



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA MORFOLÓGICA Y LA EXPRESIÓN GÉNICA AL
ESTRÉS SALINO EN PLANTAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA* TRATADAS CON
OLIGOSACARINAS DE ORIGEN NATURAL.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología.

Profesor Guía
PhD Lien González Perez

Autora
Bárbara Michelle Castro Donoso

Año
2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el (los) estudiante(s), orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Lien González Pérez
Doctora en Ciencias Agrícolas
CI: 1751321348

DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Bárbara Michelle Castro Donoso

CI: 1720642311

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre por haberme proporcionado la educación que me permitió alcanzar este objetivo. A toda mi familia por su apoyo y cariño incondicional.

A Lien González quien hizo posible la elaboración de este proyecto, por haberme guiado y brindado su conocimiento, paciencia, confianza y amistad.

DEDICATORIA

Con todo cariño para aquellas personas que fueron parte de este camino recorrido y con quienes compartí tropiezos, tristezas y alegrías. Para Nataly y Gisella mis compañeras incondicionales. Para Ana María quien me acompañó durante la elaboración de este proyecto brindándome su amistad y con quien comparto los mejores recuerdos. Finalmente para Samantha, quien ha estado junto a mí durante los mayores obstáculos de mi vida y me ha impulsado a seguir adelante.

RESUMEN

La concentración de sal en el suelo es uno de los mayores problemas de la agricultura actualmente, debido a que afecta la germinación, el crecimiento y desarrollo de las plantas y el rendimiento de los cultivos generando estrés salino.

Para mitigar los efectos del estrés salino se ha propuesto el uso de bioestimulantes, como son las oligosacarinas obtenidas mediante la ruptura física o enzimática de la pared celular de plantas, que presentan actividad biológica a bajas concentraciones. El objetivo general de este trabajo fue comparar la respuesta al estrés salino en plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacarinas de origen natural, específicamente derivadas de la pared celular de plantas (OP). Para lo cual se crecieron plantas en medio básico Murashigue y Skoog (MS), medio MS más 100 mM de cloruro de sodio (NaCl), medio MS con OP 1 mg.L⁻¹ y medio MS con OP y NaCl. Se evaluó el porcentaje de germinación, además donde, se formaron dos grupos diferentes estadísticamente, uno en los tratamientos con presencia de sal y otro en ausencia, sin embargo no se encontró efectos significativos provocados por el bioestimulante. De la misma manera sucedió con la medición de raíces, número de raíces secundarias, primordios y peso fresco, a pesar de que las OP en presencia de sal tuvieron efectos positivos, estos no fueron estadísticamente significativos sobre los parámetros morfológicos evaluados. Se evaluó también, la expresión relativa del gen *catalasa* (*Cat*) los resultados mostraron que las OP provocaron un aumento de su expresión en los dos tiempos evaluados, mientras que OP más NaCl incrementó solo a las 72 horas posteriores a la inducción. Por otro lado, sobre el gen *manganeso superóxido dismutasa* (*MnSOD*) las OP generaron un aumento de expresión a las 24 h; mientras que con OP más sal el incremento se dio a las 72 h. En ambos casos las diferencias fueron notables con respecto al control por lo que puede decirse que las OP tienen un efecto directo sobre la expresión de estos genes, a pesar de no afectar directamente el porcentaje de germinación, morfología de la raíz o peso fresco.

ABSTRACT

The amount of salt on soils is one of the biggest problems in the agriculture, because it affects the germination, growth and development of the plants and thus to salt stress reduce the efficiency of crops.

To decrease the effects of salt stress it's been proposed the use of biostimulants, such as oligosacharines obtained by chemical or physical rupture of the plant cell wall, that, in low concentrations, present biological activity. The general objective of this investigation was to evaluate the response of plants of *Arabidopsis thaliana* treated with natural oligosachrines, specifically from plan cell wall (OP), under salt stress conditions. For this, plants were grown in basic medium Murashige y Skoog (MS), MS medium with 100 mM of sodium chloride (NaCl), MS with 1mg.L^{-1} of OP and MS with 1mg.L^{-1} of OP and 100 mM of NaCl. In the evaluation of the percentage of germination two statistic groups were formed, in presence and absence of NaCl, but there were not evident effects caused by the present of the biostimulant. Other variables measured were root length, number of secondary roots, root primordiums and fresh weight, the presence of the OP in the medium caused positive effects, nevertheless they were not statistically significant. The relative expression of the gene *Catalase (Cat)* was evaluated, showing that the addition of the OP provoked the increase of its expression in both of the times evaluated (24 and 72 hours), but in salt presence the increase happened only at 72 h. On the other hand, the evaluation of the gene *Manganese superoxide dismutase (MnSOD)* showed that the OP raised the expression at 24 h without salt stress and at 72 hours with the addition of NaCl. In both cases the differences were notorious a comparison with the negative control, therefore it's possible to say that the OP have direct effects on the gene expression of the genes evaluated, even if they don't affect the germination percentage, root morphology and fresh weight.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Generalidades de los bioestimulantes	4
2.1.1 Bioestimulantes y sus características	4
2.1.2 Tipos de bioestimulantes según su origen	5
2.1.3 Oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas	9
2.1.4 Importancia económica como sustitutos de agroquímicos	12
2.2 Estrés salino en los cultivos	15
2.2.1 Importancia económica del estrés salino y consecuencias biológicas	15
2.2.2 Principales cambios morfológicos, genéticos y líneas de defensa de la planta	16
2.2.3 Sistema antioxidante, enzimas Manganese superóxido dismutasa y Catalasa	18
2.2.4 Alternativas de manejo	20
3. METODOLOGÍA	22
Material Vegetal y oligosacarinas:	22
3.1 Comparación de las diferencias morfológicas de plantas de Arabidopsis thaliana tratadas con oligosacarinas en condiciones de estrés salino mediante la caracterización de las raíces y peso fresco de las plantas.	22
3.2 Determinación de la expresión relativa de los genes Catalasa (Cat) y Manganese superóxido dismutasa 1 (MnSOD) de plantas de Arabidopsis thaliana tratadas con oligosacarinas en condiciones de estrés salino mediante PCR en tiempo real.	25
4. RESULTADOS	29
4.1 Evaluación morfológica de las plantas	29
4.1.1 Morfología de las raíces	29
4.1.2 Peso fresco de las plantas	32
4.2 Evaluación de la expresión relativa de los genes Cat y MnSOD	33
4.2.2 Expresión del gen Cat	35

4.2.3 Expresión del gen MnSOD	37
5. DISCUSIÓN.....	39
6. CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	47
REFERENCIAS.....	48
Anexos	56

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el exceso de la concentración de sal en los suelos ha provocado la pérdida de muchos cultivos. Puesto que, al sembrar bajo estas condiciones el crecimiento, la germinación y el desarrollo de las plantas se ven afectados de forma negativa, generándose una condición conocida como estrés salino. Misma que involucra cambios en las células como desequilibrio osmótico, estrés oxidativo, entre otros (Jouyban, 2012, p. 7-10). La concentración de sales en el suelo aumenta con el tiempo, debido a diversos factores, donde uno de los más importantes es el uso de las tierras para cultivos causada por la adición de agroquímicos y al riego constante (Ariza, 2009, p. 2-4).

Se estima que el 50 % de cultivos alrededor del mundo presentan estrés salino (Yokoi, Bressan, y Hasegawa, 2002, p. 25), teniendo como principal consecuencia una pérdida elevada del rendimiento. Este problema es más común en los territorios próximos a las costas, pues el agua marina y subterránea incrementan la concentración de sales. Sin embargo, se ha evidenciado estrés salino en todas las regiones (IRRI, s. f.). Debido a que este problema va en aumento y limita la producción agrícola es necesario identificar posibles soluciones que permitan alcanzar una agricultura sostenible. Hasta la fecha se han tomado diferentes enfoques, como el desarrollo de cultivos transgénicos tolerantes o resistentes al estrés salino o el uso de medios físicos y químicos para la remoción de sales del suelo, pero estos no han tenido resultados favorables (Yokoi et al., 2002, p. 25-27). Para aliviar las afectaciones a la producción agrícola provocadas por distintos tipos de estrés abiótico, existe una tendencia a nivel mundial para la utilización de compuestos de origen natural, como son los denominados bioestimulantes.

Los bioestimulantes son compuestos orgánicos, en el mayor de los casos, que han demostrado tener efectos positivos sobre el desarrollo de las plantas y mejorar la respuesta a estrés (du Jardin, 2012). Estos bioproductos ejercen

influencia directa sobre el crecimiento de las raíces y el tallo, el peso fresco, la fotosíntesis, la concentración de antioxidantes y mediante una respuesta hormonal, proveen resistencia al estrés salino, las enfermedades, la sequía, el exceso de calor y la radiación UV (NewAGInternational, 2012).

Los bioestimulantes a utilizar en este estudio serán las denominadas oligosacarinas, hidratos de carbono liberados de la pared celular de plantas y algunos fitopatógenos mediante hidrólisis enzimática, que a bajas concentraciones presentan actividad biológica. Un tipo de bioestimulante poco estudiado en la actualidad son las oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas, mismas que promueven el crecimiento y desarrollo de los cultivos, además de mejorar la respuesta metabólica a diferentes tipos de estrés actuando como moléculas elicitoras (Darvill et al., 1992, p. 156-159; Enríquez-Guevara et al., 2010, p. 144-145).

Por otro lado, las plantas generan una cadena de reacciones enzimáticas como respuesta natural al estrés salino, entre las que se pueden destacar las enzimas *superóxido dismutasa* y *catalasa*. La enzima *superóxido dismutasa*, SOD (EC 1.15.1.1), es parte del sistema antioxidante de la célula. Se ha determinado que en algunas especies vegetales el estrés salino incrementa la actividad enzimática de la *superóxido dismutasa* alcanzando incluso el 150 % de su actividad inicial. Sin embargo, se han registrado especies vegetales en las cuales no existe variación considerable en la actividad enzimática (Meloni, Oliva, Martínez, y Cambraia, 2003, p. 71-73). Así mismo, se ha determinado que la actividad de la enzima *catalasa* (EC 1.11.1.6) disminuye bajo estrés salino, provocando un aumento en la concentración del ácido salicílico, el desequilibrio osmótico y cambios morfológicos en la hoja (Ie-Sung, Yukie, Akihiro, Dea-Wook y Kenji, 2002, p. 285-287).

Tomando en cuenta la importancia de los bioestimulantes, así como el conocimiento de sus efectos sobre las plantas y sus mecanismos de acción ante condiciones de estrés salino, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo.

Hipótesis

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas *in vitro* en condiciones de estrés salino con cloruro de sodio mejoran su crecimiento, morfología, y peso fresco en presencia de oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas en el medio de cultivo y modulan la expresión relativa de los genes *Catalasa (Cat)* y *Manganeso superóxido dismutasa (MnSOD)*.

Para darle respuesta a nuestra hipótesis, se plantearon los siguientes **objetivos:**

Objetivo General

- Evaluar la respuesta al estrés salino en plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacarinas de origen natural.

Objetivos específicos

- Comparar las diferencias morfológicas de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacarinas en condiciones de estrés salino mediante la caracterización de las raíces y peso fresco de las plantas.
- Determinar la expresión relativa de los genes *Catalasa (Cat)* y *Manganeso superóxido dismutasa 1 (MnSOD)* de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacarinas en condiciones de estrés salino mediante PCR en tiempo real.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de los bioestimulantes

2.1.1 Bioestimulantes y sus características

El término bioestimulante comprende una amplia gama de compuestos, inóculos de microorganismos o sus derivados, que al ser aplicados en la planta, la semilla o el sustrato promueven el desarrollo y crecimiento de raíces, hojas y tallos; además de mejorar la respuesta al estrés biótico y abiótico, además de otros efectos (du Jardin, 2012). Cabe recalcar que estos no se consideran fertilizantes o plaguicidas, a pesar de que puedan contrarrestar los efectos de las plagas, como han demostrado algunos derivados quitosano, y mejorar la toma de agua y nutrientes para el caso de derivados de algas y microorganismos (Cabrera et al., 2012, p. 195). Los bioestimulantes pueden ser tanto moléculas aisladas, como mezclas en diferentes combinaciones y concentraciones, que generan diferentes efectos al ser aplicados en los cultivos (du Jardin, 2012). Actualmente, el concepto de bioestimulantes aún se encuentra en desarrollo, debido principalmente a su diversidad en cuanto a sus componentes y su modo de acción (Calvo, Nelson, y Kloepper, 2014, p.3-4).

El modo de acción de los bioestimulantes ha sido ampliamente estudiado, encontrándose diferencias significativas según el origen de los mismos. Sin embargo, se han descrito algunos efectos en común respecto al crecimiento y las variaciones morfológicas que tienen sobre las plantas. Además, se ha observado que pueden actuar en la regulación de la fotosíntesis, la expresión génica y el metabolismo. Diversos estudios han demostrado que los efectos bioestimulantes se producen en diferentes niveles dentro de la planta, donde a nivel celular pueden provocar cambios en las enzimas, el transporte de membrana y cambios genéticos. También pueden existir alteraciones a nivel de órganos y, finalmente, a nivel de la planta completa mediada por la emisión de señales (du Jardin, 2012).

2.1.2 Tipos de bioestimulantes según su origen

La clasificación de los bioestimulantes según su origen se divide de la siguiente manera: sustancias húmicas, compuestos orgánicos e inorgánicos, compuestos beneficiosos, extractos de algas, derivados de quitina y quitosano, antitranspirantes, compuestos nitrogenados y aminoácidos libres. Además de inóculos microbianos o sus derivados y moléculas obtenidas de la pared celular de plantas (Calvo et al., 2014, p. 3-4; du Jardin, 2012).

1. **Sustancias húmicas:** Los ácidos húmicos y derivados de humus se extraen de las zonas sedimentadas de suelos, correspondientes con el resultado final de la descomposición microbiana y degradación química de materia orgánica (Calvo et al., 2014, p. 11; Lynde, 2001, p. 3). Este tipo de bioestimulante es de gran interés para el manejo de suelos y como sustituto principal de fertilizantes a base de ácido sulfúrico debido a su similitud estructural y funcional (du Jardin, 2012). Los ácidos húmicos usados como bioestimulantes están compuestos por proteínas, carbohidratos y lignina. La combinación de estos compuestos afecta directamente su función, encontrándose mejor efecto bioestimulante cuando las formulaciones contienen fracciones de bajo peso molecular. Estos compuestos actúan de manera similar a las fitohormonas, ya que favorecen el crecimiento de la raíz y el tallo, mejoran la cosecha y la toma de nutrientes, además de participar en la respuesta al estrés (Calvo et al., 2014, p.11-12).
2. **Compuestos orgánicos:** Los bioestimulantes orgánicos tienen diversos orígenes, de los cuales puede destacarse el compost, los desechos orgánicos e industriales, entre otros. Debido a que estos provienen de diferentes fuentes presentan varios mecanismos de acción sobre las plantas, donde actúan principalmente en la fisiología y producen algunos cambios metabólicos. Cabe recalcar que los compuestos nitrogenados,

los extractos de algas y derivados de la pared celular se clasifican de manera individual. (Przybysz, Gawronska, y Gajc-Wolska, 2014, p. 1-2).

