



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE
LA PARED CELULAR DE HONGOS SOBRE LA MORFOGÉNESIS DE
PLANTAS *in vitro* DE *Arabidopsis thaliana*

Trabajo de Titulación presentado en conformidad a los requisitos
establecidos para optar por el título de ingeniera en biotecnología

Profesor Guía
Ph.D Lien González-Pérez

Autora
Jennifer Dayana Erazo Moncayo

Año
2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, 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, especialidad Fitopatología

CI: 175132134-8

DECLARACIÓN DE AUTORÍA 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.

Jennifer Dayana Erazo Moncayo

CI: 171685642-0

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, por ser el motor que me impulsa a seguir de pie y luchar por mis objetivos.

A la Dra. Lien, por haber confiado en mí y por haberme guiado con mucha paciencia en este camino de formación como profesional.

A Jaimito por haberme brindado su apoyo incondicional para culminar esta etapa, por su amistad y sus consejos.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y amor para mis padres y hermanos, quienes han sido el pilar fundamental en mi vida, mi apoyo constante en mis decisiones y mi consuelo en los momentos difíciles. A ustedes, que me han enseñado a seguir adelante ante cualquier dificultad, por sus cuidados, sus consejos, por todo el tiempo compartido y por ser el mayor ejemplo de amor incondicional en mi vida.

RESUMEN

Los bioestimulantes son moléculas bioactivas cuya función es mejorar las propiedades físico-químicas de las plantas, los rendimientos, la calidad de los cultivos y la asimilación de los nutrientes por parte de la planta. En su mayoría son compuestos biodegradables, no son tóxicos para el hombre o el medio ambiente por lo que se proponen como una alternativa al uso de agroquímicos. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de los oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos(GO) sobre el porcentaje de germinación, la morfogénesis y la expresión relativa de un gen implicado en el ciclo celular de plantas cultivadas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*. Las semillas se germinaron y crecieron en medio Murashige y Skoog (MS) para la evaluación del bioproducto en diferentes concentraciones que fueron un control (MS), MS con GO 1 mg.L⁻¹ y MS con GO 5 mg.L⁻¹. El porcentaje de germinación en todos los tratamientos fue mayor al 70 % y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Con respecto a la morfogénesis de las plantas se observó que el tratamiento MS con GO 1 mg.L⁻¹ estimuló la longitud de las raíces primarias y el peso fresco de las plantas (g) en relación al control no tratado. Sin embargo, el MS con GO 5 mg.L⁻¹ promovió el desarrollo de raíces secundarias aunque no de la raíz primaria. Adicionalmente, la expresión relativa del gen *TONSOKU* (*TSK*), implicado en el ciclo celular, mostró niveles de expresión relativa superiores a las 24 horas y una desregularización a las 72 horas. Sin embargo, los valores de expresión del *TSK* no superaron el control MS, por lo que los resultados obtenidos nos permiten inferir que el gen *TSK* no es probablemente el que está generando una mayor tasa de crecimiento de la raíz en presencia de los GO. El principal resultado consistió en la validación del efecto biológico de los GO sobre la arquitectura de la raíz de plantas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana* y la expresión génica, con el fin de que a futuro se puedan proponer estos compuestos como sustitutos de agroquímicos.

ABSTRACT

Biostimulants are bioactive molecules. They improve physical-chemical properties of the plant, increase yields and quality of crops; also enhance nutrients assimilation by the plant. Most of all biostimulants are biodegradable compounds, have no harmful effects on humans or the environment, for all these reasons they are an alternative for using agrochemical in crops. In this work, there were evaluated the effect of oligosaccharides derived from fungi cell wall (GO) over germination percentage, morphogenesis and relative gene expression of a gene involved in plant cell cycle of *Arabidopsis thaliana* cultivated *in vitro*. The seeds are germinated and grown on Murashige and Skoog (MS) media for evaluating the bioproduct in different concentrations were control (MS), MS with GO 1 mg.L⁻¹ and MS with GO 5 mg.L⁻¹. As a result, germination percentage in all treatments was higher than 70 %; however, not statistically significant was obtained between them. With regard to plant morphogenesis, it was observed that 1 mg.L⁻¹ GO treatment stimulated the growth in length of primary roots and increase of plant fresh weight (g) compared to untreated control. Nevertheless, 5 mg.L⁻¹ GO media promoted secondary roots development instead of primary roots. Additionally, relative expression of *TONSOKU (TSK)* gene, which is involved in cell cycle, showed higher levels of relative expression at 24 hours, and it was deregulated at 72 hours. Although all these results, the expression values of the *TSK* did not exceed the MS control. In consequence, one can infer that probably another gene is promoting a higher rate of root growth in the presence of GO. As main result, it was performed the validation of GO biological effect on root architecture over *in vitro Arabidopsis thaliana* plants and gene expression, so in the future these compounds can be proposed as substitutes for agrochemicals.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción.....	1
2. Capítulo II. Revisión Bibliográfica.....	4
2.1. Bioestimulantes.....	4
2.1.1 Situación actual y análisis económico de factibilidad.....	4
2.1.2 Definición y tipos de bioestimulantes.....	6
2.1.3 Oligosacáridos derivados de hongos.....	9
2.1.4 Aplicación Biotecnológica.....	11
2.2. Validación Biológica de los Bioestimulantes.....	12
2.2.1 Arabidopsis thaliana como planta modelo.....	13
2.2.2 Morfología de la raíz.....	14
2.2.3 Ciclo celular y su regulación.....	17
3. Capítulo III. Materiales y Métodos.....	24
3.1. Evaluación del efecto de oligosacáridos derivados de hongos sobre el porcentaje de germinación y desarrollo morfológico de plantas <i>in vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
3.2. Determinación de la expresión relativa de un gen implicado en el ciclo celular de las plantas <i>in vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
4. Capítulo IV. Resultados.....	33
4.1. Evaluación del efecto de oligosacáridos derivados de hongos sobre el porcentaje de germinación y desarrollo morfológico de plantas <i>in vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	33

4.2. Determinación de la expresión relativa de un gen implicado en el ciclo celular de las plantas <i>in vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
5. Capítulo V. Discusión	49
6. Capítulo VI. Conclusiones y Recomendaciones.....	57
6.1 Conclusiones.....	57
6.2 Recomendaciones.....	58
Referencias.....	59

1. Capítulo I. Introducción

Los bioestimulantes vegetales o fitoestimulantes se conforman de una variedad de compuestos, con excepción de nutrientes y biocidas, que modifican los procesos fisiológicos de las plantas. El Consejo de la Industria Europea de Bioestimulantes (EBIC, por sus siglas en inglés *European Biostimulants Industry Council*, <http://www.biostimulants.eu/>) define a los bioestimulantes como aquellos que contienen sustancias o microorganismos que estimulan el desarrollo de las plantas y su respuesta a los diversos tipos de estrés.

Estos se encuentran eximidos del marco regulatorio de los plaguicidas, debido a que no tienen acción directa sobre las plagas. La definición dada por el EBIC se diferencia de la establecida para el control biológico, ya que los bioestimulantes promueven el crecimiento, el desarrollo y el mejoramiento de la eficiencia del metabolismo de las plantas, con lo cual generan incrementos en el rendimiento y la calidad de los cultivos. Además, estos contribuyen a aumentar la tolerancia y la recuperación al estrés biótico y abiótico, así como facilitar la asimilación, la translocación y el uso de los nutrientes (European Biostimulants Industry Council, 2012).

Los bioestimulantes pueden actuar directamente en la fisiología y metabolismo de las plantas o mejorando las condiciones del suelo donde estas se desarrollan alterando la microflora (Bulgari, Cocetta, Trivellini, Vernieri y Ferrante, 2014; Calvo, Nelson y Kloepper, 2014; Santaniello et al., 2013; Nardi, Carletti, Pizzeghello y Muscolo, 2009). Su uso en la agricultura como sustitutos de los agroquímicos ha incrementado debido a que son compuestos biodegradables, no son tóxicos para el ambiente, son relativamente “fáciles” de producir y son seguros para los animales y el hombre (Calvo et al., 2014).

En este contexto, los oligosacáridos derivados de la pared celular de plantas y hongos han mostrado tener un gran potencial como reguladores de la

respuesta de defensa en plantas, el crecimiento y el desarrollo desde su primer reporte en 1985 (Albersheim y Darvill, 1985).

Por otra parte, las paredes celulares de plantas y hongos tienen entre sus funciones brindar protección, rigidez e intercambio de señales mediante receptores y estructuras proteicas entre las células vecinas (Vorwerk, Somerville y Somerville, 2004). A través de la hidrólisis enzimática de las paredes celulares se pueden obtener oligosacáridos con actividad biológica, los cuales son denominados oligosacarinas (Castillo, 2010; Wang, 2007). El tipo de efecto y especificidad de la oligosacarina varía en dependencia de las características fisicoquímicas, la concentración de trabajo y la especie vegetal que percibe la señal. Por lo tanto, es necesaria la comprensión de los mecanismos de acción, sus principales implicaciones fisiológicas y el uso potencial en cultivos agrícolas de las distintas formulaciones que se obtengan de este tipo de moléculas (Cabrera et al., 2013).

En la búsqueda de oligosacáridos activos se consideró primero el Reino Fungi, especialmente los hongos biotróficos y necrotrofos, ya que son los principales responsables de daños en las plantas. Muchos de los hongos patógenos tienen β -glucanos como los mayores componentes de su pared celular, los cuales son percibidos mediante receptores por diferentes especies de plantas (Ceron, Vargas, Aispuro y Martínez, 2012).

En la agricultura, varios estudios con oligosacáridos activos derivados de la pared celular de hongos han mostrado tener efecto bioestimulante sobre las plantas. Por ejemplo, la quitina actúa como un potencializador y regulador del crecimiento, el desarrollo y el rendimiento en varios cultivos (Sharp, 2013).

Sin embargo, existen pocos estudios acerca del efecto biológico de los oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos sobre la morfogénesis y el ciclo celular de las plantas, así como las bases moleculares que los producen.

Teniendo en cuenta estos antecedentes los objetivos del presente trabajo son:

Objetivo General

- Determinar el efecto de los oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos sobre la morfogénesis de plantas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la presencia de los oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos sobre el porcentaje de germinación y el desarrollo morfológico en plantas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*.
- Determinar la expresión relativa del gen *TONSOKU* implicado en el ciclo celular de plantas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*.

2. Capítulo II. Revisión Bibliográfica

2.1. Bioestimulantes

2.1.1. Situación actual y análisis económico de factibilidad

La revolución verde se ha destacado por incrementar la producción alimenticia a través del desarrollo e introducción de nuevas variedades de plantas con gran capacidad de rendimiento, lo que ha desencadenado una alta exigencia de la aplicación de fertilizantes inorgánicos, pesticidas y agua de riego (Malekpoor et al., 2015).

En la actualidad, el uso de agroquímicos tiene efectos adversos para el medio ambiente, ya que aumenta la salinidad, la contaminación de los suelos, el agotamiento de los recursos hídricos, entre otros (Shepherd, 2009). Se estima que para el año 2050 se requiere incrementar la productividad agrícola mundial en un 70 % a través de una intensificación sostenible de la agricultura, con el fin de alimentar a la población que alcanzaría a los 9.000 millones de habitantes (Escobar, 2010).

Los pesticidas, el fósforo y el nitrato son los principales contaminantes del agua agrícola. Las altas concentraciones de nitratos provienen aproximadamente del 50 % de los fertilizantes nitrogenados que son aplicados a los cultivos y que, a su vez, quedan como residuos contaminantes que se transportan hacia las aguas subterráneas (Ertani, Nardi y Altissimo, 2013). De la misma forma, las altas concentraciones de nitratos (Bulgari et al., 2014), de dióxido de carbono y de amoníaco que son desechos de la elaboración de fertilizantes para las plantas y los suelos, pueden generar problemas para la salud humana cuando estos se liberan hacia la atmósfera (Ertani et al., 2013).

El desarrollo de la Biotecnología ha proporcionado nuevas alternativas para disminuir el uso de productos nocivos para el medio ambiente y la salud humana.

Durante la última década, las investigaciones sobre los bioestimulantes se han incrementado sustancialmente para determinar los compuestos bioactivos y microorganismos beneficiosos involucrados (Saborío, 2002). De esta manera será posible comprender como estos pueden mejorar la eficiencia, la calidad y el rendimiento de las plantas bajo determinadas condiciones de crecimiento (Calvo et al., 2014). Por esta razón, es necesario incrementar la búsqueda e identificación de moléculas orgánicas con capacidad de activar rutas metabólicas en las plantas, ya que pueden permitir un incremento significativo en el rendimiento en menor tiempo y a bajos costos (Bulgari et al., 2014).

En tal sentido, se han propuesto a los bioestimulantes vegetales, o también conocidos como bioestimulantes agrícolas, como una alternativa de los agroquímicos para mejorar el crecimiento y el rendimiento de los cultivos (Calvo et al., 2014). En el 2012, Europa presentó el mayor mercado de bioestimulantes, alcanzando así el uso de los bioestimulantes en 6.2 millones de hectáreas (European Biostimulants Industry Council, 2012).

En un análisis económico realizado por el Consejo Europeo de la Industria Bioestimulante (EBIC, por sus siglas en inglés *European Biostimulant Industry Council*), se estima que para el año 2018 el mercado mundial de bioestimulantes deberá alcanzar los \$ 2.241 millones de dólares para abastecer a la población mundial (European Biostimulants Industry Council, 2013). La tendencia de su uso en la agricultura en muchos países está incrementando, ya que son considerados como herramientas de producción, lo cual se ha demostrado en varias publicaciones científicas (Bulgari et al., 2014; Calvo et al., 2014; Ertani et al., 2013; Ertani, Schiavon, Altissimo, Franceschi y Nardi, 2011). Además se ha evidenciado que estos compuestos estimulan el crecimiento de las plantas, debido a que no solo proveen energía, sino también

intervienen en la construcción de los componentes estructurales de las células vegetales y la pared celular de las mismas (Kollárová et al., 2009)

2.1.2. Definición y tipos de Bioestimulantes

Los bioestimulantes tienen un gran interés en la agricultura sostenible, ya que su aplicación activa diversos procesos fisiológicos que mejoran la eficiencia en el uso de nutrientes, estimulan el desarrollo de la planta y reducen el uso de los fertilizantes (Kunicki, Grabowska, Sękara y Wojciechowska, 2010). De forma general, los bioestimulantes son extractos obtenidos de materia prima orgánica que contiene compuestos bioactivos (Bulgari et al., 2014) y que, al ser utilizadas en pequeñas cantidades, tienen un efecto positivo sobre el crecimiento, la germinación y el desarrollo de las plantas (Saborío, 2002).

El EBIC en el 2012, los definió como:

“...aquellos que contienen sustancia(s) y/o microorganismos cuya función cuando se aplica a las plantas o la rizosfera es estimular procesos naturales para mejorar la captación/beneficio de los nutrientes, la eficiencia de los nutrientes, la tolerancia al estrés abiótico y calidad de los cultivos”.

Los bioestimulantes se diferencian de los fertilizantes debido a que actúan directamente en el metabolismo de la planta, de la misma forma, sus concentraciones de nutrientes son insignificantes (Nardi, Carletti, Ertani y Pizzeghello, 2006; Petrozza, Summerer, Di Tommaso, Di Tommaso y Piaggese, 2013a, 2013b).

Más tarde, esta misma institución redefine a los bioestimulantes de acuerdo a los efectos que estos pueden tener sobre las plantas, como aquellos que fomentan el crecimiento y desarrollo de las mismas durante todo el ciclo de vida del cultivo, incluyendo la calidad de producción del contenido de azúcar, color, tamaño, eficiencia del uso del agua y capacidad de interacción con los

microorganismos propios del suelo (Calvo et al., 2014; European Biostimulants Industry Council, 2012b).

Debido a que los bioestimulantes se componen de una amplia gama de moléculas y compuestos, es incierto conocer la composición específica y determinar que compuestos son los más activos dentro de una mezcla (Bulgari et al., 2014; Ertani et al., 2013; Ertani et al., 2011; Saborío, 2002). El aislamiento y el estudio de un solo componente de un bioestimulante puede mostrar resultados poco confiables, ya que el efecto que tienen sobre las plantas se debe a la combinación y acción sinérgica de estas moléculas (Bulgari et al., 2014; Ertani et al., 2013; Ertani et al., 2011).

Por lo tanto, los bioestimulantes se pueden clasificar de acuerdo a la acción o la respuesta fisiológica mostrada en las plantas (Bulgari et al., 2014; Guinan et al., 2013). En el primer congreso mundial sobre la aplicación de los bioestimulantes en la agricultura realizado en Francia en el año 2012, se clasificaron en ocho categorías a los bioestimulantes de acuerdo a las publicaciones encontradas en la base de datos "Scopus" (Du Jardin, 2012), que son:

1. **Sustancias húmicas:** son sustancias naturales pertenecientes a la materia orgánica del suelo que resultan de la descomposición de células muertas y de la actividad metabólica de los microbios del suelo. Se clasifican de acuerdo a su peso molecular y solubilidad en húmicos, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos. Tienen una influencia directa y mutua con las raíces de las plantas y la materia orgánica del suelo.
2. **Materiales orgánicos complejos:** son materiales complejos que se originan de compost, estiércol, plantas de lodo de aguas residuales, entre otros. Se pueden emplear en el suelo para incrementar la materia orgánica y las propiedades físico-químicas del mismo y promover la mejora y el uso de nutrientes; con el fin de controlar los patógenos del suelo, residuos de plaguicidas y xenobióticos.

