reduction in the ionic toxicity of NaCl in the aerial part of plants [12]. The reduction in the foliar concentrations of Na^+ and Cl^- ions (due to CSL application to leaves) and the increase in the foliar concentration of K^+ (when applied to roots), along with the activation of other resistance processes, would explain the enhanced growth of plants receiving CSL under saline stress. The formulations of microalgae and cyanobacteria extracts promoted salinity tolerance in tomato by enhancing the enzymatic antioxidant activity, root growth, and nutrient uptake [41]. The application of a plant-based protein to lettuce reduced the ionic toxicity under moderate salinity when its molecular fraction was intermediate (between 1 and 10 kDa) [16].

5. CONCLUSIONS

Under saline stress conditions, the application of corn steep liquor (CSL) resulted in a significant increase in biomass production in the aerial part, and in the leaf area. Therefore, the reduction in salinity stress caused by CSL can be mainly attributed to physiological mechanisms that varied depending on the application method. In the case of the foliar application of CSL, there was an induction of the antioxidant capacity and the synthesis of antioxidant compounds. This, together with the reduction in ROS formation due to the increased photochemical and photosynthetic efficiency and a decrease in the foliar concentrations of Na^+ and Cl^- , would have prevented oxidative damage and growth reduction. The root application of CSL maintained the photochemical activity and stimulated the photosynthetic efficiency. Along with a higher foliar concentration of K^+ and reduced stomatal closure under saline stress, this allowed a high rate of net photosynthesis and reduced ROS generation, as well as counteracting the phytotoxic effect of Na^+ ions. Thus, the root application of CSL could contribute to improving pepper production under salinity stress by reducing the K^+ fertilization. However, it is necessary to evaluate the effect of this treatment on the production and quality of pepper (*Capsicum annum* L.) plants under greenhouse and outdoor conditions. Additionally, we recommend that the biostimulating effect of CSL is further studied to determine its mechanisms of action on plant metabolism under abiotic stress.

Author Contributions

Conceptualization, F.G.-S., J.M.R. and J.M.C.-Z.; methodology, F.G.-S., J.M.R. and J.M.C.-Z.; software, I.N.-M., S.P.-P. and S.L.-A.; validation, I.N.-M., S.P.-P. and F.P.; formal analysis, I.N.-M., S.L.-A. and J.M.R.; investigation, I.N.-M., S.P.-P. and J.M.C.-Z.; resources, I.N.-M., F.G.-S. and J.M.C.-Z.; data curation, I.N.-M. and F.P.; writing—original draft preparation, I.N.-M., S.P.-P. and S.L.-A.; writing—review and editing, J.M.R., J.M.C.-Z. and F.G.-S.; visualization, I.N.-M., S.P.-P. and F.P.; supervision, J.M.C.-Z. and F.G.-S.; Project administration, J.M.C.-Z. and F.G.-S.; funding acquisition, J.M.C.-Z. and F.G.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research received no external funding.

Data Availability Statement

The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy reasons.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Velmurugan, A.; Swarnam, P.; Subramani, T.; Meena, B.; Kaledhonkar, M. Water Demand and Salinity. In *Desalination-Challenges and Opportunities*, 1st ed.; Farahani, M.H.D.A., Vatanpour, V., Taheri, A.H., Eds.; IntechOpen: Rijeka, Croatia, 2020; Chapter 3; pp. 1–12. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)][[Green Version](#)]
2. Alfosea-Simón, M.; Zavala-Gonzalez, E.A.; Cámara-Zapata, J.M.; Martínez-Nicolás, J.J.; Simón, I.; Simón-Grao, S.; García-Sánchez, F. Effect of foliar application of amino acids on the salinity tolerance of tomato plants cultivated under hydroponic system. *Sci. Hortic.* **2020**, *272*, 109509. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
3. Safdar, H.; Amin, A.; Shafiq, Y.; Ali, A.; Yasin, R.; Sarwar, M.I. Abbas Shoukat, Maqsood Ul Hussan. Impact of salinity on plant growth: A review. *Nat. Sci.* **2019**, *1*, 34–40. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
4. Syvertsen, J.; Garcia-Sanchez, F. Multiple abiotic stresses occurring with salinity stress in citrus. *Environ. Exp. Bot.* **2014**, *103*, 128–137. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
5. Negrao, S.; Schmöckel, S.; Tester, M. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Ann. Bot.* **2016**, *119*, 1–11. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)][[Green Version](#)]
6. Parida, A.K.; Das, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2005**, *60*, 324–349. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. He, M.; He, C.Q.; Ding, N.Z. Abiotic Stresses: General Defenses of Land Plants and Chances for Engineering Multistress Tolerance. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1771. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)][[Green Version](#)]
8. Arif, Y.; Singh, P.; Siddiqui, H.; Bajguz, A.; Hayat, S. Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *156*, 64–77. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
9. Navarro-León, E.; López-Moreno, F.; Torre-González, A.; Ruiz, J.; Esposito, S.; Blasco Leon, M.B. Study of salt-stress tolerance and defensive mechanisms in *Brassica rapa* CAX1a TILLING mutants. *Environ. Exp. Bot.* **2020**, *175*, 104061. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
10. Shahid, M.A.; Sarkhosh, A.; Khan, N.; Balal, R.M.; Ali, S.; Rossi, L.; Gómez, C.; Mattson, N.; Nasim, W.; Garcia-Sanchez, F. Insights into the Physiological and Biochemical Impacts of Salt Stress on Plant Growth and Development. *Agronomy* **2020**, *10*, 938. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

11. Hasanuzzaman, M.; Raihan, M.R.H.; Masud, A.A.C.; Rahman, K.; Nowroz, F.; Rahman, M.; Nahar, K.; Fujita, M. Regulation of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Salinity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9326. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
12. Bulgari, R.; Franzoni, G.; Ferrante, A. Biostimulants Application in Horticultural Crops under Abiotic Stress Conditions. *Agronomy* **2019**, *9*, 306. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)][[Green Version](#)]
13. Aazami, M.A.; Maleki, M.; Rasouli, F.; Gohari, G. Protective effects of chitosan based salicylic acid nanocomposite (CS-SA NCs) in grape (*Vitis vinifera* cv. 'Sultana') under salinity stress. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 883. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
14. Pintó-Marijuan, M.; Turon-Orra, M.; González-Betancort, A.; Muñoz, P.; Munné-Bosch, S. Improved production and quality of peppers irrigated with regenerated water by the application of 24-epibrassinolide. *Plant Sci.* **2023**, *334*, 111764. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
15. Zamljem, T.; Medic, A.; Veberic, R.; Hudina, M.; Grohar, M.C.; Slatnar, A. Influence of hydrolyzes animal protein-based biostimulant on primary, soluble and volatile secondary metabolism of Genovese and Greek-type basil grown under salt stress. *Sci. Hortic.* **2023**, *319*, 112178. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
16. El-Nakhel, C.; Cristofano, F.; Colla, G.; Pii, Y.; Lucini, L.; Rouphael, Y.A. Graminaceae-derived protein hydrolysate and its fractions provide differential growth and modulate qualitative traits of lettuce grown non-saline and mild salinity conditions. *Sci. Hortic.* **2023**, *319*, 112130. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
17. El-Nakhel, C.; Cozzolino, E.; Ottaiano, L.; Petropoulos, S.A.; Nocerino, S.; Pelosi, M.E.; Rouphael, Y.; Mori, M.; Di Mola, I. Effect of Biostimulant Application on Plant Growth, Chlorophylls and Hydrophilic Antioxidant Activity of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Grown under Saline Stress. *Horticulturae* **2022**, *8*, 971. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Sariñana-Aldaco, O.; Benavides-Mendoza, A.; Robledo-Olivo, A.; González-Morales, S. The Biostimulant Effect of Hydroalcoholic Extracts of *Sargassum* spp. in Tomato Seedlings under Salt Stress. *Plants* **2022**, *11*, 3180. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ennoury, A.; BenMrid, R.; Nhhala, N.; Roussi, Z.; Latique, S.; Zouaoui, Z.; Nhiri, M. River's *Ulva intestinalis* extract protects common bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) against salt stress. *S. Afr. J. Bot.* **2022**, *150*, 334–341. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