- 3. Elementos beneficiosos:** Este tipo de bioestimulante está constituido por elementos químicos no indispensables para las plantas, con la excepción de algunas especies. Estos son el aluminio, el cobalto, el sodio, el selenio y el silicio. Diferentes formulaciones con estos elementos han probado ser beneficiosas en algunas estructuras de las plantas, como son la membrana y la pared celular, además de mejorar la respuesta a estrés, la osmoregulación y el desarrollo (du Jardin, 2012).
- 4. Sales inorgánicas:** Se ha evidenciado que algunas sales inorgánicas, especialmente compuestos fosforados, sulfatos, nitratos y bicarbonatos tienen efecto positivo al ser utilizados sobre las plantas o el suelo. Estas moléculas se obtienen por reacciones químicas usando como sustrato material inorgánico de depósitos geológicos. Estos provocan en la planta un mayor crecimiento, actúan sobre su estructura y proveen protección en contra de hongos patogénicos. Sin embargo, su mecanismo de acción no se ha determinado por completo. En sustratos con suficiente fosfato para el desarrollo de las plantas estos pueden tener efecto beneficioso, pero en escasos de este elemento pueden disminuir el rendimiento del cultivo. La principal diferencia encontrada en este tipo de bioestimulante, en comparación con los mencionados anteriormente, es que estos no presentan un efecto similar a las fitohormonas (du Jardin, 2012; Przybysz et al., 2014, p. 2).
- 5. Extractos de algas:** Muchas especies de algas son utilizadas en la agricultura como fertilizantes, suplementos nutricionales o bioestimulantes. La biomasa de *Fucus* spp., *Laminaria* spp., *Sargassum* spp., *Turbinaria* spp. y *Ascophyllum nodosum* ha sido ampliamente explotada en la industria agrícola (Sharma, Fleming, Selby, Rao, y Martin, 2014, p. 465-466). Las formulaciones utilizadas como

bioestimulantes han tenido efectos beneficiosos sobre la germinación, el rendimiento de los cultivos, la resistencia a estrés biótico y abiótico, además de un mayor tiempo de vida post cosecha (Tuchy, Chowańska, y Chojnacka, 2013, p. 386). En los últimos años ha sido de gran interés el estudio de los extractos de algas en la agricultura, encontrándose que las moléculas bioactivas son compuestos nitrogenados, esteroides y hormonas (du Jardin, 2012). Por otro lado, algunos estudios han determinado que es posible que otros tipos de moléculas de alto peso molecular, como polifenoles y polisacáridos, tengan influencia directa en los cultivos (Sharma et al., 2014, p. 466).

6. Derivados de quitina y quitosano: La quitina es un polisacárido estructural de insectos, crustáceos y de la pared celular de algunos hongos. El quitosano, en cambio, es un derivado de la quitina obtenido por una reacción de N-acetilación, incompleta en la mayoría de los casos. Estos compuestos son de gran interés en la industria agrícola, pues estructuralmente están formados por átomos de nitrógeno, alcanzando hasta un 8 % de contenido del mismo. Adicionalmente, la presencia de polímeros naturales en sus moléculas les proveen características de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, mayor facilidad de absorción, entre otros (Ravi Kumar, 2000, p. 2-4). Según el objetivo, la quitina o el quitosano pueden romperse en fracciones de menor peso molecular mediante procesos físicos y químicos, por ejemplo para obtenerse los quitooligosacáridos. Estos últimos son ampliamente utilizados como aditivos en el suelo, como agentes antimicrobianos, antitranspirantes vegetales, para la protección de los cultivos y estimulantes del crecimiento, es decir como bioestimulantes (du Jardin, 2012).

7. Antitranspirantes: Los antitranspirantes vegetales son un conjunto de moléculas muy diversas que regulan la difusión de gases de la planta a través de los estomas. Estas moléculas pueden provenir de compuestos

sintéticos como el naftaleno, las poliacrilamidas, además de compuestos inorgánicos y biopolímeros, entre otros. El efecto bioestimulante de los antitranspirantes comprende cambios fisiológicos en las hojas y el metabolismo, variaciones osmóticas, efectos similares a hormonas y mejora de la respuesta a estrés (du Jardin, 2012).

- 8. Compuestos nitrogenados y aminoácidos libres:** Contempla compuestos nitrogenados como los aminoácidos, los péptidos, las poliaminas, entre otros. Se usan y comercializan principalmente como mezclas de moléculas obtenidas por hidrólisis, por lo que su composición puede ser muy variable. Los aminoácidos libres y otros compuestos nitrogenados son parte del metabolismo de la célula, por lo que se ha sugerido que estos pueden mejorar la captura de átomos de nitrógeno mejorando la eficiencia metabólica de la planta. También pueden generar efectos similares al de las auxinas y las giberelinas (du Jardin, 2012).

- 9. Derivados microbianos:** Incluye algunos inóculos microbianos y derivados de los microorganismos. Los productos comercializados pueden incluir bacterias, hongos y micorrizas obtenidas principalmente del suelo, residuos de plantas, agua y compost. Estudios previos han determinado que los derivados de microorganismos proveen algunos metabolitos relacionados con la percepción del estrés, por lo que incrementan en la planta la resistencia y la respuesta a estrés biótico y abiótico, mediante el manejo de las señales de respuesta (Saa, Olivos-Del Rio, Castro, y Brown, 2015, p. 1-2). Los bioestimulantes de inóculos microbianos y sus derivados se utilizan en la industria como fertilizantes por su modo de acción similar. Además de la mejora en la respuesta estrés, estos promueven el crecimiento de la planta debido a que aumentan la toma de nutrientes y minerales del suelo (Calvo et al., 2014, p. 4).

10. Derivados de la pared celular de plantas: Entre estos compuestos se encuentran los derivados de la pectina, la celulosa, la hemicelulosa, entre otros, obtenidos de la pared celular de plantas. Este tipo de bioestimulantes se ha utilizado muy poco en la agricultura; sin embargo, se ha determinado que tienen efecto un positivo en los cultivos frente al estrés, además de mejorar el crecimiento, aumentar el área foliar, entre otros (Cabrera et al., 2012, p. 196; Enríquez-Guevara et al., 2010, p. 145-147; Ertani, Schiavon, Muscolo, y Nardi, 2013, p. 146-148).

2.1.3 Oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas

Las oligosacarinas son moléculas obtenidas de la pared celular de plantas mediante hidrólisis enzimática o separación química, que en bajas concentraciones presentan actividad biológica (Enríquez-Guevara et al., 2010, p. 145-149). Están formadas por cadenas de azúcares, obtenidas de oligosacáridos, polisacáridos y glicoproteínas (Castillo, 2000; Fry, Aldington, Hetherington, y Aitken, 1993, p. 1).

El mecanismo de acción de las oligosacarinas no ha sido dilucidado por completo, sin embargo, se sabe que actúan como elicitores o moléculas señalizadoras que se adhieren a receptores de la membrana celular. Esta definición se relaciona con la presencia de plagas y la respuesta a estrés, ya que generan estímulos de defensa de la planta a nivel metabólico (Enríquez-Guevara et al., 2010, p. 148). Además, las oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas promueven el crecimiento y el desarrollo de los cultivos y mejoran la tolerancia a temperaturas bajas (Darvill et al., 1992, p. 181-182; Zabotin et al., 2005, p. 136).

Las oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas pueden clasificarse de la siguiente manera:

1. Según su origen:

1.1 Derivadas de Xiloglucano: el Xiloglucano es un polisacárido estructural de la pared celular primaria de plantas (Castillo, 2000). Las oligosacarinas derivadas de xiloglucanos se obtienen mediante digestión enzimática con hemicelulasas de la pared celular. Pueden provenir de la semilla o de los órganos de la planta. Estudios con diferentes formulaciones de moléculas derivadas de xiloglucanos han demostrado que en *Arabidopsis thaliana* éstas moléculas promueven la elongación de la raíz primaria (González-Pérez et al., 2012, p. 214-216). Adicionalmente, en células de Tabaco (BY-2) reducen el ciclo celular, estimulan el crecimiento y división celular, modifican la expresión de algunos genes relacionados con la división celular y la señalización y pueden actuar como elicitores (González-Pérez et al., 2014). Las potencialidades de los oligosacaridos de Xiloglucanos ya han sido empleadas con fines comerciales, como es el caso de un producto cuya formulación está basada en una mezcla de xiloglucanos obtenido de la corteza del tamarindo (*Tamarindus indica* L.) (Patente No. 5602111¹). El mismo puede ser usado como pesticida, para mantener la frescura de las plantas y como protector de la envoltura de semillas sintéticas.

1.2 Derivadas de pectina: El homogalacturonano es un homopolimero estructural de la pectina que mediante despolimerización genera oligogalacturónidos (OGA), moléculas que presentan actividad biológica y se relacionan con la respuesta a estrés, además de promover y regular el crecimiento de las plantas (Castillo, 2000). En la agricultura los OGA se utilizan para mejorar la cosecha y la calidad post cosecha en tomate y la emisión de raíces en variedades de guayabo. Finalmente, en caña de azúcar se demostró que el espacio entrenudo,

¹US Patent 5602111: Agent for inducing phytoalexin and method for inducing phytoalexin. Chem. Abstr., 121, 101994.

el número de tallos y la calidad del jugo mejoran al ser tratado el cultivo con estas moléculas (Enríquez-Guevara et al., 2010, p. 151-152). Un ejemplo de un producto empleado con fines comerciales es el Pectimorf[®], el cual es una mezcla de oligogalacturónidos que se obtiene a partir de los desechos de la industria citrícola (Patente No. 1998/171) (Cabrera, 2000). Es un regulador del crecimiento no tradicional, que se produce por la degradación parcial de la pared celular de la corteza de los cítricos y presenta las características de activar los mecanismos de defensa y/o modificar el crecimiento y el desarrollo de las plantas.

2. Según su modo de acción:

2.1. Interacción planta - patógeno: Uno de los principales efectos de los bioestimulantes, incluyendo las oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas, es el de generar moléculas elicitoras de fitoalexinas en presencia de plagas. Las fitoalexinas son moléculas con acción similar a antibióticos, mismas que son tóxicas para la mayoría de plagas. Éstas pertenecen a diferentes clases de metabolitos secundarios como los flavonoides, los terpenos, los compuestos insaturados, entre otros. Cabe recalcar que los elicitores de fitoalexinas no se producen solamente por bioestimulantes, estos pueden generarse también por factores bióticos y abióticos que dañen la pared celular de las plantas (Usov, 2007, p. 1047-1048).

2.2. Reguladores del crecimiento y morfogénesis: Inicialmente, las primeras oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas demostraron que afectaban de manera directa la floración y crecimiento vegetativo, pero posteriormente se observaron efectos en el crecimiento de raíces (Ryan y Farmer, 1991, p. 659). En la actualidad otros estudios han determinado la capacidad de algunas oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas de estimular

la elongación celular, la morfogénesis y maduración de los frutos, como por ejemplo los xiloglucanos o los derivados de pectina y hemicelulosa (Eggleston y Côté, 2003, p. 11; González-Pérez et al., 2012, p. 212). Otros oligosacarinas han demostrado tener efecto positivo sobre el metabolismo antioxidante (Vasconcelos, Zhang, Ervin, y Kiehl, 2009, 395).

2.1.4 Importancia económica como sustitutos de agroquímicos

Actualmente la agricultura se sustenta gracias a la utilización de gran cantidad de agroquímicos de alta eficiencia como son los fertilizantes, los herbicidas, los fungicidas, entre otros (Landis y South, 1997). La aplicación de estos productos ha incrementado el rendimiento de los cultivos más importantes como son el trigo, el arroz, el maíz, las papas, la soya y el algodón, en comparación con los cultivos que no son tratados con estos compuestos (figura 1) (Globalchem, 2007). Sin embargo, pueden generar efectos negativos en los agricultores, los animales, las poblaciones cercanas y al consumidor (Tirado, Bedoya, y Novotny, 2008, p.12).

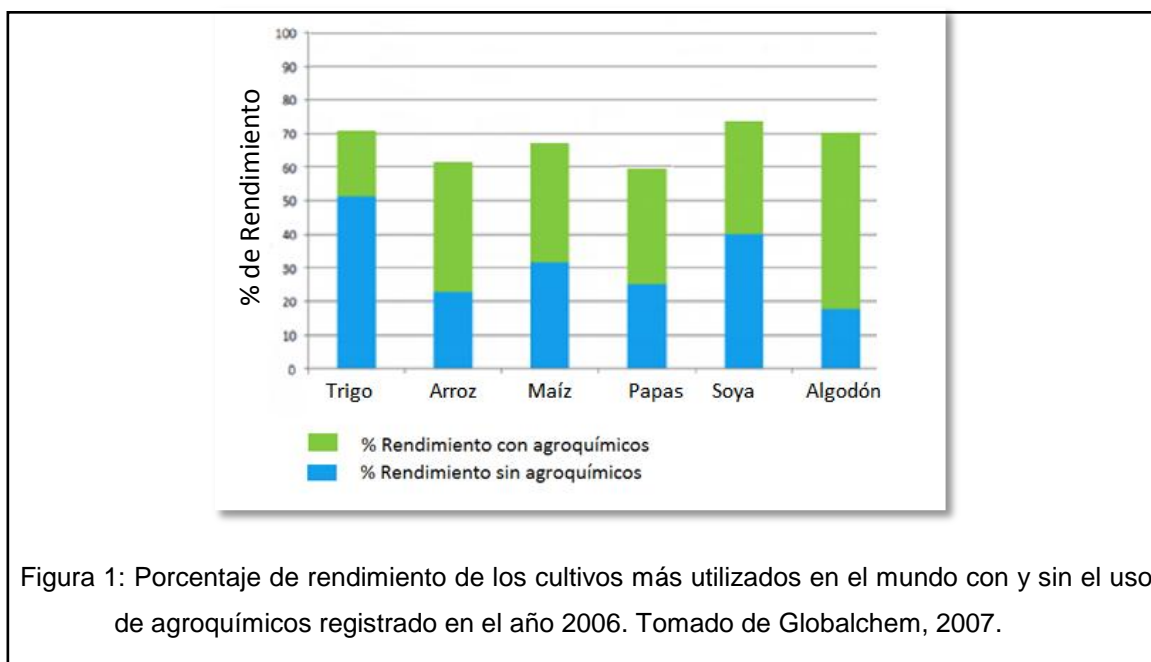
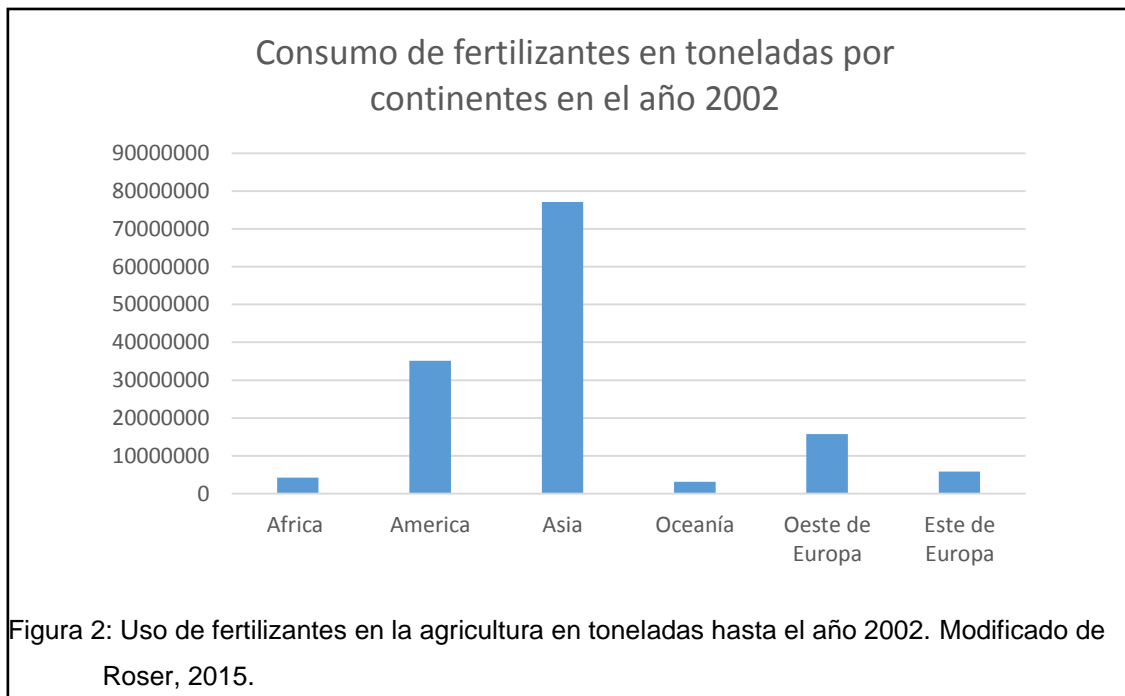
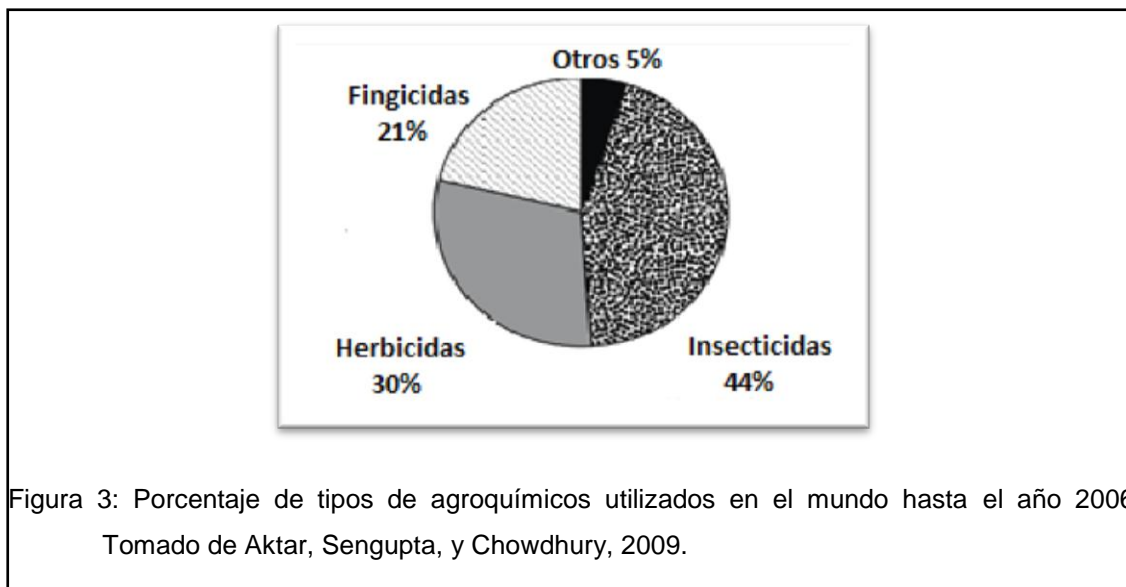


