



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE DAÑOS OXIDATIVOS OCASIONADOS POR ESTRÉS
SALINO A COMPONENTES PROTEICOS Y LIPÍDICOS EN PLANTAS DE
Arabidopsis thaliana TRATADAS CON OLIGOSACARINAS

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

Profesora guía

Ph.D. Gabriela Alexandra Viteri Espinoza

Autor

Claudia Marcela Vásquez Guevara

Año:

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante Claudia Marcela Vásquez Guevara, 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.

Gabriela Alexandra Viteri Espinoza

Doctora en ciencias exactas con mención en química.

CI: 1707295133

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.

Claudia Marcela Vásquez Guevara

CI: 1724492606

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por haberme bendecido en esta trayectoria, a mi familia, por todo el amor que me brindaron y los consejos que me dieron.

A Gabriela Viteri, por su amistad, por guiarme en mi vocación y por tener confianza en mis capacidades.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y amor, para aquellas personas que me guiaron en cada paso de mi vida, que con paciencia y amor me educaron, me enseñaron que hay que luchar en la vida y no darse por vencido y que incluso en las derrotas se aprende. Este trabajo se lo dedico a ustedes.

Mamá y Papá

RESUMEN

Desde hace algunos años se ha visto la necesidad de una mejor gestión agrícola con el objetivo un mayor rendimiento de los cultivos, lo que ha dado lugar a la amplia y a veces indiscriminada aplicación de agroquímicos. Los bioestimulantes, entre ellos las oligosacarinas derivadas de la pared celular de hongos, pueden ser una alternativa al uso de agroquímicos ya que se ha visto que están involucradas en varios procesos de desarrollo y estimulación de vías de defensa en las plantas. Este proyecto evalúa el efecto del bioestimulante FO (Fungal Oligosaccharines) sobre la respuesta en plantas de *Arabidopsis thaliana* sembradas *in vitro*, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés salino.

Se sembró plantas de *Arabidopsis thaliana* en medio MS líquido, las mismas que crecieron durante 15 días, posteriormente se realizó una inducción en el medio de cultivo, colocando NaCl y/o bioestimulante, se tomaron muestras a las 24 horas, 72 horas y 7 días después de la inducción. En los resultados se pudo observar que las muestras sometidas a estrés salino en presencia del bioestimulante, presentaron una disminución en la oxidación de componentes lipídicos y proteicos, con respecto a aquellas muestras sometidas únicamente a estrés salino.

También se evaluó la funcionalidad del sistema ubiquitina-proteasoma, el mismo que está a cargo del marcaje y degradación de proteínas en la célula. En general, la muestra tratada con bioestimulante con o sin NaCl presentaba altos niveles de sustratos ubiquitinados, alto contenido de proteasoma 26S y adecuada actividad del mismo. Por otro lado, la muestra tratada con NaCl presentaba una inhibición de la actividad del proteasoma y acumulación de sustratos ubiquitinados.

Los resultados de este trabajo sugieren que el bioestimulante utilizado da lugar a una estimulación de vías de defensa en la planta, provocando una mejor tolerancia en situaciones de estrés, así como también un mejor procesamiento de la oxidación en las biomoléculas afectadas.

ABSTRACT

During the last years, there has been a significant need to increase agricultural yields, including a better management of natural resources and increased food quality. The pressure to increase the yield of agricultural crops has led to full-scale and sometimes indiscriminate application of different types of chemical fertilizers and pesticides.

The oligosaccharines derived from plant, fungi and algae cell walls, have shown biological activity at low concentrations and it has been shown that they are involved in several developmental processes of plants, by stimulating different metabolic pathways and allowing increased stress resistance. This project evaluates the effect of FO (Fungal Oligosaccharines) on the response of *Arabidopsis thaliana* plants in both normal and salt stress conditions.

Arabidopsis thaliana plants were sown in liquid MS medium, and grown for 15 days, when an induction was performed on the culture medium, adding NaCl and/or FO. Samples were taken 24 hours, 72 hours and 7 days after induction. The results show that the plants subjected to salt stress treated with FO showed reduced oxidation of soluble components, lipids and proteins, compared to those containing only NaCl in the culture medium.

We also evaluated the functionality of the ubiquitin-proteasome system that is in charge of marking and degradation of proteins in the cell. The treatment with FO with or without NaCl showed increased levels of ubiquitinated substrates, 26S proteasome and proteasome activity. Treatment of plants with NaCl alone, showed an inhibition of proteasome activity and accumulation of ubiquitinated substrates.

Therefore, it is concluded that the oligosaccharine used in this project probably stimulates distinct defense pathways in the plant, causing resistance to future stress situations and an improved processing of oxidized biomolecules.

ÍNDICE

1. Capítulo I: Antecedentes	1
1.1 Situación actual de cultivos agrícolas.....	1
1.2 Efectos de los agroquímicos	3
1.3 Importancia del uso de oligosacarinas como alternativa	3
1.4 Importancia de las oligosacarinas en el Ecuador.....	4
1.5 Objetivos.....	5
1.5.1 Objetivo general	5
1.5.2 Objetivos específicos.....	5
2. Capítulo II: Marco teórico	7
2.1 Oligosacarinas: Generalidades.....	7
2.1.2 Mecanismo de acción	7
2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo	8
2.3 Salinidad de suelos	9
2.3.1 Causas.....	10
2.3.2 Impacto sobre la economía	10
2.3.3 Efectos sobre plantas	11
2.4 Estrategia de los seres vivos frente a condiciones de estrés: generalidades	12
2.4.1 Sistema antioxidante: Generalidades	13
2.5 Sistema ubiquitina-proteasoma.....	13
2.5.1 Estructura	14
2.5.2 Función y mecanismos	15

3. Capítulo III: Metodología.....	18
3.1 Diseño experimental	18
3.2 Preparación de medios de cultivo.....	19
3.3 Siembra de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en medio de cultivo líquido	20
3.4 Inducción con bioproducto y/o NaCl.....	20
3.5 Toma de muestras	21
3.6 Procesamiento de muestras.....	21
3.7 Cuantificación de proteínas mediante BCA	22
3.8 Determinación de concentración de sólidos solubles totales	22
3.9 Determinación de carbonilos reactivos a DNP	23
3.10 Análisis de peroxidación lipídica mediante TBA	25
3.11 Electroforesis SDS-PAGE de las muestras	26
3.12 Técnicas de inmunodetección.....	27
3.14 Actividad enzimática proteasoma 20S	29
4. Capítulo IV: Resultados	32
4.1 Niveles de sólidos solubles totales	32
4.3 Niveles de oxidación en componentes solubles.....	36
4.4 Niveles de oxidación en componentes lipídicos.....	39
4.5 Niveles de oxidación en componentes proteicos	41
4.6 Funcionalidad del sistema ubiquitina-proteasoma	42
4.6.1 Niveles de proteínas ubiquitinadas	42
4.6.2 Actividad enzimática del proteasoma 20S.....	45

4.6.3 Niveles de Proteasoma 26S	47
5. Capítulo V: Discusión	50
5.1 Ajuste osmótico, niveles de sólidos solubles y proteínas solubles.....	50
5.2 Niveles de oxidación en componentes solubles.....	52
5.3 Niveles de oxidación en componentes lipídicos.....	53
5.4 Niveles de oxidación en componentes proteicos	54
5.5 Funcionalidad del sistema ubiquitina-proteasoma	55
6. Capítulo VI: Conclusiones	58
7. Capítulo VII: Recomendaciones	60
Referencias	62

1. Capítulo I: Antecedentes

1.1 Situación actual de cultivos agrícolas

El 70 % de la población pobre en el mundo viven en zonas rurales, siendo la agricultura su principal fuente de ingreso y trabajo (World Bank, 2014). Estadísticas realizadas por la FAO, revelan que alrededor de 3000 millones de personas dependen de la agricultura, la caza, y la pesca. Sin duda, la agricultura ayuda a potenciar la economía de la mayoría de países en desarrollo; algunos países ya han experimentado un rápido crecimiento económico y reducción de la pobreza (FAO, 2012, pp. 30-39).

La agricultura proporciona importantes contribuciones a nuestro país, según el Banco Mundial, el aporte de la agricultura al PIB total del Ecuador fue de 9.4 % en el 2013, siendo las principales provincias agrícolas: Manabí, Guayas, Loja, Los Ríos, Esmeraldas, Pichincha, Azuay, El Oro, Bolívar y Cotopaxi (Espinoza, 2012). Otros datos elaborados por el Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC) dan a conocer que el Ecuador destina aproximadamente 7.4 millones de hectáreas para labores agropecuarias, de las cuales casi el 50 % es destinado únicamente para cultivos agrícolas (INEC, 2012).

La población mundial ha aumentado de 2500 millones de habitantes en el año 1950 a 7000 millones en el 2012 y se prevé que para el 2050 la población sea de 9600 millones de habitantes. Este crecimiento poblacional demanda una mejor gestión de recursos naturales, entre los cuales por supuesto está incluida la producción agrícola, la misma que necesita aumentar entre 50 % y 70 % para el 2020 (Shabala, 2013, p. 1).

Cabe recalcar que la agricultura no proporciona únicamente aportaciones monetarias, de hecho, la contribución más significativa recae en proveer alimento a poblaciones desnutridas, ya que constituye un medio y tal vez el más importante para salir del hambre (FAO, 2012, pp. 32-34). En América Latina y Caribe, las estadísticas en el año 2012 indican que existen 49 millones de personas subnutridas, de las cuales 1.8 millones de personas se encuentran

en Ecuador, lo que representa el 10.8 % de su población total (FAO, 2012, pp. 10-11).

Por las razones mencionadas anteriormente, se vuelve evidente la necesidad de mejorar el rendimiento agrícola, lo que involucra una mejor gestión de recursos naturales, aumento en la calidad de los alimentos y rendimiento de los cultivos, ya que las áreas cultivables disponibles no pueden seguir creciendo por el peligro de daños ambientales (Shabala, 2013, p. 1). El cultivo de productos agrícolas presenta varias dificultades, entre ellas la presencia de diferentes tipos de estrés, los cuales afectan negativamente el crecimiento y la productividad de los mismos. El estrés al que pueden estar sometidos dichos cultivos puede ser clasificado como estrés biótico, el cual incluye patógenos, plagas, interacciones negativas con otros organismos o plantas parásitas, y el estrés abiótico, el cual incluye exceso o falta de luz, agua, temperatura, alta concentración de sales y de contaminantes (Hasanuzzaman, Alam, Rahman, Nahar y Fujita, 2014, pp. 1-2).

Un problema importante en la agricultura es la existencia de grandes áreas que contienen suelos salinos. Este hecho ha dado lugar a numerosos estudios e investigaciones acerca de los efectos de la salinidad sobre la agricultura. La salinidad del suelo crea una situación desfavorable para el crecimiento de las plantas, ya que impide una adecuada actividad metabólica y buenos niveles de productividad agrícola. Se estima que existen aproximadamente 77 millones de hectáreas afectadas por la salinidad en suelos agrícolas en todo el mundo (Hasanuzzaman et al., 2014, pp. 1-2), generando una pérdida de producción agrícola de \$12 mil millones al año, y hay una clara tendencia a seguir aumentando (Shabala, 2013, p. 1).

Se considera que un suelo tiene riesgo de volverse salino cuando hay escases de lluvias, esta situación no permite compensar la reducción del agua en el suelo por causa de evapotranspiración, lo que da como resultado una acumulación y precipitación de sales solubles debido a la privación de un óptimo sistema de lavado (Pastor, 2014, p. 29). En Ecuador existen grandes áreas de suelos agrícolas con riesgo de tornarse en suelos salinos, entre

dichas áreas podemos citar a la península de Santa Elena o la provincia de El Oro. Esta última por ejemplo, tiene aproximadamente 380 mil hectáreas destinadas a la agricultura y ganadería, de las cuales el 24.3 % de dicha área tiene riesgo de salinidad (Mite, 2002, pp. 22-23).