- 3. Elementos químicos beneficiosos:** son aquellas sustancias que promueven el crecimiento, pero no son requeridas por todas las plantas. Los cinco elementos principales son el aluminio (Al), el cobalto (Co), el sodio (Na), el selenio (Se)¹ y el silicio (Si).
- 4. Sales Inorgánicas, incluyendo fosfito:** son aquellas sustancias que proporcionan protección contra los hongos y tienen la capacidad de estimular los mecanismos de defensa en las plantas, ya que ejercen una acción fungicida directa o indirecta.
- 5. Extractos de algas:** en plantas actúan como fertilizantes y se ven asociados a efectos hormonales que son parte de la actividad bioestimulante de estos extractos. Tienen un impacto sobre la germinación de las semillas y estimulan un aumento en el crecimiento y el desarrollo de las plantas.
- 6. Derivados de quitina y quitosano:** son biopolímeros bioactivos que se expresan como compuestos protectores que actúan como barreras físicas. Su función principal es la protección de las plantas contra los virus, las bacterias, los hongos y los insectos, así como la activación de los genes de defensa del huésped y el desarrollo de la respuesta inmune.
- 7. Antitranspirantes:** son antitranspirantes metabólicos que actúan como reguladores de estomas. Tienen efectos físicos en la superficie y/o dentro de los órganos de las plantas, actuando sobre el complejo control hormonal de las “células de guarda”.
- 8. Aminoácidos libres y otras sustancias que contengan Nitrógeno:** son componentes orgánicos nitrogenados usados en aplicaciones foliares. Tienen impacto en la nutrición de las plantas a través de la formación de quelatos y otros complejos con los nutrientes del suelo. Su

efecto recae sobre el metabolismo de la planta para mejorar la eficiencia del uso del nitrógeno, la estimulación de la fotosíntesis y el crecimiento de la planta.

Adicionalmente, los componentes más comunes presentes en los bioestimulantes son los poli y oligosacáridos (Bulgari et al., 2014; Cabrera et al., 2013). Estos son hidratos de carbono de origen natural, formados por la unión de residuos de azúcar interconectados con enlaces glicosídicos, los cuales presentan funciones biológicas de regulación (Albersheim et al., 1983).

Los poli y oligosacáridos pueden tener varios patrones estructurales que incluyen los β -glucanos, los oligomeros de quitina y el quitosano, los oligogalacturónidos, los alginatos, los fucanos, las carrageninas y los "ulvans". Los ulvans son los principales polisacáridos solubles en agua encontradas en las algas verdes, en donde su estructura muestra una gran complejidad y variabilidad (Jiao, Yu, Zhang y Ewart, 2011; Klarzynski et al., 2003; Klarzynski et al., 2000; Trouvelot et al., 2015). Estos pueden ser fraccionados artificialmente, los cuales a muy bajas concentraciones juegan un rol en la señalización de moléculas, estimulando el crecimiento y el desarrollo en las plantas (Cabrera et al., 2013; Fujikawa et al., 2012; Shibuya y Minami, 2001).

2.1.3. Oligosacáridos derivados de hongos

Los oligosacáridos con actividad biológica o bioactivos se denominan oligosacarinas y fueron descubiertas por primera vez en 1970, por Peter Albersheim y sus colaboradores (Vorwerk et al., 2004). Estas primeras oligosacarinas bioactivas fueron derivadas del hidrolizado de la pared celular del oomiceto *Phytophthora sojae* parcialmente purificado (Kamoun, 2006; Wang, 2007).

Las oligosacarinas han sido estudiadas desde hace más de 20 años como reguladoras de la defensa, el crecimiento y el desarrollo en plantas

Otra evidencia de la acción de las oligosacarinas derivadas de hongos es la capacidad de actuar como enraizador o análogo de auxinas (Castillo, 2010). Es por ello que el conocimiento de los factores genéticos, bioquímicos y fisiológicos que ocurren dentro de la célula luego de la interacción con las oligosacarinas, ha contribuido el inicio de nuevas tecnologías que permiten incrementar el rendimiento y calidad de los cultivos (Enríquez, Aispuro, Vargas y Martínez, 2010).

2.1.4. Aplicación Biotecnológica

En el suelo, los bioestimulantes interaccionan con la microflora natural, lo que genera estímulos positivos en el crecimiento de las plantas y mejoran la calidad y la eficiencia de los nutrientes del suelo (Bulgari et al., 2014).

Los mecanismos de acción más frecuentes son la estimulación de la actividad microbiana, el incremento de la actividad enzimática, la producción de fitohormonas como reguladores de crecimiento y la estimulación de los parámetros del metabolismo de las plantas (Ertani et al., 2013). De esta manera tienen la capacidad de modificar la conformación de la raíz, a la vez que aumentan el desarrollo de la misma (Bulgari et al., 2014; Petrozza et al., 2013a, 2013b).

El crecimiento de las plantas inducido por bioestimulantes puede estar directamente asociado con un incremento de aminoácidos y la mejora en la biosíntesis de proteínas (Bulgari et al., 2014). En un estudio realizado en el área de nutrición de las plantas, se propuso el uso de los bioestimulantes con el fin de mejorar la absorción y/o captación de los nutrientes y disminuir los efectos desfavorables de los fertilizantes sintéticos (Ertani, Schiavon, Muscolo y Nardi, 2013).

Otros estudios demostraron que los bioestimulantes estimularon el número de sitios de raíces secundarias en plantas de maíz (Canellas, Olivares,

Okorokova y Façanha, 2002). De la misma manera, Ertani y sus colaboradores (Ertani et al., 2012), comprobaron que la adición de los bioestimulantes genera una respuesta de adquisición de nutrientes, el cual favorece la absorción a través del aumento en el área de superficie de la raíz. También se demostró que el primer efecto de los bioestimulantes es el aumento en el tamaño de la raíz y la biomasa de las hojas (Ertani et al., 2013; Ertani et al., 2009).

El uso de los bioestimulantes y su aplicación permite disminuir y evitar pérdidas en los cultivos. Además, cuando se presentan situaciones de estrés, los bioestimulantes estimulan el porcentaje de rendimiento de la planta debido a que permiten reducir la incidencia de sequías, la congelación, los daños mecánicos y/o químicos y la resistencia a infecciones (Bulgari et al., 2014).

2.2. Validación Biológica de los Bioestimulantes

Las investigaciones sobre el uso de los bioestimulantes en cultivos han mostrado tener un efecto positivo sobre la fisiología de las plantas. Sin embargo, los mecanismos moleculares de estos efectos aún son desconocidos (Ertani et al., 2011). Se considera que los bioestimulantes pueden actuar directamente en la fisiología y metabolismo de las plantas o mejorando las condiciones del suelo donde estas se desarrollan alterando la microflora (Bulgari et al., 2014; Nardi et al., 2009).

No obstante, debido a que el modo de acción de los bioestimulantes varía con la especie y la composición de las mezclas de los mismos, como se ha descrito anteriormente, cada nueva formulación requiere que sus efectos sean debidamente validados biológicamente desde el punto de vista morfológico y molecular. Para ello, es importante partir de organismos modelos cuya información genética y fisiológica sea conocida.

2.1.2 *Arabidopsis thaliana* como planta modelo

La especie *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh pertenece a la familia *Brassicaceae*, orden *Caprales*. Es comúnmente elegida como modelo biológico gracias a su reducido tamaño y su alta adaptabilidad, por lo que de esta manera se invierte menos en espacio y esfuerzo dentro de un laboratorio (Meinke, Cherry, Dean, Rounsley y Koornneef, 1998). Los requerimientos de cultivo son simples, el ciclo de crecimiento es corto, de entre 4 a 6 semanas, en el que se pueden obtener un gran número de semillas (Meyerowitz, 2001). Tiene varios ecotipos que han sido recolectados en las poblaciones naturales, los cuales están disponibles para el análisis experimental. Los más aceptados para los análisis moleculares y genéticos son los ecotipos Columbia y Landsberg (Krishnan y Pereira, 2008).

El genoma de *A. thaliana* es relativamente pequeño, por lo tanto fácilmente manejable. Tiene alrededor de 25.478 genes que codifican 11.000 familias (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). A pesar de su reducido tamaño posee características morfológicas típicas de las Angiospermas, lo que hace que los resultados de las investigaciones puedan ser aplicables a cualquier tipo de planta con flor (Meinke et al., 1998).

Se han identificado varios procesos de transformación que involucran *Agrobacterium tumefaciens* para el estudio de la función e interacción de los genes propios e insertados (Meyerowitz, 2001). Las mutaciones obtenidas de *A. thaliana* se han relacionado con el crecimiento y el desarrollo de la planta. De esta manera se ha podido identificar mutaciones en procesos como la gametogénesis, la formación de semillas, el desarrollo de hojas y raíces, las vías metabólicas, la respuesta a hormonas y de defensa frente a patógenos, las señales ambientales, entre otros (Meinke et al., 1998).

2.2.2 Morfología de la raíz

Las raíces de las plantas son las responsables de la absorción de los nutrientes y el agua, por lo tanto son componentes críticos de la productividad global de las mismas (Malekpoor et al., 2015). Los estudios del crecimiento de la raíz se enfocan en mediciones de la longitud, la curvatura, las ramificaciones y la arquitectura de la raíz (RSA, de sus siglas en inglés *Root System Architecture*), así como la tasa de elongación (Yazdanbakhsh y Fisahn, 2010).

La RSA se determina a través de factores endógenos y limitaciones ambientales (Malekpoor et al., 2015; Xiong y Zhu, 2003) tales como el agua, los nutrientes y la temperatura (Bulgari et al., 2014; Dubrovsky y Rost, 2003). De esta manera, la comprensión de los mecanismos de regulación de RSA es de gran importancia para mejorar la calidad de los cultivos (Malekpoor et al., 2015).

En el sistema de las raíces de plantas superiores se pueden identificar tres tipos de raíces: primaria (PR), lateral (LR) y adventicia (ARS) (Figura 2a). La raíz primaria es el eje principal del cual se desarrollan las raíces laterales. Sin embargo, las raíces laterales pueden representar el 90 % de la longitud total de todo un sistema radicular (Malekpoor et al., 2015).

La raíz primaria se origina durante la embriogénesis, pero el número y el posicionamiento de las raíces laterales estarán determinadas por el número de divisiones post-embrionarias que se ven involucradas en el tamaño y la arquitectura en general del sistema radicular (Malekpoor et al., 2015; MacGregor, Deak, Ingram y Malamy, 2008).

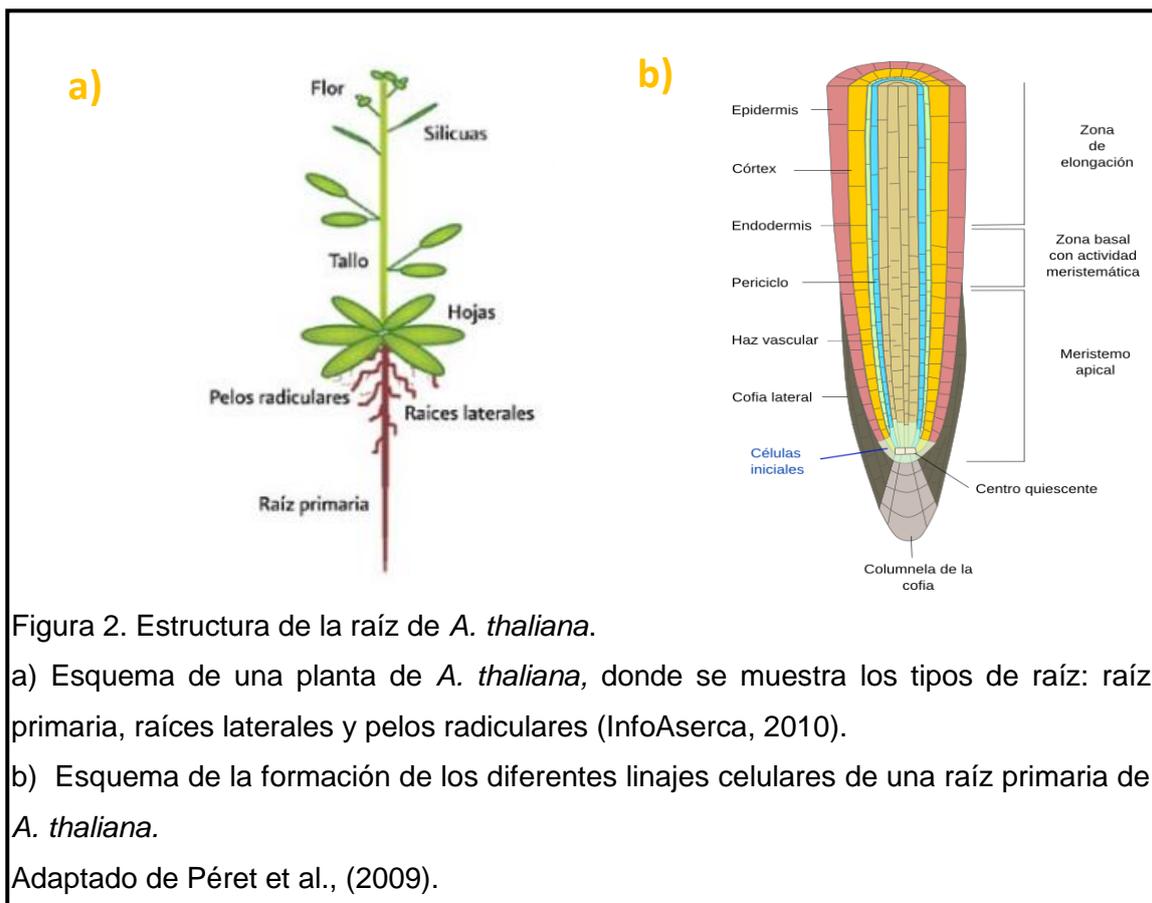


Figura 2. Estructura de la raíz de *A. thaliana*.

a) Esquema de una planta de *A. thaliana*, donde se muestra los tipos de raíz: raíz primaria, raíces laterales y pelos radiculares (InfoAserca, 2010).

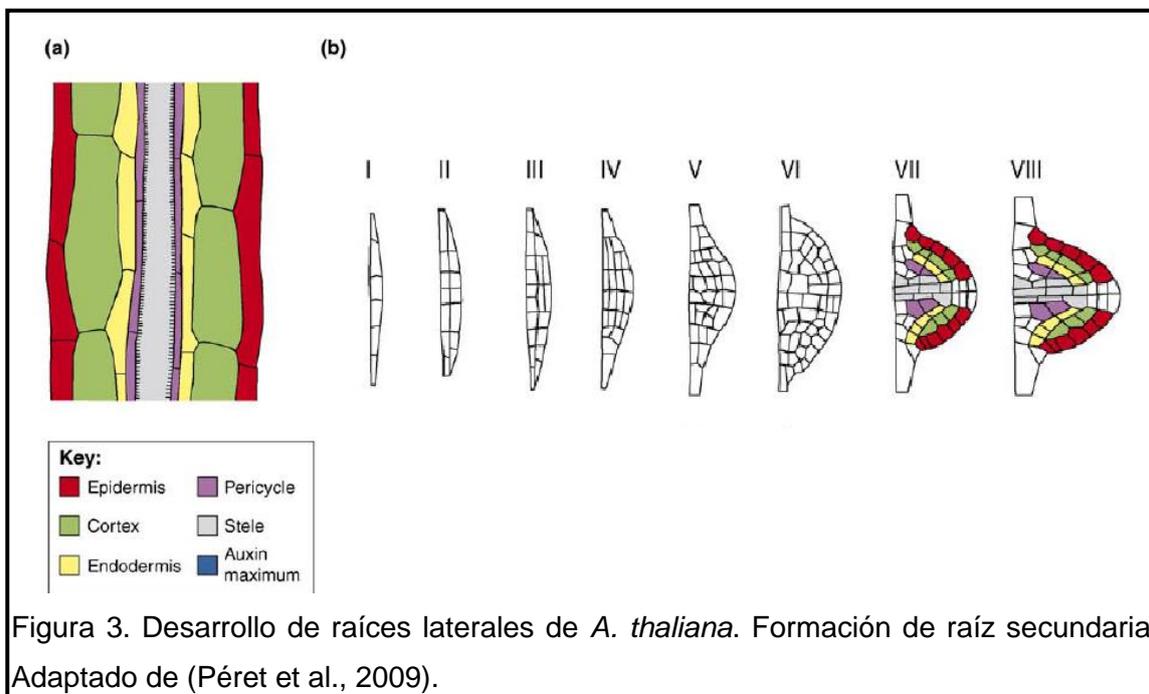
b) Esquema de la formación de los diferentes linajes celulares de una raíz primaria de *A. thaliana*.

Adaptado de Péret et al., (2009).

A. thaliana tiene un sistema radicular sencillo, lo que beneficia y facilita el estudio de los impactos endógenos y/o factores exógenos (Casimiro et al., 2003). Las raíces de *A. thaliana* consisten en capas concéntricas de epidermis, córtex, endodermis y periciclo que rodean el tejido vascular en el medio de la raíz. Las raíces secundarias se originan por células del periciclo ubicadas al polo opuesto del xilema (Figura 2b) (Malekpoor et al., 2015).

Las células del periciclo que inician los primordios de las raíces laterales permanecen competentes para las siguientes divisiones después de dejar el meristemo de la raíz apical (RAM) (Vanneste et al., 2005). Las células se dividen en un plano periclinal para dar lugar a cada capa de la raíz. Seguido, las células hijas siguen dividiéndose de forma periclinal y anticlinal para generar un primordio (etapas III-VI, Figura 3) que brota (etapa VIII, Figura 3) de la raíz parental (Malekpoor et al., 2015). Por lo tanto, se ha comprobado que

los meristemas son las estructuras que más actividad mitótica presentan en las plantas (Vanneste, Inzé y Beeckman, 2008), ya que aquí las células son totipotentes (Nakajima y Benfey, 2002).