Figura 1: Porcentaje de rendimiento de los cultivos más utilizados en el mundo con y sin el uso de agroquímicos registrado en el año 2006. Tomado de Globalchem, 2007.

El uso de fertilizantes ha incrementado excesivamente en las últimas décadas en la agricultura con la finalidad de contrarrestar el daño preexistente de los suelos cultivables (Roser, 2015). El continente asiático registra el mayor uso de fertilizantes alcanzando en el año 2002 aproximadamente 700,000.000 toneladas, seguido por América con 400,000.000 toneladas, después se encuentra el Oeste de Europa con 200,000.000 toneladas, el Este de Europa alcanza aproximadamente 60,000.000 toneladas mientras que África y Oceanía se encuentran por debajo de 50,000.000 toneladas al año (figura 2) (Roser, 2015). Solo en Estados Unidos, el gasto anual en fertilizantes registrado en el 2012 es de aproximadamente 23 millones de dólares (TFI, 2013). Sin embargo, a pesar de que el consumo de fertilizantes ha permitido mejorar la agricultura, éste ha conllevado a la degradación de suelos y la pérdida de fertilidad de los mismos alrededor del mundo, siendo éste uno de los problemas más graves en la agricultura actualmente (Fernandez-Cornejo y Nehring, 2014, p.30; Tirado et al., 2008, p. 6-8).



Por otro lado, los pesticidas más utilizados son los insecticidas, los herbicidas y los fungicidas (figura 3), los cuales se emplean para disminuir las pérdidas en los cultivos causados por plagas y favorecer la agricultura.



Sin embargo, los pesticidas químicos producen diferentes problemas, pues pueden bioacumularse en los organismos acuáticos, contaminar el agua y los cultivos y, por consiguiente, generar enfermedades o daños al ser humano, incluyendo cáncer (Globalchem, 2007; Tirado et al., 2008, p.12).

En este sentido, los bioestimulantes pueden sustituir o disminuir el uso de una amplia gama de compuestos químicos (Landis y South, 1997), dado que tienen un efecto positivo en el crecimiento, el desarrollo de los cultivos, en la floración, la cosecha y la resistencia a estrés biótico o abiótico. Estos permiten igualmente, mejorar la toma de nutrientes del suelo, permitiendo así la reducción de fertilizantes químicos. Adicionalmente tienen efecto similar al de las hormonas vegetales y mejoran la resistencia a plagas, con lo cual se elimina o disminuye la necesidad del uso de las fitohormonas y los pesticidas químicos (Aamlid y Hanslin, 2009 p. 925-927).

2. 2 Estrés salino en los cultivos

2.2.1 Importancia económica del estrés salino y consecuencias biológicas

La acumulación de sales en el suelo tiende a aumentar por la presencia de sulfatos y cloruros y el movimiento de aguas marinas y freáticas. Este problema se ve potenciado por la actividad humana debido al mal manejo del agua de riego y el uso de agroquímicos (Ariza, 2009). Se estima que aproximadamente el 23 % de los suelos cultivables en el mundo tienen exceso de sal. Esto genera gran cantidad de problemas en la agricultura actual, pues evita el crecimiento, el desarrollo y la propagación de los cultivos, especialmente en zonas áridas y semiáridas (Jouyban, 2012). Todos los continentes se ven afectados por la salinidad, sin embargo, el grado de afectación depende del uso del suelo, la frecuencia del riego y la proximidad a la costa. Asia y Australia son los continentes más afectados, 195 millones de hectáreas (Mha) de suelos cultivables están afectados por sales de sodio, en América latina 61 Mha presentan excesiva concentración de sodio. África presenta 39 M ha, Europa 7 M ha y Norte América 5 Mha (Hasanuzzaman, Nahar, y Fujita, 2013, p. 26).

Las altas concentraciones de sal y cationes hacen el suelo más compacto y disminuyen su porosidad, lo que provoca la acumulación de agua y conlleva a la hipoxia en los cultivos (Carillo, Annunziata, Pontecorvo, Fuggi, y Woodrow, 2011, p. 24-27). También puede generar agregados con lo cual se disminuye la aireación y se dificulta el crecimiento de las raíces (Warrence, Pearson, y Bauder, 2003).

En la India se han registrado pérdidas en los cultivos de arroz, trigo, caña de azúcar y algodón debido a altas concentraciones de sal en el suelo. El cultivo de algodón ha sido el más afectado, alcanzando una disminución en el rendimiento por hectárea del 48 %. Este problema no solo afecta a los cultivos, sino que también afecta al ganado y al consumidor debido a la baja producción para la alimentación y otros usos (Qadir et al., 2014, p 3-4).

Se ha calculado que a nivel mundial los suelos afectados por la alta salinidad registran una pérdida de aproximadamente 12 billones de dólares hasta el año 2000, sin embargo se estima que en la actualidad estas pérdidas podrían alcanzar los 27 billones de dólares (Pitman y Läuchli, 2002; Qadir et al., 2014, p. 13).

2.2.2 Principales cambios morfológicos, genéticos y líneas de defensa de la planta.

Los principales indicadores morfológicos de las plantas cuando hay salinidad en el suelo son el bajo crecimiento, una menor área foliar y un menor número de hojas y raíces secundarias debido a problemas en la toma de nutrientes y agua del suelo. También puede verse afectado el peso fresco y seco de la planta (Abdul Qados, 2011, p. 8; Jouyban, 2012). Se ha registrado igualmente el retraso en la germinación y la disminución de la tasa de la misma, la acumulación y toxicidad de iones y el desbalance nutricional (Martínez Villavicencio, López Alonzo, Basurto Sotelo, y Pérez Leal, 2011, p. 158).

La salinidad del suelo afecta a la planta en su fisiología y el metabolismo, donde inicialmente genera un desequilibrio osmótico, seguido por la toxicidad de iones y desordenes nutricionales. Sin embargo, el grado de afectación depende del cultivo, su genotipo, la edad y otros factores (Ariza, 2009; Läuchli y Grattan, 2007, p. 2-3). A nivel celular la primera respuesta que se presenta es la deshidratación y la pérdida de turgencia, aunque pocas horas después una vez que se da la respuesta adecuada, éstas recuperan su volumen (Yokoi, Bressan, y Hasegawa, 2002, p. 26). A pesar de que la célula se recupera, la división celular y la elongación se reducen, disminuyendo por lo tanto el crecimiento del tallo, la raíz y las hojas. Si las condiciones de extrema salinidad persisten se ve afectada la producción de raíces y brotes secundarios. Finalmente, después de varias semanas estas condiciones disminuyen la producción y el crecimiento de las hojas. Estos órganos presentan también una

variación con respecto a los pigmentos fotosintéticos, razón por la cual la tasa de fotosíntesis disminuye (Abdul Qados, 2011, p. 12). El exceso de sal e iones sulfuro tiende a acumularse en las hojas generando toxicidad y eventualmente la muerte celular (Jouyban, 2012; Läuchli y Grattan, 2007, p. 3-4).

En caso de que el suelo cultivable tenga altas concentraciones de sales de sodio, aparte de los efectos previamente mencionados, se genera alta toxicidad en las raíces y el tallo. Esto es debido a que este ion desplaza al calcio de la membrana celular afectando la permeabilidad de la misma y provocando la salida de iones potasio y la acumulación de iones sodio. Como consecuencia hay una disminución del contenido de agua en las células y una reducción en la disponibilidad de nutrientes (Martínez Villavicencio *et al.*, 2011, p.159).

Por otro lado, si las sales del suelo son cloruros la acumulación del ion cloro puede producir quemaduras en las hojas, disminución de la fotosíntesis e inhibición de la absorción de nitratos (Martínez Villavicencio *et al.*, 2011, p. 159-160).

Los mecanismos de tolerancia a concentraciones elevadas de sal no se han dilucidado por completo; sin embargo, se han encontrado varias respuestas al estrés salino (Carillo *et al.*, 2011 p. 26). Un ejemplo es el retraso en la germinación hasta que las condiciones sean más favorables. También se ha determinado que las cutículas de las hojas se engrosan para evitar la pérdida de agua y por consiguiente disminuyen la toxicidad de los iones (Ariza, 2009). Por otro lado, se ha encontrado que las raíces excluyen a los iones sodio, reduciendo así su toxicidad (Carillo *et al.*, 2011, p. 28).

En presencia de estrés salino se ha determinado que se activan varias cascadas de señalización, mediadas por diferentes moléculas quinasas. En *Arabidopsis* se ha señalado que la molécula responsable de la activación de respuestas de defensa a estrés salino por cloruro de sodio, es la quinasa AtGSK1, una proteína homóloga a la GSK3 que fue originalmente identificada

como una quinasa que fosforila la glucógeno sintasa (Piao, Lim, Cheong, y Hwang, 2001). Otras respuestas genéticas descritas son la sobreexpresión de serinas y treoninas quinatas, moléculas responsables de la tolerancia a los diferentes tipos de estrés. También se ha mencionado que las proteínas quinatas altamente conservadas AtDBF2 y la CCR4 modulan la expresión de la adaptación osmótica (Hasegawa y Bressan, 2000, p. 470, p. 478-479).

Finalmente, después de la modulación de expresión de genes cabe mencionar al sistema antioxidante, responsable de disminuir el efecto tóxico de productos del metabolismo como las especies reactivas del oxígeno (Sharma, Jha, Dubey, y Pessarakli, 2012, p. 1-2).

2.2.3 Sistema antioxidante, enzimas *Manganeso superóxido dismutasa* y *Catalasa*

A nivel metabólico el estrés ambiental, incluida la salinidad, genera el aumento en las especies reactivas del oxígeno conocidas como ROS (de sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*). Las ROS son moléculas formadas por el metabolismo aerobio, entre las que se encuentran los radicales libres, el peróxido de hidrógeno y el oxígeno molecular. En las plantas estas moléculas se forman debido a la reducción del oxígeno molecular causado por el flujo energético durante la transferencia de electrones (Sharma et al., 2012, p. 2). El exceso de ROS puede provocar en la planta alteraciones en los ácidos nucleicos y las proteínas, además de la necrosis y la muerte celular (Apel y Hirt, 2004, p.375). Por lo tanto, el exceso de ROS debe ser controlado mediante una cadena de reacciones enzimáticas controlado por la acción del sistema antioxidante. Las enzimas responsables de la degradación de estas moléculas son: *Superóxido dismutasa* (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), Glutathion reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y *Catalasa* (CAT) (Abogadallah, 2010, p.370).

La enzima *superóxido dismutasa*, al utilizar manganeso como cofactor, se conoce como *manganeso superóxido dismutasa* (MnSOD), la cual se encuentra en las plantas y los animales (Monte y Sacardote, 1994). Ésta se encarga de identificar los radicales libres, en especial el radical peróxido, y transformarlos en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (figura 3) (Abogadallah, 2010, p. 371). Sin embargo, el peróxido de hidrógeno también es tóxico para la célula y puede descomponerse con facilidad en el radical hidroxilo, otro radical libre muy reactivo y tóxico para la célula (Corrales y Ariza, 2012, p. 217). Es por esta razón que el peróxido de hidrógeno debe ser transformado, donde las enzimas *catalasa*, *ascorbato peroxidasa* y *glutathione peroxidasa* son las encargadas de la transformación del peróxido de hidrógeno en agua (figura 4).

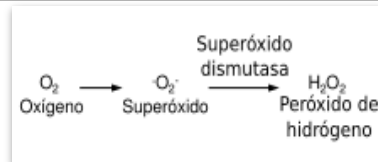


Figura 3: Ecuación de la formación del peróxido de hidrógeno a partir del ion superóxido, mismo que se genera a partir de oxígeno molecular dentro de la célula, mediado por la enzima *manganeso superóxido dismutasa* (MnSOD). Modificado de Corrales y Ariza, 2012.

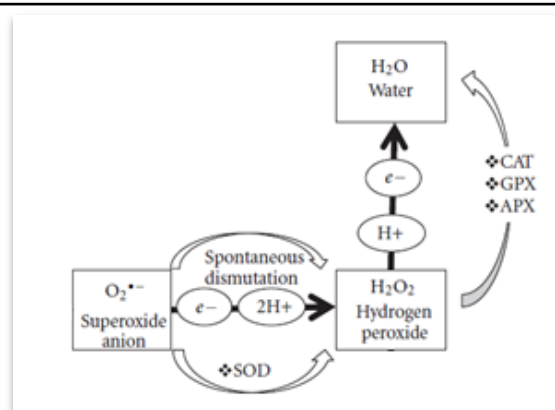


Figura 4: Transformación del peróxido de hidrógeno en agua con la adición de hidrógeno y un electrón mediada por enzimas del sistema antioxidante, entre las cuales se encuentra la enzima *Catalasa*. Tomado de Sharma et al., 2012.

La enzima *catalasa* ha registrado mayor velocidad de acción, a pesar de tener menor afinidad en comparación con las otras enzimas antes mencionadas, además de ser favorable energéticamente. Sin embargo, en condiciones de estrés se ha registrado disminución en la concentración de la misma en la célula (Sharma et al., 2012, p. 3). El producto final del metabolismo de la enzima MnSOD y CAT es agua, disminuyéndose así por completo la toxicidad inicial del exceso de radicales libres.

2.2.4 Alternativas de manejo

Hasta la fecha poco se ha logrado para tolerar o mitigar los efectos de la salinidad sobre las plantas, por lo que la búsqueda de alternativas viables y amigables con el ambiente es una prioridad para lograr una agricultura sostenible (Piedra et al., 2013, p. 31-33).