20. Zhou, K.; Yu, J.; Ma, Y.; Cai, L.; Zheng, L.; Gong, W.; Liu, Q.A. Corn Steep Liquor: Green Biological Resources for Bioindustry. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2022**, *194*, 3280–3295. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Salam, L.B.; Ishaq, A. Biostimulation potentials of corn steep liquor in enhanced hydrocarbon degradation in chronically polluted soil. *3 Biotech* **2019**, *9*, 46. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
22. Obayori, O.; Adebusoye, S.; Ilori, M.; Oyetibo, G.; Omotayo, A.; Amund, O. Effects of Corn Steep Liquor on Growth Rate and Pyrene Degradation by *Pseudomonas* strains. *Curr. Microbiol.* **2009**, *60*, 407–411. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Obayori, O.; Salam, L.; Anifowoshe, W.; Odunewu, Z.; Amosu, O.; Ofulue, B. Enhanced Degradation of Petroleum Hydrocarbons in Corn-Steep-Liquor-Treated Soil Microcosm. *Soil Sediment Contam.* **2015**, *24*, 731–743. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
24. Chinta, Y.D.; Kano, K.; Widiastuti, A.; Fukahori, M.; Kawasaki, S.; Eguchi, Y.; Misu, H.; Odani, H.; Zhou, S.; Narisawa, K.; *et al.* Effect of corn steep liquor on lettuce root rot (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*) in hydroponic cultures. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *94*, 2317–2323. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
25. Zhu, M.M.; Liu, E.Q.; Bao, Y.; Duan, S.L.; She, J.; Liu, H.; Wu, T.T.; Cao, X.Q.; Zhang, J.; Li, B. Low concentration of corn steep liquor promotes seed germination, plant growth, biomass production and flowering in soybean. *Plant Growth Regul.* **2019**, *87*, 29–37. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
26. Navarro-Morillo, I.; Navarro-Perez, V.; Perez-Millan, R.; Navarro-León, E.; Blasco, B.; Cámara-Zapata, J.M.; Garcia-Sanchez, F. Effects of Root and Foliar Application of Corn Steep Liquor on Pepper Plants: A Physiological, Nutritional, and Morphological Study. *Horticulturae* **2023**, *9*, 221. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
27. Strasser, R.; Srivastava, A.; Tsimilli-Michael, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*, 1st ed.; Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, U., Eds.; Taylor and Francis: London, UK, 2000; Chapter 25; pp. 443–480. [[Google Scholar](#)]
28. Fu, J.; Huang, B. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environ. Exp. Bot.* **2001**, *45*, 105–114. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Mukherjee, S.; Choudhuri, M. Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiol. Plant.* **2006**, *58*, 166–170. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

30. Barrameda-Medina, Y.; Montesinos-Pereira, D.; Romero, L.; Blasco Leon, M.B.; Ruiz, J. Role of GSH homeostasis under Zn toxicity in plants with different Zn tolerance. *Plant Sci.* **2014**, *227*, 110–121. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
31. Rivero, R.M.; Ruiz, J.M.; Garcia, P.C.; López-Lefebvre, L.R.; Sánchez, E.; Romero, L. Resistance to cold and heat stress: Accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* **2001**, *160*, 315–321. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
32. Law, M.Y.; Charles, S.A.; Halliwell, B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. *Biochem. J.* **1983**, *210*, 899–903. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)][[Green Version](#)]
33. Benzie, I.F.; Strain, J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Ann. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)][[Green Version](#)]
34. Cai, Y.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* **2004**, *74*, 2157–2184. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Irigoyen, J.; Einerich, D.; Sanchez-Díaz, M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* **2006**, *84*, 55–60. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
36. Wolf, B. A comprehensive system of leaf analyses and its use for diagnosing crop nutrient status. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **1982**, *13*, 1035–1059. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
37. Gedeon, S.; Ioannou, A.; Balestrini, R.; Fotopoulos, V.; Antoniou, C. Application of Biostimulants in Tomato Plants (*Solanumlycopersicum*) to Enhance Plant Growth and Salt Stress Tolerance. *Plants* **2022**, *11*, 3082. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
38. Oosten, M.; Pepe, O.; De Pascale, S.; Silletti, S.; Maggio, A. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **2017**, *4*, 5. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)][[Green Version](#)]
39. Rajabi Hamedani, S.; Roupael, Y.; Colla, G.; Colantoni, A.; Cardarelli, M. Biostimulants as a Tool for Improving Environmental Sustainability of Greenhouse Vegetable Crops. *Sustainability* **2020**, *12*, 5101. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
40. Zou, P.; Yang, X.; Yuan, Y.; Jing, C.; Cao, J.; Wang, Y.; Zhang, L.; Zhang, C.; Li, Y. Purification and characterization of a fucoidan from the brown algae *Macrocystis pyrifera* and the activity of enhancing salt-stress tolerance of wheat seedlings. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *180*, 547–558. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

41. Chanda, M.; Rachidi, F.; Hachimi Alaoui, M.; Mernissi, N.; Aasfar, A.; Mustapha, B.; Danouche, M.; Sbabou, L.; El Arroussi, H. Microalgae-cyanobacteria-based biostimulant effect on salinity tolerance mechanisms, nutrient uptake, and tomato plant growth under salt stress. *J. Appl. Phycol.* **2021**, *33*, 3779–3795. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]



11.4. PUBLICACIÓN 4

Corn Steep Liquor application on pepper plants (*Capsicum annum* L.) stimulates growth under nitrogen-deficient growing conditions

Iván Navarro-Morillo, Begoña Blasco, José M. Cámara-Zapata, Julia Muñoz-Acero, Silvia Simón-Grao, Marina Alfosea-Simón, Felix Plasencia and Francisco García-Sanchez

Scientia Horticulturae 2024, 328, 112955

Factor de impacto: 4,3 Q1 (2024) (Categoría Horticulture)

Corn Steep Liquor application on pepper plants (*Capsicum annum* L.) stimulates growth under nitrogen-deficient growing conditions

Iván Navarro-Morillo^a, Begoña Blasco^b, José M. Cámara-Zapata^{c*}, Julia Muñoz-Acero^c, Silvia Simón-Grao^d, Marina Alfosea-Simón^d, Felix Plasencia^e, Francisco García-Sanchez^d

a R + D Department of Atlántica Agrícola, 03400 Villena, Spain

b Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

c Instituto de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Universidad Miguel Hernández, 03312 Orihuela, Spain

d Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 30100 Murcia, Spain

e Escuela EFA El Campico. El Campico s/n. 10 Jacarilla, Alicante, Spain

Abstract

Excessive nitrogen fertilization in crops is causing serious environmental problems related to eutrophication of natural resources such as seas, aquifers, coastal lagoons like the Mar Menor (Spain), etc. Therefore, there is a need to design agronomic strategies that allow plants to be grown below their nutritional requirements, primarily nitrogen. One of these strategies is the use of biostimulants products made from botanical extracts, as they contain active compounds that stimulate certain metabolic processes in plants favoring nitrogen absorption and assimilation. In this experiment, foliar and root application of Corn Steep Liquor (CSL) extract was evaluated at four stages of pepper plant (*Capsicum annum* L.) cultivation under different amounts of nitrogen, ranging from 100 % to 25 % N. At the end of the experiment parameters of vegetative growth, nitrate, ammonium, total nitrogen concentration in the leaves, amino acid concentration,

soluble proteins, and the enzymatic activities of glutamine synthetase and nitrate reductase were measured. The results showed that plants reduced their vegetative growth as nitrogen concentration in the nutrient solution decreased. However, this reduction was less pronounced in plants treated with exogenous CSL in the leaves, improving the efficient use of nitrogen (NUtE and NUE in particular) by increasing nitrogen assimilation (NR and GS enzymatic activities) and the concentration of amino acids and proteins.

Keywords

Biostimulants; Efficient use of nutrients; Excessive fertilization; Nutritional requirements

1. INTRODUCTION

One of the challenges of 21st century agriculture is increasing the production and quality of crops to compensate for the progressive growth of the world population, which is estimated to reach 9.6 billion people in 2050. Currently, to enhance food production, it is necessary to increase the amount of nitrogen fertilizers applied to crops. Thus, in 2018, the global demand for synthetic N fertilizers exceeded 200 Mtn (FAO, 2023). However, the disproportionate use of these fertilizers is having a negative impact on the environment in both agricultural and non-agricultural terrestrial and aquatic ecosystems (Kocira *et al.*, 2020; Hamedani *et al.*, 2020). The most common impact resulting from the improper use of nitrogen fertilizers is nitrate (NO_3^-) leaching into groundwater, leading to eutrophication of freshwater and marine ecosystems. Additionally, gaseous N oxides are generated, which can reach the troposphere and react with ozone, resulting in toxic emissions of ammonium. Conventional nitrogen fertilizers have relatively low efficiency, ranging from 70 to 80 % at best (Dimkpa *et al.*, 2020). In this context, it is necessary to develop agronomic strategies that allow for proper and sustainable management of nitrogen fertilization, including the selection of suitable chemical forms, dosage, and application timing. Additionally, the use of agronomic techniques that contribute to increased and improved nitrogen use efficiency (NUE) by plants is essential. NUE is defined as the biomass production per unit of available nitrogen. This can be divided into two fundamental processes: (i) plant's capacity to absorb nitrogen from the soil (Nitrogen Uptake Efficiency - NUtE) and (ii) the efficient use of the absorbed nitrogen, which is defined as the plant's ability to transfer and utilize this element in biomass production of different plant organs (Nitrogen Utilization Efficiency - NUtE) (Dimkpa *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2012). Improved NUE could reduce economic costs and decrease environmental degradation caused by nitrogen fertilizer application. In recent years, the focus on enhancing NUE has involved the implementation of biotechnology and plant breeding strategies, as well as the use of biostimulant agrochemical products.