1.2 Efectos de los agroquímicos

La presión por un aumento del rendimiento de cultivos agrícolas, ha dado lugar a la amplia y a veces indiscriminada aplicación de diferentes tipos de agroquímicos o fertilizantes químicos (Dong et al., 2012, pp. 1-2). El uso inapropiado de estos fertilizantes puede repercutir en efectos negativos para los cultivos y suelos, entre los que se encuentran alta acidez, disminución de nutrientes disponibles y desbalance del ecosistema, efecto ambiental y pueden ocasionar la acumulación de compuestos nocivos en los alimentos (Travella, 2013, pp. 21-24). Esta manera de explotación del suelo, ha acelerado en gran manera su degradación y consecuentemente ha afectado la fertilidad natural del mismo, poniendo en peligro su productividad. Esta crisis avanza rápidamente con el deterioro de la base productiva en zonas rurales (Gomero y Velásquez, 2000, p. 11).

Los consumidores de los productos agrícolas han cuestionado el elevado uso de los agroquímicos y actualmente demandan productos alimenticios sin ningún tipo de sustancias tóxicas, que puedan afectar la salud (Enríquez, Aispuro, Vargas y Martínez, 2010, pp. 1-2).

1.3 Importancia del uso de oligosacarinas como alternativa

En los últimos años, muchos fisiólogos vegetales han puesto su atención en algunos oligosacáridos derivados de la pared celular de algas, hongos y plantas, los mismos que han demostrado actividad biológica a bajas concentraciones, y por ello han sido llamados oligosacarinas. Se cree que éstas están implicadas en distintos procesos de desarrollo de plantas, al ser reconocidas en las células de las plantas mediante receptores específicos, estimulando múltiples vías metabólicas y el incremento de la resistencia sistemática adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) (Enríquez et al., 2010, p.

2). Por su origen biológico, nulo impacto ambiental y tomando en cuenta que las oligosacarinas están implicadas en el metabolismo de resistencia a estrés en plantas, estos compuestos bioactivos tienen el potencial de mejorar el rendimiento agrícola de forma natural y amigable con el medio ambiente (Enríquez et al., 2010, p. 2).

En las últimas décadas ha habido un incremento en los estudios de los efectos que tienen las oligosacarinas sobre las plantas. Investigaciones afirman que oligosacáridos derivados de la pared celular de hongos, tales como la quitina y sus derivados, inducen respuestas de acumulación de metabolitos entre los que se encuentran los lípidos o las proteínas, éstas últimas por ejemplo están relacionadas en procesos de defensa contra patógenos, tales como la enzima fenilamonioliasa (PAL), β 1,3 glucanasa, quitinasa, peroxidasas así como enzimas antioxidantes (Ramírez, Rodríguez, Alfonso, Peniche, 2010, pp. 3 y Enríquez et al., 2010, p. 2). No obstante, no han existido reportes con información contundente sobre los efectos directos de las oligosacarinas en las proteínas o lípidos, así como en las vías sistemáticas de degradación de proteínas oxidadas dentro de la célula.

1.4 Importancia de las oligosacarinas en el Ecuador

La agricultura se ha considerado en la historia del Ecuador hasta la actualidad, la actividad primaria de mayor importancia en la economía nacional, debido a la fuente de trabajo, sustento alimenticio e impulso en el sector comercial interno. Sin una adecuada atención al sector agrario, no puede surtir efecto positivo ninguna acción en los sectores de la educación, salud, laboral y, por supuesto, en lo económico y social (Larrea, 2016).

Datos elaborados por el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) dan a conocer que en el Ecuador aproximadamente 2.5 millones de hectáreas son utilizadas para cultivos permanentes y transitorios, es decir aproximadamente el 20.3% de la superficie total del suelo es utilizado para distintos tipos de producción agrícola (MAGAP, 2011). Lastimosamente, en el país existen grandes áreas de suelos agrícolas con riesgo de tornarse en

suelos salinos, entre dichas áreas podemos citar a la península de Santa Elena o la provincia de El Oro. Ésta última por ejemplo tiene aproximadamente 380 mil Ha destinadas a la agricultura y ganadería de las cuales el 24.3% de dicha área tiene riesgo de salinidad, comprendiendo áreas de Pasaje, El Guabo, Machala, Tendales y Santa Rosa (Mite. F, INIAP, 2002).

En la actualidad existen bioestimulantes comerciales producidos en el Ecuador, sin embargo, muchos de estos productos tales como los ácidos húmicos, son aplicados conjuntamente con otro tipo de fertilizantes químicos con el fin de obtener el efecto deseado sobre los cultivos. Por otra parte, los bioestimulantes que contienen oligosacarinas como ingrediente activo no son comúnmente utilizados dentro del país, existen pocos productos comerciales así como insuficiente información sobre sus efectos en cultivos agrícolas en el Ecuador (Mite. F, INIAP, 2002). Uno de los propósitos de éste proyecto es proporcionar información que pueda ser utilizada en un futuro sobre el sector agrícola en el Ecuador.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

- Determinar los daños de componentes proteicos y lipídicos en plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacarinas en condiciones de estrés salino.

1.5.2 Objetivos específicos

- Comparar la presencia de grupos carbonilo en las proteínas de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacarinas en condiciones de estrés salino mediante espectrofotometría.
- Comparar los niveles de oxidación relativa de lípidos presentes en plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacarinas en condiciones de estrés salino mediante espectrofotometría.

- Identificar la presencia relativa de ubiquitina y proteasoma en *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacarinas en condiciones de estrés salino mediante el uso de anticuerpos específicos

2. Capítulo II: Marco teórico

2.1 Oligosacarinas: Generalidades

Las oligosacarinas son compuestos obtenidos por la degradación de la pared celular de hongos, plantas y algas. Son oligosacáridos que tienen actividad biológica y pueden modular el desarrollo de la planta a muy bajas concentraciones. El estudio de dichos compuestos bioactivos es importante y relevante, ya que los mismos forman parte de un conjunto de moléculas que participan en la activación de vías de defensa en plantas (Enríquez et al., 2010, p. 2).

Las oligosacarinas utilizadas para el presente proyecto son aquellas obtenidas a partir de la pared celular de hongos. La pared de celular de los hongos presenta una estructura con mucha flexibilidad, lo que le brinda protección a la célula de los cambios osmóticos. La pared celular fúngica está compuesta de polisacáridos y proteínas, algunos de los polisacáridos encontrados son la quitina, el glucano y manano. El glucano es un polisacárido estructural y el más importante, que representa el 50-60 % del peso seco de la pared celular fúngica (Pontón, 2008, pp. 1-2).

Los compuestos bioactivos de glucanos fueron los primeros en ser encontrados, están compuestos por residuos de 3-, 6- y 3,6- β -glucósidos, ya en el año 2000 existían reportes de sus efectos biológicos entre los cuales se incluyen la elaboración y recolección de fitoalexinas, las mismas que se definen como compuestos antimicrobianos producidos en plantas. En el 2004, Perkovskaya y colaboradores investigaron a un extracto de hidratos de carbono derivados de la pared celular del hongo *Botrytis cinerea*, el mismo que desarrolló la acumulación y producción de fitoalexinas en células de *Allium cepa* o cebolla (Perkovskaya, Kravchuk, Grodzinsky y Dmitriev, 2004, pp. 1-2).

2.1.2 Mecanismo de acción

Cuando una planta interactúa con factores que generen estrés biótico o abiótico, se provoca una señal que es remitida hacia el interior de la célula, de

esta manera se da una respuesta rápida y específica. Los elicitores son un tipo de moléculas que intervienen en el intercambio de dichas señales y provocan reacciones de protección de las plantas (Yoshikawa, Yamaoka y Takeuchi, 1993, pp. 2-3). Otras investigaciones realizadas por Costales, D y colaboradores en el año 2007, revelaron que las oligosacarinas no estimulan únicamente respuestas de defensa, sino que también están involucradas en la estimulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, reducción de la transpiración mediante el cierre de estomas y el aumento de la producción de auxinas (Costales, Martínez, Núñez, 2007, pp. 1-2).

Las oligosacarinas no tienen el mismo efecto sobre todas las especies vegetales, estudios realizados han demostrado que el efecto puede variar dependiendo del tipo y concentración de las oligosacarinas y de la especie vegetal a la que se le está aplicando dicho producto bioactivo. A pesar de que se conocen algunos de los efectos fisiológicos de las oligosacarinas sobre las plantas, falta determinar por completo el mecanismo de acción de las mismas (Enríquez et al., 2010, p. 5 y Costales et al., 2007, p. 4). Es importante resaltar que la oligosacarina que se va a emplear en el presente proyecto, es un compuesto totalmente novedoso, por lo tanto, no se han validado ninguno de sus efectos sobre las plantas.

2.2 *Arabidopsis thaliana* como planta modelo

A través de los años, muchas investigaciones realizadas en distintas áreas de la biología, han estudiado miles de especies de los diferentes reinos, sin embargo, unas pocas se han estudiado extensivamente como organismos modelo, lo que ha permitido que se acumulen enormes cantidades de información sobre los mismos. Seis son los organismos modelo de los que se dispone para estudios biológicos: *Drosophila melanogaster*, la mosca de la fruta; *Escherichia coli*, una bacteria encontrada en el intestino de los seres humanos así como de otros mamíferos; *Caenorhabditis elegans*, una especie de nemátodo; *Arabidopsis thaliana*, representando al reino plantae; *Mus musculus*, o conocido como ratón doméstico; y *Saccharomyces cerevisiae*, o

levadura, utilizada frecuentemente en la industria alimenticia (Pierce, 2012, pp. 5-6).

Arabidopsis thaliana es la figura predominante en el estudio de la estructura del genoma, regulación génica, desarrollo y evolución en plantas, con la posibilidad de que esta información pueda ser utilizada y aplicada en otras especies vegetales económicamente importantes (Pierce, 2012, p. 461).

Algunas de las ventajas que presenta *Arabidopsis thaliana* para su estudio incluyen; su pequeño tamaño, rápido tiempo de generación, genoma pequeño y la habilidad de generar grandes cantidades de semillas por su autopolinización (Lavagi, Estelle, Weckwerth, Beynon y Bastow, 2012, pp. 1-2). Esta planta completa su desarrollo en aproximadamente 6 semanas, su pequeño tamaño y su capacidad de crecer bajo condiciones de limitada luminosidad, hacen que su cultivo en laboratorio sea relativamente sencillo (Pierce, 2012, p. 6). Adicionalmente, investigaciones en décadas pasadas han generado un registro completo del genoma de esta planta, por consiguiente, se encuentran disponibles anticuerpos desarrollados contra sus proteínas (Lavagi et al., 2012, pp. 1-2).

2.3 Salinidad de suelos

La salinidad se define como el contenido de sales minerales disueltas en un cuerpo de agua, también es válida la expresión salinidad para referirse al contenido de sales en los suelos. La salinidad del suelo se da por una situación donde las sales presentes naturalmente en el mismo reducen la evapotranspiración, y de esta manera el agua presente en el suelo se vuelve menos “disponible” para su extracción por las raíces de las plantas. Esto se traduce en que los cultivos deben realizar un mayor esfuerzo para la extracción del agua en este tipo de suelo (National Research Council, 2006, p. 14). Cuando no es posible eliminar las sales acumuladas por un sistema de drenaje, dichas sales pueden alcanzar niveles perjudiciales para los cultivos (Taiz y Zeiger, 2006, pp. 142-144).

2.3.1 Causas

Existen muchas causas de acumulación de sales en el suelo, entre las causas naturales se encuentran: acumulaciones atmosféricas de sales oceánicas en la extensión de zonas costeras, la penetración de agua marina a los acuíferos de agua subterránea o el movimiento de agua salina de la profundidad hacia el agua dulce, la misma que se halla en la capa freática (Lutenberg, 2010, pp. 11-13).