Existen varios enfoques para contrarrestar el efecto del estrés salino en las plantas. Mediante la genética clásica se han desarrollado líneas resistentes a partir de cruces con parentales silvestres tolerantes. También se han domesticado cultivos halófilos (Piedra et al., 2013, p.34). Por otro lado, mediante la biotecnología se busca la producción de organismos genéticamente modificados, la modificación de las vías metabólicas basadas en la activación de señales y la sobreexpresión de genes de resistencia y de proteínas del sistema antioxidante (Hasegawa y Bressan, 2000, p. 478; Yokoi et al., 2002, p. 29). Esto ha sido posible a partir de la identificación de genes resistencia a altas concentraciones de sal mediante diferentes tipos de marcadores moleculares. Se ha utilizado también la aclimatación de cultivos desde etapas tempranas mediante cultivos celulares y callos *in vitro*, mas no se ha obtenido alta eficiencia de los mismos (Piedra et al., 2013, p. 37).

También se ha tratado de recuperar los suelos salinos, sin embargo este es un proceso lento y afectado altamente por las condiciones climáticas (Zamolinski, 2000, p.6). Una metodología registrada es la ruptura de las capas compactas externas del suelo, con el fin de lixiviar el exceso de sal, pero este proceso es

altamente costoso y poco efectivo (Qadir et al., 2014, p. 3-4; Zamolinski, 2000, p.7). La adición de abonos orgánicos ha permitido recuperar los suelos salinos. También se realizan “lavados” del suelo con agua de baja salinidad que busca diluir y lixiviar las sales solubles y disminuir el pH del suelo. No obstante, estas técnicas proveen soluciones a corto plazo y tienen una baja eficiencia (Riego et al., 2014, p. 212-213).

Se han probado también técnicas de fito y biorremediación para eliminar el exceso de sal del suelo; sin embargo, tampoco se han obtenido resultados favorables (Qadir et al., 2014, p.5).

En conclusión, los suelos salinos son un problema a nivel mundial y limitan la producción de los cultivos. Se han probado diferentes alternativas para recuperar estos suelos mediante técnicas costosas y poco eficientes. Por estas razones la aplicación de bioestimulantes puede ser una solución, al ser una tecnología poco costosa, de alta eficiencia y no contaminante con el medio ambiente.

3. METODOLOGÍA

Material Vegetal y oligosacarinas:

Para este trabajo investigativo se utilizaron semillas botánicas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, ecotipo Columbia 0.

Las semillas y la mezcla de oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas (OP), fueron obtenidas y cedidas gentilmente por el Dr. Juan Carlos Cabrera Pino (Unité de Biotechnologie, Bélgica). El Dr. Cabrera es responsable de la purificación y caracterización estructural de las oligosacarinas utilizadas en este trabajo, por lo que la divulgación de la composición química o la formulación de las mismas están restringida hasta que no se patenten.

3.1 Comparación de las diferencias morfológicas de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacarinas en condiciones de estrés salino mediante la caracterización de las raíces y peso fresco de las plantas.

Las semillas se desinfectaron bajo condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar horizontal (ESCO ACB-4A2), para lo cual las mismas se colocaron en un microtubo de 1,5 mL y se les adicionó una solución de cloro y agua destilada (1:10). Estas se mezclaron vigorosamente mediante vórtex (CORNING 6775) y se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente se retiró ésta solución y se agregó otra que contenía etanol, agua destilada y cloro (7:2:1), repitiendo la mezcla y reposo antes descrita. Finalmente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril de 5 minutos cada uno.

Las semillas desinfectadas fueron posteriormente sembradas en medio sólido Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), con o sin oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas o sometidas o no a estrés salino, dependiendo del tratamiento. Los tratamientos que se utilizaron en este estudio fueron los siguientes:

1. Medio MS
2. Medio MS con 100 mM de cloruro de sodio (NaCl)
3. Medio MS con 1 mg.L⁻¹ de OP
4. Medio MS con 1 mg.L⁻¹ de OP y 100 mM de NaCl

Los medios de cada uno de los tratamientos se prepararon, se esterilizaron a 120 °C por 5 minutos y posteriormente se dispensaron aproximadamente 20 mL en 8 placas Petri cuadradas (120 mm x 120 mm) por tratamiento. Una vez solidificado el medio, se sembraron 6 semillas por placa, donde las mismas se colocaron de forma alineada en un extremo y separadas por aproximadamente 1 cm. Las cajas fueron selladas con cinta Parafilm y se mantuvieron a 4 °C durante 72 horas y a la oscuridad para permitir la imbibición y germinación de las mismas (Dubrovsky, Soukup, Napsucialy-Mendivil, Jeknić, y Ivanchenko, 2009). Finalizado este tiempo, las placas se colocaron en una incubadora de plantas (Thermo Scientific), bajo condiciones controladas de luz oscuridad 16 – 8 horas a 23 °C, 50 % de humedad relativa y en soportes que permitieron que las semillas quedaran dispuestas de forma vertical para de esta manera garantizar su crecimiento óptimo y permitir una mejor medición de las mismas (Dubrovsky *et al.*, 2009).

Transcurridos 15 días, se tomaron 4 cajas por tratamiento para la determinación del porcentaje de germinación y el análisis de la morfología de las raíces por planta.

Primero se calculó por cada tratamiento el porcentaje de germinación, tomando como criterio de selección la formación de una planta completa y descartando aquellas donde se rompió la testa o solo se formó una raíz.

Para la evaluación del desarrollo y morfología de las raíces, las plantas fueron previamente fijadas en la misma caja Petri con una solución de etanol: ácido acético glacial (3:1) y se conservaron a 4 °C durante 72 horas. Posteriormente,

cada planta se observó mediante microscopía para la determinación del número de raíces secundarias, laterales y primordios, con el uso de un microscopio óptico (Olympus, Modelo CX31-RTSF). Después, las plantas se colocaron en un portaobjeto para realizar la medición de la raíz primaria, a través de la toma de fotografías y procesamiento de las imágenes. Para ello se utilizó un estereomicroscopio (Olympus, Modelo SZ2-ILTS) acoplado a una cámara Infinity Analyze y las raíces primarias se midieron utilizando el software Infinity Analyze 3 (Lumenera). La calibración se realizó según las instrucciones del fabricante de acuerdo a la magnificación usada y las medidas se expresaron en mm.

Mediante los datos obtenidos se calculó la densidad radicular (ver ecuación 1).

$$DR = \frac{RL+P}{LRP}$$

Ecuación 1: fórmula utilizada para calcular la densidad radicular, tomada de Dubrosky (2006). Donde RL corresponde al número de raíces laterales, P es el número de primordios y LRP es la longitud de la

Para la comparación y procesamiento estadístico del efecto de las oligosacarinas derivadas de plantas y el estrés salino aplicado, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, utilizando un modelo de efectos fijos. Posteriormente, se verificó la homogeneidad y normalidad de varianzas mediante la prueba Shapiro Wilk y en las réplicas donde se cumplieron las premisas se realizó una comparación múltiple de medias mediante la prueba Tukey – Kramer. Mientras que, en las réplicas que no cumplieron al menos una de las premisas, se realizó un ANOVA de clasificación simple por rangos de Kruskal Wallis y pruebas de Dunn. Todos los análisis se realizaron con el uso del paquete estadístico STATISTICA (StatSoft Inc, 2007).

Finalmente, se tomaron las restantes 4 placas a los 21 días para la determinación del peso fresco. Como muestra por tratamiento se tomaron las 6 plantas de cada placa, los cuales se pesaron y la medida se expresó en

gramos. Estos datos igualmente fueron procesados y analizados mediante un ANOVA de clasificación doble por rangos de Friedman, con el uso del mismo paquete estadístico.

3.2 Determinación de la expresión relativa de los genes *Catalasa (Cat)* y *Manganeso superóxido dismutasa 1 (MnSOD)* de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacarinas en condiciones de estrés salino mediante PCR en tiempo real.

Para la evaluación de la expresión génica el experimento se desarrolló en medios de cultivos líquidos. Las semillas se desinfectaron utilizando el protocolo indicado en el acápite 3.1 y se mantuvieron inmersas en agua destilada durante 72 horas a 4° C hasta la siembra. Seguidamente, se prepararon 100 mL de medio MS sin suplementar en frascos Erlenmeyer de 300 mL, en donde se sembraron las semillas previamente desinfectadas. Los frascos se colocaron en una incubadora bajo las mismas condiciones controladas previamente descritas de luz oscuridad (16/8 horas, respectivamente), a 23 °C, 50 % de humedad relativa y en un agitador orbital (Thermo Scientific) a 200 rpm, durante 15 días.

Pasado este tiempo se procedió a realizar una aclimatación con nuevo medio de cultivo y posterior cambio a los tratamientos para inducir variaciones genéticas o metabólicas en las plantas. Para la aclimatación se eliminó el medio viejo y se reemplazó por medio MS fresco y las plantas se mantuvieron a las mismas condiciones durante 24 horas. Pasado ese tiempo se tomó muestras de hojas de plantas como tiempo 0 (T_0), las que sirvieron de control negativo para los análisis de PCR en tiempo real. Las mismas fueron colectadas en el flujo laminar horizontal, inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C hasta su utilización.

A continuación se adicionaron a los medios de cultivo los diversos tratamientos de las distintas condiciones de estrés salino y de oligosacarinas derivadas de plantas dependiendo del tratamiento. Solo en caso de medio MS como control no se modificó el mismo. Para cada tratamiento se colocaron dos frascos de cultivo, uno por cada tiempo a coleccionar, de forma tal que no se generara estrés en las plantas durante la toma de muestras.

Se tomaron muestras de hojas de cada tratamiento a las 24 y 72 horas después de la inducción, igualmente en el flujo laminar horizontal, siguiendo el proceso de congelación y almacenamiento previamente indicado. El experimento se realizó por duplicado en momentos distintos, donde se mantuvieron las mismas condiciones utilizadas.

Cada muestra se pesó y se tomó aproximadamente 100 mg para la extracción de RNA totales, utilizando el juego de reactivos *PureLink RNA mini* (Ambion), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Posteriormente, el RNA total extraído se trató con DNase I RNase free (Ambion) para eliminar el DNA residual. Para determinar la calidad del RNA se realizó una electroforesis en gel del agarosa al 1 %, durante 30 minutos y 100 voltios (Sambrook y Russel, 2001). Finalmente, se cuantificó el RNA mediante espectrofotometría con el uso del equipo FLUOstar Omega (BMG Labtech) y barrido a 230, 260, 280 y 340 nm. La calidad del RNA se estimó en base a la relación 280/260 proporcionada por el equipo.

Para proceder con la PCR en tiempo real, primeramente todas las muestras se diluyeron a la misma concentración de $300 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ en todas las preparaciones. Con el propósito de realizar una cuantificación relativa y descartar que las diferencias obtenidas en los tratamientos sean debido al uso de concentraciones diferentes.

Los cebadores utilizados en este trabajo fueron diseñados en base a las secuencias informadas para los dos genes de interés en la base de datos TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, <https://www.arabidopsis.org/>) (ver anexo 1). Para el diseño se empleó el programa primer 3, disponible de manera libre *on line* (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) y posteriormente se calcularon los parámetros óptimos de los cebadores como temperatura de fusión (T_m), presencia de secuencias complementarias, lazos internos, contenido en G/C y trectos de polipirimidinas (T,C) o polipurinas (A,G) y secuencia 3' terminal con el uso del programa OligoAnalyzer 3.1 disponible *on line* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). La información de los cebadores utilizados se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Cebadores específicos diseñados para la amplificación los genes que codifican para las enzimas *catalasa* y *manganeso superóxido dismutasa*

No. Accesoión TAIR (https://www.arabidopsis.org/)	Gen de interés	Secuencia (5'-3')	Longitud del fragmento
AT1G20620	Catalasa 3	D: GATCATGGGCACCAGACAGG R: CGGCTTGCAAGTTTCTGTCC	148 pb
ATMSD1	Arabidopsis Manganeso superóxido dismutasa 1	D: GATGTTTGGGAGCACGCCTAC R: CCTCGCTTGCATATTTCCAGTTG	100 pb

Nota: D- Directo y R-Reverso; pb-pares de bases

La síntesis de DNA complementario (cDNA) y posterior amplificación de los genes de interés se realizó en un solo paso utilizando el juego de reactivos *SuperScript III One-Step RT-PCR System Polymerase* (Life Technology). Cada reacción se realizó en base al protocolo adjunto. Para cada reacción se prepararon 25 µL, misma que contenía 1 µL del RNA de interés (300 – 400 ng.µL⁻¹), 12, 5 µL de 2x SYBR® Green, 0,5 µL de cada cebador para alcanzar una concentración final de 0,2 µM, 1 U de la enzima *SuperScript® III RT/Platinum® Taq* polimerasa y agua PCR hasta completar el volumen indicado. La amplificación se realizó en el equipo CFX96 *Real-time PCR System* (Bio-Rad), siguiendo el protocolo que se indica a continuación:

1. 50 °C durante 3 minutos
 2. 95 °C durante 5 minutos
 3. 95 °C durante 15 segundos
 4. 60 °C durante 45 segundos
 5. 40 °C durante 1 minuto
- } Repetir 39 veces

Se realizó también la curva de temperatura de fusión iniciando a 65 °C hasta 95 °C con un incremento 0,5 °C cada 10 segundos.

Cada muestra se analizó por triplicado dentro de la misma placa de PCR. El análisis de transcritos se estimó en base al promedio de los valores expresado en ciclo de cuantificación (Cq). Este valor fue provisto por el equipo en base a un límite simple y el método de base autocalculado y predeterminado para el SYBR utilizado.

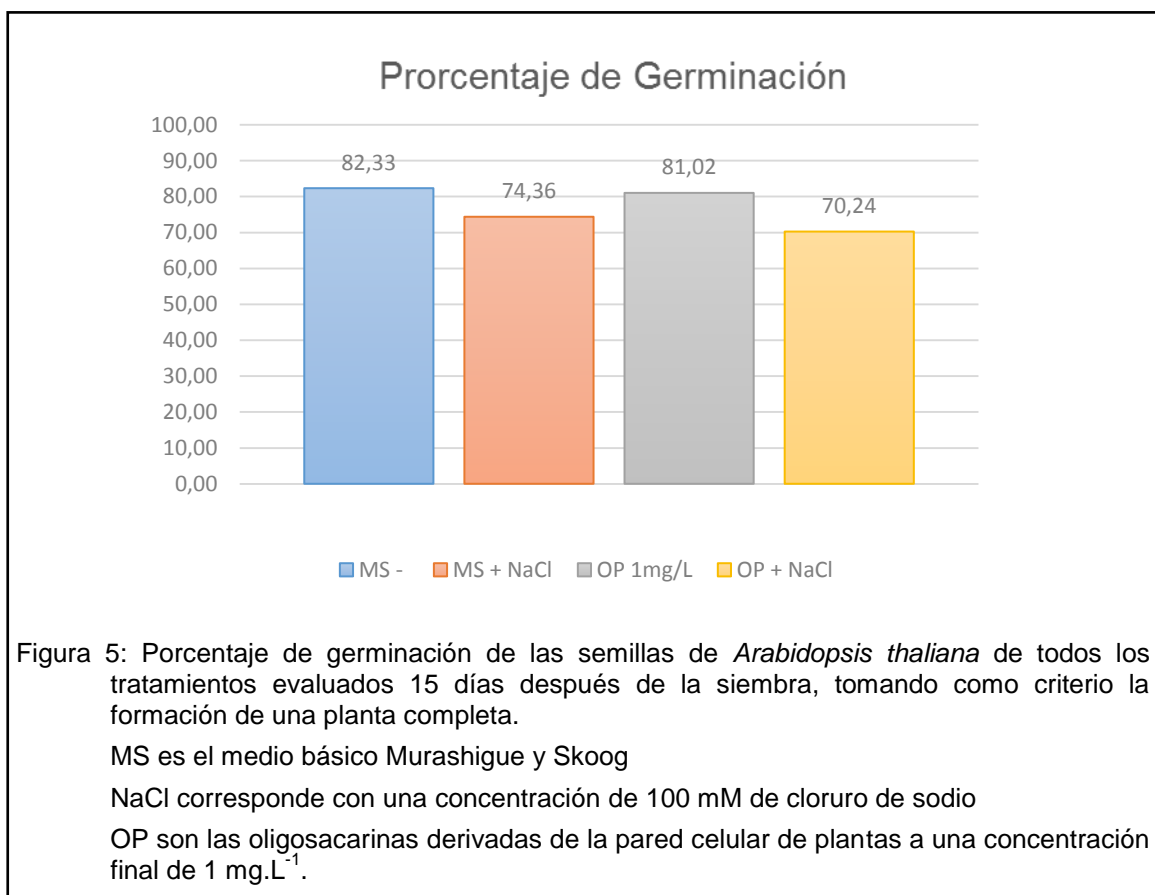
Para la cuantificación relativa de los genes diana a las 24 y 72 horas se realizó en base a la concentración de RNA comparándola con el tiempo 0. Por lo tanto, la expresión se determinó como un aumento o una disminución respecto al control (BioRad, 2006). Los resultados fueron analizados con el programa adjunto al equipo (*CFX Software Manager*), además de la expresión relativa, también se determinó la desviación estándar de los valores Cq y la eficiencia de la reacción.