Las plantas han desarrollado estrategias y mecanismos de adaptación para tolerar condiciones adversas y proporcionar diversos grados de tolerancia, como son mecanismos eficientes de reconocimiento, de transducción de señales, los sistemas de expresión de genes y diversas rutas metabólicas (Bartels y Sunkar, 2005; Conde, Chaves y Gerós, 2011). También producen una variedad de hormonas vegetales o fitohormonas, las cuales se ven involucradas en los procesos de crecimiento y desarrollo, así como en varias respuestas hacia el estrés biótico y abiótico (Bari y Jones, 2009).

En muchos casos, la interacción entre fitohormonas induce señales para iniciar el crecimiento de raíces laterales (Vanneste et al., 2008). Por ejemplo, se ha comprobado que la unión de hormonas como la auxina y la citoquinina cumplen una función en la regulación de la división celular y el mantenimiento de las células madre en los meristemas apicales de brotes y raíces (Zwack y Rashotte, 2015).

2.2.3 Ciclo celular y su regulación

El ciclo celular es un proceso biológico de gran importancia en el crecimiento y desarrollo de los organismos (Inzé y De Veylder, 2006). Contrario a los animales, el desarrollo de los órganos en las plantas es post-embrionario y la división celular tiene lugar en los meristemos apicales y distales del embrión maduro, que luego continúan durante el crecimiento para producir los órganos que formarán la planta adulta (Inzé y De Veylder, 2006; De Jager, Maughan, Dewitte, Scofield y Murray, 2005).

Consta de dos fases que siguen una secuencia ordenada: la interfase y la fase M. La primera consta a su vez de: G_1 , S y G_2 que preceden a la mitosis. La fase G_1 es de intensa actividad bioquímica, ya que la célula se prepara aumentando su tamaño y en número sus organelos, membranas internas y otros componentes citoplasmáticos (De Jager et al., 2005).

La fase S, es el periodo de síntesis del material genético. Esta fase se encarga de asegurar la replicación completa de los cromosomas y permitir la reparación del DNA cuando sea necesario. Finalizada esta etapa, la célula entra a la fase G_2 , en donde se disponen las estructuras para la división celular que ocurre en la mitosis, dando como resultado final dos células hijas con la misma información genética (Evert, 2006), como se muestra en la Figura 4.

Las dos fases G (*gap*) se encargan de controlar que la fase anterior haya sido precisa y se haya completado (Scofield, Jones y Murray, 2014). Los puntos de control/regulación se ubican en los límites de G_1/S y G_2/M , los cuales son los principales sitios de arresto como resultado de la evaluación de las condiciones externas (Dewitte y Murray, 2003). La mayoría de estos puntos de control involucran la activación de una clase especial de proteínas quinasas dependientes de ciclinas llamadas CDK (de sus siglas en inglés, *Cyclin-Dependent Kinase*) (Dewitte y Murray, 2003).

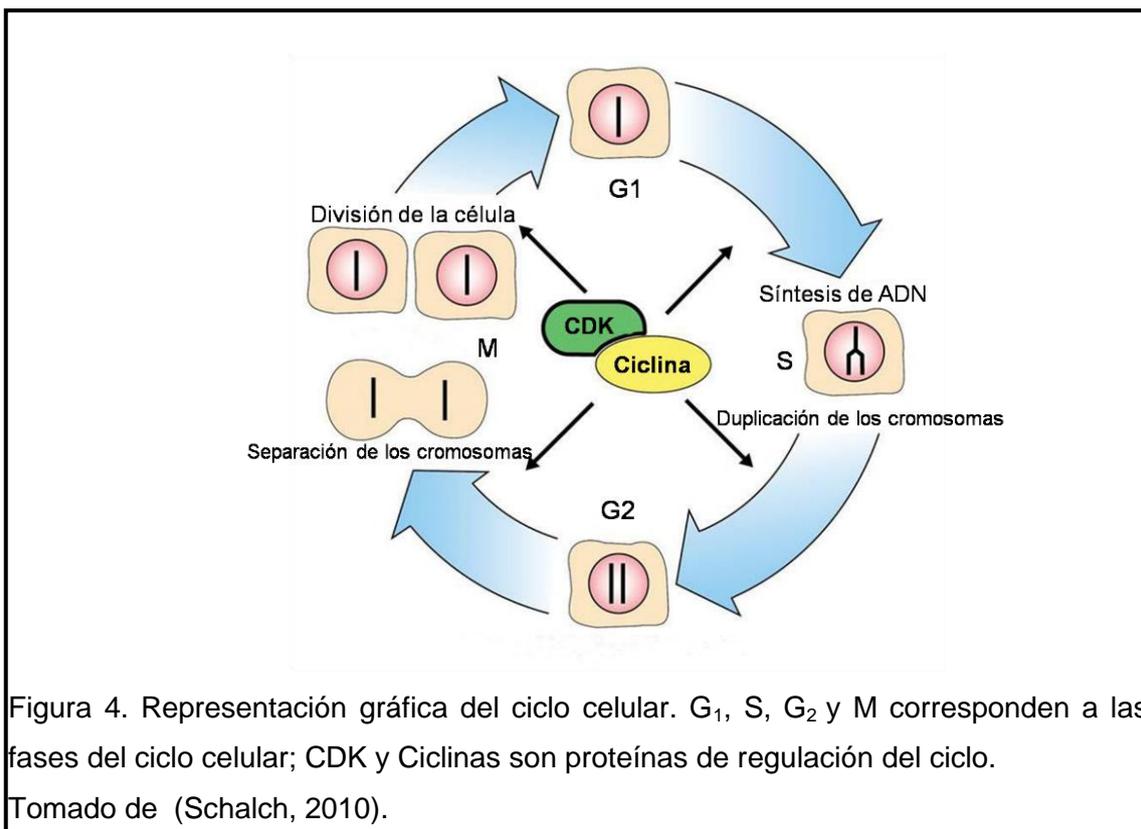


Figura 4. Representación gráfica del ciclo celular. G₁, S, G₂ y M corresponden a las fases del ciclo celular; CDK y Ciclinas son proteínas de regulación del ciclo.

Tomado de (Schalch, 2010).

Los componentes moleculares que se involucran en el ciclo celular mitótico son altamente conservados de manera funcional y estructural a través de los organismos eucariotas. Sin embargo, la regulación transcripcional del ciclo celular puede ser diferente entre especies (Inzé y De Veylder, 2006). Esta flexibilidad evolutiva permite entender cómo ciertas características específicas del ciclo celular han ido evolucionando, o cómo las divisiones celulares conducen al desarrollo de nuevos órganos (Sterken et al., 2009).

La variación fenotípica natural analizada en *A. thaliana* se da por varios rasgos de la planta afines con el ciclo celular, como son la tasa de crecimiento de la raíz, la velocidad de desarrollo y la tasa de endoreduplicación (Sterken et al., 2009). Sin embargo, es complicado predecir si la variación genética presente en los genes del ciclo celular podría impulsar a la variación fenotípica natural de las especies (Sterken et al., 2009).

Por esta razón, el conocimiento de la interdependencia entre el control de la división celular y la morfogénesis aún es desconocido (Suzuki, Nakajima, Inagaki, et al., 2005). En tal sentido, los estudios sobre cómo los genes son regulados en el ciclo celular son complejos y se deben continuar para entender los mecanismos de desarrollo y control durante el crecimiento de la planta.

Uno de los genes involucrados en el paso y regulación del ciclo celular es el *TONSOKU (TSK)*, quien juega un papel importante en el control de la división celular y la morfogénesis de las plantas (Suzuki, Nakajima, Morikami y Nakamura, 2005; Suzuki et al., 2004;) Se ha demostrado que está presente en *A. thaliana* y que codifica para una proteína de dominio nuclear que es la Leucina-Glicina-Asparagina (LGN) (Suzuki, Nakajima, Morikami, et al., 2005).

Este gen se encuentra involucrado además en el mantenimiento del genoma (Suzuki et al., 2004), por lo que mutaciones en *TSK* provocan la desorganización en las estructuras de los meristemos, la hipersensibilidad a agentes que dañan el DNA y el aumento de la recombinación homóloga (Suzuki, Nakajima, Morikami y Nakamura, 2005).

Los estudios muestran que la expresión de *TSK* es dependiente del ciclo celular, por lo tanto, los defectos en este gen pueden causar la activación del punto de control del ciclo celular haciendo que se detenga la progresión del mismo, es decir que retardan la transición del ciclo celular de la fase G_2 a la fase M (Suzuki, Nakajima, Inagaki, et al., 2005).

Establecer la correlación entre las respuestas fisiológicas de las plantas y la activación de genes permite mejorar el entendimiento sobre los efectos de los bioestimulantes y el comportamiento de los mismos en diferentes especies vegetales (Bulgari et al., 2014). La importancia de estudiar la expresión génica puede mostrar indicios sobre los mecanismos de regulación, las vías bioquímicas y las funciones celulares que están siendo afectadas con el uso de los bioestimulantes (Ertani et al., 2013; Santaniello et al., 2013).

Herramientas moleculares

Actualmente, el uso de las herramientas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y la secuenciación se han convertido en las técnicas más utilizadas para la identificación de los mecanismos de acción de moléculas antes desconocidos (Ochman, Gerber y Hartl, 1988).

En la PCR convencional o de punto final la detección y cuantificación de la amplificación de una determinada secuencia son analizadas al final de los ciclos de la PCR en un gel de electroforesis y un analizador de imágenes como un fotodocumentador. En la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa, los productos de amplificación son medidos en cada ciclo mediante el monitoreo de la reacción durante la amplificación exponencial. Aquí se puede determinar la cuantificación inicial del gen diana de forma precisa mediante la señal de fluorescencia que indica la formación del producto (Kubista et al., 2006; Klein, 2002).

Por otro lado, la RT-PCR permite la síntesis del DNA complementario (cDNA, de sus siglas en inglés *Complementary DNA*) a partir de cadenas de RNA, proporcionando un método rápido y sensible para el análisis de la expresión génica. Este tipo de RT-PCR se utiliza para detectar o cuantificar la expresión de transcritos, aún si las cantidades de RNA son limitadas (Kubista et al., 2006).

En los análisis del PCR en tiempo real, las curvas de respuesta no muestran las cantidades iniciales de las moléculas diana. Estas se separan en la fase de crecimiento de la reacción. Esta diferencia se cuantifica comparando el número de ciclos de amplificación requeridos para las curvas, en relación a las muestras para llegar a un determinado nivel de señal del umbral de fluorescencia. El número de ciclos *Ct* (por sus siglas en inglés *Cycle Threshold*) es necesario para conocer el umbral de la fase de la reacción y los

niveles en los cuales este puede ser crítico. Existen dos tipos de cuantificación de la PCR en tiempo real, la absoluta y la relativa. La cuantificación absoluta generalmente es utilizada para determinar cargas virales, la presencia de agentes patogénicos y/o transgénicos y permite detectar el número exacto de moléculas de DNA o RNA en una muestra. Por otro lado, la cuantificación relativa es utilizada principalmente en estudios de expresión génica. Este tipo de cuantificación mide los cambios en el estado basal de un gen de interés en relación a la expresión de un gen de referencia o control (Aguilera, Tachiquín, Graciela, Munive y Olvera, 2015).

Diversos programas informáticos usan métodos y algoritmos para calcular la expresión de los genes diana. Uno de los más usados es el modelo de Livak y Schmittgen (2001); puesto que este viene incluido en la mayoría de los equipos de tiempo real.

Este modelo permite calcular los cambios en la expresión génica mediante una diferencia entre la muestra experimental y una muestra calibrador. Para que el modelo se cumpla es necesario tener una eficiencia del 100%, que indica la máxima amplificación de las muestras en cada ciclo (Livak y Schmittgen, 2001). El modelo se deriva de la siguiente manera:

El modelo se deriva de la ecuación que representa la amplificación exponencial del PCR:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,x}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde X_n corresponde al número de moléculas del gen X, X_0 es el número inicial de moléculas del gen X; E_x es la eficiencia de la amplificación y n es el número de ciclos. El C_t corresponde a la separación en donde la fluorescencia de gen alcanza el límite del umbral:

$$X_T = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,x}} = K_x \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde X_T corresponde al número de moléculas del gen X en el ciclo C_t , C_{TX} corresponde al ciclo C_t del gen X y K_x es una constante. Esta ecuación es similar para un gen de referencia endógeno (gen de control interno), en donde la reacción es:

$$R_n = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde R_T corresponde al número de moléculas del gen de referencia; R_0 es el número inicial de las moléculas del gen de referencia; E_R corresponde a la eficiencia de amplificación del gen de referencia; C_{TX} corresponde al ciclo C_t del gen de referencia y K_x es una constante del gen de referencia. Dividiendo la ecuación 2 y 3, tenemos la siguiente expresión:

$$\frac{X_T}{R_n} = \frac{X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_x}{K_R} = K \quad (\text{Ecuación 4})$$

Asumiendo que la eficiencia del gen de referencia es igual a la eficiencia del gen X, la ecuación queda así:

$$E_x = E_R = E,$$

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K, \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K, \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde X_N es igual a la cantidad normalizada del gen X (X_0/R_0) y el valor de ΔC_T es igual a la diferencia de los C_t s del gen diana y del gen de referencia. AL ordenar la ecuación queda de la siguiente manera:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Para finalizar, se divide el X_N de cualquier muestra q , que se define como el tratamiento a ser evaluado, para el X_N de la muestra calibrador (Walti et al.,2002):

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T} \quad (\text{Ecuación 8})$$

$$-\Delta \Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb})$$

Para amplicones delineados menores de 150 pb, en donde las concentraciones de los primers y Mg²⁺ se han optimizado, la eficiencia de amplificación es cercana a 1. Por lo tanto, la cantidad del gen diana normalizada a un control endógeno o control interno y relativo a una muestra calibrador queda definido de la siguiente manera:

$$\text{Cantidad del gen diana} = 2^{-\Delta \Delta C_T} \quad (\text{Ecuación 9})$$

3. Capítulo III. Materiales y Métodos

Material Vegetal

Para el desarrollo de este Proyecto se emplearon semillas botánicas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (ecotipo Columbia-0). Las semillas fueron obtenidas y donadas gentilmente por el Dr. Juan Carlos Cabrera Pino (Unité de Biotechnologie, Belgium).

Oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos

La mezcla de oligosacáridos derivados de hongos (GO) fue obtenida por el Dr. Juan Carlos Cabrera Pino (Unité de Biotechnologie, Belgium). La divulgación de la composición química o formulación de los oligosacáridos está restringida hasta tanto no se patenten los mismos.

3.1 Evaluación del efecto de oligosacáridos derivados de hongos sobre el porcentaje de germinación y desarrollo morfológico de plantas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas fueron desinfectadas en condiciones de esterilidad en flujo laminar horizontal mediante la inmersión en una solución de hipoclorito de sodio y agua destilada (1:10) durante 5 minutos. Posteriormente, se retiró esta solución y se le añadió una mezcla de etanol, agua destilada e hipoclorito de sodio (7:2:1) por 5 minutos. Pasado este tiempo, se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas fueron colocadas en placas Petri cuadradas (10 x 10 cm) con medio sólido básico de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), con o sin bioestimulantes, dependiendo del tratamiento.

Los tratamientos que se aplicaron se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos usados para los experimentos.

Denominación del tratamiento	Tipo de tratamiento	Composición de los medios de cultivos
MS	Control negativo	MS sin suplementar
GO 1 mg.L⁻¹	Medios suplementados	MS con GO a 1 mg.L ⁻¹
GO 5 mg.L⁻¹		MS con GO a 5 mg.L ⁻¹

Nota: GO es la mezcla de oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos usados como bioestimulantes; MS: medio sólido básico de Murashige y Skoog.

Se colocaron 6 semillas por placa a una distancia de aproximadamente 1 cm en el extremo superior de cada caja Petri. Se sembraron 8 réplicas por cada tratamiento, 4 para dejar durante 15 días para los análisis de germinación y morfológicos de la raíz y 4 para crecer 21 días y determinar el peso fresco de las plantas.

Las cajas fueron selladas con parafilm y se colocaron en refrigeración a 4 °C y a la oscuridad durante 72 horas para asegurar la imbibición y germinación de las semillas (Dubrovsky, Soukup, Napsucialy, Jeknić y Ivanchenko, 2009).

Luego de este tiempo las cajas se trasladaron a una incubadora bajo condiciones controladas de temperatura a 23 °C, humedad relativa al 50 % y ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas, respectivamente. Dentro de estas condiciones las cajas Petri fueron colocadas verticalmente en soportes, de tal forma que las semillas se encontraran en la parte superior de las placas respecto a la gravedad para asegurar un desarrollo óptimo de las raíces y una

mejor visualización de las mismas (Dubrovsky et al., 2009). Se realizaron 3 repeticiones del experimento en momentos diferentes.

Transcurridos los 15 días, se determinó en cada tratamiento el porcentaje de germinación, considerando como criterio de germinación la formación de una plántula, quedando eximidas las semillas que rompieron la testa y no se formó una planta completa. Para la evaluación del desarrollo morfológico, las plantas fueron fijadas con una solución de etanol: ácido acético glacial (3:1) y se conservaron a 4 °C durante 72 horas. Las variables medidas en este ensayo fueron la longitud de la raíz primaria, el número de raíces secundarias, el número de raíces laterales, el número de primordios y la densidad de las raíces laterales por planta (Dubrovsky et al., 2009).

Para la medición de cada una de las variables, las plantas fijadas se extrajeron de las cajas y se colocaron sobre un portaobjetos para asegurar la extensión total de la raíz primaria. Seguido, mediante la ayuda de un estereomicroscopio (Olympus, Modelo SZ61) y el programa de análisis de imagen de la cámara digital Infinity acoplada al estereomicroscopio, se procedió a medir las raíces, cuya medida se expresó en milímetros (mm) (Dubrovsky et al., 2009). Se determinó el número total de raíces laterales (RL) y secundarias (RS) mediante la observación en el microscopio, diferenciando las raíces laterales de los primordios (P) de la raíz.