Algunas de las dificultades provocadas por las sales en los suelos agrícolas son ocasionados por el manejo errado del riego y la ausencia de un apropiado drenaje en el suelo, las sales que se encuentran en el agua de riego, residuos de animales, fertilizantes y nutrientes (Lutenberg, 2010, p. 14). El riego excesivo puede causar la saturación del suelo, la cual concentra las sales absorbidas en los niveles más bajos del suelo, es decir, en la zona de arraigamiento de las plantas (Lutenberg, 2010, p. 14).

2.3.2 Impacto sobre la economía

Existen aproximadamente 77 millones de hectáreas afectadas por la salinidad en el suelo agrícola de todo el mundo, dentro de las cuales aproximadamente un 50 % del rendimiento de los principales cultivos se ha visto disminuido (Hasanuzzaman et al., 2014, pp. 1-2). La pérdida de la producción agrícola debido a daños por suelos salinos a nivel mundial es de \$12 mil millones al año, con tendencia a seguir aumentando (Shabala, 2013, pp. 1-2).

Los suelos salinos tienen importantes efectos negativos sobre la producción agrícola, las condiciones de vida de los agricultores, la economía, el balance de los ecosistemas, etc. Igualmente, el trabajo con suelos afectados por la sal requiere mayor mano de obra para recuperar los suelos, y la reducción del rendimiento agrícola, resulta en menor retribución para los agricultores (FAO, 2015). Esta disminución de ingresos y la pérdida de tierras son frecuentemente causantes de migración de los campesinos hacia las ciudades, debido a que los programas de recuperación de suelos son extremadamente costosos (FAO, 2015).

2.3.3 Efectos sobre plantas

Las raíces cumplen un importante rol durante el crecimiento y desarrollo de las plantas y son las primeras en encontrarse con la salinidad del suelo. Dicha salinidad puede ocasionar una reducción de la toma de agua, inhibición del crecimiento radicular e inducción de estrés oxidativo en las células vegetales (Munns y Tester, 2008, pp. 1-2).

El estrés oxidativo tiene entre sus efectos, la interrupción de la homeostasis celular debido a la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Hernández, Fernández, Díaz y Olmos, 2009, pp. 1-2). Las especies reactivas de oxígeno incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos. Los radicales libres de oxígeno son considerados como subproductos de la respiración aeróbica y se generan en diferentes compartimentos celulares como las mitocondrias, los cloroplastos o los peroxisomas (Petrov, Hille, Mueller y Gechev, 2015, pp. 1-3). Normalmente, estas dosis de ROS son bajas y se emplean para señalización celular, no obstante, a mayores concentraciones representan una amenaza significativa que con el tiempo llega a conducir a la muerte celular programada. Estas moléculas son altamente reactivas y son fuertes oxidantes que pueden reaccionar con moléculas biológicas y dañarlas en gran manera. (Petrov et al., 2015, pp. 1-3).

Entre las biomoléculas que pueden ser afectadas se encuentran: ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e hidratos de carbono. Las lesiones que sufre el ácido desoxirribonucleico (DNA por sus siglas en inglés), incluyen modificaciones en bases de nucleótidos, formación de sitiosapurínicos o sitios AP, ruptura de simple o doble cadena, etc. Como consecuencia de estas modificaciones, tienen lugar mutaciones en el DNA las cuales pueden ser mortales para el organismo (Svilar, Goellner, Almeida y Sobol, 2011, pp. 1-3). En cuanto al efecto sobre los hidratos de carbono, aún falta dilucidar por completo los efectos que tienen las especies reactivas de oxígeno, sin embargo, estudios han establecido que los polisacáridos del grupo de los glucosaminoglucanos son susceptibles a la degradación cuando hay la

existencia de especies reactivas de oxígeno (González, Betancourt y Ortiz, 2000, pp. 3-5).

En proteínas, algunos aminoácidos, así como los enlaces disulfuro y los enlaces peptídicos son fraccionados por las especies reactivas de oxígeno provocando una alteración en su estructura y su función. Aminoácidos tales como la tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína tienen la peculiaridad de ser los más afectados, generando componentes tales como la fenil-quinurenina o la quinurenina (González et al., 2000, p. 5).

Los ROS forman entrecruzamientos de tipo covalente, por lo cual, se induce a fallas de conformación en la cadena polipeptídica y esto da lugar a la pérdida de la función, y consecuentemente a una mayor susceptibilidad de la proteína a degradación por enzimas proteolíticas. Las proteínas oxidadas son fácilmente reconocidas por sistemas de degradación proteolíticos, debido a la formación de grupos carbonilo y a cambios conformacionales de la molécula (González et al., 2000, p. 5).

Los lípidos también son susceptibles a la oxidación por efecto de las especies reactivas de oxígeno, dando como resultado distintos subproductos. Se sabe que el malondialdehído (MDA por sus siglas en inglés) es uno de los subproductos más abundantes de la oxidación lipídica (García, Rodríguez y Peñaloza, 2005, pp. 1-2). Las membranas de los tejidos vegetales son particularmente sensibles al daño oxidativo producido por ROS (Davey, Stals, Keulemans y Swennen, 2005, pp. 1-2).

2.4 Estrategia de los seres vivos frente a condiciones de estrés: generalidades

Los seres vivos están continuamente expuestos a factores ambientales impredecibles e inevitables y por ello cuentan con mecanismos que ayudan a tolerar dichas situaciones ambientales, como una estrategia de supervivencia (Szöllősi, 2014, pp. 89-94). Diferentes tipos de estrés tanto biótico como abiótico, inducen tolerancia mediante adaptaciones morfológicas y fisiológicas (Miransari, 2014, p. 541).

Entre los cambios fisiológicos que se dan bajo estrés, se encuentran la producción de diferentes compuestos, tales como osmolitos o enzimas, así como también la activación de diferentes rutas de señalización del sistema antioxidante, la señalización redox, señalización hormonal, etc. (Miransari, 2014, p. 545).

2.4.1 Sistema antioxidante: Generalidades

Las especies reactivas de oxígeno son un producto del metabolismo normal y tienen importantes roles en cuanto a la señalización celular y control del equilibrio redox, mientras que la generación desbalanceada de ROS puede causar daños en biomoléculas (Bela et al., 2015, p. 1). Las plantas responden a este estrés oxidativo mediante la activación de diferentes vías de señalización y la producción de moléculas antioxidantes. Dichas moléculas antioxidantes tienen la capacidad de degradar los productos del estrés celular, tales como las especies reactivas de oxígeno (Miransari, 2014, p. 541). Existen diferentes sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para mantener los niveles normales de ROS y minimizar los daños derivados de los mismos (Bela et al., 2015, p. 1).

Entre las principales moléculas no enzimáticas implicadas en el sistema antioxidante se encuentran el ascorbato, los tocoferoles, el glutatión y los carotenoides (Waśkiewicz, Beszterda, y Goliński, 2014, pp. 202-206). Igualmente, las principales enzimas implicadas en el sistema antioxidante pueden ser encontradas en casi todos los compartimientos de las células vegetales, entre las mismas se encuentran: superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa (Saed, Pakniyat, Pirasteh, y Azooz, 2014, pp. 585-590).

2.5 Sistema ubiquitina-proteasoma

Una estrategia para mitigar daños es el sistema ubiquitina proteasoma (UPS por sus siglas en inglés), este sistema está compuesto por distintos tipos de proteínas, entre las cuales se encuentran; la proteína ubiquitina, enzima activadora de ubiquitina (E1), enzima conjugadora de ubiquitina (E2), enzima

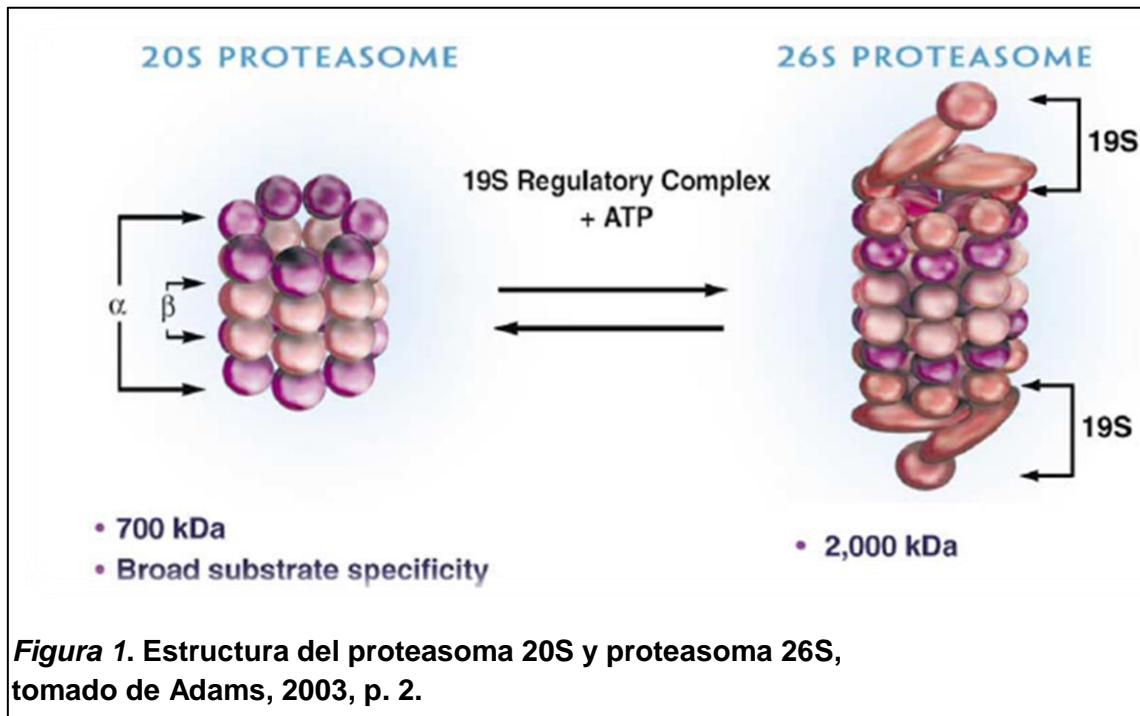
ubiquitina proteinligasa (E3), también dispone de un complejo enzimático llamado proteasoma, compuesto por varias subunidades. Este sistema está presente en todas las células eucariotas y también se puede encontrar en algunas bacterias y Archaeas. En los últimos años se ha demostrado la gran importancia que tiene el UPS en el ciclo celular y la supervivencia de las células (Adams, 2003, pp. 1-3).

La principal función de éste sistema es la degradación de proteínas dañadas o innecesarias en la célula, lo que asegura la presencia de un proteoma funcional en la misma. Durante el metabolismo normal en la células, así como en situaciones de estrés oxidativo, el sistema ubiquitina-proteasoma debe garantizar una respuesta celular regulada, y por lo tanto la degradación de proteínas oxidadas e innecesarias (Jung, Höhn, y Grune, 2014, p. 1). Cuando la degradación de las proteínas oxidadas es interrumpida, el efecto que provoca es potencialmente dañino, ya que se da una acumulación de proteínas alteradas en la célula, dando lugar a la muerte celular (Adams, 2003, pp. 1-3).

2.5.1 Estructura

El proteasoma 26S es un complejo multiproteico de 2000 kDa. que consiste en una subunidad 20S que está asociada con una o dos subunidades 19S. La subunidad reguladora 19S está conformada por una tapa y una base, ésta última está constituida por 9 subunidades, seis de ellas con actividad ATPasa, mientras que la tapa está constituida por 12 subunidades, las cuales interaccionan con los anillos α de 20S y funcionan abriendo la cavidad, con el fin de introducir los sustratos en esta área (Rocha, 2013, pp. 4-5).

Por otra parte, la subunidad 20S se asemeja a un cilindro compuesto por 4 anillos apilados, cada anillo está conformado por siete proteínas individuales. Los dos anillos internos contienen subunidades proteicas β , los cuales presentan sitios activos proteolíticos, mientras que los anillos externos están conformados por subunidades proteicas α , las cuales sirven como “compuerta” para el paso de la proteína hacia el núcleo catalítico (Fig.1) (Jung, Höhn, y Grune, 2014, p. 3).