According to the European Regulation on Fertilizer Products, biostimulants are defined as “product whose function is to stimulate plant nutrition processes independently of the product's

nutrient content with the sole aim of improving one or more of the following characteristics of the plant or the plant rhizosphere: (a) nutrient use efficiency; (b) tolerance to abiotic stress; (c) quality traits; (d) availability of confined nutrients in the soil or rhizosphere." In general, biostimulants can be formulated with the following active compounds (Conesa *et al.*, 2020; Zarzecka *et al.*, 2020; Dalal *et al.*, 2019; Cozzolino *et al.*, 2020; Rouphael *et al.*, 2018; Campobenedetto *et al.*, 2020). Organic substances based on humic and fulvic acids; animal or plant hydrolyzed proteins; compounds or amino acids containing N, poly- and oligosaccharides; vitamins, chitins and chitosan; extracts from seaweed (macro and microalgae); inorganic substances such as silicon; plant extracts (seeds, leaves, roots, and fruits); and microorganisms such as fungi and bacteria. The mode/mechanism of action of "biostimulants" is highly diverse and can include N metabolism activation, phosphorus (P) release from soils, microbial generic activity stimulation of soil, root growth stimulation, physiological processes enhancement such as germination, photosynthesis, and nutrient absorption from the soil, etc. Biostimulants can also mitigate the negative effects of abiotic stress factors in plants, such as drought, heat, salinity, frost, boron toxicity, etc. (Du Jardin, 2015).

Currently, one of the biostimulant types that is receiving significant attention is plant-derived biostimulants (PDBs). So far, the most evaluated PDBs include extracts from licorice root, hydrolyzed proteins derived from legumes, lemongrass extracts, garlic extract, and particularly, moringa leaf extract (Rouphael *et al.*, 2018; Hussein *et al.*, 2014; Kurepin *et al.*, 2014; Elzaawely *et al.*, 2017; Hayat *et al.*, 2018; Younis *et al.*, 2018; Rady *et al.*, 2019; Zulfiqar *et al.*, 2020). One type of PDB that has not been widely evaluated yet is the so-called Corn Steep Liquor (CSL). CSL is an organic liquid residue obtained from the water used in the wet milling of corn, which still contains a high proportion of organic and mineral substances (Zhu *et al.*, 2019). In bean plants, the application of CSL to the irrigation solution at a concentration of 1 % improved germination, plant growth and flowering, and increased N, P, potassium (K), manganese (Mn) and copper (Cu) foliar concentrations (Xi *et al.*, 2013). This article evaluated the CSL foliar and root application to pepper plants grown under different levels of nitrogen in the nutrient solution. The aim was to determine if the application of this extract could stimulate plant growth in a way that would allow for a reduced nitrogen concentration on crops compared to the current levels used nowadays. The hypothesis was based on the presence of certain substances in CSL, such as free amino acids, mineral nutrients, and phenolic compounds including vanillic, ferulic, coumaric, sinapic, and caffeic acids (Niwa *et al.*, 2001; Xi *et al.*, 2013; Joshi *et al.*, 2018), that stimulate plant growth by enhancing physiological and metabolic processes. To test this hypothesis, a detailed chemical analysis of CSL was conducted, and various parameters related to nitrogen metabolism were analyzed.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemical analysis of corn steep liquor product

In this experiment, the product called CSL-B in Navarro-Morillo *et al.* (2023) was used. The identification of non-volatile metabolites was carried out using a sample of 1 g homogenized with Milli-Q water in a 1:100 ratio, in an ultrasonic bath for 10 min. Subsequently, the sample was filtered with a 0.22 μm filter and injected into an Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) system (LC 1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled with a Time-of-Flight Mass Spectrometer (LC/Q-TOF Agilent 6546, Santa Clara, CA, USA), operating in positive and negative ionization mode. The chromatographic separation was achieved using an Agilent Zorbax RRHD SB-C18, 2.1 \times 50 mm, 1.8 μm column. The mobile phase A was composed of Milli-Q water, and the mobile phase B was prepared using acetonitrile with gradient elution: 0 min, B at 2 %; 22 min, B at 95 %; 25 min, B at 5 %. Both phases were acidified with 0.1 % formic acid. The column was equilibrated for 3 min before each analysis. The flow rate used was 0.4 mL min⁻¹, and 5 μL of the sample was injected for analysis. The conditions of the dual AJS ESI source were as follows: 325 °C gas temperature; 10 L min⁻¹ gas flow; 275.8 kPa nebulizer pressure; 295 °C curtain gas temperature; 12 L min⁻¹ curtain gas flow; 4000 V capillary voltage; 500 V nozzle voltage; 120 V fragmentor voltage; 70 V skimmer voltage; 50–1500 Da product ion scan range; 5 spectra/s MS scan rate; 3 spectra/s MS/MS scan rate; 2 maximum precursors per cycle; 10, 20, 40 eV collision energy. The analysis of metabolites was performed in triplicate. The integration, data processing, and metabolite identification were managed using MassHunter qualitative analysis software version 10.0 and the PCDL Manager B.08.00 library. The library utilized contains over 200 bioactive compounds described during fermentation processes with microorganisms.

The quantification of metabolites was carried out using a calibration curve with a phenyllactic acid standard at a concentration range between 0.08–100 mg L⁻¹.

The analysis of volatile organic compounds (VOCs) was carried out following the method described by Xu *et al.* (2012). For the headspace extraction, 5 g of the product were homogenized with 10 mL of Milli-Q water and transferred to a 20 mL vial. The VOCs were extracted using a DVB/C-WR/PDMS-coated SPME fiber (80 μm \times 10 mm) for 45 min at 50 °C in a water bath with constant agitation.

The analysis of VOCs was performed using an Agilent 7890A gas chromatograph coupled to an Agilent 7000A triple quadrupole mass spectrometer equipped with an Electron Impact (EI) ionization source. The chromatographic separation was achieved using a ZB-624plus column (30 m \times 0.25 mm, 1.40 μm). The temperature ramp was programmed as follows: 40 °C for 2 min with increased at a rate of 15 °C min⁻¹ up to 220 °C, below increase at a rate of 10 °C min⁻¹ up to 250

°C and held at this temperature for 5 min. Helium (99.99 %) was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The detection of compounds was performed in Full Scan mode, scanning a mass range from m/z 50 to 450 amu.

The data collected with MassHunter G7000C software was analyzed using MassHunter qualitative Analysis B.07.00 software, and the NIST20 spectral library was used to identify the detected components. The analysis was performed in triplicate.

2.2. Vegetal material and growth conditions

Pepper plants (*Capsicum annuum* cv. Alycum) were used for this experiment. The seeds of these plants were germinated and grown for 45 days in a tray with cells (cell size: 3 cm x 3 cm x 10 cm). Subsequently, the seedlings were transferred to a growth chamber under controlled conditions with a relative humidity of 60–80 %, temperature of 29 °C / 20 °C (day/night), and a 16/8 hour photoperiod with a photosynthetic photon-flux density (PPFD) of 450 μmol photons m⁻²s⁻¹ (measured using an SB Quantum 190 sensor, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA). Under these conditions, the plants were grown in individual pots (13 cm top diameter, 10 cm bottom diameter, 12.5 cm height, and a volume of 2 L) filled with a perlite:peat moss mix (75:25). Fertilization was carried out using a Hoagland-type nutrient solution composed of the following compounds: 8 mM NaNO₃, 3 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM MgSO₄, 2 mM KH₂PO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 2 μM MnCl₂, 1 μM ZnSO₄, 0.25 μM CuSO₄, 0.1 μM Na₂MoO₄, 125 μM Fe-EDDHA, and 50 μM H₃BO₃, with a pH of 5.8. The plants were watered once every 3–5 days with approximately 50–100 mL of water, depending on their vegetative growth stage.

2.3. Experimental design and plant sampling

After 20 days of germination, the treatments described in Table 1 were applied. The volume used in both root application and foliar treatment was 50 mL.

Table 1. Treatments of nitrogen and CSL applied in the trial.

| Treatment | Description | Compounds |
|-----------|--------------------|-----------------------------------|
| T1 | N-100 % | 8 mM N |
| T2 | N-100 % + CSL Leaf | 8 mM N + 5 mL CSL L ⁻¹ |
| T3 | N-100 % + CSL Root | 8 mM N + 5 mL CSL L ⁻¹ |
| T4 | N-50 % | 4 mM N |
| T5 | N-50 % + CSL Leaf | 4 mM N + 5 mL CSL L ⁻¹ |
| T6 | N-50 % + CSL Root | 4 mM N + 5 mL CSL L ⁻¹ |
| T7 | N-25 % | 2 mM N |
| T8 | N-25 % + CSL Leaf | 2 mM N + 5 mL CSL L ⁻¹ |
| T9 | N-25 % + CSL Root | 2 mM N + 5 mL CSL L ⁻¹ |

The reduction of N in the treatments from T4 to T9 was achieved by decreasing the supply of NaNO₃. The treatments were applied four times, with a seven-day interval between each application. Finally, the experimental design consisted of a randomized block with eight plants per treatment, arranged in individual pots, with the treatments randomly distributed in the growth chamber.