Finalmente, se calculó la densidad de las raíces laterales por planta (D) mediante la siguiente ecuación:

$$D = \frac{RL+P}{L}$$

(Ecuación 10)

En donde, **RL + P** es la sumatoria del número de raíces laterales (RL) y el número de primordios (P), y **L** es la longitud de la raíz primaria expresada en mm (Dubrovsky, Gambetta, Hernández, Shishkova y González, 2006).

A los 21 días se determinó el peso fresco, tomando como muestra a 6 plantas por cada placa, para un total de 4 muestras por tratamiento. Su peso se expresó en gramos (g). Se realizaron 3 repeticiones por cada experimento.

En este estudio, el análisis estadístico consistió en un diseño completamente al azar (DCA), siendo las variables independientes los tres tratamientos con los oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos (GO). Las variables dependientes fueron el porcentaje de germinación, la longitud de raíz primaria, el número de raíces secundarias, la densidad de las raíces laterales por planta y el peso fresco.

Para comparar el efecto de los tratamientos sobre las variables de medición se empleó un método no paramétrico como el test de Kruskal Wallis mediante el empleo del paquete estadístico InfoStat (versión 2004).

3.2 Determinación de la expresión relativa de un gen implicado en el ciclo celular de las plantas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*

Para este experimento se realizó la siembra de semillas en medio líquido básico de MS. Para la desinfección de las mismas se siguió el protocolo anteriormente descrito en el acápite 3.1, pero se conservaron en agua destilada durante 72 horas a 4 °C para asegurar su imbibición y germinación. Pasado ese tiempo se sembraron en frascos de cultivo de 300 mL que contenían 100 mL de medio MS básico. Posteriormente, los frascos se colocaron en un agitador orbital a 150 rpm de agitación en la incubadora y bajos las mismas condiciones controladas previamente descritas en el acápite 3.1.

Transcurridos 15 días de crecimiento, 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. Estas fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Posteriormente se pasó a realizar las inducciones con los diferentes tratamientos. Para ello, las plantas se transfirieron a 100 mL de cultivo fresco con los tres tratamientos usados en el medio sólido (Tabla 1). Para cada uno se colocaron dos frascos de cultivo, uno por cada tiempo a coleccionar y de esta manera no inducir estrés en las plantas durante la toma de muestras.

La toma de muestras de cada uno de los tratamientos inducidos se realizó a las 24 y 72 horas posteriores a la inducción. Para ello, igualmente se tomaron hojas de plantas, las cuales fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción de RNA total. Se congelaron 5 réplicas por cada tratamiento. Se realizaron 2 repeticiones del experimento en momentos diferentes.

Para la extracción del RNA total de las muestras congeladas se empleó el juego de reactivos *Pure link® RNA mini kit* (Ambion), siguiendo el protocolo de uso descrito por el fabricante. Posteriormente, para eliminar los residuos de DNA, el RNA total extraído fue tratado con *RQ1 DNase* (Promega) siguiendo las instrucciones de uso.

La calidad del RNA resultante se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa y se cuantificó mediante el espectrofotómetro Synergy ht (BIOTEK). Posteriormente se hicieron diluciones de los RNA, de tal manera que se tuviera la misma cantidad en $\text{ng}/\mu\text{L}$ en todas las muestras a analizar. Las mismas se conservaron igualmente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Para la PCR en tiempo real primeramente se diseñaron los cebadores específicos del gen *TONSOKU (TSK)* para *A. thaliana* a partir de secuencias

informadas en la base de datos TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, <https://www.arabidopsis.org/>). La secuencia que se utilizó tiene el número de accesión AT3G18730 (BRUSHY 1). Los cebadores se diseñaron con el empleo del programa Primer3 disponible online (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) y se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores específicos diseñados para la amplificación del gen *TONSOKU* (*TSK*).

Gen	Identificación de los cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño esperado del fragmento
<i>TSK</i>	AtTSK-D	ACGCAAGAACCATATCGTGAAAGAG	100 pb
	AtTSK-R	GGCTTCAACTGAGAACCCATTGTT	

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

Por último, se realizó la síntesis del DNA complementario y la amplificación del gen *TONSOKU* en un solo paso, mediante el uso el juego de reactivos *SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit* (Life Technology), siguiendo el manual de uso del fabricante.

Para el desarrollo de la técnica de PCR en tiempo real se definió al medio MS en tiempo 0 (t_0) como control interno y el gen *TONSOKU* como gen diana. Previamente, se hicieron diluciones de los RNAs totales extraídos de las muestras para obtener 300 ng/ μ L para la reacción de la PCR en tiempo real. Para cada reacción de la PCR en tiempo real se preparó una mezcla de 25 μ L que se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Volumen y componentes de la reacción de PCR en tiempo real

Componente	Concentración	Volumen
RNA molde	300 ng/ μ L	1 μ L
SYBR® Green	2X	12,5 μ L
Cebador Directo	10 μ M	0,5 μ L
Cebador Reverso	10 μ M	0,5 μ L
Enzima <i>SuperScript® III RT/Platinum® Taq</i> polimerasa	1 U	0,5 μ L
Agua DEPC	A completar volumen final	10 μ L
TOTAL	25 μL	

Se programaron las temperaturas óptimas y el tiempo de incubación para llevar a cabo la síntesis de cDNA, seguida por la amplificación por PCR como se muestra en la Tabla 4. Las amplificaciones y análisis posteriores se realizaron en el equipo CFX96 *Real-time PCR System* (BIO-RAD Laboratories).

Tabla 4. Programa de tiempo real para la síntesis de cDNA y amplificación del gen *TONSOKU*

Programa de Ciclado estándar
50 °C por 3 minutos
95 °C por 5 minutos
40 ciclos de: <div style="padding-left: 40px;">95 °C por 15 segundos</div> <div style="padding-left: 40px;">60 °C por 45 segundos</div> 40 °C, 1 minuto
Curva de fusión: de los 65 °C a los 95 °C con una velocidad de calentamiento de 0,5 °Cs ⁻¹

Análisis de la expresión relativa del gen *TSK*

Cada muestra se analizó por triplicado dentro de una misma placa de PCR y para estimar el número de transcritos del gen se tomó el promedio de los valores obtenidos expresados en Cq (número de ciclos en el cual la fluorescencia se ha incrementado por encima de la base) (Jordan y Kurtz, 2000). Para la determinación del Cq se usó un límite simple y el método de base auto calculado por el equipo, predeterminado para el fluoróforo SYBR.

Para el análisis de la expresión relativa del gen *TONSOKU* se realizó la comparación relativa de la unidad de masa (ng/μL de ácido nucleico) (Ecuación 11) de las muestras a las 24 y 72 horas con respecto al tiempo 0 (t_0) como muestra control, utilizando el modelo de expresión de Livak y Schmittgen, (2001) modificado con un solo gen de análisis:

$$Exp = 2^{-\Delta Ct} \quad (\text{Ecuación 11})$$

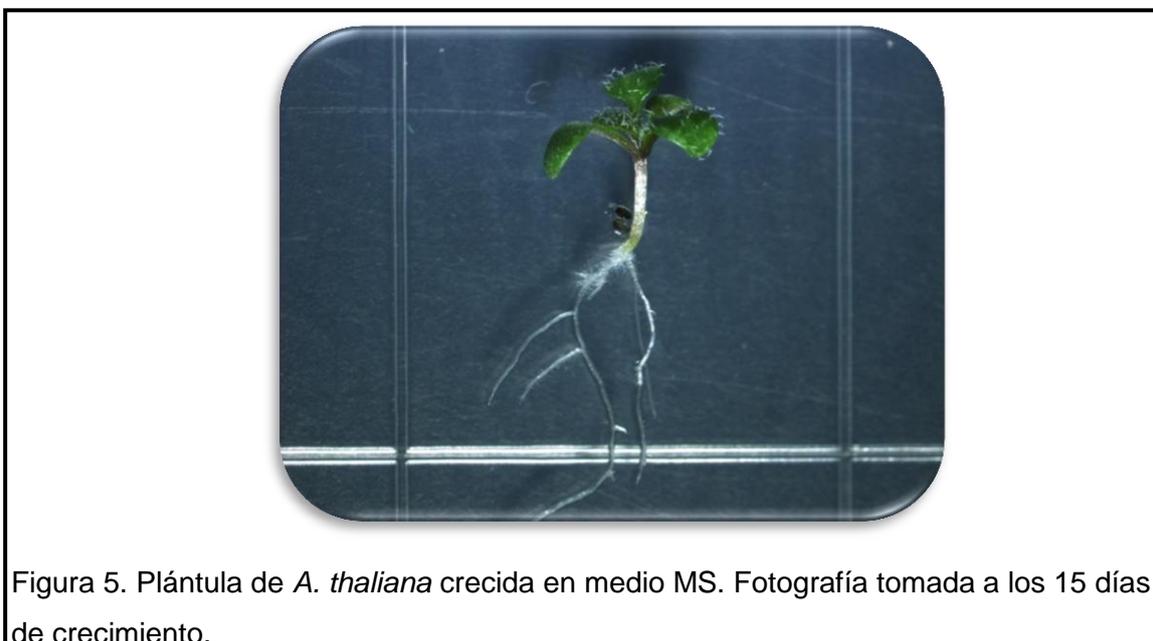
$$\Delta Ct = Ct_x - Ct_{cb}$$

En donde, Ct_x corresponde al valor de Ct de los tratamientos en estudio y el Ct_{cb} es el valor del Ct del tratamiento calibrador, en este caso el calibrador corresponde al MS en tiempo cero (t_0). Este modelo es utilizado para analizar la expresión relativa de los datos cuando solo se tiene un gen de estudio o no se utiliza un gen constitutivo o "*housekeeping gene*" (Livak y Schmittgen, 2001).

4. CAPÍTULO VI. RESULTADOS

Material vegetal

Las plantas de *A. thaliana* donadas por el Dr. Cabrera fueron mantenidas en tubos eppendorf de 1,5 mL a 4°C hasta su utilización en el ensayo. La formación de una plántula fue el parámetro descriptivo que se tomó como criterio de inclusión de los experimentos.



4.1. Evaluación del efecto de oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos sobre el porcentaje de germinación y el desarrollo morfológico de plantas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*

Los resultados obtenidos en relación al porcentaje de germinación a los 15 días de cultivo de *A. thaliana* se muestran en la Figura 6. Se puede observar

que los tratamientos MS y GO 1 mg.L⁻¹ presentan el mismo porcentaje de germinación; sin embargo, el GO 5 mg.L⁻¹ fue el que menor porcentaje de germinación mostró (73,6 %). De este modo, los medios MS y GO 1 mg.L⁻¹ son 1,08 veces mayor que el GO 5 mg.L⁻¹.

El análisis de Krustal Wallis mostró que no hay diferencias entre los tratamientos, puesto que el valor de H (0,956) es mayor al nivel de significancia ($p > 0,05$).

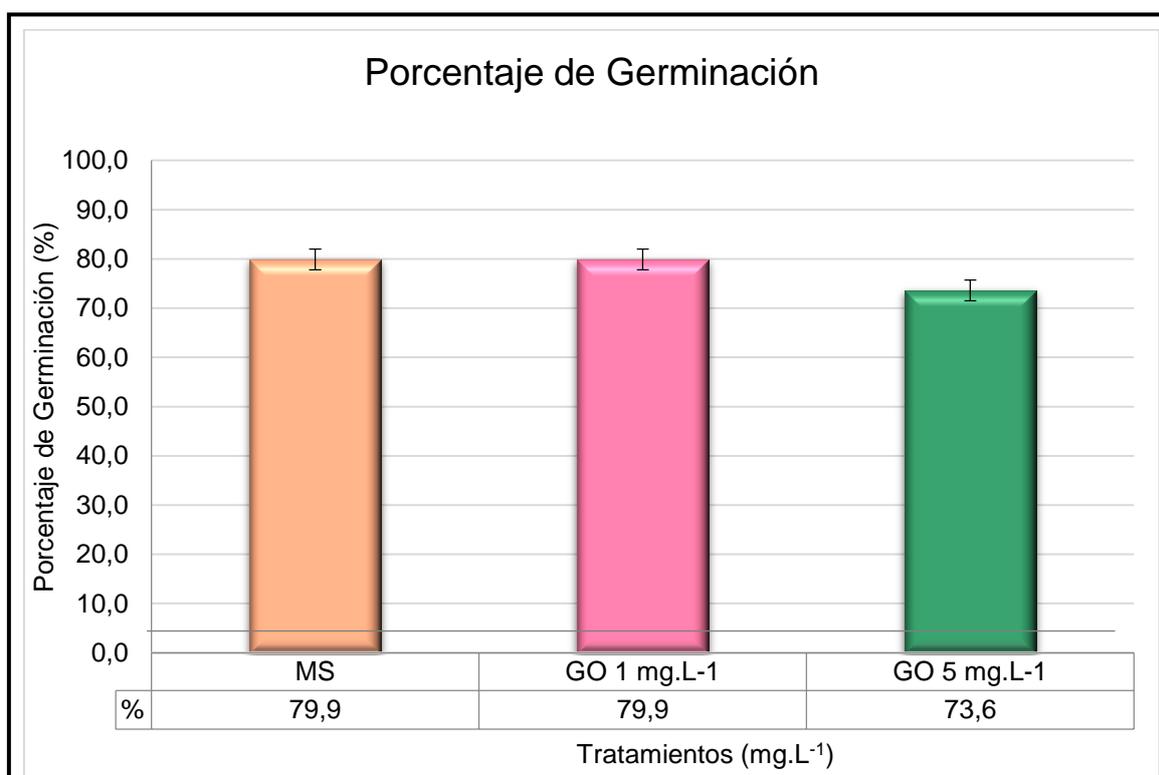


Figura 6. Valores de las medias del porcentaje de germinación obtenidos a los 15 días de crecimiento de *A. thaliana* con los diferentes tratamientos.

Los resultados obtenidos del análisis de la morfología de las raíces de plantas de *A. thaliana* con 15 días de edad, mostraron que las que crecieron en presencia de GO 1 mg.L⁻¹ tuvieron un incremento en la longitud de la raíz primaria con respecto al control negativo MS y al GO 5 mg.L⁻¹, siendo así que

el tratamiento GO 1 mg.L⁻¹ fue 1,30 y 1,73 veces mayor que el control negativo (MS) y el tratamiento de GO 5 mg.L⁻¹, respectivamente (Figura 7).

Sin embargo, mediante el análisis de Kruskal Wallis se evidenció que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, ya que el valor de H (32,84) es mayor al nivel de significancia ($p > 0,05$) (Figura 8).