La ubiquitina por otra parte, es una proteína pequeña de 76 residuos, con una masa molecular de 8.5 kDa. y cuya denominación se da por ser ubicua. Esta pequeña proteína presenta entre sus múltiples funciones el marcaje de proteínas a degradar, mediante la intervención de un grupo de enzimas que en conjunto con la ubiquitina, se encargan del reconocimiento y marcaje de las proteínas a degradar. Entre sus características principales, se destaca su cola C-terminal y 7 residuos de lisina (Jung et al., 2014, p. 2).

2.5.2 Función y mecanismos

La función principal del sistema ubiquitina-proteasoma, es la eliminación de proteínas anómalas o innecesarias, caso contrario se provocaría una acumulación la cual puede llegar a ser mortal para la célula. (Voet y Voet, 2006, pp. 1409-1414). El sistema ubiquitina-proteasoma está involucrado también, en la regulación del ciclo celular y del crecimiento en plantas, y tiene importantes roles en los procesos apoptóticos. (Finley, 2012, pp. 2-3).

El mecanismo de funcionamiento de este sistema, consiste en el marcaje de proteínas seleccionadas para su degradación mediante la ubiquitina. Las

proteínas seleccionadas se unen a la ubiquitina por un enlace covalente, dicha selección es una reacción que requiere ATP. Tres reacciones intervienen en la fijación de la ubiquitina a la proteína a degradar, cada una mediada por una enzima diferente (Rocha, 2013, p. 3).

En la primera reacción, el grupo carboxilo terminal de la ubiquitina se une a una enzima activadora de ubiquitina E1 mediante un enlace tioéster, dicha reacción requiere ATP. La ubiquitina ya activa se transfiere a un grupo sulfhidrilo de un E2 o enzima conjugadora de ubiquitina, la misma que constituye la segunda reacción. Posteriormente la ubiquitina proteinligasa o E3 transfiere a la ubiquitina activada desde E2 hasta un residuo de lisina de su proteína diana, formando un enlace isopeptídico y así se concreta la tercera reacción (Fig. 2) (Voet y Voet, 2006, pp. 1404-1405).

Con el fin de que la proteína seleccionada sea degradada eficientemente, ésta debe estar unida a una cadena de poliubiquitina de al menos 4 moléculas de ubiquitina, de hecho, estas cadenas pueden llegar a longitudes de 50 o más moléculas (Voet y Voet, 2006, p. 1405).

Como se explicó anteriormente, el proteasoma 26S consiste en una subunidad reguladora 19S situada en los extremos de la subunidad 20S con forma cilíndrica. La subunidad reguladora 19S reconoce las cadenas de poliubiquitina, de manera que se forma una unión entre la cadena y la subunidad. Posteriormente, la proteína que será degradada se desdobra, introduciendo la misma al interior del núcleo proteolítico del proteasoma 20S. Al mismo tiempo ocurre una remoción de la cadena de poliubiquitina del sustrato y las ubiquitinas se pueden reutilizar para el marcaje de otras proteínas a degradar (Fig. 2) (Rocha, 2013, pp. 2-4).

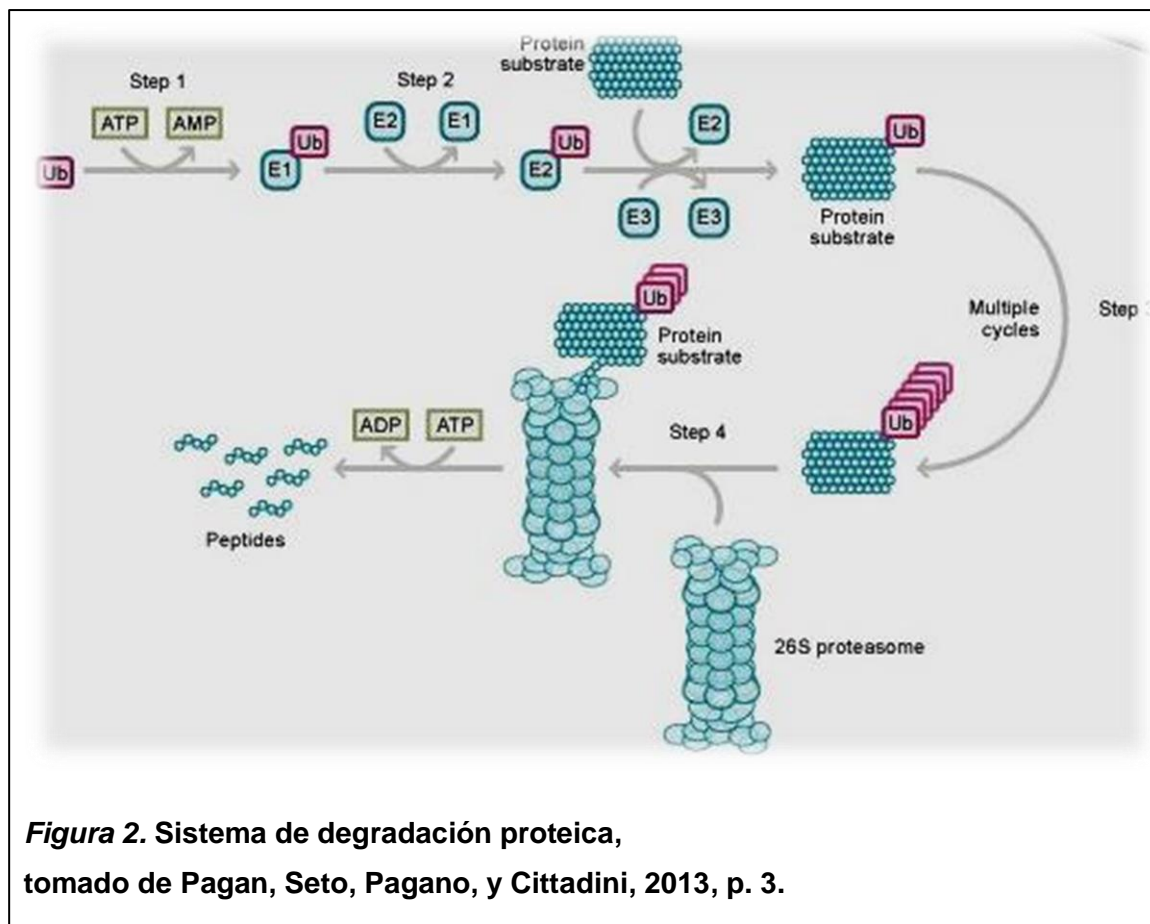


Figura 2. Sistema de degradación proteica, tomado de Pagan, Seto, Pagano, y Cittadini, 2013, p. 3.

3. Capítulo III: Metodología

3.1 Diseño experimental

Los factores en estudio fueron: la composición del medio de inducción así como el tiempo de exposición a dichos componentes. Los niveles del factor tratamiento fueron MS, MS + NaCl, FO 1mg.L⁻¹ y FO 1mg.L⁻¹ + NaCl, y los niveles del factor tiempo fueron 1 día, 3 días y 7 días. Se realizaron 3 repeticiones para cada nivel del factor tratamiento y para cada nivel del factor tiempo. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar DBCA. Las variables en estudio fueron los niveles de sólidos solubles totales, niveles de proteínas solubles totales, los niveles de oxidación de componentes solubles, niveles de oxidación en componentes lipídicos y actividad enzimática del proteasoma 20S. Se realizó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk mediante Rcommander (Fox, 2005, pp. 3-10). Además, este análisis, se complementó con un test de comparaciones múltiples de Duncan para un nivel de significancia $p \leq 0.001$, con el fin de encontrar diferencias significativas de cada factor analizado.

Tabla 1. Concentraciones utilizadas para la elaboración de medios de cultivo líquidos.

VARIABLES				
Niveles de sólidos solubles totales	Niveles de proteínas solubles totales	Niveles de oxidación en componentes solubles	Niveles de oxidación en componentes lipídicos	Actividad enzimática del proteasoma 20S
FACTORES				
Tratamiento				
MS	MS + NaCl	FO 1mg.L ⁻¹	FO 1mg.L ⁻¹ + NaCl	
Tiempo				
1 día	3 días	7 días		

3.2 Preparación de medios de cultivo

Para el crecimiento de *Arabidopsis thaliana in vitro* se utilizó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (Yoshikawa et al., 1993, p. 1), el cual es comúnmente usado para el desarrollo de cultivos vegetales. Se utilizó medio líquido, con la finalidad de poder cambiarlo fácilmente para inducir respuesta de las plantas a estrés. El medio se preparó en matraces de 250 mL de capacidad, es importante resaltar que todos los matraces fueron de igual tamaño para evitar cambios en las condiciones de crecimiento. Se prepararon 100 mL de medio MS por triplicado, disolviendo 4.3 g de MS y 6.2 g de sacarosa en 100 mL de H₂O destilada, se ajustó el pH del medio entre 5.7 y 5.8 y se esterilizó en el autoclave.

Las soluciones utilizadas para la inducción fueron oligosacarinas derivadas de los hongos, las mismas que se obtuvieron gracias al trabajo y a la gentil donación del Dr. Juan Carlos Cabrera Pino de la *Unité de Biotechnologie* en Bélgica, quien donó los productos. Por motivos de procesos de patentes el bioproducto fue denominado FO (Fungal Oligosaccharines por sus siglas en inglés), el cual se utilizó a concentración de 1 mg.L⁻¹ y cloruro de sodio (NaCl) a 100 mM.

3.2 Desinfección de semillas de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas botánicas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ecotipo Columbia fueron desinfectadas usando solución de hipoclorito de sodio que se preparó diluyendo 1 mL de éste compuesto comercial en agua destilada estéril, en proporción 1:10 en un tubo de 1.5 mL, las semillas, juntamente con la solución se agitaron utilizando un vórtex marca Corning y se dejó actuar en reposo durante 5 minutos. Las semillas sedimentaron y el sobrenadante con todas sus impurezas se desechó. Posteriormente, se adicionó 1 mL de solución etanol absoluto / H₂O destilada estéril / cloro, en proporción 7:2:1, en el mismo tubo en el cual estaban las semillas de *Arabidopsis thaliana*, se homogeneizó utilizando un vórtex y nuevamente se dejó actuar la solución durante 5 minutos. La solución se retiró hasta dejar un volumen de aproximadamente 100 µL en el

tubo. El último lavado se repitió un total de tres veces. Finalmente, las semillas se dejaron reposar en H₂O destilada durante 48 horas a 4 °C antes de su siembra.

3.3 Siembra de semillas de *Arabidopsis thaliana* en medio de cultivo líquido

La siembra de semillas se realizó en medio MS, en una cámara de flujo laminar marca ESCO Opti MAIR utilizada únicamente para trabajo con material vegetal. Las semillas se depositaron en los matraces de 250 mL de capacidad con ayuda de una micropipeta marca Corning de 1000 µL. Los matraces se sellaron con papel aluminio y parafilm y se colocaron en un agitador marca Thermo Scientific a 200 rpm dentro de una incubadora especial para plantas marca Wisd, cuyas condiciones fueron 23 °C de temperatura, 50 % de humedad y fotoperiodo de 16 horas con luz y 8 horas de oscuridad.

3.4 Inducción con bioproducto y/o NaCl

Las semillas sembradas en medio líquido crecieron durante 15 días, en los cuales se observó germinación, aparición de raíces y hojas. Al finalizar este tiempo, el medio en cada uno de los matraces fue reemplazado por medio MS fresco que se dejó bajo las mismas condiciones de crecimiento descritas anteriormente, por un periodo de 24 horas de aclimatación, después de lo cual, el medio MS se modificó mediante la adición de 4 mL de NaCl de una solución stock a 2.7 M y 4 mL de FO (Fungal Oligosaccharines) de una solución stock, cuya concentración estaba a 25 mg.L⁻¹ para alcanzar las concentraciones finales deseadas: FO 1mg.L⁻¹ y NaCl 100mM.