After 7 days following the last application of the treatments, all plants were immediately processed for subsequent analysis. The vegetal material was washed and then dried on filter paper to obtain fresh mass (FM). Samples were harvested and kept fresh or frozen at -40 °C for the analysis of the following parameters: leaf area, activity of nitrogen metabolism enzymes (nitrate reductase and glutamine synthetase), concentration of amino acids and soluble proteins. Additionally, samples were harvested and dried in a forced air oven to determine dry mass (DM) as well as the concentration of different forms of N (total N, organic N, and nitrates) for calculating nitrogen use efficiency (NUE).

2.4. Analysis of vegetal material

2.4.1. Leaf and aboveground biomass

At the end of the experiment, the biomass of the aboveground plant parts was measured in terms of dry weight. Leaf area was measured using an optical reader, LI-COR brand, model LI-3000A (IRGA: LI-COR Inc., Nebraska, USA).

2.4.2. Enzymatic activities of nitrogen metabolism

The nitrate reductase (NR) activity was determined following the procedure described by Navarro-León *et al.* (2016). 0.2 g of fresh plant material was macerated in a mortar with 1 mL of extraction buffer containing 2 mM EDTA-Na, 2 mM DTT, 1 % (w/v) PVPP in 100 mM KH₂PO₄

(pH 7.5). The suspension was centrifuged for 20 min at 20,600 g at 4 °C (Heraeus Sepatech 132 Biofuge 17RS, Hanau, Germany). The obtained supernatant was added to the reaction mixture containing: 100 mM KNO₃, 2 mM NADH, 10 mM cysteine, and 10 mM MgCl₂ in 100 mM KH₂PO₄ buffer (pH 7.5), and the mixture was incubated at 30 °C for 30 min. Subsequently, 1 mM zinc acetate was used as a stop reagent, and 1 % sulfanilamide in 1.5 M HCl and 0.02 % (w/v) NNEDA in 0.2 M HCl were used for the detection of the formed NO₂⁻. Finally, the NR activity was determined by measuring the absorbance at 540 nm of the produced NO₂⁻.

The glutamine synthetase (GS) activity was determined using an adaptation of the hydroxamate synthetase assay published by Navarro-León *et al.* (2016). 0.1 g of leaf tissue was macerated in a mortar with 1 mL of extraction buffer containing: 100 mM sucrose, 2 % (v/v) β-mercaptoethanol, and 20 % (v/v) ethylene glycol in 100 mM maleic acid-KOH (pH 6.8). The suspension was centrifuged for 20 min at 20,600 g at 4 °C (Heraeus Sepatech 132 Biofuge 17RS, Hanau, Germany). The resulting extract was used to measure GS activity. The reaction mixture used consisted of 150 mM sodium glutamate, 30 mM hydroxylamine, and 10 mM ATP as substrates, along with 45 mM MgSO₄·7 H₂O and 4 mM EDTA-Na, all dissolved in 150 mM imidazole-HCl buffer (pH 7.8). After incubation at 28 °C for 30 min, the formation of glutamylhydroxamate was determined by measuring its absorbance at 540 nm after its complexation with acidified ferric chloride. Six measurements of each parameter per treatment were performed.

2.4.3. Amino acids and soluble proteins concentration

For the determination of soluble amino acids and proteins, approximately 0.5 g of vegetal material was weighed and homogenized with 5 mL of 50 mM pH 7.0 phosphate buffer. The homogenate was filtered with 4 layers of gauze and then centrifuged at 12,360 g (Heraeus Sepatech 132 Biofuge 17RS, Hanau, Germany) for 15 min. The supernatant was used for quantifying soluble amino acids and proteins. The concentration of soluble amino acids was quantified using the ninhydrin method (Yemm and Cocking, 1955). As for soluble proteins, 0.1 mL of the supernatant was mixed with 0.9 mL of 50 mM pH 7.0 phosphate buffer and 5 mL of coomassie blue. After 20 min, the samples were measured at a wavelength of 595 nm, using a standard curve of albumin (Navarro-León *et al.*, 2016). Six measurements of each parameter per treatment were performed.

2.4.4. Total nitrogen, organic nitrogen and nitrates concentration, and nitrogen use efficiency use

For the determination of total nitrogen, 0.2 g of dried leaves were ground and mineralized with 98 % H₂SO₄ and 30 % H₂O₂ at a temperature of 300 °C, and the resulting mineralized solution was used for nitrogen analysis. The concentration of total nitrogen was determined using colorimetry based on the Berthelot reaction, following the method described by Krom (1980). To determine the concentration of soluble NO₃⁻, an aqueous extraction was performed following

(Cataldo *et al.*, 1975). The determination of NO_3^- was based on the colorimetric reaction formed by the combination of NO_3^- with salicylic acid in a basic medium (Cataldo *et al.*, 1975). The organic nitrogen content was obtained by subtracting the soluble nitrate content from the total nitrogen (Wolf, 1982). Six measurements of each parameter per treatment were performed.

For the calculation of Nitrogen Utilization Efficiency (NUtE), Nitrogen Uptake Efficiency (NUpE) and Nitrogen Use Efficiency (NUE) the equations described by Xu *et al.* (2012) were used. NUtE is defined as the ratio of biomass production to the amount of N in the plant; NUpE is defined as the ratio of N content in the plant to the amount of N applied in fertilization; NUE is obtained as the product of NUtE and NUpE.

2.5. Statistical analysis

Results were statistically evaluated using an analysis of variance, simple ANOVA, with a 95 % confidence interval. Differences between the means of the treatments were compared using Fisher's Least Significant Difference (LSD) test at a 95 % probability level. The levels of significance were expressed as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS non-significant.

3. RESULTS

3.1. Chemical composition of corn steep liquor extract

The analysis of Corn Steep Liquor (CSL) using UHPLC-MS-TOF has allowed the identification of a total of 91 bioactive compounds. Table 2 shows the most abundant ones.

- 2-Ethyl-2-hydroxybutyric acid: classified within the group of hydroxy fatty acids (also known as HFAs)
- DL-3-Phenyllactic acid: a phenolic acid primarily produced through lactic acid bacteria fermentation. Literature suggests studies related to its activity as a promoter of root growth.
- Mannitol and erythritol: polyols with bio-stimulation effects in crops.
- GABA, isoleucine, and proline: amino acids with effects on crop nutrition as well as improvement of plant stress response.

Table 2. Quantification of the major metabolites of the CSL product.

| Metabolites | Concentration (g kg ⁻¹) |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| 2-Ethyl-2-hydroxybutyric acid | 4.2 ± 0.2 |
| DL-3-Phenyllactic acid | 2.2 ± 0.1 |
| Mannitol | 0.56 ± 0.06 |
| Erythritol | 0.54 ± 0.04 |
| GABA | 0.26 ± 0.07 |
| Isoleucine | 0.56 ± 0.06 |
| Proline | 0.83 ± 0.08 |

It is a highly diverse composition of non-volatile bioactive metabolites, comprising a wide range of compounds belonging to the groups of polyols, amino acids, fatty acids, organic acids, phenolic acids, and phytohormones. Many of the identified compounds have been described as promoters of plant growth, such as amino acids, phenylacetic acid, and indoleacetic acid.

Fig. 1 displays the profile of volatile organic compounds (VOCs) in CSL. The group of volatile compounds including alkanes, alcohols, aldehydes, and ketones were found to be the most abundant in the product. VOCs are substances with the ability to diffuse rapidly through the soil and can be distributed within the plant's tissue. Some VOCs are utilized by plants as nutrients and may exhibit a biostimulatory effect on plant growth.