4. RESULTADOS

4.1 Evaluación morfológica de las plantas

4.1.1 Morfología de las raíces

Al evaluar el porcentaje de germinación de las semillas en los diferentes tratamientos se observó que en todos los casos los valores fueron superiores al 70 %, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Como se puede apreciar en la figura 5, cuando se crecieron las semillas en MS solo (control negativo) y MS en presencia de oligosacarinas derivadas de plantas (OP) la respuesta en éste parámetro fue muy similar, con valores cercanos al 80 %. Sin embargo, cuando se crecieron en presencia MS más 100 mM de cloruro de sodio (NaCl) y MS con OP más 100 mM de NaCl los porcentajes mostraron una disminución, ya que se mantuvieron cerca del 70 %, siendo el menor valor registrado el del medio con OP y sal.



Los resultados obtenidos del análisis de la morfología de las raíces por planta en todos los tratamientos se detallan en la tabla 2. Los análisis estadísticos mostraron que hay dos grupos que se distinguen claramente para todas las variables medidas, con diferencias significativas para $p < 0.05$. El primero se compone del MS solo (control negativo) y el MS en presencia de OP con letras iguales (a) y un segundo grupo que son el MS más 100 mM de cloruro de sodio (NaCl) y MS con OP más 100 mM de NaCl (letra b). Es decir hay una clara diferenciación entre plantas crecidas con o sin estrés salino, pero no hay una diferencia que se atribuya a la presencia de los OP.

Tabla 2: Valores medios \pm la desviación estándar de las variables evaluadas de la morfología de las raíces por planta a los 15 días después de la siembra; en presencia de oligosacarinas derivadas de plantas (OP), de estrés salino (100 mM de NaCl) y con el medio control (MS). Se muestran los resultados de la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer y Dunn. Letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0.05$.

Tratamiento	Longitud de la raíz primaria (mm)	N° raíces secundarias	N° raíces laterales	N° primordios	Densidad Radicular
MS	20,84 \pm 6,46a	0,882 \pm 0,43a	4,981 \pm 1,98a	4,54 \pm 2,75a	0,74 \pm 0,62a
MS + NaCl	7,61 \pm 3,63b	0,272 \pm 0,26b	0,744 \pm 0,39b	0,851 \pm 0,40b	0,29 \pm 0,18b
MS + OP	19,43 \pm 7,10a	0,773 \pm 0,59a	4,859 \pm 2,87a	3,477 \pm 2,97a	0,66 \pm 0,65a
MS + OP + NaCl	7,64 \pm 5,24b	0,354 \pm 0,29b	0,545 \pm 0,37b	0,958 \pm 1,08b	0,29 \pm 0,25b

Si se analizan los resultados en detalle tenemos en primer lugar, que el efecto de las OP con respecto al control no tratado mostró un comportamiento muy similar. Sin embargo, cuando se evaluó el bioproducto en presencia de estrés salino se pudo apreciar que, aunque no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas, por lo tanto, se sugiere que los OP sí mejoraron la respuesta de las plantas respecto al control de estrés, ya que se incrementó la longitud de la raíz primaria, el número de raíces secundarias y los primordios. Específicamente, la mayor diferencia se presentó en el número de raíces secundarias, donde las plantas crecidas con OP y sal fueron 1,30 veces mayor que aquellas crecidas solo en presencia de sal (Tabla 2 y Figura 6).

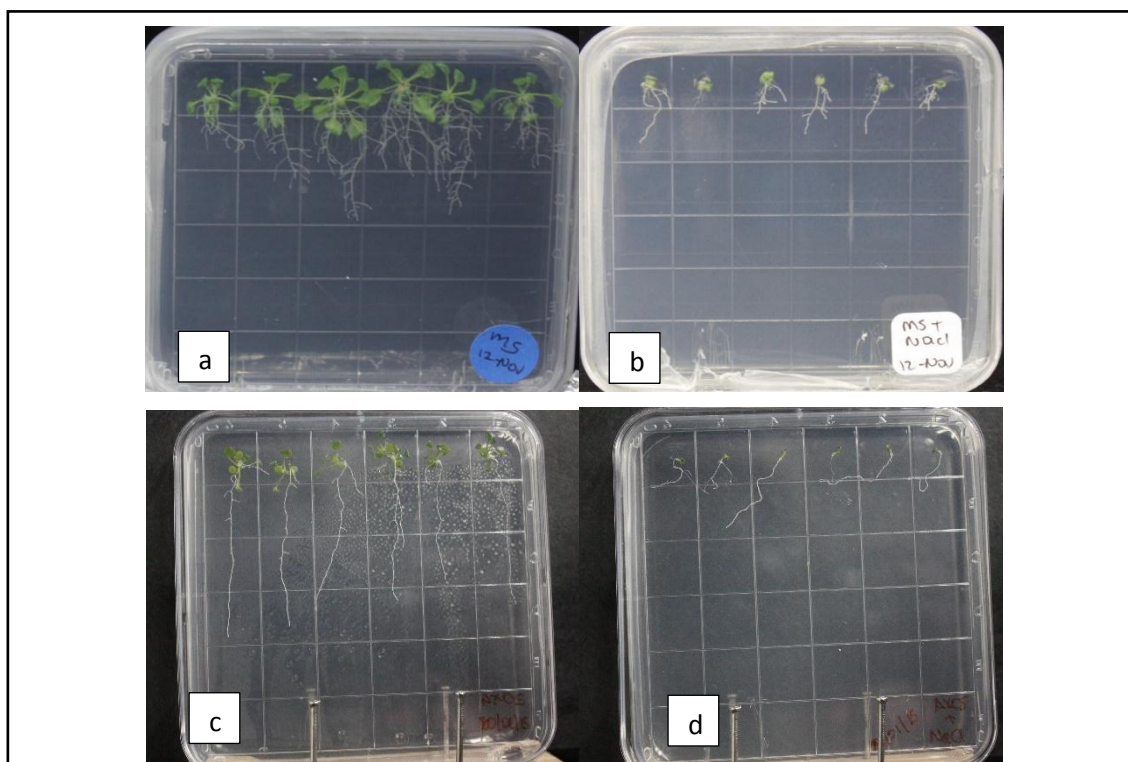


Figura 6: Plantas de *Arabidopsis thaliana* de los diferentes tratamientos, crecidas en placas a los 15 días después de la siembra.

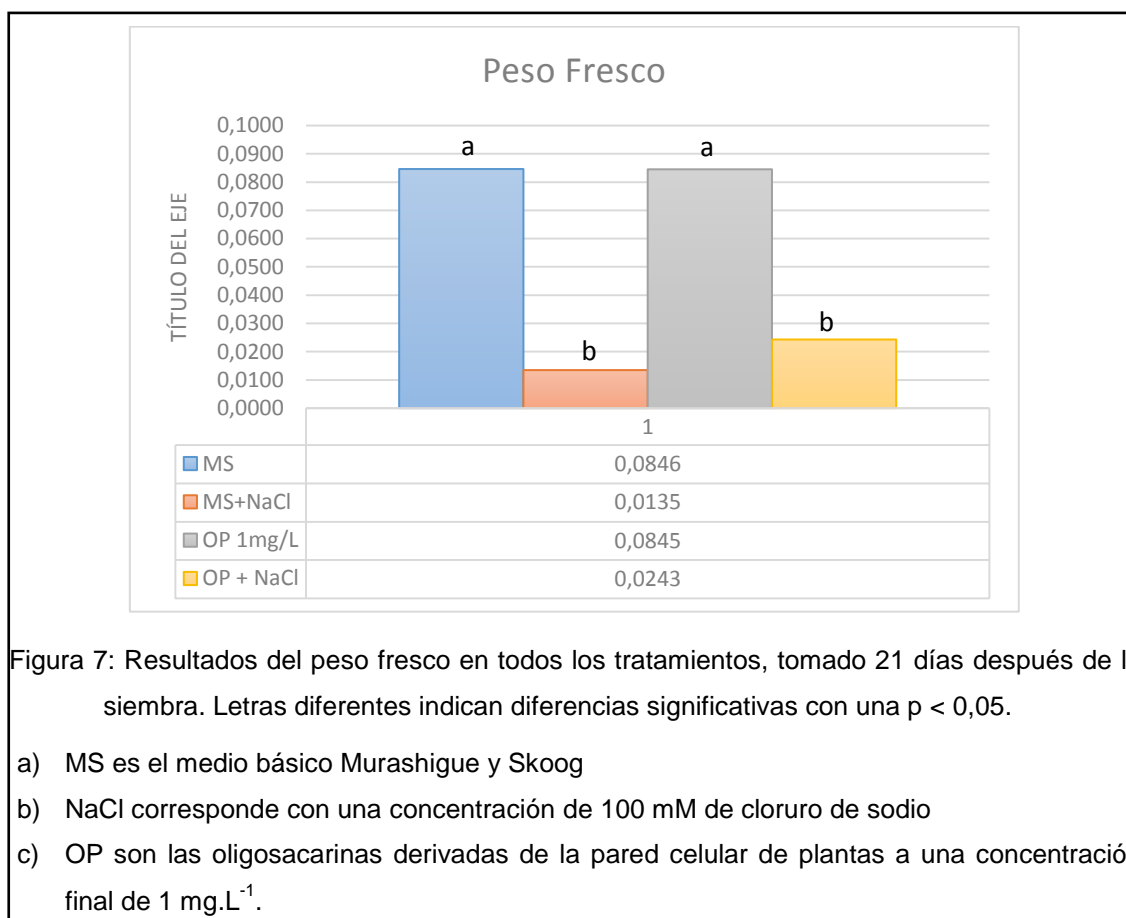
- | | |
|-------------------|---|
| a) MS | MS es el medio básico Murashigue y Skoog, |
| b) MS + NaCl | NaCl corresponde con una concentración de |
| c) MS + OP y | 100 mM de cloruro de sodio y OP son las |
| d) MS + OP + NaCl | |

Finalmente, en el análisis de la densidad radicular se encontró que las plantas crecidas en el MS control negativo mostraron el mejor resultado, ya que tuvieron valores 0,12 mayores que los encontrados en las plantas crecidas en presencia de OP. Mientras que, en los tratamientos con cloruro de sodio, con y

sin bioproducto, la media de éste parámetro fue la misma, aunque hubo mayor variabilidad entre los resultados obtenidos con OP (Tabla 2).

4.1.2 Peso fresco de las plantas

Los resultados obtenidos para el peso fresco de las plantas de 21 días de edad se detallan en la figura 7. El comportamiento observado fue similar a lo descrito previamente para el análisis de la morfología de raíz de las plantas, ya que de igual manera se discriminaron dos grupos diferentes estadísticamente, que fueron el MS y MS más los OP (letra a) de los tratamientos MS más NaCl y con los OP y NaCl (letra b). No obstante, en presencia de NaCl, la adición de los OP mejoró la respuesta a estrés, pues el peso fresco promedio fue aproximadamente el doble que cuando las plantas fueron crecidas en ausencia del bioproducto.



4.2 Evaluación de la expresión relativa de los genes *Cat* y *MnSOD*

Para el análisis del RNA extraído y tratado se designó como parámetro de calidad en la electroforesis del gel de agarosa al 1 % la visualización de al menos dos bandas claras correspondientes a las subunidades 28 y 18S del RNA ribosomal, además de la ausencia de degradación visible (*smear*) u otras bandas correspondientes con residuos de DNA. En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos y se puede apreciar que las extracciones de RNA total realizadas tuvieron una calidad óptima para ensayos posteriores de PCR en tiempo real.

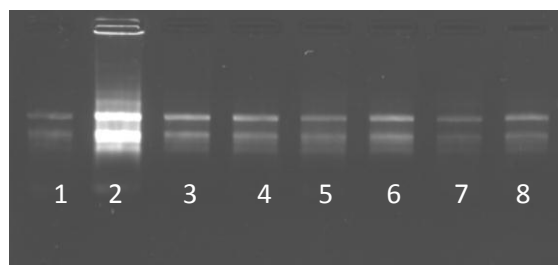


Figura 8: Resultados de la corrida de los RNA totales extraídos de las hojas de plantas de cada tratamiento, corridos en un gel de agarosa al 1%.

1) MS 24 h

5) MS + OP 24 h

2) MS 72 h

6) MS + OP 72 h

3) MS + NaCl 24 h

7) MS + OP + NaCl 24 h

4) MS + NaCl 72 h

8) MS + OP + NaCl 72 h.

MS es el medio básico Murashigue y Skoog, NaCl corresponde con una concentración de 100 mM de cloruro de sodio y OP son las oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas a una concentración final de 1 mg.L⁻¹.

Posteriormente, en base a la cuantificación por espectrofotometría, se seleccionaron los RNA en los que el valor de la relación 260/280 oscilaba entre 1.8 y 2.1, los cuales son los parámetros adecuados para determinar que un RNA se encuentra puro o con bajas cantidades de elementos contaminantes como polisacáridos, polifenoles o proteínas (Sambrook y Russel, 2001).

Por otra parte, la calidad y especificidad de los cebadores diseñados se evaluó en base a la curva de temperatura de fusión evaluada. En todos los casos se observaron dos picos claramente distinguibles, los cuales se correspondieron a cada uno de los cebadores utilizados. Para el gen *MnSOD* la curva se apreció entre los 75 y 80 °C, mientras que para el gen *CAT* estuvo entre los 80 y 85 °C (Figura 9). En ningún caso se apreciaron picos en los controles, por lo tanto no existió contaminación, ni la formación de dímeros entre cebadores. Finalmente, se determinó que la eficiencia de la reacción en ambos genes fue del 100 %, por lo tanto en todas las reacciones analizadas hubo amplificación adecuada y óptima.