La concentración de cloruro de sodio (NaCl), se escogió con la finalidad de poder asemejar las concentraciones de sales que contienen normalmente los suelos salinos (Taiz y Zeiger, 2006, p. 142). Una vez cambiados los medios y hecha la inducción, se procedió a tomar muestras en cada uno de los tiempos de muestreo.

3.5 Toma de muestras

La toma de muestras de 24 horas, 72 horas y 7 días, se realizó en la cámara de flujo laminar. El medio de cada uno de los matraces se escurrió en un vaso de precipitación para desecharlo posteriormente. Las muestras vegetales se tomaron con unas pinzas y se colocaron en tubos de 1.5 mL previamente pesados. Las plantas colectadas en los tubos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, luego de lo cual, los tubos se pesaron y posteriormente se almacenaron en un ultracongelador a - 80 °C marca VWR International hasta su procesamiento.

3.6 Procesamiento de muestras

Para todos los procedimientos utilizados en este proyecto, exceptuando aquel para la medición de la actividad del proteasoma, el procesamiento de las muestras se realizó macerando 200 mg de planta en un tubo de 1.5 mL con un pistilo estéril, agregando 50 µL de PBS 1X que contenía inhibidor de proteasas SIGMAFAST Protease Inhibitor Cocktail Tablets marca SIGMA ALDRICH a concentración 5X, con el fin de que no se degraden las proteínas presentes en la muestra por acción de las proteasas.

La planta se maceró hasta que no se observaran residuos sólidos, luego de lo cual las muestras de cada tratamiento se centrifugaron en una centrífuga 5804 R marca Eppendorf a 14000 rpm durante 30 minutos y 4 °C. El sobrenadante se separó y se lo colocó en tubos nuevos de 1.5 mL, se estimó el volumen recolectado y el extracto recogido se almacenó a - 80 °C en un ultracongelador marca VWR International.

El procesamiento de las muestras destinadas a la medición de la actividad del proteasoma 20S, se realizó tal como se describe previamente, con la diferencia de que las muestras fueron maceradas sin el uso de inhibidor de proteasas para evitar la privación de la actividad del proteasoma 20S.

3.7 Cuantificación de proteínas mediante BCA

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA por sus siglas en inglés) debido a su mayor sensibilidad, usando el Kit QuantiPro BCA de la marca SIGMA ALDRICH. En primer lugar, se preparó el reactivo de BCA que consiste en 25 partes del reactivo BCA, 25 partes del buffer y 1 parte del reactivo de cobre. La curva de calibración de este ensayo se realizó utilizando como estándar una solución de proteína albúmina de suero bovino (BSA) con concentración de $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, en un rango de 0 – 10 μg de proteína. Cada concentración se realizó por triplicado en una microplaca de 96 pocillos marca STERILIN.

Las muestras de los extractos proteicos obtenidos, como se describió previamente, se diluyeron en una proporción 1:20 con buffer fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés) y de esta solución diluida se colocaron 5 μL en cada pocillo de la microplaca que contenía 200 μL de reactivo BCA, para determinar su concentración.

La microplaca con las muestras y los estándares se incubaron por media hora a 37 °C en una incubadora marca Labnet international, Inc., luego de lo cual se pudo apreciar el apareamiento de un color púrpura en las muestras, debido a la reacción del BCA con las proteínas. Las absorbancias de las diferentes soluciones se midieron espectrofotométricamente en un lector de placas multimodal marca BMG LABTECH FLUOstar Omega a 562 nm. Cada medición se realizó por triplicado.

3.8 Determinación de concentración de sólidos solubles totales

La determinación de sólidos solubles totales se realizó con el fin de conocer los niveles de oxidación de los mismos, puesto que por razones de falta de insumos no se pudo purificar únicamente las proteínas de los extractos del material vegetal. Con esta determinación se logró conocer la concentración de compuestos disueltos en cada muestra y consecuentemente se pudo colocar igual cantidad de sólidos para el ensayo de determinación de oxidación.

La determinación de sólidos solubles totales en las muestras se realizó mediante un método gravimétrico. Para cada tratamiento se elaboraron 3 recipientes de papel aluminio, los cuales se colocaron en una estufa marca Labnet international, Inc., a 60 °C durante toda la noche, con el fin de eliminar la humedad; se determinaron los pesos de los mismos por triplicado hasta alcanzar pesos constantes.

Una vez alcanzada esta condición entre dos medidas consecutivas, un volumen entre 10 a 30 μL de muestra procesada se depositó en cada recipiente. Los recipientes cuidadosamente se colocaron nuevamente en la estufa a 60 °C hasta secar la muestra completamente, verificando un peso constante del residuo como se indicó anteriormente.

El peso del residuo se obtuvo por diferencia entre el peso del recipiente vacío con el peso del recipiente que contiene la muestra seca y posteriormente se determinó la concentración de los sólidos solubles por unidad de volumen de muestra analizada.

3.9 Determinación de carbonilos reactivos a DNP

La determinación de los niveles relativos de carbonilos de componentes solubles fue realizada adaptando ligeramente el protocolo de Olivier, Ahn, Moerman, Goldstein y Stadtman, 1987, pp. 2-3.

La reacción con la DNP (2,4 dinitrofenilhidrazina) es utilizada como un mecanismo de análisis cualitativo y cuantitativo de la presencia de grupos carbonilo, ya que el producto formado, la DNPH (2,4 dinitrofenilhidrazona) es un compuesto coloreado que se puede medir espectrofotométricamente a 365 nm. En vista de que las posibilidades de generación de productos mediante esta reacción son múltiples, se decidió expresar el contenido de grupos carbonilos como la hidrazona del formaldehído, para lo cual se preparó una curva de calibración en base a las absorbancias de este compuesto a diferentes concentraciones.

La curva de calibración de carbonilos se realizó mediante la síntesis de hidrazona ($C_7H_6N_4O_4$) utilizando el formaldehído (CH_4) como fuente del grupo funcional. La hidrazona se obtuvo gracias al trabajo y a la gentil colaboración del Dr. Jorge Heredia, del Centro de Investigaciones Traslacionales (CIT-UDLA). Se pesaron 5 mg de la hidrazona y se disolvió en 1 mL de etanol absoluto mediante agitación en vórtex marca Corning LSE, la concentración final de la solución fue $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

En una microplaca de 96 pocillos marca STERILIN se colocaron 100 μL de etanol absoluto como blanco por triplicado, a continuación, se colocaron 200 μL de la mezcla por triplicado, realizando diluciones en serie de 1:2 con etanol absoluto, hasta completar un total de 24 diluciones, la última concentración evaluada fue de $1,5259 \times 10^{-4} \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las absorbancias de las soluciones se midieron en un lector de placas multimodal marca BMG LABTECH FLUOstar Omega a 365 nm.

Para la determinación de componentes reactivos a DNP se procedió a colocar en tubos de ensayo de vidrio 2 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) al 0.2 % (p/v) preparada en HCl 2 N, al cual se le añadió 2 mg del extracto total soluble de las muestras, la mezcla se dejó incubando durante 2 horas a temperatura ambiente luego de lo cual, la reacción fue detenida por adición de 1.5 mL de TCA 20 % (p/v). La precipitación de los componentes por presencia de TCA se llevó a cabo durante aproximadamente 20 horas a 4 °C.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron en una centrífuga 5804 R marca Eppendorf a 5000 rpm durante 10 minutos, eliminando el sobrenadante y realizando 3 lavados con 1 mL de solución etanol / acetato de etilo en proporción 1:1 y centrifugando la muestra en las mismas condiciones anteriores entre cada lavado. Después de la última centrifugación, el sólido se disolvió en 1 mL de NaOH 1 N.

La absorbancia de las soluciones obtenidas se determinó a 365 nm en un lector de placas multimodal marca BMG LABTECH FLUOstar Omega. Para cada muestra se preparó una solución blanco bajo las mismas condiciones

descritas pero sin la presencia de DNP. Se realizaron tres réplicas del procedimiento por cada tratamiento.

3.10 Análisis de peroxidación lipídica mediante TBA

La presencia de los radicales libres de oxígeno (ROS) puede generar reacción de oxidación a biomoléculas lipídicas que se encuentran presentes en membranas celulares, generando múltiples subproductos. Uno de los principales y más estudiados es el malondialdehído (MDA), por esta razón los resultados de esta oxidación se expresan como nmoles de MDA por gramo muestra, ya que se utilizó iguales cantidades de material vegetal (González et al., 2000). La determinación de los niveles relativos de peroxidación de componentes lipídicos fue tomada del protocolo de Du y Bramlage, 1992, pp. 1-2, al mismo que se le realizaron algunas modificaciones.

Se pesaron 50 mg de material vegetal, los cuales fueron homogeneizados con 250 μ L de acetona en tubos de 1.5 mL, utilizando pistilos estériles y manteniendo la muestra siempre a 4 °C para minimizar la evaporación de la acetona. La muestra se maceró hasta que no se observaran residuos sólidos en el tubo. Una vez homogeneizada la muestra se procedió a centrifugarla en una centrífuga 5804 R marca Eppendorf a 14000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante se extrajo y se lo colocó en un tubo limpio de vidrio con tapa rosca, al cual se adicionó 125 μ L de H₂O destilada, manteniendo la misma a 4 °C.

Se añadieron 250 μ L de TCA 20 % y 125 μ L de TBA 0.67 % a las muestras y se calentaron a 92 °C en un baño maría durante 15 minutos, luego de lo cual se enfriaron en agua corriente y se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante de cada muestra se colocó en tubos nuevos de 1.5 mL y se adicionaron 750 μ L de H₂O destilada.

Las soluciones se colocaron por triplicado en una microplaca de 96 pocillos marca STERILIN y su absorbancia se midió a 532 nm en un lector de placas multimodal marca BMG LABTECH FLUOstar Omega. Para cada muestra se preparó un blanco, siguiendo el mismo procedimiento, pero en lugar de acetona

se colocó el mismo volumen de H₂O destilada. Se realizaron tres réplicas del procedimiento por cada tratamiento.

3.11 Electroforesis SDS-PAGE de las muestras

La visualización de las proteínas presentes en las muestras se realizó mediante electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Los geles desnaturizantes se prepararon usando una concentración de acrilamida al 12 % y un diámetro de 1 mm, su composición fue la siguiente:

Tabla 2. Componentes utilizados en la preparación de geles desnaturizantes de poliacrilamida.

Compuesto	Gel separador	Gel concentrador
H ₂ O destilada	1,26 mL	1,4 mL
Acrilamida/bis-acrilamida 30 %	2,5 mL	335 µL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,24 mL	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	250 µL
SDS 10 %	60 µL	10 µL
Persulfato de amonio 10 %	40 µL	10 µL
TEMED	5 µL	5 µL

Las muestras de proteína se prepararon en buffer de carga 5X, cuya composición fue: 0.5 mL Tris 1 M pH 7, 2.5 mL SDS 20 %, 2 mL glicerol, 0.2 mg azul de bromofenol, 500 µL β-mercaptoetanol y se aforó hasta 10 mL con H₂O destilada. La separación de proteínas en el gel se hizo preparando buffer de corrida 1X, pesando 30.3 g Tris base, 144 g glicina y 50 mL SDS 20 % y se aforó hasta 1 L con H₂O destilada. La tinción de las proteínas en el gel se logró con una solución de azul de Coomassie preparada, disolviendo 60 mL etanol absoluto, 7.5 mL ácido acético y 250 mg de azul brillante de Coomassie en polvo y se aforó hasta 100 mL con H₂O destilada.

La muestra a cargar en el gel se preparó mezclando 20 µg de proteína con 1 µL buffer de carga 5X, ésta se homogeneizó en un tubo limpio de 0.6 mL y se calentó en un bloque térmico marca Labnet international, Inc. a 95 °C durante 5 minutos. Pasados los 5 minutos, las muestras se depositaron en el gel desnaturizante en carriles independientes, adicionalmente se usó un

marcador marca SIGMA ALDRICH para determinar los pesos de las proteínas separadas.