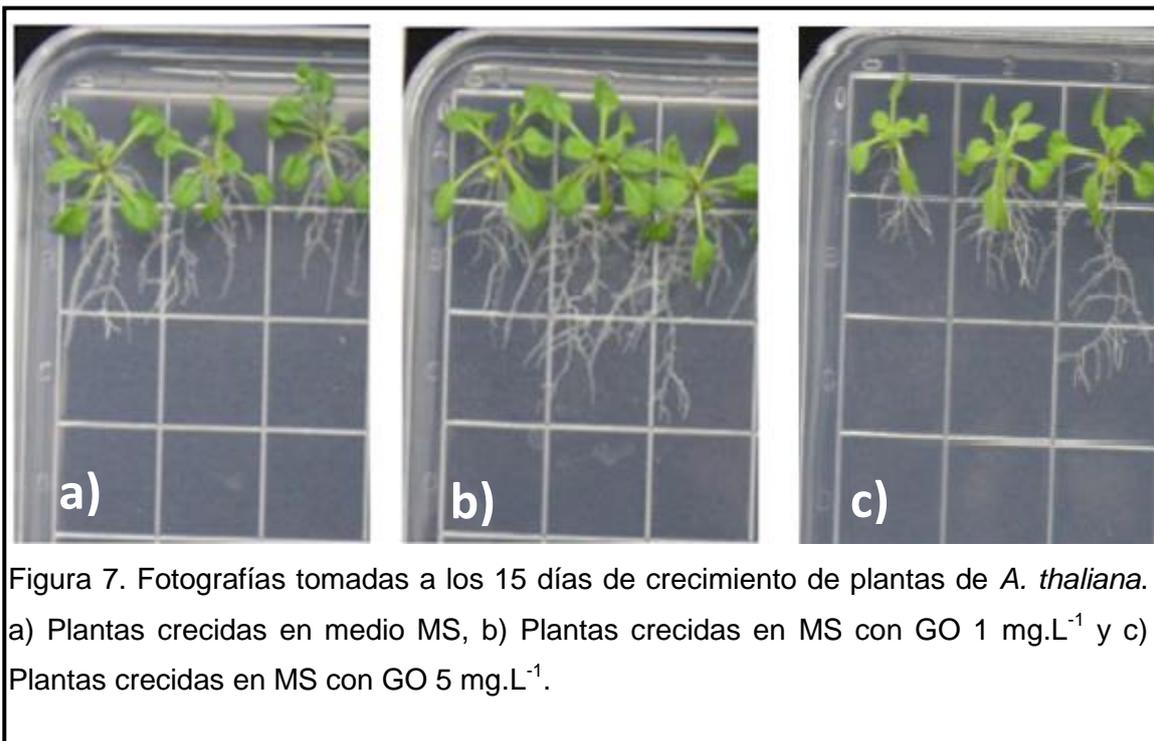
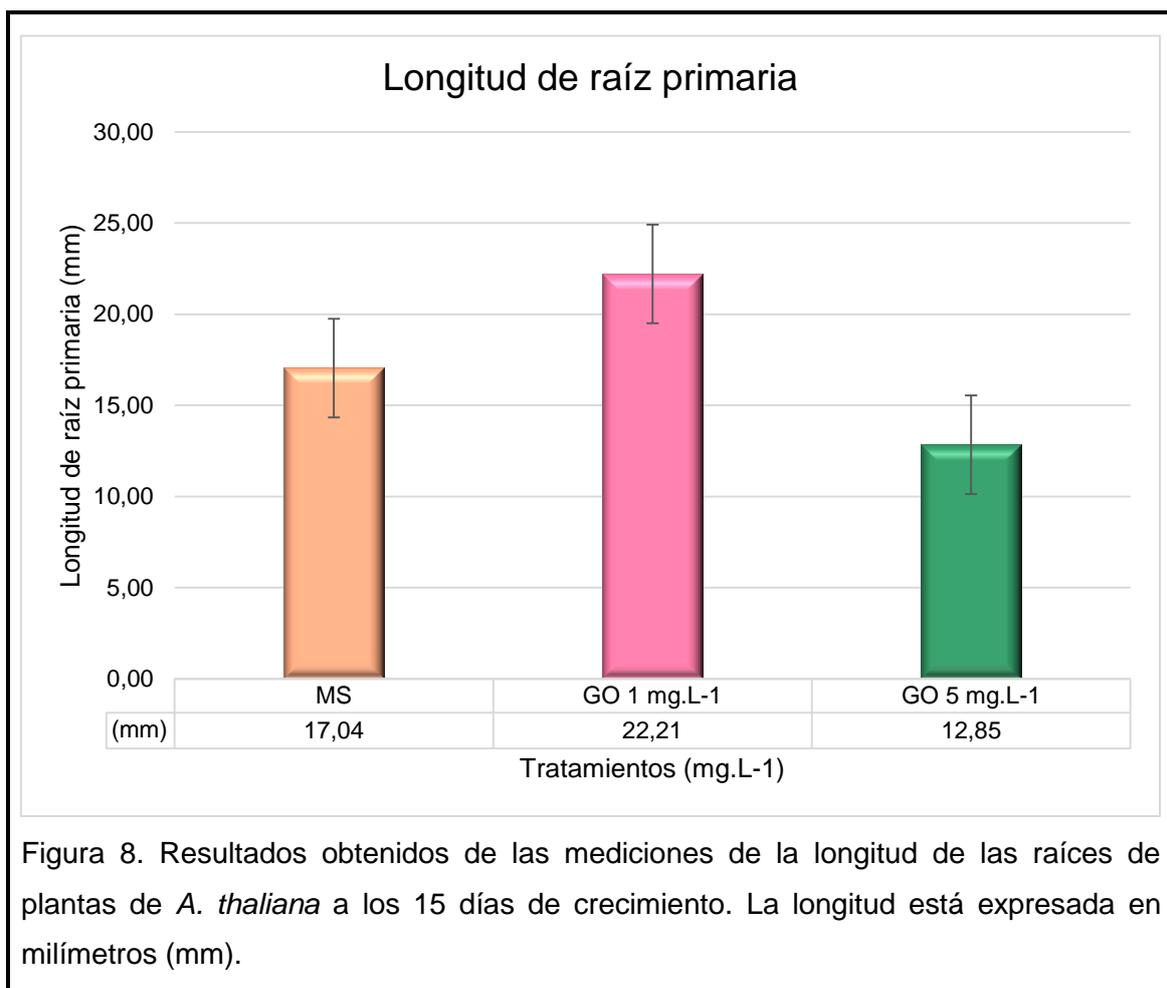
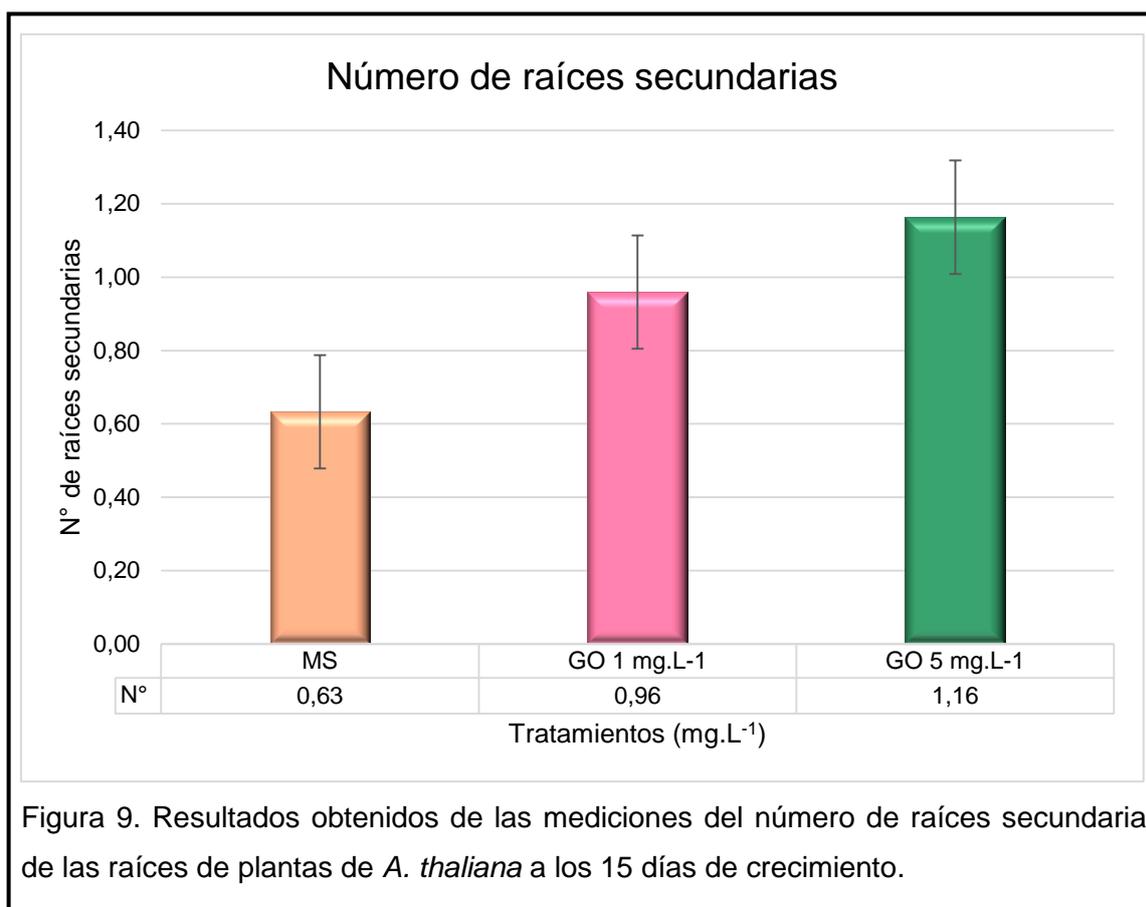


Figura 7. Fotografías tomadas a los 15 días de crecimiento de plantas de *A. thaliana*. a) Plantas crecidas en medio MS, b) Plantas crecidas en MS con GO 1 mg.L⁻¹ y c) Plantas crecidas en MS con GO 5 mg.L⁻¹.



Sin embargo, se encontró que el tratamiento GO 5 mg.L⁻¹ produjo un incremento sobre el número de raíces secundarias con respecto al MS control, de la misma manera que el GO 1 mg.L⁻¹, aunque en este caso fue inferior al GO 5 mg.L⁻¹ (Figura 7). De esta manera, se pudo observar que el tratamiento GO 5 mg.L⁻¹ fue 1,84 y 1,21 veces mayor que el control negativo (MS) y el tratamiento de GO 1 mg.L⁻¹, respectivamente (Figura 9).

No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente entre los tratamientos mediante el análisis de Kruskal Wallis, ya que el valor de H (6,72) supera al nivel de significancia ($p > 0,05$).



Adicionalmente, en los resultados obtenidos con respecto a la densidad de las raíces laterales por planta, se pudo observar que el tratamiento de GO 5 mg.L⁻¹ es 1,79 y 1,19 veces mayor al de GO 1 mg.L⁻¹ y MS, respectivamente (Figura 7). Por el contrario, se pudo observar que el tratamiento de GO 1 mg.L⁻¹ presentó el menor incremento frente a los tratamientos evaluados, siendo 1,5 veces menor que el control MS.

Sin embargo, mediante el análisis de Kruskal Wallis se evidenció que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, debido a que el valor del estadístico H (12,42) es superior al nivel de significancia ($p > 0,05$) (Figura 10).

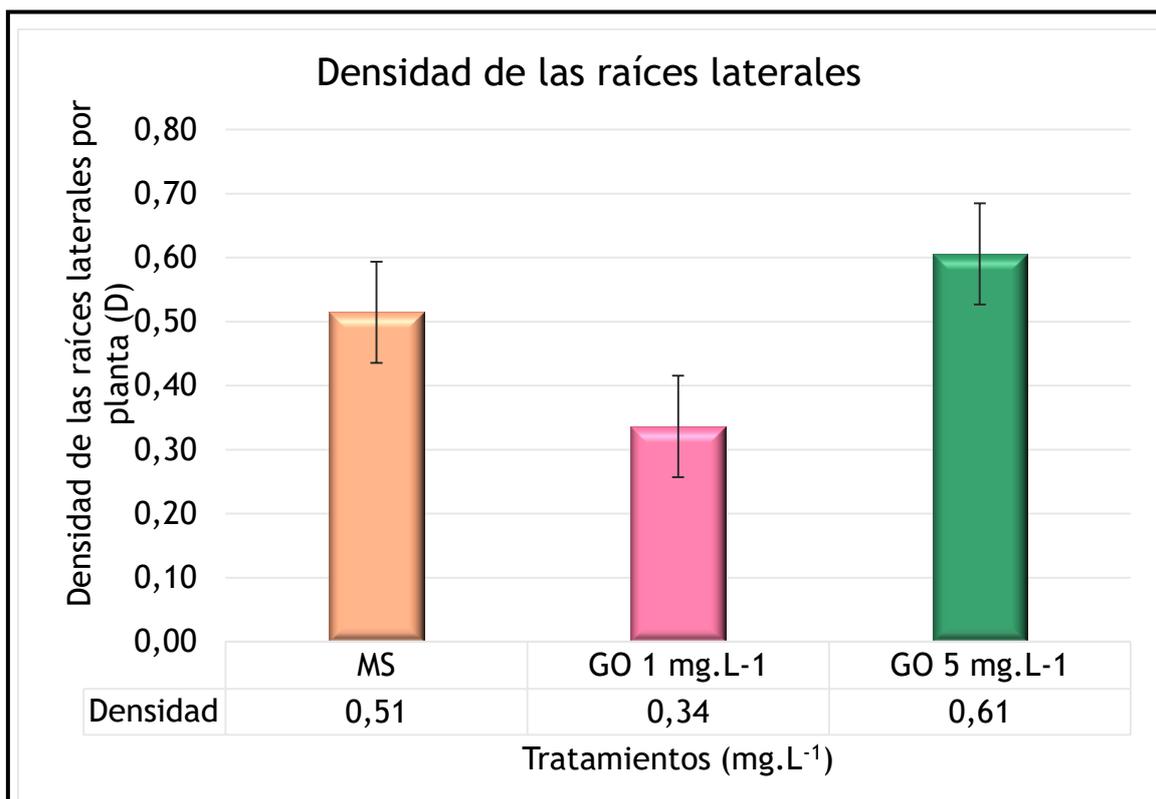
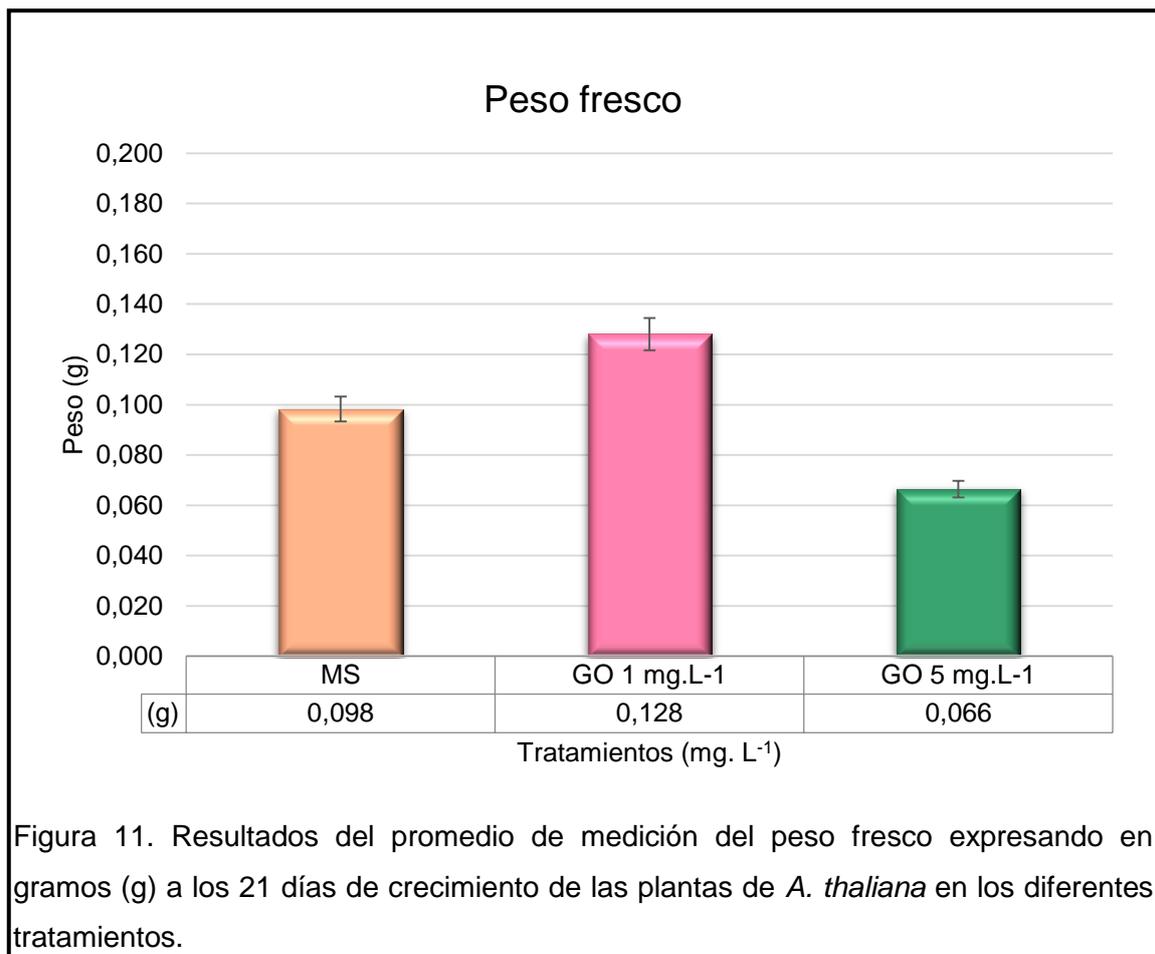


Figura 10. Resultados obtenidos de las mediciones de la densidad de las raíces de plantas de *A. thaliana* a los 15 días de crecimiento. La densidad (D) de la raíces está expresada como la sumatoria del número de raíces laterales (RL) y el número de primordios (P), sobre L que es la longitud de la raíz primaria expresada en mm (Dubrovsky et al., 2006).

Los resultados obtenidos del peso fresco fueron evaluados mediante el test de Kruskal Wallis, el cual evidenció que no existieron diferencias estadísticamente significativas para esta variable ya que el valor de H (1,74) superó el nivel de significancia ($p > 0,05$).

Sin embargo, se pudo observar que el GO 1 mg.L⁻¹ fue el tratamiento que mostró un ligero incremento con respecto al resto de los tratamientos. De esta manera, los valores del peso de las plantas crecidas en GO 1 mg.L⁻¹ fueron 1,3 y 1,94 veces superiores con respecto al MS y al GO 5 mg.L⁻¹, respectivamente (Figura 11). Siendo así que, los resultados obtenidos con GO 5 mg.L⁻¹ fueron los más bajos en relación a los demás tratamientos.



Los datos obtenidos de los resultados de la morfología y peso fresco de las plantas se resumen en la Tabla 5. En la misma se resaltan en negrillas los valores más altos obtenidos para cada tratamiento en las variables analizadas, aunque en ninguno de los casos se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. En la misma se puede observar que el tratamiento GO 1 mg.L⁻¹ tuvo un mayor incremento en las variables de germinación, longitud de raíz primaria y peso fresco. Por el contrario, el tratamiento GO 5 mg.L⁻¹ mostró los valores más altos al medir el número de raíces secundarias por planta y en la densidad de raíces laterales.

Tabla 5. Tabla resumen de los resultados obtenidos de la morfología y peso fresco de las plantas de *A. thaliana*.

Variables analizadas	Tratamientos	Resultados
Germinación (%)	MS	79,9
	GO 1 mg.L⁻¹	79,9
	GO 5 mg.L ⁻¹	73,6
Longitud de la raíz primaria (mm)	MS	17,04
	GO 1 mg.L⁻¹	22,21
	GO 5 mg.L ⁻¹	12,85
Número de raíces secundarias (N°)	MS	0,63
	GO 1 mg.L ⁻¹	0,96
	GO 5 mg.L⁻¹	1,16
Densidad de raíces laterales (D)	MS	0,51
	GO 1 mg.L ⁻¹	0,34
	GO 5 mg.L⁻¹	0,61
Peso fresco (g)	MS	0,098
	GO 1 mg.L⁻¹	0,128
	GO 5 mg.L ⁻¹	0,066

4.2. Determinación de la expresión relativa de un gen implicado en el ciclo celular de plantas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*

La calidad de los RNA purificados y posteriormente tratados con DNAase se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12. En todos los casos se obtuvo muestras de una calidad adecuada para el análisis de PCR, sin degradación y libres de DNA. A partir de los resultados de la cuantificación se realizaron las diluciones para tener concentraciones homogéneas de 300 ng/μL.