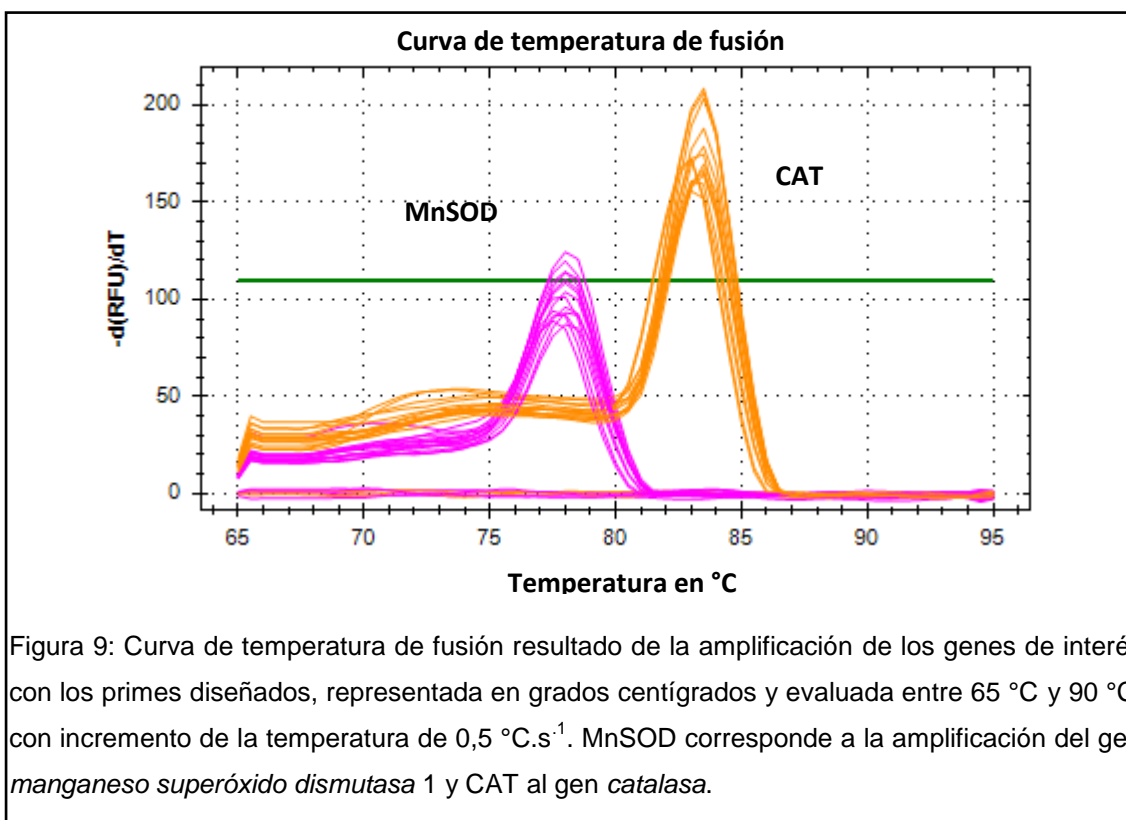


Figura 9: Curva de temperatura de fusión resultado de la amplificación de los genes de interés con los primers diseñados, representada en grados centígrados y evaluada entre 65 °C y 90 °C, con incremento de la temperatura de 0,5 °C.s⁻¹. MnSOD corresponde a la amplificación del gen *manganeso superóxido dismutasa 1* y CAT al gen *catalasa*.

La evaluación de la expresión relativa de los genes se realizó a partir de dos réplicas biológicas, sembradas en diferentes momentos bajo las mismas condiciones, y de cada uno se hicieron repeticiones. Por lo tanto, los resultados para cada uno de los genes se procesaron mediante un análisis simultáneo de la expresión relativa de los genes en base al cálculo de la media y desviación estándar total para cada tratamiento. El valor de referencia para estimar la

expresión relativa de los genes fue 1, correspondiente con el T_0 antes de la inducción.

4.2.2 Expresión del gen *Cat*

Los resultados de la evaluación de la expresión relativa del gen *catalasa* se muestran en la tabla 3. Al analizar las muestras de 24 horas se observó que su expresión tendió a disminuir, a excepción de las muestras crecidas en MS con presencia de los OP, pues en este tratamiento se evidenció un ligero aumento de 0.029. Por otro lado, al analizarse las muestras de 72 horas se evidenció que la presencia de los OP influyó en la expresión del gen, pues se apreció un aumento con respecto al tiempo 0, mientras que en ausencia de las mismas la expresión se mantuvo por debajo del control.

Tabla 3: Resultados de la expresión relativa del gen *catalasa* (CAT).

Tratamiento	Tiempo	Expresión relativa	Cq	Cq SEM
Control T_0	Antes de inducir	1,000	20,885	1,339
MS	24 horas posteriores a la inducción	0,691	21,419	0,525
MS + NaCl		0,631	21,549	1,167
MS + OP		1,029	20,844	0,987
MS + OP + NaCl		0,274	22,751	1,651
MS	72 horas posteriores a la inducción	0,898	21,041	0,285
MS + NaCl		0,969	20,930	0,523
MS + OP		2,781	19,410	0,352
MS + OP + NaCl		1,574	20,231	0,661

Nota: T_0 corresponde con el tiempo 0, MS es el medio básico Murashigue y Skoog, NaCl corresponde con una concentración de 100 mM de cloruro de sodio y OP son las oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas a una concentración final de 1 mg.L⁻¹, Cq es el ciclo de cuantificación y CqSEM la varianza del valor Cq.

Al comparar cada muestra a los tiempos evaluados se encontró, en todos los casos, que a las 72 horas el gen tuvo mayor expresión respecto a las 24 horas. En las muestras crecidas en MS y MS más NaCl el aumento fue de 0.207 y

0.338, respectivamente. Mientras que en las muestras de MS más los OP el aumento fue de 1.752 y para MS con los OP más NaCl fue de 1.3. Dichas variaciones corresponden con un aumento de la expresión en 2.7 y 5.8 veces respecto a las 24 h, respectivamente (figura 10).

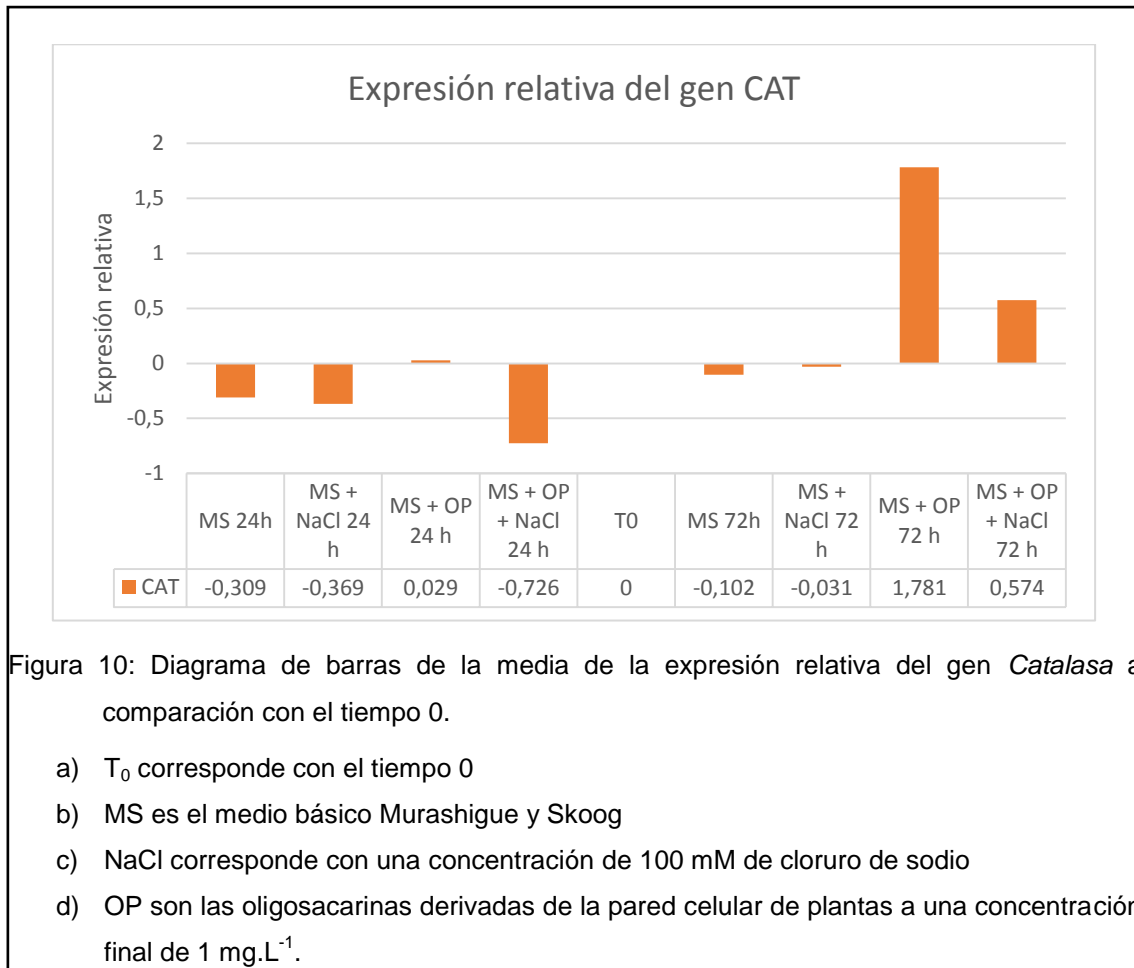


Figura 10: Diagrama de barras de la media de la expresión relativa del gen *Catalasa* a comparación con el tiempo 0.

- a) T₀ corresponde con el tiempo 0
- b) MS es el medio básico Murashigue y Skoog
- c) NaCl corresponde con una concentración de 100 mM de cloruro de sodio
- d) OP son las oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas a una concentración final de 1 mg.L⁻¹.

4.2.3 Expresión del gen *MnSOD*

Los resultados de la expresión relativa del gen *manganeso superóxido dismutasa 1* se muestran en la tabla 4 y la figura 11. Al analizarse las muestras a las 24 horas es posible determinar que, al igual que el gen *catalasa*, la tendencia inicial fue la represión del gen, a excepción de las muestras crecidas en MS más los OP que mostraron un ligero aumento de la expresión de 0.357.

A las 72 horas se apreció una disminución en la expresión del gen en los tratamientos MS y MS más los OP, siendo este último 2.72 veces menor que a las 24 horas. Sin embargo, a este tiempo pero en presencia de estrés salino, se observó un aumento en la expresión del gen, que fue mayor en presencia del bioproducto. Este aumento se correspondió con el doble de la expresión inicial observada a las 24 h, ya que tuvo un valor de 1,399.

Tabla 4: Resultados de la expresión relativa del gen *Manganeso superóxido dismutasa* (MnSOD).

Tratamiento	Tiempo	Expresión relativa	Cq	Cq SEM
Control T ₀	Antes de inducir	1,000	30,596	0,147
MS	24 horas posteriores a la inducción	0,932	30,697	0,262
MS + NaCl		0,758	30,995	0,298
MS + OP		1,357	30,156	0,264
MS + OP + NaCl		0,694	31,124	0,231
MS		72 horas posteriores a la inducción	0,816	30,889
MS + NaCl	0,920		30,716	0,075
MS + OP	0,499		31,598	0,189
MS + OP + NaCl	1,399		30,112	0,375

Nota: 0Hr corresponde con el tiempo 0, MS es el medio básico Murashigue y Skoog, NaCl corresponde con una concentración de 100 mM de cloruro de sodio y OP son las oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas a una concentración final de 1 mg.L⁻¹, Cq es el ciclo de cuantificación y CqSEM la varianza del valor Cq

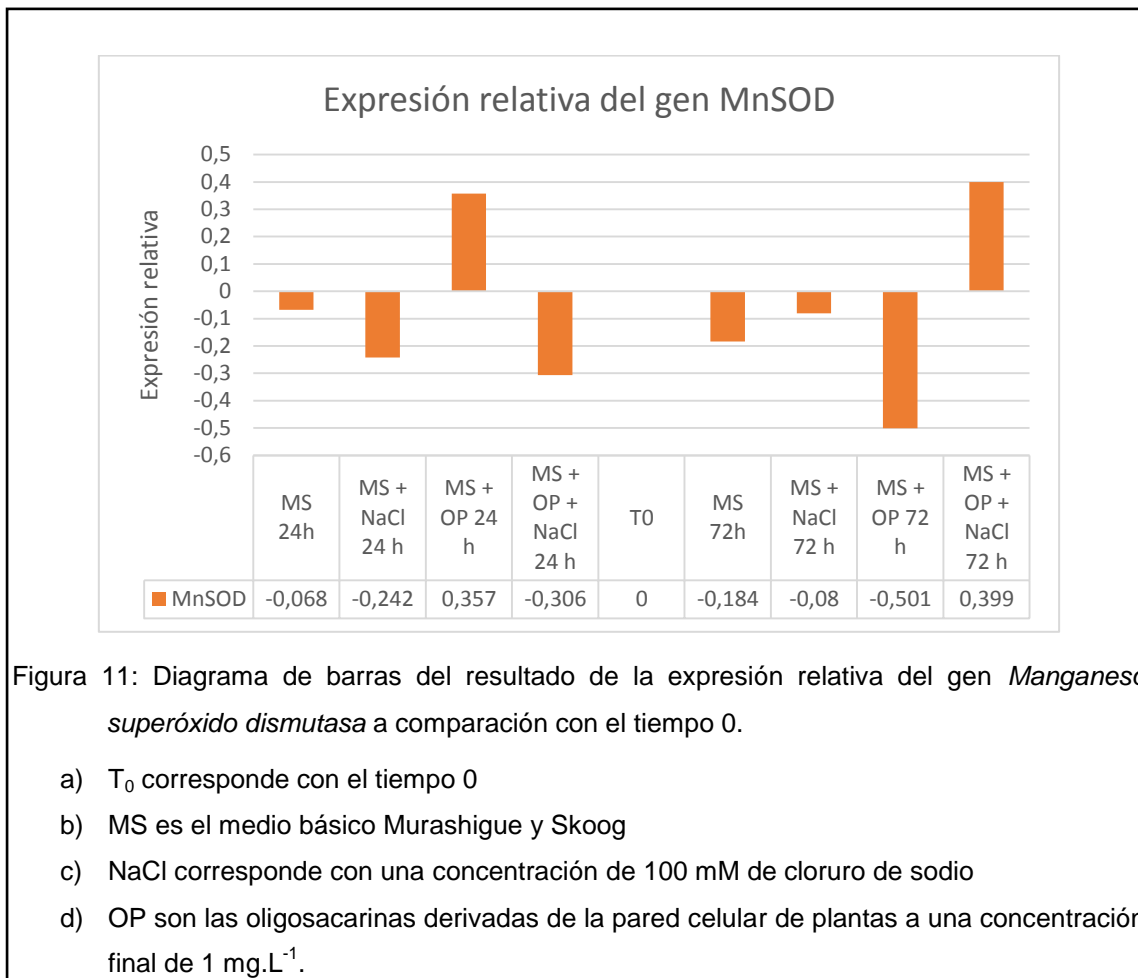


Figura 11: Diagrama de barras del resultado de la expresión relativa del gen *Manganese superóxido dismutasa* a comparación con el tiempo 0.

- a) T_0 corresponde con el tiempo 0
- b) MS es el medio básico Murashigue y Skoog
- c) NaCl corresponde con una concentración de 100 mM de cloruro de sodio
- d) OP son las oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas a una concentración final de 1 mg.L^{-1} .

5. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto de oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas (OP) sobre plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas *in vitro*, a una concentración final de 1 mg.L⁻¹ con y sin presencia de estrés salino. Para todos los tratamientos las plantas fueron sembradas y crecidas bajo las mismas condiciones controladas con la finalidad de descartar la influencia de factores climáticos externos en la respuesta genotípica y fenotípica (Bradbeer, 1988, p.3). Todas las semillas utilizadas en esta investigación fueron cosechadas al mismo tiempo y se mantuvieron a 4 °C y en oscuridad hasta su siembra para evitar que los resultados se vieran afectados por componentes externos a la aplicación del bioestimulante de interés.

En la literatura consultada hasta la fecha, no hay información suficiente del uso de oligosacáridos derivados de plantas como bioestimulantes, por lo que resulta difícil contrastar la información disponible con las pruebas morfológicas realizadas. Esto es debido a que las mezclas evaluadas en este estudio son totalmente nuevas y contienen componentes de la pared celular que no habían sido validados como oligosacarinas (mezcla pendiente de patente y resultados no publicados). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio constituyen los primeros aportes para dilucidar el efecto y el mecanismo de acción de las mismas.