El voltaje de la cámara marca Bio-Rad se configuró a 150 V, dejando correr las muestras durante una hora y media aproximadamente. Una vez concluida la separación, el gel se tiñó usando solución de azul de Coomassie durante 30 minutos, en un sistema de agitación marca Labnet international, Inc. y posteriormente se eliminó el excedente de colorante con lavados sucesivos utilizando H₂O destilada.

El gel correctamente desteñado fue escaneado en un fotodocumentador Chemidoc de la marca Bio-Rad usando el software Image Lab en la aplicación Protein Gels- Stain Free Gel y con una exposición de 0.500 segundos.

3.12 Técnicas de inmunodetección

Para realizar análisis inmunoquímicos, se utilizó la técnica Dot Blot. Para ello las proteínas extraídas fueron colocadas directamente sobre la membrana PVDF. Se procedió a diluir las proteínas con ácido trifluoroacético (TFA) al 70 % (v/v), de manera que estén a una concentración de 100 ng.μL⁻¹. Posteriormente, una membrana PDVF fue adaptada con una placa donde se colocan puntas de micropipeta, de manera que la misma quede como molde para facilitar la elaboración de círculos (dots) sobre la membrana. Con una micropipeta marca Corning se tomaron 300 ng de cada muestra, los que se depositaron sobre la superficie de la membrana seca y se dejó reposar para alcanzar un secado total durante toda la noche, la placa se cubrió con papel para evitar contaminación de la membrana. Este procedimiento se realizó dentro de una sorbona marca BIOBASE.

Concluido el paso anteriormente descrito, la membrana se colocó en un recipiente con solución de leche descremada al 5 % o solución de bloqueo BSA / PBS-T 1 % de la marca Thermo Scientific y se bloqueó durante una hora a temperatura de 4 °C y agitación constante. Una vez concluido el tiempo de bloqueo, la membrana se incubó con anticuerpo primario anti-ubiquitina de la

marca Agrisera en diluciones 1:10000 o anti-proteasoma de la marca Agrisera en diluciones 1:2000 durante 16 horas a 4 °C y agitación constante.

Posteriormente, se realizaron tres lavados de la membrana de 15 minutos cada uno con solución PBS tween 1X (PBS 1X + 2 mL Tween 20) y se realizó una segunda incubación con anticuerpo secundario preparado con dilución 1:25000 durante una hora a 4 °C y agitación constante. Finalmente, se realizaron 3 lavados en las mismas condiciones anteriormente explicadas y se adicionó una solución de quimioluminiscencia marca Thermo Scientific, preparada de acuerdo a las instrucciones del fabricante, dejando actuar la solución en la membrana durante 1 minuto.

La membrana se colocó en un fotodocumentador Chemidoc de la marca Bio-Rad utilizando una pinza y se procedió a realizar la lectura de la misma. El software utilizado fue Image Lab, empleando la aplicación Blots-Chemi y exponiendo la membrana durante 0.500 segundos.

La detección de proteínas oxidadas se realizó también por técnicas de inmunodetección, con una derivatización de las muestras antes de depositarlas en el gel de poliacrilamida. Para esta técnica se utilizó el kit OxyBlot Protein Oxidation Detection de la marca Merck Millipore. Cabe recalcar que el kit empleado en el presente proyecto no presenta antecedentes de haber sido utilizado en ensayos con tejidos vegetales, únicamente se ha empleado en ensayos con tejidos animales, por lo tanto, no existe un protocolo validado para el trabajo con plantas y consecuentemente el ensayo realizado fue preliminar. Cada muestra preparada involucró 20 µg de proteína por duplicado, una alícuota se utilizó para el control positivo y la otra alícuota se utilizó para el control negativo. El uso de la solución de control negativo, permite una comparación de proteínas que han sido y no modificadas por oxidación. En concreto, las bandas que están presentes en la reacción de derivatización, pero ausentes en la reacción de control negativo, son aquellas proteínas que efectivamente presentan modificaciones por causa de la oxidación.

Para la preparación de la mezcla se tomaron 5 μL de muestra cuya concentración estaba a 4 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$, a continuación se añadieron 5 μL de SDS 12 % para que generen una concentración final de SDS 6 %. Posteriormente se añadieron 10 μL de solución DNP 1X a la alícuota destinada para la reacción, mientras que a la alícuota destinada para el control negativo se adicionaron 10 μL de solución de control de derivatización. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y la reacción se detuvo luego de este tiempo con la adición de 7.5 μL de solución de neutralización.

La membrana se bloqueó y se incubó con los anticuerpos tal como se explicó en la técnica realizada de Dot Blot. Los cambios realizados fueron el tipo de anticuerpo primario de la marca Merck Millipore que en este caso fue específico frente a DNP, en diluciones 1:150 y el anticuerpo secundario en diluciones 1:300, además, el tiempo de incubación del anticuerpo primario fue de tres horas. Posteriormente, se realizó lectura de la membrana en las mismas condiciones descritas anteriormente en la técnica de Dot Blot.

3.14 Actividad enzimática proteasoma 20S

El análisis de la actividad enzimática del proteasoma 20S proporciona una idea más clara sobre la respuesta de las plantas tratadas con el bioestimulante, para este ensayo se utilizó el kit 20S Proteasome Activity Assay de la marca Merck Millipore. Adicionalmente los reactivos necesarios para el ensayo fueron preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante:

- Buffer de ensayo 1X: se disolvieron 1.5 mL de buffer de ensayo 10X en 13.5 mL de H_2O destilada y se almacenó el mismo en 4 °C
- Sustrato de proteasoma: El sustrato se resuspendió en 65 μL de dimetilsulfóxido (DMSO)
- Estándar aminometil cumarina (AMC): El estándar se resuspendió en 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO)
- Proteasoma 20S control positivo: se realizaron diluciones 1:6, 1:18, 1:72, 1:216, las diluciones se realizaron con buffer de ensayo 1X.
- Lactacisteína: El inhibidor se resuspendió en 10 μL de DMSO

Para realizar la medición de la actividad enzimática fue necesario realizar una curva de calibración. El ensayo usa un péptido unido covalentemente al fluoróforo 7-Amino-4-metil-cumarina (AMC). La reacción proteolítica del proteasoma 20S corta el sustrato unido con este fluoróforo, dicha escisión emite una fluorescencia de AMC libre que puede cuantificarse utilizando un filtro de 380/460 nm.

La curva estándar de AMC fue realizada en una microplaca de 96 pocillos para fluorescencia marca STERILIN, usando 100 μL de buffer de ensayo 1X como blanco por triplicado. A continuación las muestras se prepararon por doble dilución partiendo de una concentración inicial de 12.5 μM hasta alcanzar una concentración final de 0.4 μM . La lectura de las emisiones fluorescentes de cada solución a 380/460 nm se realizaron en un espectrofluorímetro modelo Synergy HT marca Bio-Tek.

Se realizó un ensayo para medir la actividad enzimática del proteasoma 20S como control positivo provisto en el kit. Las distintas concentraciones de proteasoma se analizaron realizando diluciones 1:6, 1:18, 1:72, 1:216 y adicionando buffer, sustrato e inhibidor de la actividad proteolítica. La microplaca se incubó a 40 °C en una incubadora marca Labnet international, Inc. durante 2 horas, luego de lo cual, se leyó la fluorescencia de la AMC liberada a 380/460 nm en un espectrofluorímetro.

En una microplaca de 96 pocillos para fluorescencia marca STERILIN se colocaron por triplicado las muestras de plantas de los distintos tratamientos de MS, FO 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, MS + NaCl y FO 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NaCl. A continuación, se colocó el sustrato en cada pocillo que contenía la muestra y en distintos pocillos se colocaron las muestras, nuevamente con el sustrato y adicionalmente se colocó el inhibidor lactacisteina en la mezcla. Igualmente en diferentes pocillos se colocó blanco de buffer y blanco de sustrato, tal como se muestra en la tabla 3.

Por último, la placa se incubó a 40 °C en una incubadora marca Labnet international, Inc. durante 2 horas y a continuación se leyó la fluorescencia a 380/460 nm en un espectrofluorímetro modelo Synergy HT marca Bio-Tek.

Tabla 3. Tratamientos con 72 horas de inducción con sus respectivos reactivos para la medición de la actividad del proteasoma 20S

Muestras	Buffer de ensayo 1X (μL)	H ₂ O destilada (μL)	Muestra (μL)	Inhibidor lactacistéina (μL)	Sustrato del proteasoma (μL)
Buffer de ensayo	10	90	-	-	-
Blanco de sustrato	10	80	-	-	10
MS	10	81	9	-	10
MS+NaCl	10	81	9	-	10
FO 1mg.L ⁻¹	10	81	9	-	10
FO 1mg.L ⁻¹ + NaCl	10	81	9	-	10
MS	10	80	9	1	10
MS+NaCl	10	80	9	1	10
FO 1mg.L⁻¹	10	80	9	1	10
FO 1mg.L⁻¹ + NaCl	10	80	9	1	10

4. Capítulo IV: Resultados

4.1 Niveles de sólidos solubles totales

De acuerdo al análisis estadístico realizado en los niveles de sólidos solubles totales, los datos expusieron un valor de $p\text{-value} = 5.512 e^{-07}$, por lo que se procedió a realizar un ajuste de modelo lineal generalizado junto a un análisis de varianza de dos factores (Tabla. 4), los resultados mostraron que el factor tiempo no presenta una diferencia estadística significativa de varianza entre sus niveles (1 día, 3 días, 7 días), no obstante, el factor tratamiento presenta una significancia < 0.05 , por lo tanto presenta diferencias estadísticamente significativas de varianza entre sus niveles (MS, MS + NaCl, FO 1mg.L⁻¹, FO 1mg.L⁻¹ + NaCl).

Tabla 4. Resumen de análisis de varianza de 2 factores, para la variable de niveles de sólidos solubles totales

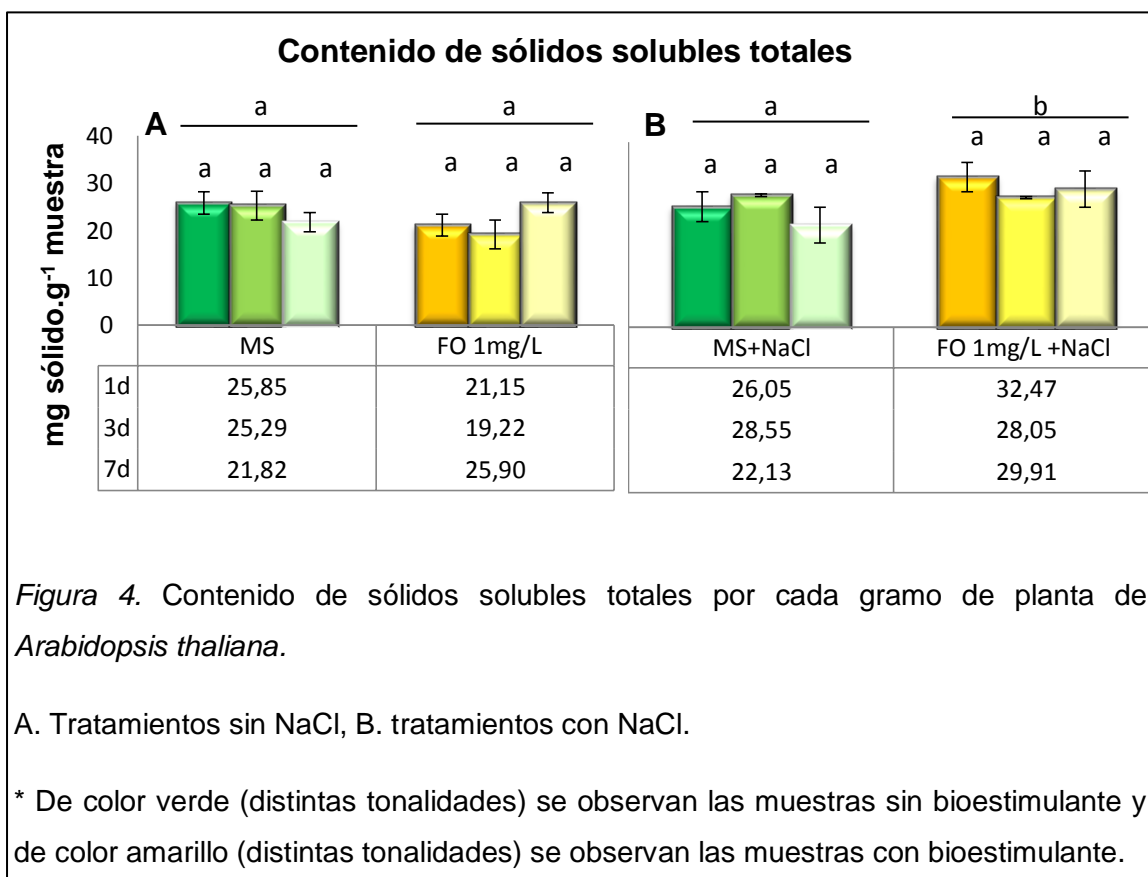
Factores	GI	F value	Pr (>F)
Tiempo	2	0,999	0,3718
Tratamiento	3	5,794	0,00106 *

Nota: Factores analizados: tiempo (1 día, 3 días, 7 días) y tratamiento (MS, MS + NaCl, FO 1mg.L⁻¹, FO 1mg.L⁻¹ + NaCl). GI se refiere a los grados de libertad y Pr (>F) es el valor de probabilidad, el cual indica que de cada factor analizado al menos uno de los niveles es significativo con $\alpha = 0.05$.