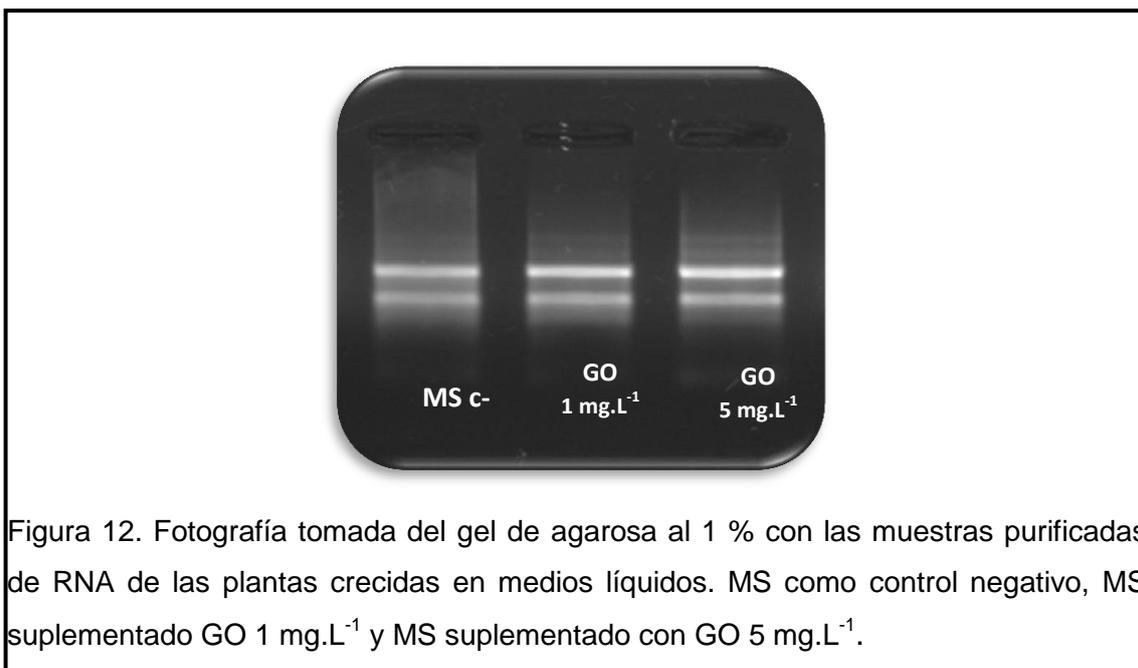


Figura 12. Fotografía tomada del gel de agarosa al 1 % con las muestras purificadas de RNA de las plantas crecidas en medios líquidos. MS como control negativo, MS suplementado GO 1 mg.L⁻¹ y MS suplementado con GO 5 mg.L⁻¹.

Posteriormente, se analizó la expresión relativa del gen *TONSOKU* (*TSK*) mediante la PCR en tiempo real, usando los cebadores específicos diseñados para este gen (Tabla 1) y con el MS en tiempo cero (t_0) como control interno. Estos cebadores resultaron ser adecuados para la amplificación específica del gen de interés, lo cual se evidenció con un pico único obtenido mediante el análisis de la curva de temperatura de fusión del cebador (Figura 13). De la misma manera, se observó que no hubo disociación o presencia de dímeros de cebadores durante la amplificación.

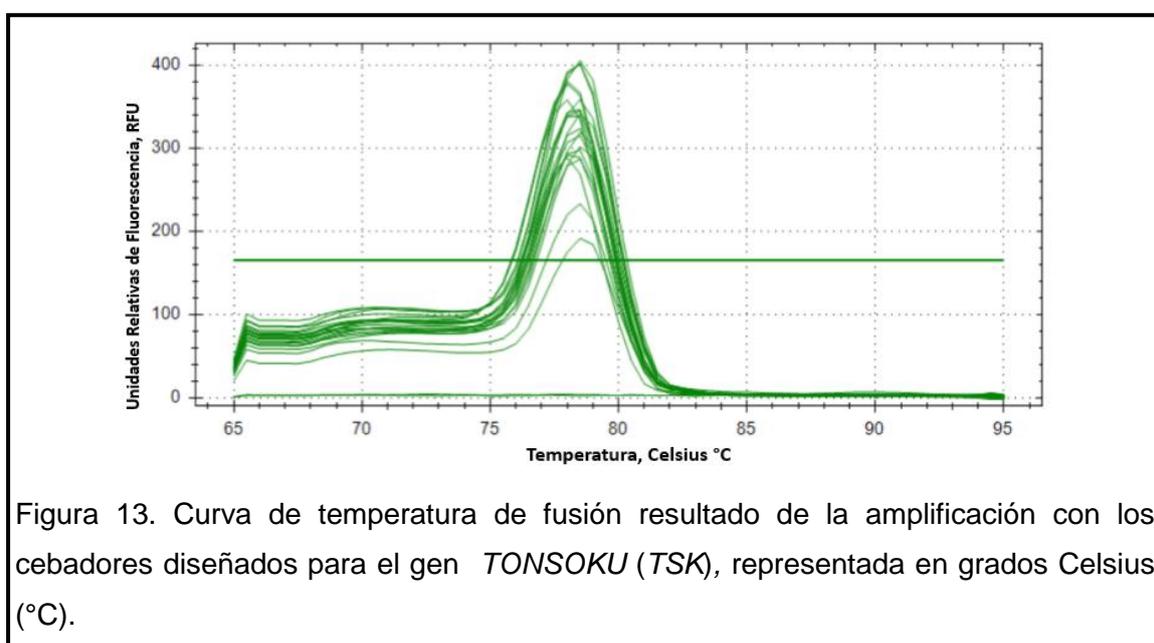


Figura 13. Curva de temperatura de fusión resultado de la amplificación con los cebadores diseñados para el gen *TONSOKU* (*TSK*), representada en grados Celsius (°C).

En todas las réplicas evaluadas se obtuvo una eficiencia del 100 %, en donde los valores de los Cq fueron expresados en unidades logarítmicas en relación al control interno (MS en tiempo cero (t_0)).

Los resultados de la evaluación de la expresión génica relativa del gen *TONSOKU* se muestran en la Tabla 6 y Figura 14, en donde se detallan los tratamientos a las diferentes horas de inducción.

Tabla 6. Resultados de la expresión relativa del gen *TONSOKU* (TSK).

Tratamiento	Tiempo	Expresión relativa
Control t_0	Tiempo 0	1,000
MS	24 horas posteriores a la inducción	4,677
GO 1 mg.L ⁻¹		2,421
GO 5 mg.L ⁻¹		3,417
MS	72 horas posteriores a la inducción	0,938
GO 1 mg.L ⁻¹		0,676
GO 5 mg.L ⁻¹		0,706

Donde: t_0 corresponde con el tiempo 0, MS es el medio básico Murashine y Skoog, GO son los oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos a una concentración final de 1 mg.L⁻¹ y 5 mg.L⁻¹.

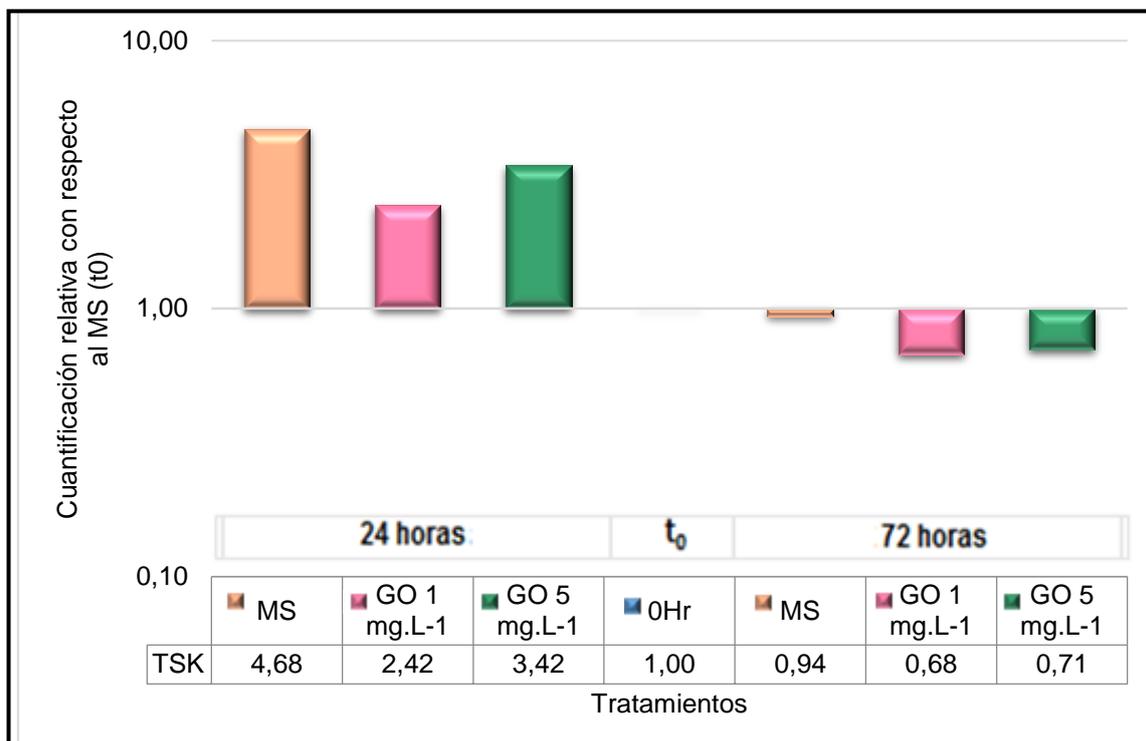


Figura 14. Figura que representa la cuantificación de la expresión relativa del gen *TONSOKU* (*TSK*) medida en los tratamientos: MS (control negativo), MS suplementado con GO 1 mg.L⁻¹ y MS suplementado con GO 5 mg.L⁻¹. El análisis se realizó en dos tiempos, 24 horas y 72 horas, posteriores a la inducción con cada tratamiento. El valor de referencia es 1,00, correspondiente al medio MS en tiempo 0 (t_0) usado como control interno y todas las muestras tuvieron la misma unidad de masa (ng/ μ L).

Los resultados de la expresión relativa del gen *TSK* mostraron que a las 24 horas posteriores a la inducción el tratamiento MS o control no tratado tuvo un incremento de 4,68 veces en la expresión del gen con respecto al control en tiempo cero (t_0) antes de la inducción. Las expresiones del gen *TSK* de las muestras tratadas con bioestimulantes también incrementaron; sin embargo, se encontró que fueron inferiores al control no tratado, siendo de 2,42 y 3,42 veces en GO 1 mg.L⁻¹ y GO 5 mg.L⁻¹, respectivamente. Por otro lado, a las 72 horas posteriores a la inducción, todas las muestras mostraron una regulación negativa de la expresión de este gen con respecto al control en tiempo cero (t_0). De esta forma, se mostró que el control no tratado fue el que obtuvo los

mayores valores, ya que fue 0,94 veces menor que el control, mientras que GO 1 mg.L⁻¹ fue 0,68 y GO 5 mg.L⁻¹ fue 0,71 veces menor.

En tal sentido, podemos decir que la expresión génica de *TSK* es opuesta en todos los tratamientos a los dos tiempos evaluados, de forma tal que hay una inducción a las 24 horas y una regulación negativa a las 72 horas. Además, se evidenció que el GO 1 mg.L⁻¹ es el tratamiento que muestra los valores más bajos a los dos tiempos analizados.

5. Capítulo V. Discusión

En esta investigación se evaluó el efecto de los oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos (GO) a dos concentraciones de 1 mg.L^{-1} y 5 mg.L^{-1} , en plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas *in vitro*. Para poder analizar los resultados obtenidos en este estudio es importante tomar en cuenta que los experimentos se realizaron en condiciones controladas e idénticas para todos los tratamientos con los GO. Los parámetros que se consideraron para el control interno de los ensayos fueron las condiciones de desarrollo de las plantas y el almacenamiento de las semillas, incluyendo el tiempo de conservación de las mismas (Bentsink y Koornneef, 2008).

En la presente investigación todas las semillas empleadas fueron cosechadas al mismo tiempo, conservadas a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad y crecidas bajo las mismas condiciones. De esta manera, se descarta la posibilidad de que los cambios fenotípicos encontrados sean provocados por factores externos y no por los bioestimulantes evaluados en el estudio.

La respuesta biológica de los oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos (GO) sobre la morfogénesis de plantas de *A. thaliana* ha sido poco estudiada de acuerdo a la literatura disponible. De forma general, se pudo observar que los oligosacáridos probados en las dos concentraciones (GO 1 mg.L^{-1} y GO 5 mg.L^{-1}) tuvieron un efecto positivo sobre la germinación de las semillas de *A. thaliana*, manteniéndose así con valores por encima del 70 % en todos los tratamientos (Figura 6). Sin embargo, los GO no mostraron porcentajes superiores al control no tratado, por lo que tampoco tuvieron un efecto significativo sobre este parámetro.

En este sentido, en estudios previos de evaluación del efecto de los bioestimulantes sobre la germinación, otros autores han evaluado diferentes formas de tratamiento de las semillas para mejorar los índices de este

parámetro. Por ejemplo, entre las diferentes formas de medición y análisis de los bioestimulantes se han hecho aplicaciones en los medios de cultivo, en los suelos o las semillas que han sido directamente embebidas o recubiertas (*seed coating*) con el bioestimulante. Los resultados obtenidos han mostrado ser muy diferentes, ya que todo indica que la respuesta depende de la especie de planta, el bioestimulante o la combinación de ambos, así como la dosis empleada. Por ejemplo, se evaluaron mezclas de oligogalacturónidos (OGA, de sus siglas en inglés) sobre cultivos de trigo (*Triticum aestivum*) a una concentración de 1 mg.L^{-1} mediante la aplicación directa en el suelo o por recubrimiento de las semillas y se demostró que hubo un efecto positivo en los parámetros de germinación, así como en la promoción del crecimiento de la planta en general. Sin embargo, mezclas similares fueron usadas en tomate (*Solanum lycopersicum*) y en pimiento (*Capsicum annuum*), pero a concentraciones entre $2\text{-}10 \text{ mg.L}^{-1}$, y en ambos casos no se observó efecto positivo sobre la germinación, aunque sí hubo incremento en otros parámetros de crecimiento (Cabrera et al., 2013).

Adicionalmente, en estudios realizados con oligosacáridos de xiloglucanos y el Pectimorf (bioestimulante de origen péctico) en el cultivo *in vitro* de plantas de *A. thaliana* a concentraciones de $0,1$ y 10 mg.L^{-1} , respectivamente, se demostró que ambos no tuvieron un efecto notable con respecto a la germinación, manteniéndose con altos porcentajes en todos los casos, pero sin diferir del control no tratado (Glaría, 2010). Por tanto, podemos decir que los resultados obtenidos en nuestro trabajo están en correspondencia con lo obtenido en estudios previos.

Los resultados de la morfología de las raíces de plantas de *A. thaliana* con 15 días de edad crecidas con GO, mostraron que las plantas crecidas en presencia de $GO \ 1 \text{ mg.L}^{-1}$ tuvieron un incremento en la longitud de la raíz primaria. Por lo tanto, podemos decir que los GO tuvieron un efecto de tipo auxínico en las raíces de *A. thaliana*, si tenemos en cuenta lo planteado por Beeckman y colaboradores (Marhavý et al., 2013; Beeckman, Burssens y Inzé,

2001) acerca de que las auxinas promueven el crecimiento de la raíz primaria o laterales (dependiendo de la concentración).

Las auxinas juegan un papel importante en la regulación de varias características de las raíces (Malekpoor et al., 2015). En un estudio realizado con oligogalacturónidos junto con auxinas en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), determinaron que el efecto del crecimiento de la raíz dependía de la concentración de estas oligosacarinas y también del tipo de auxina. En todos los resultados pudieron evidenciar que los oligogalacturónidos inhibían el efecto inductor de la auxina ácido indol acético (IAA, por sus siglas en inglés *Indol-3-Acetil Acid*), el cual actúa como un regulador positivo de la iniciación de las raíces laterales (Dubrovsky et al., 2008). Además, se determinó que el efecto inhibitorio era dependiente del grado de polimerización (Kollárová, Henselová y Lisková, 2005). Otro tipo de oligosacarina denominada galactoglucomanano (GGMOs), tuvo el mismo efecto antagónico a las auxinas sobre las plantas de soja verde (*Vigna radiata*), de forma dependiente a la concentración afectando a la formación de raíces laterales y a la elongación de la raíz primaria (Kollárová et al., 2009; González et al., 2012). A pesar de los resultados que estas investigaciones mostraron, el mecanismo por el cual el oligosacárido afecta la formación de raíces inducida por auxinas es aún desconocido (Kollárová, Henselová y Lisková, 2005).

Los efectos encontrados en base a la concentración de los oligosacáridos se reportan por Cutillas y sus colaboradores (Cutillas et al., 1998), en donde se plantea que los oligosacáridos derivados de xiloglucanos tienen dos tipos de actividad biológica como reguladores del crecimiento de las plantas dependiendo la concentración. Siendo así que se ha reportado la inhibición del crecimiento inducido por auxinas en concentraciones nanomolares y el desarrollo del crecimiento en concentraciones micromolares. En este sentido, podemos sugerir que a pesar de no tener los valores de molaridad de los GO utilizados en este trabajo de investigación, el efecto

observado corresponde al efecto de la concentración micromolar, ya que se obtuvo un mayor incremento de la longitud de la raíz primaria.