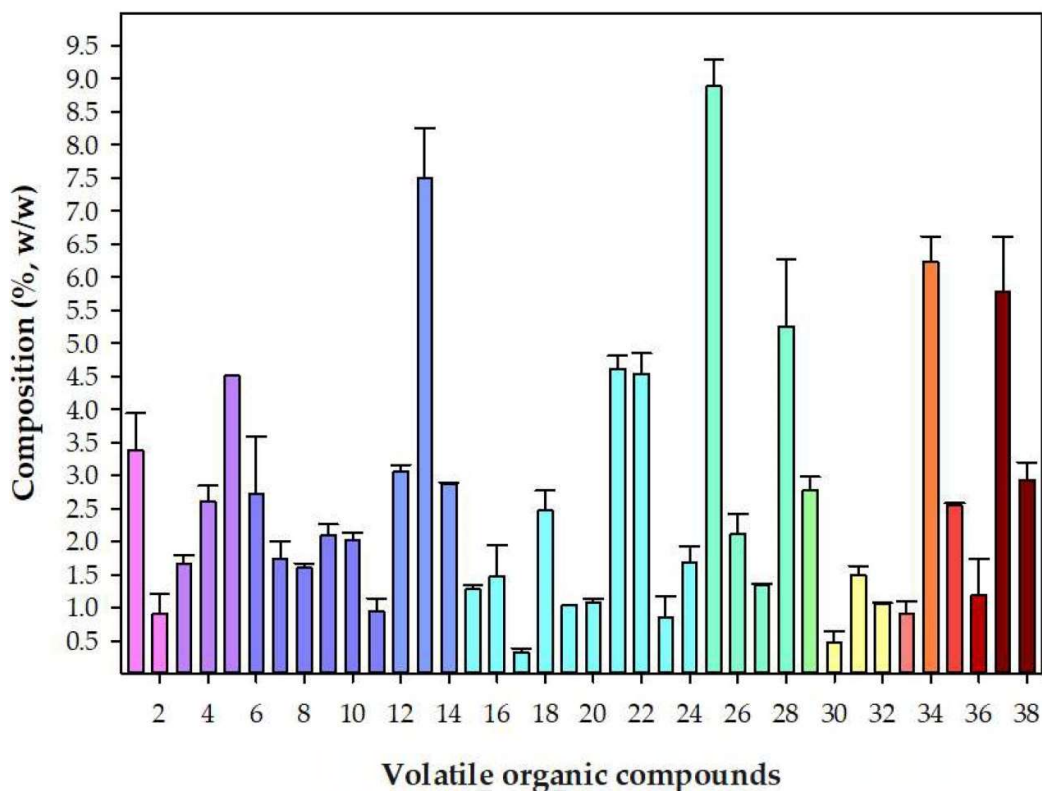


Fig. 1. Composition of volatile organic compounds in the CSL product. Dicarboxylic acids (1: 2-Oxopentanedioic acid; 2: 1,2-Propanediol, diacetate); Fatty acids (3: Butanoic acid, 3-methyl-; 4: Hexanoic acid; 5: Nonanoic acid); Alkanes (6: Toluene; 7: d-Limonene; 8: Naphthalene, 1-methyl-7-(1-methylethyl)-; 9: Cyclohept[*f*]indene, 1,2,3,5,6,7,8,9-octahydro-; 10: Chamazulene; 11: 4,4'-Dimethylbiphenyl); Alcohols (12: 2,3-Butanediol, [R-(R*,R*)]-; 13: 1-Decanol; 14: 2-Naphthalenethiol); Aldehydes (15: Butanal, 3-methyl-; 16: Butanal, 2-methyl-; 17: 2-Butenal, 2-ethyl-; 18: 1,3-Dioxolane, 4-methyl-2-propyl-; 19: Furfural; 20: 2-Thiophenecarboxaldehyde; 21: Nonanal; 22: 2-Isopropyl-5-methylhex-2-enal; 23: 1,3-Cyclohexadiene-1-carboxaldehyde, 2,6,6-trimethyl-; 24: Benzeneacetaldehyde, .alpha.-ethylidene-); Ketones (25: Ethanone, 1-(2-furanyl)-; 26: Ethanone, 1-(2,5-dihydroxyphenyl)-; 27: Resorcinol, 2-acetyl-; 28: 4-(2,6,6-Trimethylcyclohexa-1,3-dienyl)but-3-en-2-one); Cyclohexanones (29: 2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexene-1,4-dione); Esters (30: Ethyl Acetate; 31: 3-(Methylthio)propyl acetate; 32: Acetic acid, decyl ester); Phenols (33: 2,4-Di-tert-butylphenol); Indanones (34: 1H-Inden-1-one, 2,3-dihydro-); Methoxybenzenes (35: Benzene, 1-methoxy-4-methyl-); Monoterpenoid (36: 2,4,6-Cycloheptatrien-1-one, 2-hydroxy-4-(1-methylethyl)-); Pyrazines (37: Pyrazine, 2,6-dimethyl-; 38: 2,3,5-Trimethyl-6-ethylpyrazine).

3.2. Vegetative development of pepper plants (*Capsicum annum L.*)

The effects of different nitrogen doses in the nutrient solution and the application of CSL product, both foliar and root, on plant growth can be seen in Table 3 and Fig. 2. The growth of plants

cultivated with 100 % N nutrient solution (8 mM) was not affected by the application of CSL product in either foliar or root application modes. The reduction of 50 % and 25 % of N in the nutrient solution resulted, as expected, in a decrease in the dry weight of the aboveground part and leaf area. However, this reduction was mitigated by the root application of CSL product at both N levels, as indicated by the fact that for the T6 and T9 (N-50 % + CSL Root and N-25 % + CSL Root) treatments, the vegetative growth of the plants was significantly higher than for the T4 and T7 (N-50 % and N-25 %) treatments, respectively.

Table 3. Aerial biomass production and leaf area per plant in pepper plants (*Capsicum annum* L.) with 8 mM N (N-100 %, control) and with CSL applications in leaves and roots (T1, T2 and T3, respectively); 50 % of the N dose (4 mM N) and applications of CSL in leaf and root (T4, T5 and T6, respectively); and 25 % of the N dose (2 mM N) and applications of CSL in leaf and root (T7, T8 and T9, respectively).

| Treatments | Dry mass aboveground part (g) | Leaf area (cm ²) |
|------------|-------------------------------|------------------------------|
| T1 | 4.7 ± 0.8 | 900 ± 90 |
| T2 | 4.9 ± 0.6 | 940 ± 90 |
| T3 | 4.9 ± 0.3 | 930 ± 30 |
| p-valor | NS | NS |
| T4 | 2.0 ± 0.2c | 640 ± 60c |
| T5 | 2.5 ± 0.1bc | 700 ± 80bc |
| T6 | 2.6 ± 0.1b | 760 ± 30b |
| p-valor | *** | *** |
| T7 | 1.7 ± 0.2c | 400 ± 40c |
| T8 | 2.1 ± 0.2bc | 440 ± 40c |
| T9 | 2.3 ± 0.1b | 580 ± 30b |
| p-valor | *** | *** |

The values indicate the means ± standard deviations (n = 8). The differences between treatments were analyzed with Fisher's least significant difference test (LSD; p = 0.05); distinct letters in the second and third groups (treatments from T4 to T9) and in the same column show significant differences when comparing the results between treatments and with the control (T1) at p < 0.05. In the ANOVA, the significance level is shown by *** (p < 0.001), NS non-significant.



Fig. 2. Appearance of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) subjected to treatments with 8 mM N (N-100 %, control) and with CSL applications in leaves and roots (T1, T2 and T3, respectively); 50 % of the N dose (4 mM N) and applications of CSL in leaf and root (T4, T5 and T6, respectively); and 25 % of the N dose (2 mM N) and applications of CSL in leaf and root (T7, T8 and T9, respectively).

3.3. Characterization of nitrogen in pepper plants (*Capsicum annuum* L.)

The concentration of total nitrogen, organic nitrogen, and nitrates in the plants of the N-100 % treatment was 62, 61, and 0.78 mg g⁻¹ dry weight, respectively, with no significant differences observed with foliar or root application of CSL. The concentration of these three forms of nitrogen progressively decreased as the nitrogen concentration in the nutrient solution was reduced (N-50 % and N-25 %) in all treatments. However, foliar application of CSL in both N-50 % and N-25 % resulted in a higher concentration of total and organic nitrogen compared to plants that received root application of CSL. In the latter, no significant differences were observed compared to the non-application of CSL. Regarding nitrate concentration, there were no differences with root or foliar application of CSL at the N-50 % level. However, at the N-25 % level, the concentration significantly decreased in the order of T8 (N-25 % + CSL Leaf) > T7 (N-25 %) > T9 (N-25 % + CSL Root) (Table 4).

Table 4. Foliar concentration of different forms of N in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) with 8 mM N (N-100 %, control) and with CSL applications in leaves and roots (T1, T2 and T3, respectively); 50 % of the N dose (4 mM N) and applications of CSL in leaf and root (T4, T5 and T6, respectively); and 25 % of the N dose (2 mM N) and applications of CSL in leaf and root (T7, T8 and T9, respectively).

| Treatments | Total N (mg g ⁻¹ DM) | Organic N (mg g ⁻¹ DM) | Nitrates (mg g ⁻¹ DM) |
|-----------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| T1 | 62 ± 2 | 61 ± 4 | 0.78 ± 0.07a |
| T2 | 67 ± 5 | 66 ± 4 | 0.78 ± 0.03a |
| T3 | 66 ± 4 | 65 ± 5 | 0.63 ± 0.06b |
| <i>p</i> -valor | NS | NS | *** |
| T4 | 41 ± 4c | 40 ± 3c | 0.34 ± 0.02b |
| T5 | 50 ± 2b | 50 ± 1b | 0.33 ± 0.02b |
| T6 | 42 ± 2c | 42 ± 1c | 0.38 ± 0.04b |
| <i>p</i> -valor | *** | *** | *** |
| T7 | 32 ± 2c | 32 ± 2c | 0.09 ± 0.01d |
| T8 | 35 ± 1b | 35 ± 1b | 0.38 ± 0.05b |
| T9 | 31 ± 1c | 31 ± 1c | 0.18 ± 0.01c |
| <i>p</i> -valor | *** | *** | *** |

The values indicate the means ± standard deviations (n = 8). The differences between treatments were analyzed with Fisher's least significant difference test (LSD; p = 0.05); distinct letters in the second and third groups (treatments from T4 to T9) and in the same column show significant differences when comparing the results between treatments and with the control (T1) at p < 0.05. In the ANOVA, the significance level is shown by *** (p < 0.001), NS non-significant.