De manera general los datos obtenidos respecto al porcentaje de germinación indicaron que la adición de oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas (OP), tanto en ausencia como en presencia de estrés salino, no influenció positivamente a la salida de la planta de la semilla, es decir la reanudación del crecimiento embrionario a partir de un estado de reposo (Figura 5). Esto es debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos analizados. No obstante, en todos los casos se mantuvo por encima del 70 %, lo cual es adecuado si tenemos en cuenta que la tasa de germinación de los genotipos salvajes de

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh se encuentran en el rango de 60 – 70 % (Shinomura, Nagatani, Chory, y Furuya, 1994).

Se conoce además, que la inducción de la germinación de semillas de *A. thaliana* o la transición de una semilla de un estado de dormancia a la germinación, está controlada por estímulos internos y externos, tanto físicos como químicos (Shinomura *et al.*, 1994). Los factores externos incluyen la calidad de la luz, la humedad, la exposición transitoria al frío y los tratamientos químicos como la aplicación de hormonas; mientras que los internos son los reguladores de crecimiento como el ácido giberélico (GA) y el ácido abscísico (ABA). Así mismo se ha descrito que diferentes tipos de estrés abiótico, entre ellos el salino, inhiben o retrasan el desarrollo y crecimiento de las plantas y, en el caso de la germinación, las plantas han desarrollado mecanismos para arrestar este proceso y retomarlo una vez que las condiciones sean favorables (Daszkowska-Golec, 2011). Para minimizar o mejorar la germinación de las semillas y su respuesta a los factores ambientales se han usado diferentes compuestos, entre ellos los bioestimulantes como sustitutos de fitohormonas (Darvill *et al.*, 1992).

En este sentido, otros autores han estudiado el efecto de diferentes formulaciones de bioestimulantes sobre este parámetro y encontraron resultados positivos. Por ejemplo, la aplicación en el suelo de varias especies de rizobacterias en concentración de 10^8 - 10^{11} CFU.mL⁻¹ inducen una germinación temprana en condiciones de estrés salino en *Arabidopsis thaliana* (Ruzzi y Aroca, 2015, p. 5-6). Igualmente se han probado derivados de algas y ácidos húmicos directamente sobre la semilla y en el suelo a 80-120 mg.pot⁻¹ en otras especies vegetales como brócoli (*Brassica oleracea italica*), tomate (*Solanum lycopersicum*), entre otros, encontrándose un aumento del porcentaje de germinación de hasta un 50 % (Martínez Villavicencio *et al.*, 2011, p.159; Ouni, Ghnaya, Montemurro, Abdelly, y Lakhdar, 2014, p. 363; Ruzzi y Aroca, 2015, p. 6). Sin embargo, en otros estudios se utilizaron oligosacáridos derivados de la pared celular de plantas a partir xiloglucanos a concentraciones

de 0,1 mg.L⁻¹ y derivados de pectina a 10 mg.L⁻¹ en cultivos *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*. En ninguno de los casos se observó un efecto positivo de las oligosacarinas sobre el porcentaje de germinación, en comparación al control no tratado, a pesar de que si influyeron positivamente sobre otros parámetros del crecimiento de las plantas (González-Pérez et al., 2012, p. 214-215).

Por lo tanto, de los resultados derivados de nuestro trabajo para este parámetro podemos concluir que la adición en el medio de cultivo de las oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas, a la concentración analizada, no estimuló la germinación de las semillas de *A. thaliana*. Estos están en correspondencia con lo informado anteriormente por otros autores, ya que el modo de acción de estos compuestos depende de la oligosacarina, su composición, la concentración de trabajo y la especie de planta analizada por lo que cada mezcla debe ser evaluada biológicamente para demostrar sus efectos (Calvo, Nelson, y Kloepper, 2014).

Del mismo modo, en cuanto a los resultados de morfología de las raíces tomados en las plantas de 15 días después de la siembra se encontró que en la longitud de la raíz primaria, el número de raíces secundarias, laterales, primordios y la densidad radicular no hubo diferencia significativa, en presencia o ausencia de las OP a la concentración de 1 mg.L⁻¹, con y sin estrés salino. Es decir, la adición de las OP no mejoró la respuesta de la planta en cuanto al desarrollo de raíces ya que su morfología no varió con respecto a cada control evaluado. Así mismo, en cuanto al peso fresco de las plantas de 21 días de crecidas, no se encontraron diferencias significativas estadísticamente con la adición del bioproducto, a pesar que la adición de OP en el medio salino sí llegó a duplicar el valor obtenido en las plantas sin tratamiento.

Como se mencionó anteriormente el tipo de oligosacarinas evaluadas en este estudio no ha sido probada con anterioridad como bioestimulantes de plantas. Sin embargo, otros derivados de la pared celular de plantas si han demostrado

influir de manera directa en el desarrollo de la planta, como por ejemplo los oligosacáridos de xiloglucanos y derivados de la pectina (Enríquez-Guevara et al., 2010, p. 145; Vissenberg, Martínez-Vilchez, Verbelen, Miller, y Fry, 2000, p.1).

Una de las características que distinguen a las oligosacarinas es que tienen efecto biológico a bajas concentraciones, las cuales van desde los $0.1-10 \text{ mg.L}^{-1}$. Las causas para la acción a bajas concentraciones de las oligosacarinas derivadas de plantas pueden ser variadas, desde el alto peso molecular de estas moléculas y las dificultades que encuentran en la pared celular (entramado complejo) para llegar hasta la superficie de la membrana, una menor afinidad de las moléculas sintéticas por el receptor, hasta un problema difusional y por tanto, de encuentro e interacción sustrato – receptor. Se ha descrito que altas concentraciones de la oligosacarina podrían provocar que las mismas formen dímeros concatenados que eviten la interacción o reconocimiento adecuado del receptor (Cabrera, Boland, Messiaen, Cambier, y Van Cutsem, 2008, p. 478-479). Se han encontrado dos tipos de receptores en la membrana plasmática de la pared celular de plantas, los cuales fueron determinados en suspensiones celulares de *A. thaliana* y probados con oligolacturónidos (OGA, de sus siglas en inglés *oligogalacturonides*). Estos difieren en la forma en que reconocen la molécula, ya sea en un extremo o a lo largo de la misma. Por tanto, se postula que la alteración de la estructura requerida para la interacción de las moléculas con el receptor es otra causa para la disminución o pérdida de la actividad biológica de la oligosacarina, pues no se produce la transducción de la señal al interior de la célula (Cabrera et al., 2008, p. 478). En este trabajo se empleó la concentración de 1 mg.L^{-1} en base a evaluaciones previas realizadas por González (datos no publicados). Sin embargo, estos resultados nos sugieren que la actividad biológica de las OP puede estar a concentraciones más bajas de las usadas.

No obstante, también es necesario mencionar que los resultados presentados pueden variar en pruebas de campo, pues la mayor parte de información

encontrada al respecto ha sido obtenida bajo condiciones *in vitro*. En evaluaciones de campo con otro tipo de bioestimulantes, como ácidos húmicos y flúvicos derivados de materia orgánica, se ha encontrado correspondencia entre los efectos sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos de los estudios *in vitro* y de campo. Además de que han demostrado influenciar de forma directa la estabilidad de agregados, la biodisponibilidad de nutrientes y agua, el pH, entre otras características del suelo, de reducir la concentración de NaCl y su toxicidad mediante la toma del ion sodio (Ouni et al., 2014, p. 365).

En cuanto a la evaluación de la expresión relativa de los genes *catalasa* (*Cat*) y *manganeso súperoxido dismutasa* (*MnSOD*) se evidenció el efecto directo de las oligosacarinas derivadas de plantas, ya que alteró la expresión relativa en ambos genes, en presencia y ausencia de estrés salino a los diferentes tiempos evaluados.

El estudio de la expresión del gen *Cat* genera una idea global de la cantidad de la enzima, codificada por el mismo, en el medio celular. Estudios previos indican que la expresión del gen *Cat* bajo condiciones de estrés salino disminuye, lo cual ha sido probado en cultivos *in vitro* de arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum spp*), coco (*Cocos nucifera*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Shim, Momose, Yamamoto, Kim y Usui, 2003, p.288). Estos autores sometieron las plantas a diferentes tipos de estrés oxidativo, como fueron calor, sal y sequía, y la expresión del gen se evaluó a las 72 horas y 6 días posteriores a la inducción. Ellos indican que estos tipos de estrés provocan el aumento en la concentración peróxido de hidrógeno, quien a su vez induce la formación de 2-hidroxisalícilato que provoca el aumento de ácido salicílico, quien finalmente reduce o disminuye la concentración de la *catalasa*. En nuestro estudio se comprobó que solo en presencia de sal, sin bioestimulantes, la expresión del gen *cat* disminuyó con respecto al control no tratado a los dos tiempos evaluados, lo que coincide con lo informado previamente.

Sin embargo, estos resultados variaron al adicionar las OP en el medio, las que

a las 72 horas incrementaron la expresión del gen, con y sin estrés salino (Figura 10). Algunos estudios han demostrado que la adición de biostimulantes, ejemplo de macroalgas, en condiciones de estrés abiótico genera el aumento de la concentración de enzimas del sistema antioxidante, incluyendo la enzima *catalasa* y pueden proveer una mejor respuesta frente a distintos tipos de estrés (Vasconcelos *et al.*, 2009).

Por su parte, los resultados de la expresión relativa del gen *MnSOD* mostraron que en presencia de estrés salino existió un aumento en la concentración relativa del gen, misma que se vio influenciada de manera positiva en presencia de oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas a las 72 horas (Figura 11). Estudios en arvejas (*Pisum sativum* L.) encontraron que bajo condiciones de salinidad la concentración mRNA codificante para las enzimas *SOD*, incluida la *MnSOD*, inicialmente disminuía, sin embargo, en variedades de alta salinidad se presentó a largo plazo (100 días) el incremento de la enzima *MnSOD*. Ésta respuesta favoreció al desarrollo de las plantas mediante el incremento en la concentración de enzimas antioxidantes y por consiguiente la reducción de ROS en el medio celular (Hernández, Jiménez, Mullineaux, y Sevilla, 2000, p. 855-856).

Adicionalmente, en cultivos transgénicos que sobre-expresan la enzima *manganeso superóxido dismutasa*, se determinó que existió mayor tolerancia a concentraciones elevadas de sal en el suelo (Wang *et al.*, 2010 p. 1121-1123). Estos estudios indican que al potenciarse la respuesta del sistema antioxidante y provocar la sobreexpresión de la enzima *MnSOD* se provee a la planta un mecanismo de defensa frente a condiciones de estrés oxidativo, incluido estrés salino. Así como estimulan un mejor desarrollo y crecimiento de las mismas.

Finalmente, algunos estudios han demostrado que la adición de mezclas de azúcares derivados de la pared celular de plantas, como oligosacáridos, potencia la respuesta del sistema antioxidante frente a condiciones de estrés oxidativo. Esto debido a que se incrementa la concentración de algunas enzimas como la *MnSOD* y se reduce el impacto a la planta de las condiciones

de crecimiento no óptimas o adecuadas (Keunen, Peshev, Vangronsveld, Van Den Ende, y Cuypers, 2013, p.22).

En resumen, los resultados obtenidos de la expresión génica con los genes *catalasa* y *manganeso súperoxido Dismutasa* en presencia de las oligosacarinas derivadas de plantas y estrés salino nos indican que estas moléculas actúan preparando a la planta para una mejor respuesta ante las condiciones de estrés. Por lo tanto, estas constituyen las primeras evidencias de su uso potencial como bioestimulantes de plantas y de sus posibles aplicaciones para mitigar los efectos de la salinidad de los suelos.

6. CONCLUSIONES

La adición de oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas a la concentración de 1 mg.L^{-1} no afectó de manera significativa el porcentaje de germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*, ya sea en presencia o ausencia de estrés salino.

La morfología de las raíces y el peso fresco de plantas de *A. thaliana*, no variaron de forma significativa en presencia de oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas a una concentración de 1 mg.L^{-1} , con y sin estrés salino, aunque en presencia de sal si generaron efectos positivos.

La expresión relativa del gen *catalasa* se incrementó en las plantas de *A. thaliana* crecidas en presencia de oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas a una concentración de 1 mg.L^{-1} , con y sin estrés salino, a las 24 y 72 horas después de la inducción.

La expresión del gen *manganeso superóxido dismutasa 1* se incrementó en las plantas de *A. thaliana* crecidas en presencia de oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas a una concentración de 1 mg.L^{-1} ; lo cual se observó a las 24 horas después solo con la adición de las oligosacarinas y a las 72 horas en presencia de oligosacarinas y estrés salino.

RECOMENDACIONES

Evaluar concentraciones menores, entre 0,01 y 0,1 mg L⁻¹ de las oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas para determinar si existe o no influencia sobre la germinación, el crecimiento de la planta y la morfología de las raíces.

Analizar la expresión relativa de otros genes que están implicados en la respuesta a estrés oxidativo, como la glutatión peroxidasa, *glutación reductasa*, u otras isoformas de la enzima *superóxido dismutasa*.

REFERENCIAS

- Aamlid, T. S., & Hanslin, H. M. (2009). Evaluation of Organic Fertilizers and Biostimulants on Sand-Based Golf Greens and Football Pitches Under Scandinavian Climate Conditions, *11*(4886), 919–931.
- Abdul Qados, A. M. S. (2011). Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *10*(1), 7–15. <http://doi.org/10.1016/j.jssas.2010.06.002>
- Abogadallah, G. M. (2010). Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling & Behavior*, *5*(4), 369–374. <http://doi.org/10.4161/psb.5.4.10873>
- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, *2*(1), 1–12. <http://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, *55*(1), 373–399. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Ariza, J. (2009). Salinidad y vegetación. *Creative Commons*, 1–9.
- BioRad. (2006). Manual CFX 96 Software Manager. Recuperado el 21/01/16, de <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10010424.pdf>
- Bradbeer, J. W. (1988). Seed Dormancy and Germination. *Tertiary Level Biology*, 146. <http://doi.org/10.1199/tab.0119>
- Cabrera, J. C., Wégria, G., Onderwater, R. C. a, Napoles, M. C., Falcon-Rodriguez, a. B., Costales, D., ... Wattiez, R. (2012). Practical use of oligosaccharins in agriculture. *Acta Horticulturae*, *1009*, 195–212.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 3–41. <http://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Carillo, P., Annunziata, M. G., Pontecorvo, G., Fuggi, A., & Woodrow, P. (2011). Salinity Stress and Salt Tolerance. *Salinity Stress and Salt Tolerance*,

Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations, 21–38.
<http://doi.org/10.5772/22331>

Castillo Rolbin. (2000). Oligosacarinas. *Universidad de Costa Rica*, 3.

Corrales, L. C., & Ariza, M. M. M. (2012). Estrés oxidativo : origen , evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova - Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 10, 213–225.

Darvill, a, Augur, C., Bergmann, C., Carlson, R. W., Cheong, J. J., Eberhard, S., ... Meyer, B. (1992). Oligosaccharins--oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. *Glycobiology*, 2(3), 181–198. <http://doi.org/10.1093/glycob/2.3.181>

du Jardin, P. (2012). The Science of Plant Biostimulants - A bibliographic analysis : Final report.

Dubrovsky, L (2000). *Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124:1648-1657.

Eggleston, G., & Côté, G. (2003). Oligosaccharides in food and agriculture. *Oligosaccharides in Food and Agriculture*, 1–14. <http://doi.org/10.1021/bk-2003-0849.fw001>

Enríquez-guevara, E. A., Aispuro-hernández, E., Alimentos, D. T. De, Vegetal, D. O., Vargas-arispuro, I., Victoria, L., ... Cp, S. (2010). Oligosacarinas Derivadas de Pared Celular: Actividad Biológica y Participación en la Respuesta de Defensa de Plantas Cell Wall Oligosaccharine Derivatives : Biological Activity and Participation in the Response of Plant Defense, 144–155.