Se ha informado que las concentraciones de acción *in vivo* para las oligosacarinas se mueven en rangos entre 0.1-10 mg.L⁻¹ (González et al., 2012; John, Röhrig, Schmidt, Walden y Schell, 1997). En tal sentido, existen numerosas investigaciones con diversas formulaciones de oligosacáridos derivados de hongos, fundamentalmente a base de quitina/quitosano, los que han sido validados como potenciadores, reguladores del crecimiento, del desarrollo y el rendimiento en varios cultivos (Cabrera et al., 2013). En estos estudios, igualmente se informa que estos bioestimulantes tienen su mayor efecto cuando son aplicados a bajas concentraciones (Bulgari et al., 2014; Cabrera et al., 2013; Ertani et al., 2009). Los resultados obtenidos en este estudio coincidirían con lo informado anteriormente (Figura 8), ya que se demostró que a una mayor concentración de GO (5 mg.L⁻¹) el efecto sobre el crecimiento de la longitud de raíz fue inferior a los demás tratamientos.

Las diferencias en el modo de acción a diferentes concentraciones de las oligosacarinas derivadas de hongos empleadas en este estudio pueden ser debidas a diversos factores, uno de los cuales es el grado de polimerización (DP de sus siglas en inglés *Degree of Polymerization*) de los oligosacáridos empleados. Se ha encontrado que el DP es importante para determinar la actividad biológica de los oligosacáridos (Cabrera et al., 2013).

En estudios previos realizados con los oligalacturónidos se encontró que estos compuestos tuvieron un mayor efecto como inductores de la respuesta de las plantas cuando su grado de polimerización (DP) es entre 9 y 15. Siendo así que, los grados de polimerización le permiten cumplir a los oligalacturónidos con las características estructurales y las condiciones iónicas necesarias para ser biológicamente más activos en las plantas (Cabrera et al., 2013). Estas características coinciden con los requerimientos para la iniciación de una conformación dependiente de Ca²⁺ denominada “caja de huevo” (Cabrera,

Boland, Messiaen, Cambier y Van Cutsem, 2008). Estos autores demuestran que al tener un DP menor a 9, la capacidad de formar las “cajas de huevo” estables es más complicado. La importancia de la formación de estas cajas se basa en la propuesta de Decreux y Messiaen (Decreux y Messiaen, 2005), quienes plantearon que las “cajas de huevo” pécticas pueden unirse iónicamente al dominio extracelular de las quinasas asociadas a la pared celular (WAK1, de sus siglas en inglés *Wall-Associated Kinases*). Además, se ha podido comprobar que cualquier alteración en la formación de las “cajas de huevo” influye en la interacción de WAK1 y los homogalacturónidos (Cabrera et al., 2008).

En el mismo estudio, se reportó que la dimerización de los oligogalacturónidos a través de los puentes de Ca^{2+} incrementa con la edad de la solución, pasando por un proceso denominado maduración de las “cajas de huevo”. Este proceso de maduración consiste en un aumento continuo de la longitud de las secuencias entre dos cadenas asociadas de calcio, con el fin de formar un número máximo de puentes de calcio para asegurar la estabilidad de las “cajas de huevo”. De esta forma, este estudio pudo confirmar que la maduración de las “cajas de huevo” estimuló un aumento significativo en la unión al dominio extracelular de WAK1 y su bioactividad de inductor de la alcalinización en *A. thaliana* (Cabrera, Boland, Cambier, Frettinger y Van Cutsem, 2010). En nuestro estudio, solo podemos inferir que éste es uno de los factores que podría influir en la respuesta observada, ya que no se dispone de la información de los DP de los GO empleados hasta que los mismos no sean patentados.

Otros estudios han mostrado que los receptores WAKs se expresan en los meristemas (Wagner y Kohorn, 2001), que están involucrados directamente en la red de pectina en la pared celular y que se encuentran implicados de alguna manera en la expansión celular, lesiones y otras respuestas al estrés generadas por patógenos (Cabrera et al., 2008). Sin embargo, es importante generar más estudios a nivel de receptores celulares y grados de

polimerización para poder comprender de mejor manera la interacción de estas moléculas en el desarrollo morfológico de las plantas y en especial de las raíces.

Por otro lado, estudios realizados con varias concentraciones de una mezcla de oligogalacturónidos probados en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) var. Amalia, mostraron que las semillas embebidas en esta mezcla a una concentración de 10 mg.L^{-1} tuvieron una reducción significativa del peso fresco de las raíces a diferencia de su control y de las semillas que fueron germinadas y crecidas en bajas concentraciones (Costales, Núñez y Martínez, 2007). Estos datos muestran una misma tendencia del comportamiento con los resultados obtenidos en la Figura 11, en donde se observó que a una mayor concentración, tratamiento con GO 5 mg.L^{-1} , los valores del peso fresco fueron inferiores en comparación con el control MS y con el GO 1 mg.L^{-1} . De la misma forma, estudios realizados con algas marinas como bioestimulantes del crecimiento de cultivos, indicaron que su mejor efecto en crecimiento se dio a bajas concentraciones (Khan et al., 2009).

En resumen, todos los análisis de morfogénesis nos sugieren que el mejor y mayor efecto de los bioestimulantes en las plantas respecto a la longitud de la raíz podrían encontrarse en valores inferiores de concentración (Tabla 5). Por el contrario, cuando los GO se encuentran en altas concentraciones se muestra un efecto incrementado en el número de raíces laterales y la densidad de las raíces laterales. Por lo tanto, se puede sugerir cualquier concentración dependiendo el objetivo del trabajo.

Finalmente, para comprender el efecto de los GO sobre la morfogénesis de la raíz, en donde interviene toda una red genética que controla su crecimiento y el ciclo celular, es importante investigar los cambios de expresión génica que se producen (Beemster et al., 2005). Se conoce que las plantas responden de manera muy variada a los estímulos presentados durante su crecimiento y desarrollo. Estas respuestas son reguladas por mecanismos

moleculares en donde los factores de transcripción juegan un papel fundamental para el desarrollo de las mismas (García, Gómez, Trejo y Herrera, 2013).

El gen *TONSOKU* (*TSK*) analizado en este estudio codifica para una proteína necesaria para la progresión de la fase G₂/M del ciclo celular y se localiza en los extremos de los microtúbulos del huso durante la mitosis. Se ha encontrado además que cuando éste gen es alterado o sufre algún daño se genera la interrupción de la división celular y por consiguiente no hay progresión a la mitosis. Por lo tanto, puede estar involucrado en la organización directa del huso, más no en el control del ciclo celular (Suzuki, Nakajima, Morikami, et al., 2005).

Al evaluar la expresión relativa del gen *TSK*, se pudo observar que los GO influyeron en el ciclo celular de las plantas, ya que se observaron cambios en su expresión génica relativa (Figura 14). Sin embargo, contrario al efecto que mostraron sobre la morfología de la raíz, donde a mayor concentración de GO hubo menor crecimiento de la raíz, en este caso a 5 mg.L⁻¹, la expresión de *TSK* es cercana a la del control MS. Por lo tanto, podemos decir que no parece haber una asociación entre la concentración de los GO, el desarrollo radicular y la expresión del gen *TSK*. Adicionalmente, se pudo observar que existió un aumento en la expresión del gen a las 24 horas y una desregulación a las 72 horas. Esto nos sugiere que se comporta como un gen de respuesta temprana, es decir que actúa inmediatamente después de un estímulo (cambio a cultivo fresco y/o presencia de los GO). Sin embargo, se requieren de más estudios para confirmar estos resultados.

TSK fue seleccionado para la investigación, ya que el mismo mostró una sobreexpresión cuando se trataron cultivos celulares de BY-2 de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. *Bright Yellow*) con oligosacáridos de xyloglucanos (XGOs) (González et al., 2014). Sin embargo, si bien estos estudios son importantes porque los cultivos celulares ofrecen un excelente sistema bajo

condiciones controladas para el conocimiento del ciclo celular, sus resultados deben ser confirmados en experimentos con plantas completas (Orchard et al., 2005). Esto es debido a que el control de la división celular no es un evento aislado en el organismo, puesto que el mismo debe ser coordinado con otros procesos tales como el control hormonal, metabolismo de los nutrientes, respuesta a la luz, señalización y dinámica de las membranas, además de la regulación transcripcional y modificaciones de la cromatina, señales de crecimiento, entre otras (Gutierrez, 2009). Es por ello que no es sorprendente que las evidencias obtenidas en el presente trabajo sean contrarias a lo encontrado en cultivos celulares de tabaco con otros oligosacáridos.

En estudios previos de cuantificación por PCR en tiempo real del gen *TSK* en órganos y tejidos de *A. thaliana* se encontró que su expresión se comporta de manera diferente en cada una de las partes de la planta, siendo de mayor a menor su expresión en las flores, los meristemos apicales, las hojas, la raíz y finalmente el tallo (Suzuki, Nakajima, Inagaki, et al., 2005).

Estos son los únicos reportes encontrados de la expresión diferencial de este gen en órganos de plantas, así como tampoco existen reportes de su comportamiento en presencia de otros bioestimulantes, excepto los reportados para células de tabaco. Estos resultados nos permiten inferir que el gen *TSK* no es probablemente el que está generando una mayor tasa de crecimiento de la raíz.

Los resultados obtenidos en este estudio pueden ser una base para futuros estudios relacionados con la morfogénesis, fisiología y molecular de los oligosacáridos derivados de hongos. Sin embargo, aún es necesario profundizar en los mecanismos de acción de éstos oligosacáridos a nivel molecular con el estudio de otros genes para lograr determinar las vías por las que realizan su acción. No obstante, aunque los mismos son preliminares, permiten considerar estos como potenciales bioestimulantes dentro de las alternativas en la agricultura para disminuir el uso de fertilizantes y pesticidas

utilizados para estimular el crecimiento vegetativo, proteger y mantener los cultivos vegetales.

6. Capítulo VI. Conclusiones y Recomendaciones

6.1 Conclusiones

Los oligosacáridos derivados de la pared celular tuvieron un efecto positivo sobre el porcentaje de germinación de plantas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*, el cual se encontró por encima del 70 %, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados.

Los oligosacáridos de la pared celular de hongos a la concentración de 1 mg.L⁻¹ provocaron un mayor crecimiento de la longitud de la raíz primaria y una menor densidad de raíces laterales de las plantas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*, aunque no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control no tratado.

Los oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos a la concentración de 5 mg.L⁻¹ indujeron una menor longitud de la raíz primaria y mayor densidad de raíces laterales por planta con respecto al control no tratado, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Los oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos provocaron un aumento en la expresión relativa del gen *TSK* a las 24 horas después de la inducción; mientras que a las 72 horas se presencié una desregulación del gen con respecto al control no tratado.

6.2 Recomendaciones

Realizar estudios morfogénicos y moleculares con oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos en concentraciones más bajas ($<1 \text{ mg.L}^{-1}$).

Realizar estudios moleculares con otros genes que permitan relacionar los puntos de control del ciclo celular, de respuesta a auxinas y de esta manera comprender el mecanismo de acción de estos oligosacáridos derivados de hongos.

Determinar el grado de polimerización (DP) de los GO para posteriores investigaciones, ya que pueden dar una luz acerca de la interacción con la planta y de esta manera comprender los cambios morfológicos y moleculares de las plantas.

REFERENCIAS

- Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Graciela, M., Munive, R., & Olvera, B. P. (2015). *PCR en tiempo real*. Recuperado en línea el 25 de Junio de 2016 de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/pcrtiempo.pdf>.
- Albersheim, P., y Darvill, A. (1985). Oligosaccharins. *Scientific American*, 253(3), 58–64. Recuperado el 26 de abril de 2015 de <http://eric.ed.gov/?q=oligosaccharin&id=EJ324350>.
- Albersheim, P., Darvill, A., McNeil, M., Valent, B., Sharp, J., Nothnagel, E., York, W. (1983). Oligosaccharins: naturally occurring carbohydrates with biological regulatory functions *Structure and function of plant genomes* (pp. 293-312): Springer. Recuperado el 8 de febrero de 2016 de <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11103-008-9435-0>.
- Bari, R. y Jones, J. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant molecular biology*, 69 (4), 473-488. Recuperado en línea el 18 de Agosto del 2015 de <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11103-008-9435-0>.
- Bartels, D. y Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 24(1), 23-58. Recuperado el 13 de febrero de 2016 de https://www.researchgate.net/profile/Ramanjulu_Sunkar/publication/228682987.
- Beeckman, T., Burssens, S. y Inzé, D. (2001). The peri-cell-cycle in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 52 (suppl 1), 403-411. Recuperado el 26 de diciembre de 2015 de https://jxb.oxfordjournals.org/content/52/suppl_1/403.full.
- BIO-RAD Laboratories, I. (2006). Real Time PCR. Application Guide. 1-105. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf
- Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, A., Vernieri, P. y Ferrante, A. (2014). Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture y Horticulture*, 31(1), 1-17. Recuperado el 6 de mayo de 2015 de

https://www.researchgate.net/publication/266786101_Biostimulants_and_crop_responses_A_review.

- Cabrera, J., Boland, A., Messiaen, J., Cambier, P. y Van Cutsem, P. (2008). Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. *Glycobiology*, 18(6), 473-482. Recuperado el 10 de febrero de 2016 de <http://doi.org/10.1093/glycob/cwn027>.
- Cabrera, J., Wégria, G., Onderwater, R., González, G., Nápoles, M., Falcón-Rodríguez, A. y Wattiez, R. (2013). PRACTICAL USE OF OLIGOSACCHARINS IN AGRICULTURE. *Acta Horticulturae (ISHS) 1009*, 195-212. Recuperado el 5 de marzo de 2015 de https://www.researchgate.net/publication/258762286_Practical_use_of_oligosaccharins_in_agriculture.
- Calvo, P., Nelson, L. y Kloepper, J. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 1-39. doi: 10.1007/s11104-014-2131-8. Recuperado el 25 de agosto de 2015 de https://www.researchgate.net/publication/262223222_Agricultural_uses_of_plant_biostimulants.
- Canellas, L., Olivares, F., Okorokova, F. y Façanha, A. (2002). Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology*, 130(4), 1951-1957. Recuperado el 4 de agosto de 2015 de <http://www.scielo.br/pdf/sa/v67n2/a12v67n2.pdf>.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., ... & Bennett, M. J. (2003). Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends in plant science*, 8(4), 165-171. Recuperado el 4 de agosto de 2015 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138503000517>.
- Castillo, R. (2010). Oligosacarinas. Recuperado el 14 de marzo de 2015 de <https://franciscosaborio.files.wordpress.com/2011/11/oligosacarinas-word.pdf>.

- Ceron, A., Vargas, I., Aispuro, E. y Martínez, M. (2012). *Oligoglucan Elicitor Effects During Plant Oxidative Stress*. Recuperado el 14 de agosto de 2015 de http://www.intechopen.com/download/pdf/pdfs_id/26768.
- Conde, A., Chaves, M. y Gerós, H. (2011). Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. *Plant and Cell Physiology*, 52(9), 1583-1602. Recuperado el 24 de mayo de 2015 de http://secure.oxfordjournals.org/our_journals/pcp/resource/pcp_%201.pdf
- Cutillas, A., Fulton, D., Fry, S. y Lorences E. (1998). Xyloglucan-derived oligosaccharides induce ethylene synthesis in persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit. *Journal of Experimental Botany*. 49(321):701–706. Extraído en línea de jxb.oxfordjournals.org/content/49/321/701.full.pdf.
- De Jager, S., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S. y Murray, J. (2005). The developmental context of cell-cycle control in plants. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology. Recuperado el 3 de junio de 2015 de [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084-9521\(05\)00028-5](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084-9521(05)00028-5).
- Decreux, A. y Messiaen, J. (2005). Wall-associated Kinase WAK1 Interacts with Cell Wall Pectins in a Calcium-induced Conformation. *Plant and Cell Physiology*, 46(2), 268-278. doi: 10.1093/pcp/pci026. Recuperado el 10 de febrero de 2016 de <http://www.fytofend.com/uploads/Wak1%20&%20wall%20pectin%20&%20Ca%20dependency.pdf?phpMyAdmin=9e8f1c26b896ce15339dc85a208970ce>.
- Dewitte, W. y Murray, J. (2003). The plant cell cycle. *Annual review of plant biology*, 54(1), 235-264. Recuperado el 3 de junio de 2015 de <http://www.cas.miamioh.edu/~meicenrd/pdevlmnt/dewitte2003.pdf>.
- Du Jardin, P. (2012). The Science of Plants Biostimulants: A Bibliographic Analysis. *European Commission*. Directorate-General for Enterprise Industry: EU. Recuperado el 3 de junio de 2015 de <http://hdl.handle.net/2268/169257>.
- Dubrovsky, J. y Rost, T. (2003). Lateral root initiation. In Dubrovsky J. y Rost T. (Eds.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (Academic Press ed.).