Fig. 3 represents the total nitrogen content of the aboveground part of the pepper plants for each treatment. The plants in the control treatment (N-100 %) had significantly higher values than the N-50 % plants, and the values for N-50 % were higher than those for N-25 %, regardless of CSL application. For each nitrogen level, it is evident that the application of CSL increased the nitrogen concentration compared to plants without CSL application. The foliar CSL treatment had higher values than the root treatment, although these differences were not significant.

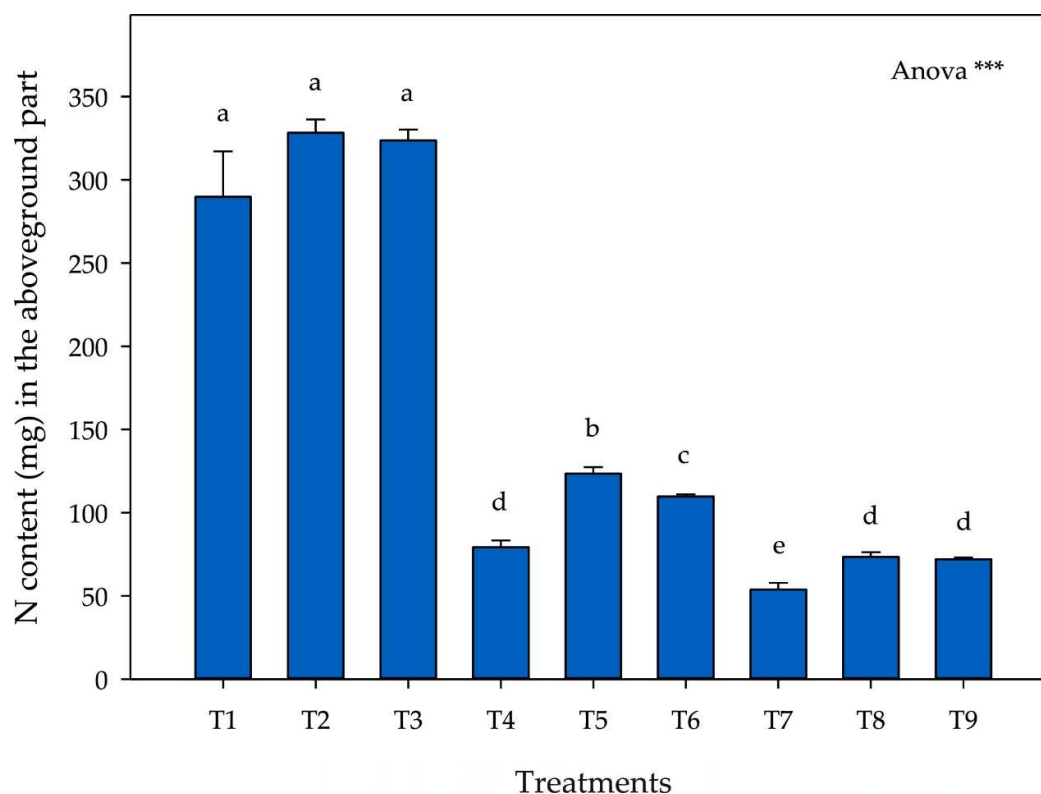


Fig. 3. Total nitrogen content in the aboveground part in pepper plants (*Capsicum annum L.*) with 8 mM N (N-100 %, control) and with CSL applications in leaves and roots (T1, T2 and T3, respectively); 50 % of the N dose (4 mM N) and applications of CSL in leaf and root (T4, T5 and T6, respectively); and 25 % of the N dose (2 mM N) and applications of CSL in leaf and root (T7, T8 and T9, respectively). In the ANOVA, the significance level is represented by $p < 0.001$ (***). The different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means, as established by Fisher's least test (LSD). The values indicate the means \pm standard deviations (SDs) ($n = 8$).

3.4. Nitrogen metabolisms in pepper plants (*Capsicum annum L.*)

In the biochemical study of nitrogen assimilation, amino acid concentration, and protein content, it can be observed that when plants grow in an optimal nitrogen medium (N-100 %), the root application of CSL increases GS activity and protein concentration, while foliar application only increases the latter parameter. The reduction of nitrogen in the N-50 % and N-25 % levels result in a significant decrease in each of these parameters, with a greater reduction observed in the N-25 % level. The application of CSL, whether root or foliar, mitigated this reduction in such a way that in the N-50 % and N-25 % levels for both application modes, NR, amino acid concentration, proteins, and GS activity significantly increased (Table 5).

Table 5. Nitrogen assimilation parameters in pepper plants (*Capsicum annum L.*) with 8 mM N (N-100 %, control) and with CSL applications in leaves and roots (T1, T2 and T3, respectively);

50 % of the N dose (4 mM N) and applications of CSL in leaf and root (T4, T5 and T6, respectively); and 25 % of the N dose (2 mM N) and applications of CSL in leaf and root (T7, T8 and T9, respectively).

| Treatments | NR ($\mu\text{M NO}_2^- \text{ mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$) | GS ($\text{mM } \gamma\text{-GH mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$) | Amino acids ($\text{mg g}^{-1} \text{ FM}$) | Proteins ($\text{mg g}^{-1} \text{ FM}$) |
|------------|---|--|---|--|
| T1 | 0.52 ± 0.04a | 1.9 ± 0.2b | 1.0 ± 0.1a | 8.8 ± 0.9b |
| T2 | 0.49 ± 0.03a | 2.0 ± 0.1b | 0.9 ± 0.1a | 11.0 ± 1.3a |
| T3 | 0.49 ± 0.02a | 2.9 ± 0.1a | 0.9 ± 0.1a | 10.5 ± 1.0a |
| p-valor | NS | *** | NS | ** |
| T4 | 0.12 ± 0.01c | 0.8 ± 0.1c | 0.7 ± 0.1b | 6.9 ± 1.1c |
| T5 | 0.14 ± 0.01b | 0.9 ± 0.1c | 0.9 ± 0.1a | 10.5 ± 1.1a |
| T6 | 0.15 ± 0.02b | 1.4 ± 0.2b | 0.9 ± 0.1a | 10.0 ± 0.9a |
| p-valor | *** | *** | ** | ** |
| T7 | 0.04 ± 0.01d | 0.6 ± 0.1c | 0.6 ± 0.1c | 3.8 ± 0.7c |
| T8 | 0.06 ± 0.01c | 0.6 ± 0.1c | 0.8 ± 0.1b | 7.3 ± 0.9b |
| T9 | 0.09 ± 0.01b | 1.0 ± 0.1b | 0.8 ± 0.1b | 7.0 ± 0.8b |
| p-valor | *** | *** | *** | *** |

The values indicate the means ± standard deviations (n = 8). The differences between treatments were analyzed with Fisher's least significant difference test (LSD; p = 0.05); distinct letters in the same column show significant differences between treatments at p < 0.05. In the ANOVA, the significance level is shown by *** (p < 0.001), ** (p < 0.01), NS non-significant.

3.5. Efficient use of nitrogen in pepper plants (*Capsicum annum L.*)

Using the leaf nitrogen data and plant vegetative growth, the Nitrogen Utilization efficiency (NUtE), Nitrogen Uptake Efficiency (NUpE) and Nitrogen Use Efficiency (NUE) were calculated. In plants cultivated with the optimal nitrogen level (N-100 %), these parameters were not affected by the application of CSL (root or foliar). The N-50 % and N-25 % nitrogen levels without CSL application resulted in a decrease in NUE, NUtE, and NUpE. The application of CSL at both nitrogen levels, whether foliar or root, led to certain changes in the values: In the N-50 % level, there was an increase in NUE and NUpE with foliar and root CSL application, and an increase in NUtE with foliar application, compared to the treatment without CSL application; In the N-25 % level, both root and foliar CSL application increased all the parameters (NUE, NUtE, and NUpE) compared to the treatment without CSL application (Table 6).

Table 6. NUE, NUtE, and NUpE in pepper plants (*Capsicum annum L.*) with 8 mM N (N-100 %, control) and with CSL applications in leaves and roots (T1, T2 and T3, respectively); 50 % of the

N dose (4 mM N) and applications of CSL in leaf and root (T4, T5 and T6, respectively); and 25 % of the N dose (2 mM N) and applications of CSL in leaf and root (T7, T8 and T9, respectively).

| Treatments | NUE (mg ⁻¹) | NutE (mg DM mg ⁻¹ N) | NUpE (mg N mg ⁻¹ N) |
|-----------------|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| T1 | 113 ± 6 | 75 ± 4 | 1.51 ± 0.03 |
| T2 | 105 ± 9 | 73 ± 3 | 1.57 ± 0.04 |
| T3 | 107 ± 8 | 75 ± 3 | 1.55 ± 0.05 |
| <i>p</i> -valor | NS | NS | NS |
| T4 | 40 ± 2c | 48 ± 1c | 0.83 ± 0.01d |
| T5 | 64 ± 4b | 50 ± 2c | 1.29 ± 0.04b |
| T6 | 70 ± 5b | 61 ± 3b | 1.14 ± 0.07c |
| <i>p</i> -valor | *** | *** | *** |
| T7 | 58 ± 3c | 52 ± 1c | 1.12 ± 0.02b |
| T8 | 92 ± 5b | 60 ± 4b | 1.53 ± 0.05a |
| T9 | 111 ± 6a | 74 ± 4a | 1.50 ± 0.05a |
| <i>p</i> -valor | *** | *** | * |

The values indicate the means ± standard deviations (n = 8). The differences between treatments were analyzed with Fisher's least significant difference test (LSD; p = 0.05); distinct letters in the same column show significant differences between treatments at p < 0.05. In the ANOVA, the significance level is shown by *** (p < 0.001), * (p < 0.05), NS non-significant.