Ertani, A., Schiavon, M., Muscolo, A., & Nardi, S. (2013). Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. *Plant and Soil*, 364(1-2), 145–158. <http://doi.org/10.1007/s11104-012-1335-z>

Fernandez-Cornejo, J., & Nehring, R. (2014). Pesticide Use in US Agriculture: 21 Selected Crops, 1960-2008, 1960–2008. Recuperado from

<http://farmpolicy.com/wp-content/uploads/2014/05/eib124.pdf>

- Fry, S. C., Aldington, S., Hetherington, P. R., & Aitken, J. (1993). Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiology*, *103*(1), 1–5. <http://doi.org/10.1104/pp.103.1.1>
- Globalchem. (2007). Challenges for Agriculture and Horticulture. Recuperado from <http://www.globachem.com/en/about-globachem/value-of-agrochemicals>
- González-Pérez, L., Perrotta, L., Acosta, A., Orellana, E., Spadafora, N., Bruno, L., ... Rogers, H. J. (2014). In tobacco BY-2 cells xyloglucan oligosaccharides alter the expression of genes involved in cell wall metabolism, signalling, stress responses, cell division and transcriptional control. *Molecular Biology Reports*. <http://doi.org/10.1007/s11033-014-3566-y>
- González-Pérez, L., Vázquez-Glaría, A., Perrotta, L., Acosta, A., Scriven, S. a., Herbert, R., ... Rogers, H. J. (2012). Oligosaccharins and Pectimorf® stimulate root elongation and shorten the cell cycle in higher plants. *Plant Growth Regulation*, *68*(2), 211–221. <http://doi.org/10.1007/s10725-012-9709-z>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2013). *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-4747-4>
- Hasegawa, P., & Bressan, R. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant ...*, *51*(11), 463–499. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463>
- Hernández, J. A., Jiménez, A., Mullineaux, P., & Sevilla, F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell & Environment*, *23*, 853–862. <http://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00602.x>
- Jouyban, Z. (2012). The Effects of Salt stress on plant growth. *Tech. J. Engin & App. Sci.*, *2*(1), 7–10.

- Keunen, E., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van Den Ende, W., & Cuypers, A. (2013). Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: Extending the traditional concept. *Plant, Cell and Environment*, 36(7), 1242–1255. <http://doi.org/10.1111/pce.12061>
- Landis, T., & South, D. (1997). *National Proceedings: Forest an Conservation*. (A. Barthell, Ed.) (First). Pacific Noethwest Region: U.S Department of Agriculture.
- Läuchli, a, & Grattan, S. (2007). Plant growth and development under salinity stress. *Advances in Molecular Breeding toward Drought and Salt Tolerant*, 1–32. Recuperado from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-5578-2_1
- Lynde, C. W. (2001). Moisturizers: what they are and how they work. *Skin Therapy Letter*, 6(13), 3–5.
- Martinez Villavicencio, N., López Alonzo, C. V., Basurto Sotelo, M., & Pérez Leal, R. (2011). Efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo. *Tecnociencia Chihuahua*, V(3), 156–161.
- Meloni, D. a., Oliva, M. a., Martinez, C. a., & Cambraia, J. (2003). Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 49(1), 69–76. [http://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00058-8](http://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00058-8)
- Monte, M., & Sacardote, E. (1994). Radicales libres de oxígeno y las superóxido dismutasa. Aspectos biológicos y médicos, 61–69.
- Ouni, Y., Ghnaya, T., Montemurro, F., Abdelly, C., & Lakhdar, A. (2014). The role of humic substances in mitigating the harmful effects of soil salinity and improve plant productivity, 8(July).
- Piao, H. L., Lim, J. H., Cheong, G. W., & Hwang, I. (2001). Constitutiv over-expression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 27, 305–314.

- Piedra, L., Cepero, G., María, C., Salinidad, L. A., Problema, C., La, E. N., ... Solución, U. N. A. (2013). Revisión bibliográfica LA SALINIDAD COMO PROBLEMA EN LA AGRICULTURA: Review Salinity as a problem in agriculture: plant breeding an immediate solution Alexis Lamz Piedra y María C . González Cepero, *34(4)*, 31–42.
- Pitman, M., & Läuchli, A. (2002). *Global Impact of Salinity and Agricultural Ecosystems*. (A. Läunchli & U. Lüttge, Eds.) (first). Holanda: Salinity: Enviroment-Plants-Molecules.
- Przybysz, A., Gawrońska, H., & Gajc-Wolska, J. (2014). Biological mode of action of a nitrophenolates-based biostimulant: case study. *Frontiers in Plant Science*, *5(December)*, 1–15. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00713>
- Qadir, M., Quillerou, E., Nangria, V., Murtaza, G., Singh, M., Thomas, R. J., ... Noble, A. D. (2014). Economics of Salt-induced Land Degradation and Restoration. *Natural Resources Forum*, *38(4)*, 282–295.
- Quados, A. (2011). Effect of salt stress on plant growth and metabolism of vean plant *Vicia faba* (L.). *Journal of the Saudi Societi of Agricultural Science*. *10(1)*, 7-15.
- Ravi Kumar, M. N. . (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, *46(1)*, 1–27. [http://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](http://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9)
- Riego, E. L. D. D. E., Irma, J., Banda, M., Ortiz, P. R., Briones, F., & Zamora, C. (2014). Rehabilitación De Suelos Salino-Sódicos : Estudio De Caso En.
- Roser, M. (2015). Fertilizer and Pesticides. Recuperado el 01/02/16 de <http://ourworldindata.org/data/food-agriculture/fertilizer-and-pesticides/>
- Ruzzi, M., & Aroca, R. (2015). Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.042>
- Ryan, C. a, & Farmer, E. E. (1991). Oligosaccharide Signals in Plants: A Current Assessment. *Annual Review of Plant Physiology and Plant*

Molecular Biology, 42(1), 651–674.
<http://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.003251>

- Saa, S., Olivos-Del Rio, A., Castro, S., & Brown, P. H. (2015). Foliar application of microbial and plant based biostimulants increases growth and potassium uptake in almond (*Prunus dulcis* [Mill.] D. A. Webb). *Frontiers in Plant Science*, 6(February), 1–10. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00087>
- Sambrook, R., Rusell, W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3 ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 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(1), 465–490. <http://doi.org/10.1007/s10811-013-0101-9>
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26. <http://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Shim, I. S., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D. W., & Usui, K. (2003). Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 39(3), 285–292. Recuperado el 01/02/16 de <http://www.springerlink.com/index/VG33952MVU645886.pdf>
- Shimomura, T., Nagatani, A., Chory, J., Furuya, M. (1994). *The induction of Seed Germination in Arabidopsis thaliana is Regulated Principally by Phytochrome B ad Secundarilu by Phytocrome A*. *Plant Physiol*, 104(2), 363-371.
- StatSoftInc. (2007). *STATISTICA (dta analysis software system)*, verión 8.0.
- TFI. (2013). *Statistics FAQs*. Recuperado el 04/01/16 de <https://www.tfi.org/statistics/statistics-faqs>

- Tirado, R., Bedoya, D., & Novotny, V. (2008). Agrochemical use in the Philippines and its consequences to the environment. *East*, (February).
- Tuchy, L., Chowańska, J., & Chojnacka, K. (2013). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth: Review. *Chemik*, 67(7), 636–641. <http://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>
- Usov, A. I. (2007). Oligosaccharins — a new class of signalling molecules in plants. *Russian Chemical Reviews*, 62(11), 1047–1071. <http://doi.org/10.1070/RC1993v062n11ABEH000063>
- Vasconcelos, A. C. F. De, Zhang, X., Ervin, E. H., & Kiehl, J. D. C. (2009). Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. *Scientia Agricola*, 66(3), 395–402. <http://doi.org/10.1590/S0103-90162009000300015>
- Vissenberg, K., Martinez-Vilchez, I. M., Verbelen, J. P., Miller, J. G., & Fry, S. C. (2000). In vivo colocalization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of Arabidopsis roots. *Plant Cell*, 12(7), 1229–1237. <http://doi.org/10.1105/tpc.12.7.1229>
- Wang, Y. C., Qu, G. Z., Li, H. Y., Wu, Y. J., Wang, C., Liu, G. F., & Yang, C. P. (2010). Enhanced salt tolerance of transgenic poplar plants expressing a manganese superoxide dismutase from *Tamarix androssowii*. *Molecular Biology Reports*, 37(2), 1119–1124. <http://doi.org/10.1007/s11033-009-9884-9>
- Warrence, N., Pearson, K., & Bauder, J. (2003). Basics of Salinity and Sodicity Effects on Soil Physical Properties. Recuperado el 18/012/15 de <http://waterquality.montana.edu/energy/cbm/background/soil-prop.html#SalProp>
- Yokoi, S., Bressan, R. a., & Hasegawa, P. M. (2002). Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS Working Report*, 25–33.
- Zabotin, A. I., Barisheva, T. S., Larskaya, I. a, Toroshina, T. E., Trofimova, O. V, Hahn, M. G., & Zabolina, O. a. (2005). Oligosaccharin—a new systemic factor in the acquisition of freeze tolerance in winter plants. *Plant*

Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology, 139(1), 36–41. <http://doi.org/10.1080/11263500500060601>

Zamolinski, A. F. (2000). Experiencias en recuperación de suelos salinizados. *Publicacion Tecnica Del INTA*.

Anexos

Acceso TAIR	Nombre del Gen	Secuencia
AT1G20620	CAT3- Catalase 3.	<p>1 ACTAAACCAA AATCCTCAAA AGCCTATTTG GGGGATCATC AACCTTCTAT 51 CATCACCATG GATCCTTACA AGTATCGTCC TTCAAGCGCG TACAACGCC 101 CATTCTACAC CACAAACGGT GGTGCTCCAG TCTCCAACAA CATCTCTTCC 151 CTCACCATCG GAGAAAGAGG TCCGGTCTT CTTGAGGATT ATCATTGAT 201 CGAGAAGGTT GCTAATTTCA CCAGAGAGAG GATCCCTGAG AGAGTGGTTC 251 ATGCTAGAGG AATCAGTGCT AAGGGTTTCT TTGAAGTCAC CCATGACATT 301 TCAAACCTCA CTTGTGCTGA TTTTCTCAGA GCCCCTGGTG TTCAAACTCC 351 GGTTATTGTC CGTTTCTCCA CCGTTGTCCA CGAACGTGCC AGTCCTGAAA 401 CCATGAGGGA TATTCGTGGT TTTGCTGTCA AGTTTTACAC CAGAGAGGGA 451 AACTTTGATC TTGTTGGGAA CAACACTCCG GTGTTCTTCA TCCGTGATGG 501 GATTCAGTTC CCGGATGTTG TCCACGCGTT GAAACCTAAC CCGAAAAACA 551 ACATCCAAGA GACTGGAGG ATTCTGGACT ACATGTCCCA CTGCTGAG 601 AGTTTGCTCA CATGGTGTG GATGTTTGTAT GATGTTGGTA TTCCACAAGA 651 TTACAGGCAC ATGGAGGGTT TCGGTGTCCA CACCTACT CTATTGTTCCA 701 AATCTGAAA AGTTCTCTTT GTGAAGTTCC ACTGGAACC AACTTGTGGG 751 ATCAAGAATC TACTGATGA AGAGGCCAAG GTTGTGGAG GAGCCAATCA 801 CAGCCACGCC ACTAAGGATC TCCACGATGC CATTGTATCT GGCAACTACC 851 CCGAGTGGAA ACTTTTCATC CAGACCATGG ATCCTGCAGA TGAGGATAAG 901 TTTGACTTTG ACCCACTTGA TGTGACCAAG ATCTGGCCTG AGGATATTTT 951 GCCTCTGCAA CCGGTTGGTC GCTTGGTTCT GAACAGGACC ATTGACAAC 1001 TCTTCAATGA AACTGAGCAG CTGCGTTCA ACCCGGGTCT TGTGGTCTCT 1051 GGAATCTACT ACTCAGACGA CAAGCTGCTC CAGTGTAGGA TCTTTGCTTA 1101 TGTTGACACT CAGAGACATC GCCTTGGACC GAATTTTTC CAGCTTCCAG 1151 TCAATGTCC CAAATGTGCT CACCACAACA ATCACCATGA AGGTTTTATG 1201 AACTTCATGC ACAGAGATGA GGAGATCAAT TACTACCCT CAAAGTTTGA 1251 TCCTGTCCG TGCGCTGAGA AAGTCCCAC CCCTACAAC TCCTACACTG 1301 GAATTCGAAC AAAGTGCCTC ATCAAGAAAG AGAACAACCT CAAACAGGCT 1351 GGAGACAGGT ACAGATCATG GGCACCAGAC AGGCAAGACA GTTTTGCAA 1401 GAGATGGTG GAGATTCTAT CGGAGCCACG TCTACCCAC GAGATCCGC 1451 GCATCTGGAT CTCTTACTGG TCTCAGGCTG ATCGATCCT GGGACAGAAA 1501 CTTGCAAGCC GTCTGAACGT GAGGCCAAGC ATCTAGAGGC CAATCTCCAT 1551 ATAAGCTCAG TCTATGTGAG GTACAATCAA TCTCATCGAT CTATCATCGC 1601 TTGGTCGTTA AATCCGTCAA AAAGATAATC ACATGTGTTG TTGTTTCATG 1651 TCTATATAAT AATAATGCTT GTAATCCCAA AAATCATGT TTCCTTCTT 1701 TCTAGTCTCA CTGTCTTTGT AATCTCTTTT TACAATAAA CAATGTTTCT 1751 TGAAGC</p>
ATMSD1, ARABIDOPSIS MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE	AT3G10920	<p>1 GCGACCACTA GAAGGAGAAA CAAATCTTCA TTCCAGCAAT GCGGATTCGT 51 TGTGTAGCGA GTAGAAAAAC CCTAGCCGGC TTGAAGGAGA CATCATCGAG 101 GCTATTGAGG ATCAGAGGGA TTCAGACTTT TACGCTTCTT GATCTTCTT 151 ACGATTATGG CGCATTGGAA CCGGCCATTA GTGGAGAGAT CATGCAGATT 201 CATCACCAGA AGCATCACCA GGCTTATGTT ACTAATTACA ATAATGCTCT 251 TGAGCAGCTT GATCAAGCTG TGAACAAGGG AGATGCTTCC ACTGTTGTTA 301 AGTTGCAGAG CGCCATCAA TTCAACGGCG GAGGTCATGT CAACCATTCC 351 ATTTCTGGA AGAACCTTGC TCCTTCCAGT GAAGTGGTG GAGAGCCACC 401 AAAAGGATCT CTTGGTAGTG CCATTGACGC TCACTTTGGC TCCTTGAAG 451 GTCTGGTGAA AAAGATGAGT GCTGAGGGTG CTGCAGTGCA AGGCTCAGGA 501 TGGGTGTGGC TCGACTAGA CAAAGAACTG AAGAAGCTAG TTGTTGACAC 551 AACTGCCAAT CAGGATCCAT TAGTGACAAA AGGAGGAAGC TTGGTACCTC 601 TGGTGGGTAT AGATGTTTGG GAGCACGCCT ACTACTTGCA GTACAAAAAT 651 GTGAGGCCTG AGTATCTGAA GAATGTATGG AAAGTGATCA ACTGGAAATA 701 TGCAAGCGAG GTTTATGAGA AGGAAAGCAA CTGAATCGTT TACACGATGA 751 CATAAGGAGA TGAACGATTT CCAGCTCAGC TTTTGTTTTA AGGTTGTCTG 801 AAACAACACT AGAGTGTCTC TTTGGTTTTT AAGATTTGCT CAACTCAGCT 851 GTGTGGTACG TTGTTTACA ATGAAAGTTT TSAAGAATAA AAATTTGCTA 901 TTATTGTCAG AAAGCGCTAT TGTTTATTCT</p>

Anexo 1: Secuencias utilizadas para la elaboración de cebadores obtenida de la base de datos TAIR