Por otro lado, el test de comparaciones múltiples de Duncan para un nivel de significancia $p \leq 0.001$, el factor tratamiento presentó que las plantas sometidas a estrés salino en presencia del bioestimulante fue el único nivel que mostró una diferencia significativa, mientras que el resto de tratamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 4.B). Así también, el test de Duncan mostró que no existen diferencias significativas entre ninguno de los niveles del factor tiempo en ninguno de los tratamientos (Fig. 4).

A pesar del análisis estadístico presentado previamente, los niveles de sólidos solubles totales presentaron una tendencia, donde las muestras control

presentan un mayor contenido de sólidos con respecto a las muestras tratadas con FO 1 mg.L⁻¹; tanto a las 24 como a las 72 horas de inducción los tratamientos control presentaron una tendencia de 18 % y 24 % mayor cantidad de sólidos respectivamente. Por el contrario, a tiempos más largos (7 días), la cantidad de sólidos solubles totales tienden a aumentar en las muestras de FO 1 mg.L⁻¹ en un 16 % en comparación con las muestras MS control a los 7 días (Fig. 4.A).

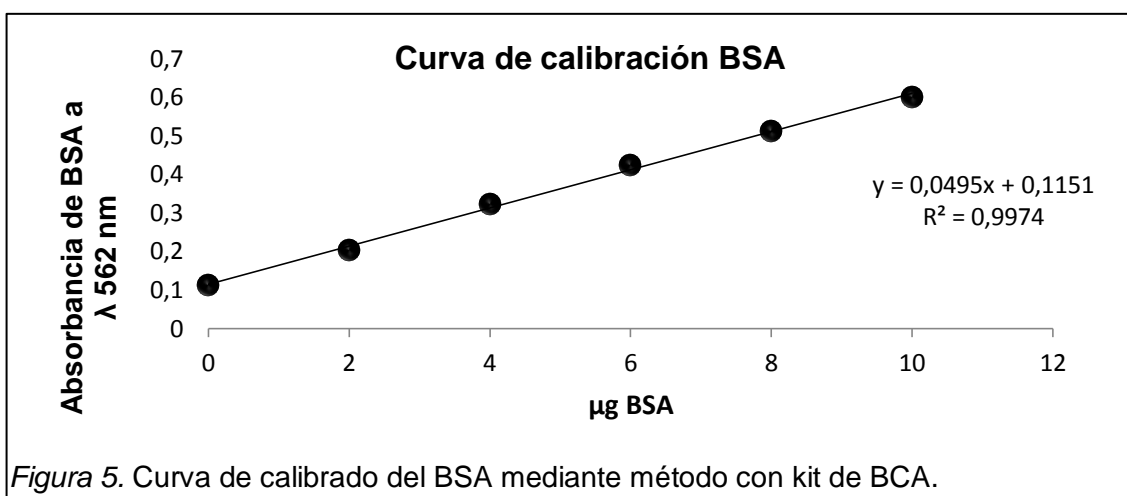


En el caso de las plantas sometidas a estrés salino, la inducción a las 24 horas con el bioestimulante presentó una tendencia de incremento del 20 % en el contenido de sólidos solubles totales en comparación a las que no tienen presencia de FO. A las 72 horas no se observó una diferencia entre los dos tratamientos, ya que la concentración de sólidos solubles aumentó sólo 2 % en el tratamiento con NaCl a comparación con el tratamiento en presencia del bioestimulante. No obstante, durante periodos más largos como a los 7 días, se

observó una tendencia de aumento del contenido de sólidos en un 26 % en el tratamiento con bioestimulante (Fig. 4.B).

4.2 Niveles de proteínas solubles totales

La curva de calibración con la proteína albúmina de suero bovino (BSA) presentó linealidad en el rango entre 0 – 10 μg de BSA como el ejemplo que se observa a continuación en la figura 5.



De acuerdo al análisis estadístico realizado en los niveles de proteínas solubles, los datos expusieron un valor de $p\text{-value} = 6.771 e^{-05}$, por lo que se procedió a realizar un ajuste de modelo lineal generalizado junto a un análisis de varianza de dos factores (Tabla. 5), los resultados mostraron que el factor tiempo presenta diferencias estadísticamente significativas de varianza entre sus niveles (1 día, 3 días, 7 días), de igual manera, el factor tratamiento presenta diferencias estadísticamente significativas de varianza entre sus niveles (MS, MS + NaCl, FO $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, FO $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NaCl), debido a que los valores de probabilidad son < 0.05 , el cual indica que cada factor analizado es significativo con $\alpha = 0.05$.

Por otro lado, el test de comparaciones múltiples de Duncan para un nivel de significancia $p \leq 0.001$ para el factor tratamiento el cual presentó diferencias en la mayoría de sus niveles, únicamente los tratamientos FO 1mg y FO 1mg + NaCl no presentaron diferencias entre ellos (Fig. 6). Por otro lado,

interesantemente, el test de Duncan mostró que existen diferencias significativas entre todos los niveles del factor tiempo en cada uno de los tratamientos (Fig. 6).

Tabla 5. Resumen de análisis de varianza de 2 factores, para la variable de niveles de proteínas solubles totales

Factores	GI	F value	Pr (>F)
Tiempo	2	657,91	$< 2e^{-16} *$
Tratamiento	3	52,81	$< 2e^{-16} *$

Nota: Factores analizados: tiempo (1 día, 3 días, 7 días) y tratamiento (MS, MS + NaCl, FO 1mg.L-1, FO 1mg.L-1 + NaCl). GI se refiere a los grados de libertad y Pr (>F) es el valor de probabilidad, el cual indica que de cada factor analizado al menos uno de los niveles es significativo con $\alpha = 0.05$.

La concentración proteica de los extractos obtenidos de las muestras bajo estudio (Fig. 6), mostró una tendencia similar entre la muestra control y aquella con FO. Después de 24 horas y 72 horas de inducción, las muestras con el bioestimulante presentan una mayor concentración proteica en un 20 % y 8 % respectivamente, en comparación con las muestras que se mantuvieron únicamente en MS. También se observó que a los 7 días de inducción, la concentración proteica mostró una tendencia de disminución de 4% con respecto a las muestras control (Fig. 6.A).

Por otro lado, las muestras inducidas con NaCl después de 24 horas, contienen 11 % más proteínas, con respecto a la muestra que está con bioestimulante. Sin embargo, este comportamiento se invierte a los 3 días y 7 días después de la inducción, ya que las plantas sometidas a estrés salino en presencia del bioestimulante, incrementan su concentración de proteínas en 32 % y 8 % respectivamente (Fig. 6.B). De hecho, el análisis de los contenidos proteicos muestra una tendencia en general de mayor concentración de proteínas cuando las plantas están sometidas a estrés salino en conjunto con el bioestimulante.

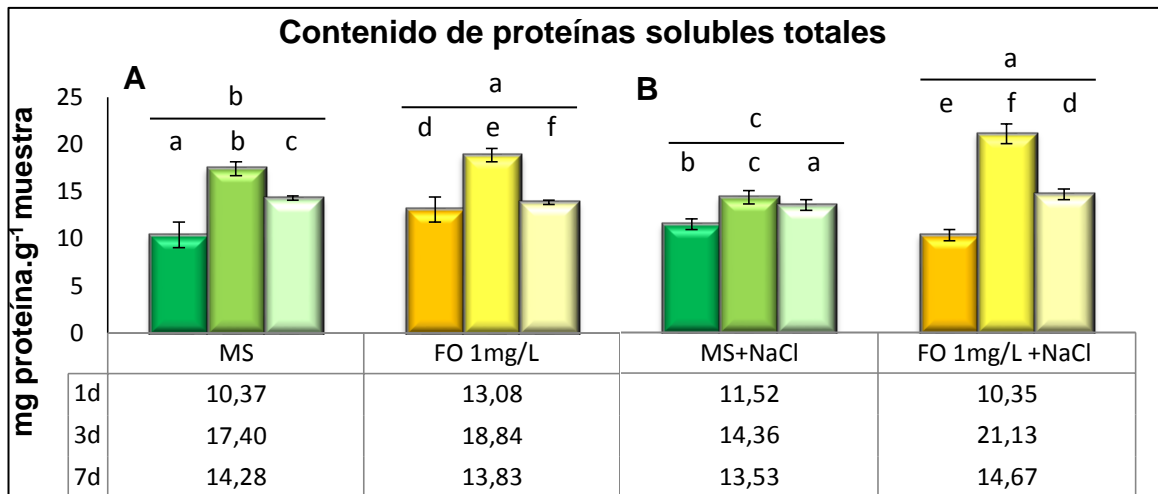


Figura 6. Contenido de proteínas solubles totales por cada gramo de planta de *Arabidopsis thaliana*.

A. Tratamientos sin NaCl, B. tratamientos con NaCl

* De color verde (distintas tonalidades) se observan las muestras sin bioestimulante y de color amarillo (distintas tonalidades) se observan las muestras con bioestimulante.

4.3 Niveles de oxidación en componentes solubles

La curva de calibración realizada para la cuantificación de los grupos carbonilos presentó linealidad en el rango de 5 a 95 nmoles de carbonilos.mL⁻¹ de hidrazona con las absorbancias obtenidas en los experimentos (Fig. 7).

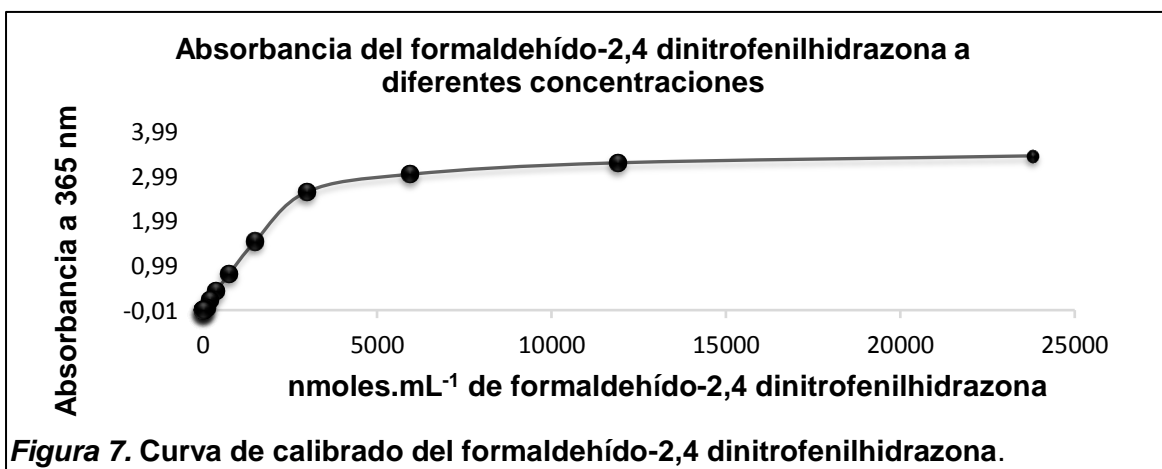


Figura 7. Curva de calibrado del formaldehído-2,4 dinitrofenilhidrazona.