4. DISCUSSION

One of the challenges facing 21st-century agriculture is the excessive use of nitrogen fertilizers, which, when they reach the environment, cause eutrophication problems in aquifers, coastal lagoons, seas, and oceans. To prevent agriculture from harming nature, it is necessary to develop agronomic strategies that allow plants to be grown below their nutritional needs. In this experiment, the application of CSL product has been tested as a potential biostimulant to reduce the use of conventional nitrogen fertilizers. Since nitrogen concentration directly influences growth parameters (Lea and Azevedo, 2006; Iqbal *et al.*, 2020; Emamverdian *et al.*, 2023), it has been chosen as a bioindicator to assess the bio-stimulating effect on the parameter of dry biomass of the aerial part of plants and leaf area. The data from the vegetative growth study indicate that deficient levels of N, N-50 %, and N-25 % reduced the dry biomass of the aerial part by 61 % and 64 % respectively, compared to the optimal level of N-100 %. This highlights the importance of maintaining the nutrient solution for irrigation at an optimal level of 8 mM N. Nitrogen is an essential element for plants, so such drastic reductions of 50 % or 25 % are challenging to manage in agriculture.

Regarding the application of the CSL product, root application partially restored the growth loss caused by the reduction in nitrogen levels in both N-50 % and N-25 % treatments (Table 4, Fig. 2). However, despite this recovery, the plants did not reach the same level of growth as the N-100 % treatment plants. On the other hand, foliar application of CSL failed to stimulate plant growth at either of the two deficient levels, N-50 % and N-25 %. Therefore, the CSL positive effect was observed in root applications for both nitrogen levels, although the plants did not reach optimal growth values like those in the N-100 % treatment. Although this result is not entirely satisfactory, it can be considered promising since CSL managed to stimulate plant growth. It is necessary to conduct further experiments with nitrogen reduction levels above 4 mM to precisely assess the potential of this agrochemical product at nitrogen reduction values that are acceptable for plants.

The decrease in vegetative growth parameters in plants grown under deficient nitrogen levels, N-50 % and N-25 %, was associated with a reduction in nitrogen concentration in the plant in its various forms (total, organic, and nitrates), as well as a decrease in the total nitrogen content in the aerial part and in the enzymatic activities such as NR, GS, amino acids, and proteins. This indicates that a reduction exceeding 50 % of nitrogen in the nutrient solution disrupts nitrogen distribution in the plant and all processes related to nitrogen metabolism, absorption, and assimilation. In pepper plants, like in most plants, NO_3^- is the preferred nitrogen source. It is absorbed by the roots and transported to the leaves, where it is converted into assimilation products such as amino acids and proteins, which are necessary for biomass production. The first step in NO_3^- assimilation is its reduction to NH_4^+ in two reactions: first, NO_3^- is converted to NO_2^- by nitrate reductase (NR), and subsequently, nitrite reductase converts it to NH_4^+ . This process requires reducing power in the form of NADH and reduced ferredoxin for the reaction to occur. The NH_4^+ produced is assimilated in an organic form by two enzymes: glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT), which produce glutamine (Gln) and glutamate (Glu), respectively. These compounds serve as precursors for the synthesis of other amino acids, proteins, nucleic acids, polyamines, chlorophylls, and hormones (Iqbal *et al.*, 2020; The *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). In pepper plants grown under nitrogen deficiency, the processes of nitrogen absorption and assimilation are altered, as indicated by the data obtained in this experiment.

The beneficial effects of root application of CSL could be related to the improvement in nitrogen absorption by the roots and/or its assimilation within the plant. Although the nitrogen concentration in the leaves was similar between the N-50 % and N-50 % root-applied CSL treatments, as well as between the N-25 % and N-25 % root-applied CSL treatments, the plants treated with CSL had a higher total nitrogen content in the aerial part (Fig. 2). The increased vegetative development of these plants led to a dilution effect, resulting in the same nitrogen concentration for both treatments. Therefore, for the same nitrate concentration in the nutrient

solution, the application of CSL increases the amount of nitrogen accumulated in the aerial part of the plants. Do not rule out the hypothesis that CSL could be stimulating the physiological and metabolic processes in plants that lead to increased vegetative growth, thereby enhancing the efficient use of nitrogen even at the same concentration in the nutrient solution or in the leaf. In fact, the results of amino acid and protein concentrations show that they are higher in plants treated with CSL. Both amino acids and soluble proteins play essential roles in plant growth, contributing to primary metabolism functions such as chlorophyll synthesis, increased photosynthetic activity, maintenance of water relations in the plant, synthesis of growth hormones like auxin, precursors for other amino acids, and protein synthesis. Additionally, these nitrogenous compounds also participate in the induction of secondary metabolism, generating defense compounds such as phenols, alkaloids, etc. (Iqbal *et al.*, 2020; The *et al.*, 2021; Cheng *et al.*, 2022).

The chemical composition of the applied CSL product indicates that it contains higher amounts of metabolites such as 2-ethyl-2-hydroxybutyric acid, erythritol, mannitol, GABA, isoleucine, proline, and DL-3-phenyllactic acid. These metabolites are known to be associated with stimulating effects in plants and providing protection against environmental stresses. Some research has shown that the application of biostimulants based on the presence of amino acids can improve plant growth and productivity by stimulating the assimilation processes of certain essential nutrients like nitrogen. This is achieved through the induction of enzymes such as NR and GS, which are key regulators of this physiological process, as well as the synthesis of nitrogenous organic compounds like amino acids and soluble proteins (Di Mola *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023).

In conclusion, these results indicate that foliar application of the CSL product under nitrogen-deficient conditions (N-50 % and N-25 %) not only induces increased synthesis of amino acids and soluble proteins (Tables 5 and 6) but also improves the nitrogen nutritional status by stimulating higher concentrations of total nitrogen and organic nitrogen in the leaves. Possibly, and although further research is needed, these results can be explained by the potential stimulation of CSL when applied via the roots, enhancing nitrogen absorption processes under limited nitrogen conditions in the growing medium (N-50 % and N-25 %). This hypothesis is supported by the results of nitrogen use efficiency. Under nitrogen-limited conditions in the growing medium (N-50 % and N-25 %), the application of the CSL product significantly improved various parameters that define nitrogen use efficiency (NUE) (Table 6). Specifically, the application of CSL significantly stimulated nitrogen uptake efficiency (NUpE), especially under N-50 % deficient conditions (Table 6). On the other hand, root application of CSL induced a significant increase in nitrogen utilization efficiency (NUtE) and NUE under N-50 % and N-25 % deficient conditions (Table 6). It is worth noting that both root and foliar applications of the CSL product

improved all NUE parameters under nitrogen-limited conditions in the growing medium. This explains the biostimulating effect of this compound, leading to an increase in biomass production in the aerial part, particularly when CSL is applied via the roots (Table 3).

5. CONCLUSIONS

In this experiment, it can be concluded that pepper plants are highly dependent on the nitrogen concentration in the nutrient solution, and the application of Corn Steep Liquor (CSL), primarily through root application, can alleviate nitrogen deficiency in the growing medium. Under nitrogen-limited conditions (N-50 % and N-25 %), the use of CSL via root application is beneficial for pepper cultivation, as it substantially improves plant growth. The mechanisms of action include enhanced nitrogen assimilation (NR and GS enzymatic activities) and increased synthesis and accumulation of amino acids and proteins. There is also a significant increase in nitrogen use efficiency, NUtE and NUE, particularly. Therefore, the utilization of CSL, especially when applied via root application, can be a useful technique for developing crops in nitrogen-limited areas. Under nitrogen-limited conditions (N-50 % and N-25 %), foliar application of CSL also provides benefits, although to a lesser extent than root application. Future experiments should aim to determine the range in which nitrogen fertilization can be reduced with the application of CSL without compromising vegetative development. Additionally, it is important to study the agronomic performance of plants when this extract is applied and delve into the metabolic processes activated by CSL components.