- Dubrovsky, J., Gambetta, G., Hernández-barrera, A., Shishkova, S. y González, I. (2006). Lateral Root Initiation in Arabidopsis: Developmental Window, Spatial Patterning, Density and Predictability. *Annals of Botany*, 97(5), 903-915. doi: 10.1093/aob/mcj604. Recuperado el 1 de agosto de 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2803408/>.
- Dubrovsky, J. G., Soukup, A., Napsucialy, S., Jeknić, Z. y Ivanchenko, M. G. (2009). The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany*, 103(5), 807-817. doi: 10.1093/aob/mcn267. Recuperado el 16 de septiembre de 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2707874/>.
- Enríquez, E., Aispuro, E., Vargas, I. y Martínez, M. (2010). Oligosacarinas Derivadas de Pared Celular: Actividad Biológica y Participación en la Respuesta de Defensa de Plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 28, 144-155. Recuperado el 12 de agosto de 2015 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61218468007>.
- Ertani, A., Nardi, S. y Altissimo, A. (2013). Review: Long-term research activity on the biostimulant properties of natural origin compounds. 181-187. doi: 10.17660/ActaHortic.2013.1009.22 Recuperado el 4 de agosto de 2015 de <https://www.researchgate.net/publication/284809863>.
- Ertani, A., Pizzeghello, D., Baglieri, A., Cadili, V., Tambone, F., Gennari, M. y Nardi, S. (2012). Humic-like substances from agro-industrial residues affect growth and nitrogen assimilation in maize (*Zea mays* L.) plantlets. *Journal of Geochemical Exploration*, 129, 103-111. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.10.001>. Recuperado el 12 de agosto de 2015 de <https://www.researchgate.net/publication/257189361>.
- Ertani, A., Schiavon, M., Altissimo, A., Franceschi, C. y Nardi, S. (2011). Phenol-containing organic substances stimulate phenylpropanoid metabolism in *Zea mays*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(3), 496-503. Recuperado el 12 de agosto de 2015 <https://www.researchgate.net/publication/230258083>.
- Ertani, A., Schiavon, M., Muscolo, A. y 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. Recuperado el 12 de agosto de 2015 de <https://www.researchgate.net/publication/230856450>.
- Escobar, J. (2010). Estado, tendencias y consideraciones institucionales en Ecuador respecto al contexto mundial. *Agrobiotecnología*: IICA. Recuperado el 12 de agosto de 2015 de <http://legacy.iica.int/Esp/regiones/andina/Ecuador/Publicaciones%20de%20la%20Oficina/Agrobiotecnolog%C3%ADa%20Ecuador.pdf>.
- European Biostimulants Industry Council. (s.f). Promoting the biostimulant industry and the role of plant biostimulants in making agriculture more sustainable. from <http://www.biostimulants.eu/>.
- European Biostimulants Industry Council. (s.f). What are biostimulants?, from <http://www.biostimulants.eu/about/what-arebiostimulants/>.
- European Biostimulants Industry Council. (s.f). Economic overview of the biostimulants sector in Europe, Recuperado el 17 de April 2015 de <http://www.biostimulants.eu/wp-content/uploads/2013/04/>.
- Evert, R. (2006). Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development: John Wiley y Sons. Recuperado el 24 de julio de 2015 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0470047380.ch6/pdf>.
- Fujikawa, T., Sakaguchi, A., Nishizawa, Y., Kouzai, Y., Minami, E., Yano, S., Nishimura, M. (2012). Surface α -1, 3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants. *PLoS Pathog*, 8(8), e1002882. Recuperado el 28 de junio 2015 de <http://www.nias.affrc.go.jp/eng/research/h24/nias2012-07.pdf>.
- Glaría, A. (2010). Líneas transgénicas Spcdc25 y Oex wee1 de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh: Caracterización y efecto de dos oligosacarinas de origen natural. (Maestría en Biología Vegetal), Universidad de la Habana.
- González, L., Perrotta, L., Acosta, A., Orellana, E., Spadafora, N., Bruno, L., ... Rogers, H. (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*, 1–14. Recuperado el 7 de febrero de 2016 de <http://doi.org/10.1007/s11033-014-3566-y>.
- González, L., Vázquez, A., Perrotta, L., Acosta, A., Scriven, S., Herbert, R., ... Rogers, H. (2012). Oligosaccharins and Pectimorf® stimulate root elongation and shorten the cell cycle in higher plants. *Plant Growth Regulation*, 68(2), 211–221. Recuperado el 13 de diciembre de 2015 de <http://doi.org/10.1007/s10725-012-9709-z>.
- Guinan, K., Sujeeth, N., Copeland, R., Jones, P., O'Brien, N., Sharma, H., ... O'Sullivan, J. (2013). Discrete roles for extracts of *Ascophyllum nodosum* in enhancing plant growth and tolerance to abiotic and biotic stresses. In *World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture 1009* (pp. 127–135). Recuperado el 12 de agosto de 2015 de <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1009.15>.
- Gutierrez, C. (2009). The Arabidopsis Cell Division Cycle. *The Arabidopsis Book*, 7, e0120. Recuperado el 24 de marzo de 2015 de <http://doi.org/10.1199/tab.0120>.
- InfoAserca. (2010). Las alcamidas: Un grupo nuevo de reguladores del crecimiento y sus aplicaciones en la biotecnología agrícola. *Claridades Agropecuarias*, 205, 36–42. Recuperado el 10 de enero de 2016 de <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/205/ca205-36.pdf>
- InfoStat(2004). InfoStat versión 2004. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Recuperado en línea de <http://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=15>.
- Inzé, D., y De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development 1. *Annu. Rev. Genet.*, 40, 77–105. Recuperado el 3 de agosto de 2015 de <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.genet.40.110405.090431>.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., y Ewart, H. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*, 9(2), 196–223. Recuperado el 3 junio de 2015 de <http://doi.org/10.3390/md9020196>.
- Jordan, L., y Kurtz, R. (2000). *Optical Design of CFX96™ Real-Time PCR*

- Detection System Eliminates the Requirement of a Passive Reference Dye. amplification* (Vol. 6047). Bio-Rad Laboratories, Inc. Recuperado el 7 de febrero de 2016 de http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6047A.pdf.
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Phytopathology*, 44(1), 41. Recuperado en línea el 5 de Julio de 2016 de <http://www.annualreviews.org/eprint/XvrultBn654374eput2R/full/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436>.
- Khan, W., Rayirath, U., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D., ... Prithiviraj, B. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386–399. Recuperado el 4 de mayo de 2015 de <http://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>.
- Klarzynski, O., Descamps, V., Plesse, B., Yvin, J.-C., Kloareg, B., y Fritig, B. (2003). Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(2), 115–122. Recuperado el 18 de mayo de 2015 de <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.2.115>.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J., Yvin, J., Kopp, M., Kloareg, B., y Fritig, B. (2000). Linear β -1, 3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*, 124(3), 1027–1038. Recuperado el 18 de mayo de 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC59202/pdf/pp001027.pdf>.
- Klein, D. (2002). Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6), 257–260. Recuperado el 8 de febrero de 2016 de [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02355-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02355-9).
- Kollárová, K., Richterová, D., Slováková, L., Henselová, M., Capek, P., y Lišková, D. (2009). Impact of galactoglucomannan oligosaccharides on elongation growth in intact mung bean plants. *Plant science*, 177(4), 324–330. Recuperado en línea el 15 de Junio de 2015 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945209001605>.

- Krishnan, A., y Pereira, A. (2008). Integrative approaches for mining transcriptional regulatory programs in Arabidopsis. *Briefings in Functional Genomics y Proteomics*, 7(4), 264–274. Recuperado el 19 de mayo de 2015 de <http://doi.org/10.1093/bfpg/eln035>.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., ... Strombom, L. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27, 95–125. Recuperado el 2 de febrero de 2016 de <http://doi.org/doi:10.1016/j.mam.2005.12.007>.
- Kunicki, E., Grabowska, A., Sękara, A., y Wojciechowska, R. (2010). The effect of cultivar type, time of cultivation, and biostimulant treatment on the yield of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Folia Horticulturae*, 22(2), 9–13. Recuperado el 2 de agosto de 2015 de <http://www.ptno.ogr.ar.krakow.pl/Wydawn/FoliaHorticulturae/Spisy/FH2010/PDF22022010/fh2202p02.pdf>.
- Livak, K., y Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25, 402–408. Recuperado el 10 de abril de 2016 de <http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- MacGregor, D., Deak, I., Ingram, P., y Malamy, J. (2008). Root system architecture in Arabidopsis grown in culture is regulated by sucrose uptake in the aerial tissues. *The Plant Cell*, 20(10), 2643–2660. Recuperado el 18 de mayo de 2015 de <http://www.plantcell.org/content/20/10/2643.full.pdf+html>.
- Marhavý, P., Vanstraelen, M., De Rybel, B., Zhaojun, D., Bennett, M. J., Beeckman, T., y Benková, E. (2013). Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *The EMBO journal*, 32(1), 149-158. Extraído el 01 de junio de 2016 de <http://emboj.embopress.org/content/32/1/149.full>.
- Malekpoor, M., Seymour, G., Swarup, R., Moeiniyan Bagheri, H., Ramsey, R., y Thompson, A. (2015). Environmental, developmental, and genetic factors controlling root system architecture. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 30(2), 95–112. Recuperado el 9 de enero de 2016

- de <http://doi.org/10.1080/02648725.2014.995912>.
- Meinke, D., Cherry, J., Dean, C., Rounsley, S., y Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, 282(5389), 662–682. Recuperado el 18 de agosto de 2015 de <http://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>.
- Meyerowitz, E. (2001). Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant Physiology*, 125(1), 15–19. Recuperado el 10 de agosto de 2015 de <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1104/pp.125.1.15>.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15(3), 473–497. Recuperado el 15 de julio de 2015 de <https://essm.tamu.edu/media/46257/murashigeandskoogintropapersjanick.pdf>.
- Nakajima, K., y Benfey, P. (2002). Signaling In and Out Control of Cell Division and Differentiation in the Shoot and Root. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S265-S276. Recuperado el 15 de julio de 2015 de http://www.plantcell.org/content/14/suppl_1/S265.short.
- Nardi, S., Carletti, P., Ertani, A., y Pizzeghello, D. (2006). Knowledge and evaluation of plant growth stimulants. *Informatore Agrario (Italy)*. Recuperado el 4 de mayo de 2015 de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IT2007601959>.
- Nardi, S., Carletti, P., Pizzeghello, D., y Muscolo, A. (2009). Biological Activities of Humic Substances. In *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems* (pp. 305–339). John Wiley y Sons, Inc. Recuperado el 18 de enero de 2016 de <http://doi.org/10.1002/9780470494950.ch8>.
- Ochman, H., Gerber, A., y Hartl, D. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 120(3), 621–623. Recuperado el 20 de agosto de 2015 de <http://www.genetics.org/content/genetics/120/3/621.full.pdf>.
- Orchard, C., Siciliano, I., Sorrell, D., Marchbank, A., Rogers, J., Francis, D., ... Onckelen, H. Van. (2005). Tobacco BY-2 cells expressing fission yeast

- cdc25 bypass a G2/M block on the cell cycle. *Plant Journal*, 44(2), 290–299. Recuperado el 18 de mayo de 2015 de <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02524.x>.
- Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., ... Bennett, M.(2009). Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science*, 14(7), 399–408. Recuperado el 15 de mayo de de [http://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S1360-1385\(09\)00146-0](http://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S1360-1385(09)00146-0).
- Petrozza, A., Summerer, S., Di Tommaso, G., Di Tommaso, D., y Piaggese, A. (n.d.-a). An evaluation of tomato plant root development and morpho-physiological response treated with VIVA® by image analysis. In *I World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture 1009* (pp. 155–159). Recuperado el 15 de mayo de 2015 de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201400150169>.
- Petrozza, A., Summerer, S., Di Tommaso, G., Di Tommaso, D., y Piaggese, A. (n.d.-b). Evaluation of the effect of Radifarm® treatment on the morpho-physiological characteristics of root systems via image analysis. In *I World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture 1009* (pp. 149–153). Recuperado el 20 de mayo de 2015 de http://www.actahort.org/books/1009/1009_18.htm.
- Ramírez, A., Cruz, N., y Franchialfaro, O. (2003). Uso de bioestimuladores en la reproducción de Guayaba (*Psidium guajava* L.) mediante el enraizamiento de esquejes. *Cultivos Tropicales*, 24(1), 59–63. Recuperado el 14 de julio de 2015 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193218221010>.
- Rozen, S., y Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, 365–386. Recuperado 20 de mayo de 2015 de <http://www.flyrnai.org/supplement/MMB-RosenSkaletsky.pdf>.
- Saborío, F. (2002). Bioestimulantes en fertilización foliar. *Dado Que El Acceso Y El Flujo de La Información Sobre Investigaciones Recientes En El Área*

Agrícola Es Restringida O de Alto Costo, El Laboratorio Periódicamente Realiza Seminarios, Cursos de Capacitación Y Talleres, Que Sean de Acceso a Estudiantes, Prod, 107. Recuperado el 16 de diciembre de 2015 de http://www.cia.ucr.ac.cr/pdf/Memorias/Memoria_Curso_Fertilizaci%C3%B3n_Foliar.pdf.

Santaniello, A., Giorgi, F., Di Tommaso, D., Di Tommaso, G., Piaggese, A., y Perata, P. (2013). Genomic Approaches To Unveil The Physiological Pathways Activated In *Arabidopsis* Treated With Plant-Derived Raw Extracts (1009th ed., pp. 161–174). *International Society for Horticultural Science (ISHS)*, Leuven, Belgium. Recuperado el 4 de agosto de 2015 de <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1009.20>.

Schalch, C. (2010). Ciclo Celular - Daiane Viana 1º B. *BLOG DA BIOLOGIA E ECOLOGIA*. Santos, SP, Brasil. Recuperado 18 de mayo de 2015 de <http://biologiatancredo.blogspot.com/2010/11/ciclo-celular-daiiane-viana-1-b.html>.

Scofield, S., Jones, A., y Murray, J. (2014). The plant cell cycle in context. *Journal of Experimental Botany*, 65(10), 2557–2562. Recuperado el 20 de mayo de 2015 de <http://jxb.oxfordjournals.org/content/65/10/2557.full>.

Sharp, R. (2013). A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields. *Agronomy*, 3(4), 757-793. Recuperado el 20 de mayo de 2015 de <http://www.mdpi.com/2073-4395/3/4/757/htm>.

Shepherd, J. (2009). *Geoengineering the climate: science, governance and uncertainty*. Royal Society. Recuperado el 16 de diciembre de 2015 de https://royalsociety.org/~media/Royal_Society_Content/policy/publications/2009/8693.pdf.

Shibuya, N., y Minami, E. (2001). Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59, 223–233. Recuperado el 16 de diciembre de 2015 de <http://doi.org/10.1006/pmpp.2001.0364>.

- Sterken, R., Kiekens, R., Coppens, E., Vercauteren, I., Zabeau, M., Inzé, D., ... Vuylsteke, M. (2009). A population genomics study of the Arabidopsis core cell cycle genes shows the signature of natural selection. *The Plant Cell*, 21(10), 2987–2998. Recuperado el 21 de mayo de 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19880799>.
- Suzuki, T., Inagaki, S., Nakajima, S., Akashi, T., Ohto, M. a., Kobayashi, M. y Tabata, S. (2004). A novel Arabidopsis gene TONSOKU is required for proper cell arrangement in root and shoot apical meristems. *The Plant Journal*, 38(4), 673-684. Recuperado el 8 de agosto de <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02074.x>.
- Suzuki, T., Nakajima, S., Inagaki, S., Hirano-Nakakita, M., Matsuoka, K., Demura, T., ... Nakamura, K. (2005). TONSOKU is expressed in S phase of the cell cycle and its defect delays cell cycle progression in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 46(5), 736–742. Recuperado el 8 de agosto de 2015 de <http://pcp.oxfordjournals.org/content/46/5/736.full>.
- Suzuki, T., Nakajima, S., Morikami, A., y Nakamura, K. (2005). An Arabidopsis protein with a novel calcium-binding repeat sequence interacts with TONSOKU/MGOUN3/BRUSHY1 involved in meristem maintenance. *Plant and Cell Physiology*, 46(9), 1452–1461. Recuperado el 8 de agosto de <http://pcp.oxfordjournals.org/content/46/9/1452.full>.
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, 408(6814), 796–815. Recuperado el 20 de junio de http://doi.org/http://www.nature.com/nature/journal/v408/n6814/supinfo/408796a0_S1.html.
- Trouvelot, S., Héloir, M., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., ... Adrian, M. (2015). Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in Plant Science*. Recuperado el 13 de enero de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25408694>.

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., y Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), research0034.1 – research0034.11. Recuperado el 14 de junio de 2015 de <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034>.
- Vanneste, S., De Rybel, B., Beemster, G. T. S., Ljung, K., De Smet, I., Van Isterdael, G., ... Tasaka, M. (2005). Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 17(11), 3035–3050. Recuperado el 21 de mayo de 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16243906>.
- Vorwerk, S., Somerville, S., y Somerville, C. (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science*, 9(4), 203–209. Recuperado el 6 de mayo de 2015 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138504000512>.
- Wagner, T., y Kohorn, B. (2001). Wall-Associated Kinases Are Expressed throughout Plant Development and Are Required for Cell Expansion. *The Plant Cell*, 13(2), 303–318. Recuperado el 10 de agosto de 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102244/>.
- Wang, B. (2007). *Environmental Biodegradation Research Focus*. Nova Science Publishers. Recuperado el 10 de agosto de 2015 de <https://books.google.com.ec/books?id=WtHCXIVMH1EC>.
- Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H., ... Wang, X. (2002). Profiling membrane lipids in plant stress responses: role of phospholipase D{alpha} in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 277, 31994–32002. Recuperado el 9 de febrero de 2015 de <http://www.jbc.org/content/277/35/31994.full.pdf>.
- Xiong, L., y Zhu, J. (2003). Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Physiology*, 133(1), 29–36. Recuperado el 19 de febrero de 2015 de <http://doi.org/10.1104/pp.103.025395.mutant>.
- Yazdanbakhsh, N., y Fisahn, J. (2010). Analysis of *Arabidopsis thaliana* root

growth kinetics with high temporal and spatial resolution. *Annals of Botany*, 105(5), 783–791. Recuperado el 9 de febrero de 2015 de <http://doi.org/10.1093/aob/mcq048>.

Zwack, P. J., y Rashotte, A. (2015). Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 66(16), 4863–4871. Recuperado el 18 de mayo de 2015 de <http://doi.org/10.1093/jxb/erv172>.