CRedit authorship contribution statement

Iván Navarro-Morillo: Software, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Visualization. **Begoña Blasco:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing. **José M. Cámara-Zapata:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Julia Muñoz-Acero:** Software, Investigation, Visualization. **Silvia Simón-Grao:** Validation, Formal analysis, Writing – original draft. **Marina Alfosea-Simón:** Validation, Writing – original draft. **Felix Plasencia:** Validation, Data curation, Visualization. **Francisco García-Sánchez:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- C. Campobenedetto, E. Grange, G. Mannino, J. van Arkel, J. Beekwilder, R. Karlova, C. Garabello, V. Contartese, C.M. Berteà. A biostimulant seed treatment improved heat stress tolerance during cucumber seed germination by acting on the antioxidant system and glyoxylate cycle. *Front. Plant Sci.*, 11 (2020), p. 836
- D.A. Cataldo, M. Maroon, L.E. Schrader, V.L. Youngs. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 6 (1975), pp. 71-80
- M. Cheng, Y. Cui, X. Yan, R. Zhang, J. Wang, X. Wang. Effect of dual-modified cassava starches on intelligent packaging films containing red cabbage extracts. *Food Hydrocolloid*, 124 (2022), Article 107225
- M.R. Conesa, P.J. Espinosa, D. Pallarés, A. Pérez-Pastor. Influence of plant biostimulant as technique to harden citrus nursery plants before transplanting to the field. *Sustainability*, 12 (2020), p. 6190
- E. Cozzolino, M. Giordano, N. Fiorentino, C. El-Nakhel, A. Pannico, I. Di Mola, M. Mori, M.C. Kyriacou, G. Colla, Y. Rouphael. Appraisal of biodegradable mulching films and vegetal-derived biostimulant application as eco-sustainable practices for enhancing lettuce crop performance and nutritive value. *Agronomy*, 10 (2020), p. 427
- A. Dalal, R. Bourstein, N. Haish, I. Shenhar, R. Wallach, M. Moshelion. Dynamic physiological phenotyping of drought-stressed pepper plants treated with “productivity-enhancing” and “survivability-enhancing” biostimulants. *Front. Plant Sci.*, 10 (2019), p. 905
- I. Di Mola, E. Cozzolino, L. Ottaiano, S. Nocerino, Y. Rouphael, G. Colla, C. El-Nakhel, M. Mori. Nitrogen use and uptake efficiency and crop performance of baby spinach (*Spinacia oleracea* L.) and lamb's lettuce (*Valerianella locusta* L.) grown under variable sub-optimal N regimes combined with plant-based biostimulant application. *Agronomy*, 10 (2020), p. 278
- C.O. Dimkpa, J. Fugice, U. Singh, T.D. Lewis. Development of fertilizers for enhanced nitrogen use efficiency – Trends and perspectives. *Sci. Total Env.*, 731 (2020), Article 139113
- P. Du Jardin. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hort.*, 196 (2015), pp. 3-14
- A.A. Elzaawely, M.E. Ahmed, H.F. Maswada, T.D. Xuan. Enhancing growth, yield, biochemical, and hormonal contents of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) sprayed with moringa leaf extract. *Arch. Agron. Soil Sci.*, 63 (2017), pp. 687-699

A. Emamverdian, A. Ghorbani, Y. Li, N. Pehlivan, J. Barker, Y. Ding, G. Liu, M. Zargar. Responsible mechanisms for the restriction of heavy metal toxicity in plants via the co-foliar spraying of nanoparticles. *Agronomy*, 13 (2023), p. 1748

FAO, 2023. Available online: [https://www.fao.org/news/story/es/item/277654/icode/\(20/07/2023\)](https://www.fao.org/news/story/es/item/277654/icode/(20/07/2023)).

S.R. Hamedani, Y. Roupheal, G. Colla, A. Colantoni, M. Cardarelli. Biostimulants as a tool for improving environmental sustainability of greenhouse vegetable crops. *Sustainability*, 12 (2020), p. 5101

S. Hayat, H. Ahmad, M. Ali, K. Hayat, M. Khan, Z. Cheng. Aqueous garlic extract as a plant biostimulant enhances physiology, improves crop quality and metabolite abundance, and primes the defense responses of receiver plants. *Appl. Sci.*, 8 (2018), p. 1505

N.M. Hussein, M.I. Hussein, S.H. Gadel Hak, M.A. Hammad. Effect of two plant extracts and four aromatic oils on tuta absoluta population and productivity of tomato cultivar gold Stone. *Nat. Sci.*, 12 (2014), pp. 108-118

A. Iqbal, D. Qiang, M. Alamzeb, W. Xiangru, G. Huiping, Z. Hengheng, P. Nianchang, Z. Xiling, S. Meizhen. Untangling the molecular mechanisms and functions of nitrate to improve nitrogen use efficiency. *J. Sci. Food Agric.*, 100 (2020), pp. 904-914

S. Joshi, S. Goyal, M.S. Reddy. Corn steep liquor as a nutritional source for biocementation and its impact on concrete structural properties. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 45 (2018), pp. 657-667

S. Kocira, A. Szparaga, P. Hara, K. Treder, P. Findura, P. Bartoš, M. Filip. Biochemical and economical effect of application biostimulants containing seaweed extracts and amino acids as an element of agroecological management of bean cultivation. *Sci. Rep.*, 10 (1) (2020), pp. 1-16

M.D. Krom. Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analysis*, 105 (1980), pp. 305-316

L.V. Kurepin, M. Zaman, R.P. Pharis. Phytohormonal basis for the plant growth promoting action of naturally occurring biostimulators. *J. Sci. Food Agric.*, 94 (2014), pp. 1715-1722

P.J. Lea, R.A. Azevedo. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Ann. App. Biol.*, 149 (2006), pp. 243-247

E. Navarro-León, Y. Barrameda-Medina, M. Lentini, S. Esposito, J.M. Ruiz, B. Blasco. Comparative study of Zn deficiency in *L. sativa* and *B. oleracea* plants: NH_4^+ assimilation and nitrogen derived protective compounds. *Plant Sci.*, 248 (2016), pp. 8-16

I. Navarro-Morillo, V. Navarro-Perez, R. Perez-Millan, E. Navarro-León, B. Blasco, J.M. Cámara-Zapata, F. Garcia-Sanchez. Effects of Root and Foliar Application of Corn Steep Liquor

- on Pepper Plants: a Physiological, Nutritional, and Morphological Study. *Horticulturae*, 9 (2023), p. 221
- T. Niwa, U. Doi, Y. Kato, T. Osawa. Antioxidative properties of phenolic antioxidants isolated from corn steep liquor. *J Agric. Food Chem.*, 49 (2001), pp. 177-182
- M.M. Rady, E.S. Desoky, A.S. Elrys, M.S. Boghdady. Can licorice root extract be used as an effective natural biostimulant for salt-stressed common bean plants?. *S. Afr. J. Bot.*, 121 (2019), pp. 294-305
- Y. Rouphael, M. Giordano, M. Cardarelli, E. Cozzolino, M. Mori, M. Kyriacou, P. Bonini, G. Colla. Plant-and seaweed-based extracts increase yield but differentially modulate nutritional quality of greenhouse spinach through biostimulant action. *Agronomy*, 8 (2018), p. 126
- S.V. The, R. Snyder, M. Tegeder. Targeting nitrogen metabolism and transport processes to improve plant nitrogen use efficiency. *Front. Plant Sci.*, 11 (2021), Article 628366
- L. Wang, X. Li, F. Gao, Y. Liu, S. Lang, C. Wang, D. Zhang. Effect of ultrasound combined with exogenous GABA treatment on polyphenolic metabolites and antioxidant activity of mung bean during germination. *Ultrason Sonochem.*, 94 (2023), Article 106311
- Y. Wang, S. Liu, X. Yang, J. Zhang, Y. Zhang, X. Liu, H. Zhang, H. Wang. Effect of germination on nutritional properties and quality attributes of glutinous rice flour and dumplings. *J. Food Compos. Anal.*, 108 (2022), Article 104440
- B. Wolf. A comprehensive system of leaf analyses and its use for diagnosing crop nutrient status. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 13 (1982), pp. 1035-1059
- Y.L. Xi, K.Q. Chen, W.Y. Dai, J.F. Ma, M. Zhang, M. Jiang, P. Wei, P.K. Ouyang. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 using corn steep liquor powder as nitrogen source. *Bioresour. Technol.*, 136 (2013), pp. 775-779
- G. Xu, X. Fan, A.J. Miller. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 63 (2012), pp. 153-182
- E.W. Yemm, E.C. Cocking. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, 80 (1955), pp. 209-213
- A. Younis, M.S. Akhtar, A. Riaz, F. Zulfiqar, M. Qasim, A. Farooq, U. Tariq, M. Ahsan, Z.M. Bhatti. Improved cut flower and corm production by exogenous moringa leaf extract application on gladiolus cultivars. *Acta Sci. Pol.*, 17 (2018), pp. 25-38
- K. Zarzecka, M. Gugala, I. Mystkowska, A. Sikorska. Total and true protein content in potato tubers depending on herbicides and biostimulants. *Agronomy*, 10 (2020), p. 1106

M.-M. Zhu, E.-Q. Liu, Y. Bao, S.-L. Duan, J. She, H. Liu, T.-T. Wu, X.-Q. Cao, J. Zhang, B. Li, Y.-T. Sheng, M.-X. Liang, H.-X. Zhang, X.-T. Guo. Low concentration of corn steep liquor promotes seed germination, plant growth, biomass production and flowering in soybean. *Plant Growth Regul.*, 87 (2019), pp. 29-37

F. Zulfiqar, A. Casadesús, H. Brockman, S. Munné-Bosch. An overview of plant-based natural biostimulants for sustainable horticulture with a particular focus on moringa leaf extracts. *Plant Sci.*, 295 (2020), Article 110194