En concordancia al análisis estadístico realizado en los niveles de oxidación en componentes solubles, los datos expusieron un valor de $p\text{-value} = 0.0004351$, por lo que se procedió a realizar un ajuste de modelo lineal generalizado junto a un análisis de varianza de dos factores (Tabla. 6), los resultados mostraron que el factor tiempo presenta diferencias estadísticamente significativas de varianza entre sus niveles (1 día, 3 días, 7 días), de igual manera, el factor tratamiento presenta diferencias estadísticamente significativas de varianza entre sus niveles (MS, MS + NaCl, FO 1mg.L⁻¹, FO 1mg.L⁻¹ + NaCl), debido a que los valores de probabilidad son < 0.05 , el cual indica que cada factor analizado es significativo con $\alpha = 0.05$.

Tabla 6. Resumen de análisis de varianza de 2 factores, para la variable de niveles de niveles de oxidación en componentes solubles.

Factores	GI	F value	Pr (>F)
Tiempo	2	57,7	$< 2e^{-16} *$
Tratamiento	3	266,39	$< 2e^{-16} *$

Nota: Factores analizados: tiempo (1 día, 3 días, 7 días) y tratamiento (MS, MS + NaCl, FO 1mg.L⁻¹, FO 1mg.L⁻¹ + NaCl). GI se refiere a los grados de libertad y Pr (>F) es el valor de probabilidad, el cual indica que de cada factor analizado al menos uno de los niveles es significativo con $\alpha = 0.05$.

Por otro lado, el test de comparaciones múltiples de Duncan para un nivel de significancia $p \leq 0.001$ para el factor tratamiento el cual presentó diferencias estadísticamente significativas en todos sus niveles. Por otro lado, el test de Duncan mostró que también existen diferencias significativas en todos los niveles del factor tiempo en cada uno de los tratamientos (Fig. 8).

Los resultados muestran que las plantas que se encuentran con el bioestimulante a las 24 horas, 72 horas y 7 días de inducción muestran mayores niveles de oxidación en 25 %, 24 % y 20 % respectivamente en comparación de las muestras control MS. También se observa que la presencia del bioestimulante genera un ligero aumento en la concentración de grupos carbonilos (Fig. 8.A).

Cuando los análisis se realizaron con las muestras sometidas a estrés salino, la coloración naranja fue mucho más intensa que aquellas muestras tratadas bajo el mismo estrés pero con la presencia del bioestimulante. A tiempos cortos (24 horas) se mostró un incremento en el contenido de grupos carbonilo, en el material soluble analizado de las muestras sometidas a NaCl con presencia del bioestimulante, siendo los niveles de oxidación 13 % más altos en éstas, en comparación a las muestras que únicamente tienen NaCl. Sin embargo, resulta muy interesante el hecho de que a medida que transcurre el tiempo, la cantidad de estos componentes disminuye en una mayor proporción cuando existe la presencia del bioestimulante, a las 72 horas y 7 días los niveles de carbonilación se reducen en 46 % y 44 % respectivamente con respecto a las muestras sometidas a la presencia de NaCl (Fig. 8.B).

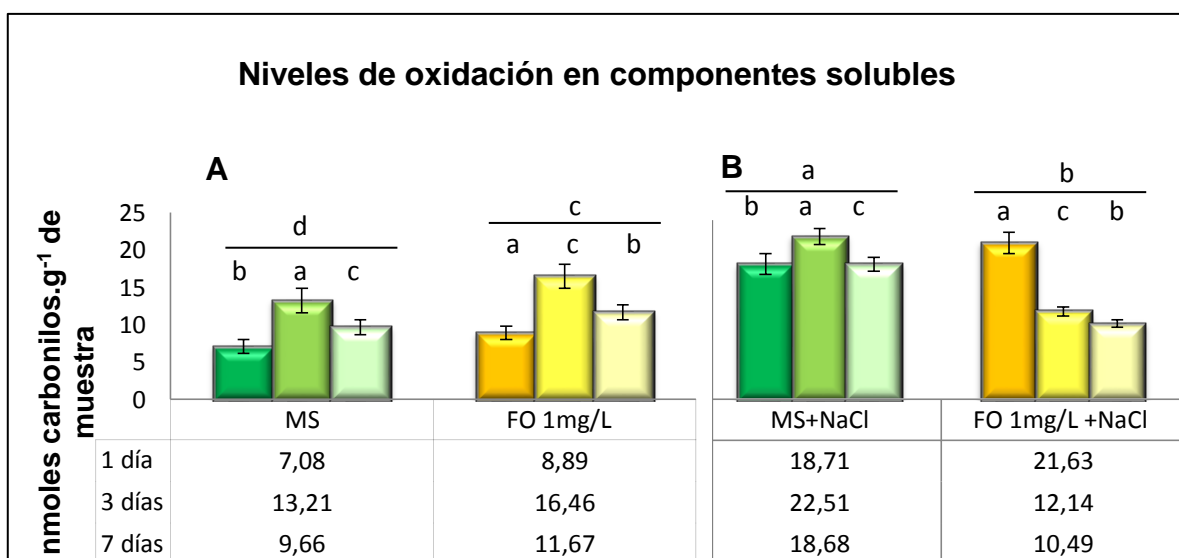


Figura 8. Niveles de oxidación relativa en componentes solubles en muestra de *Arabidopsis thaliana*.

A. Tratamientos sin NaCl, B. tratamientos con NaCl.

* De color verde (distintas tonalidades) se observan las muestras sin bioestimulante y de color amarillo (distintas tonalidades) se observan las muestras con bioestimulante.

4.4 Niveles de oxidación en componentes lipídicos

Según el análisis estadístico realizado en los niveles de oxidación en componentes lipídicos, los datos expusieron un valor de $p\text{-value} = 0.0001715$, por lo que se procedió a realizar un ajuste de modelo lineal generalizado junto a un análisis de varianza de dos factores (Tabla. 7), los resultados mostraron que el factor tiempo presenta diferencias estadísticamente significativas de varianza entre sus niveles (1 día, 3 días, 7 días), de igual manera, el factor tratamiento presenta diferencias estadísticamente significativas de varianza entre sus niveles (MS, MS + NaCl, FO 1mg.L⁻¹, FO 1mg.L⁻¹ + NaCl), debido a que los valores de probabilidad son < 0.05 , el cual indica que cada factor analizado es significativo con $\alpha = 0.05$.

Tabla 7. Resumen de análisis de varianza de 2 factores, para la variable de niveles de oxidación en componentes lipídicos.

Factores	GI	F value	Pr (>F)
Tiempo	2	63,92	$< 2e^{-16} *$
Tratamiento	3	79,99	$< 2e^{-16} *$

Nota: Factores analizados: tiempo (1 día, 3 días, 7 días) y tratamiento (MS, MS + NaCl, FO 1mg.L⁻¹, FO 1mg.L⁻¹ + NaCl). GI se refiere a los grados de libertad y Pr (>F) es el valor de probabilidad, el cual indica que de cada factor analizado al menos uno de los niveles es significativo con $\alpha = 0.05$.

Por otro lado, el test de comparaciones múltiples de Duncan para un nivel de significancia $p \leq 0.001$ para el factor tratamiento presentó diferencias estadísticamente significativas en todos sus niveles, sin embargo, las diferencias entre el tratamiento MS y FO 1mg así como entre el tratamiento MS y FO 1mg + NaCl, son pequeñas en comparación a las diferencias encontradas entre los demás tratamientos. Por otro lado, el test de Duncan mostró que únicamente al séptimo día de inducción, cada tratamiento presentó diferencias significativas en comparación con los tiempos de 24 y 72 horas, los mismos que no presentaron diferencias (Fig. 9).

Los resultados revelan que las muestras incubadas con el bioestimulante durante 24 horas y 7 días presentaron 45 % y 27 % más peroxidación lipídica respectivamente frente al control, no obstante, el mismo tratamiento con bioestimulante presenta a las 72 horas 15 % menos peroxidación lipídica que la muestra control (Fig. 9.A).

Con respecto a las muestras tratadas con NaCl se observó que a los tres tiempos estudiados, estas muestras presentaron aproximadamente entre 30 a 43 % más peroxidación lipídica con respecto a las muestras con NaCl en presencia del bioestimulante (Fig. 9.B). Los resultados presentaron en general una conducta similar en casi todos los tratamientos exceptuando al tratamiento control, en dicha conducta es posible observar que las muestras presentan una disminución progresiva en su peroxidación lipídica a medida que pasa el tiempo (Fig. 9).

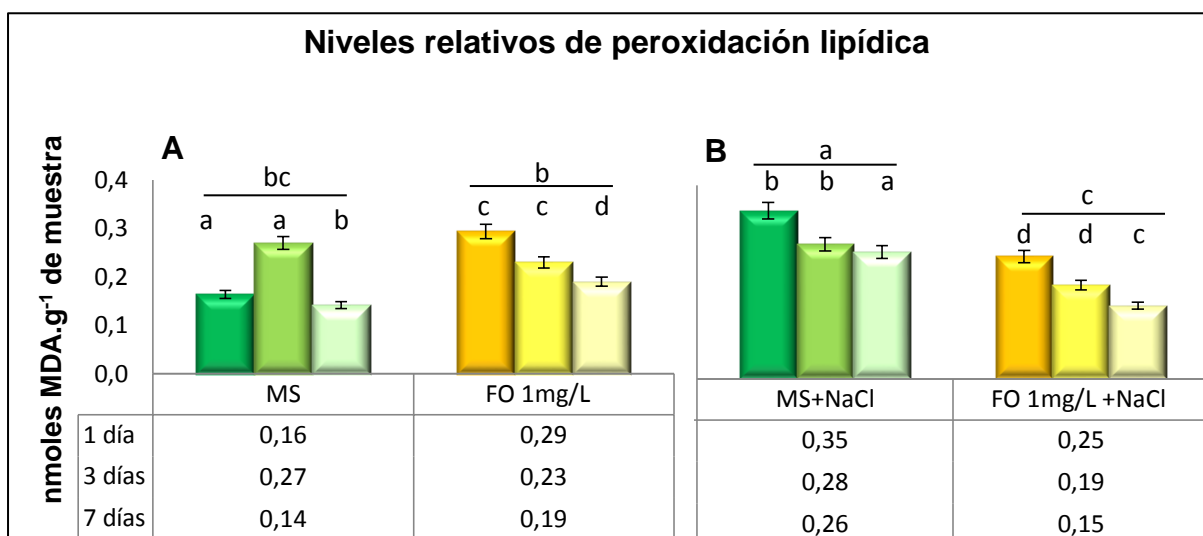


Figura 9. Niveles de peroxidación relativa en componentes lipídicos en muestras de *Arabidopsis thaliana*.

A. Tratamientos sin NaCl, B. tratamientos con NaCl.

* De color verde (distintas tonalidades) se observan las muestras sin bioestimulante y de color amarillo (distintas tonalidades) se observan las muestras con bioestimulante.

4.5 Niveles de oxidación en componentes proteicos

Estos resultados nos permiten observar indirectamente que existe carbonilación en todas las muestras de los distintos tratamientos (Tabla 8), pero aquellas muestras sometidas a estrés salino presentaron mayor intensidad de señal en sus bandas al compararlas con aquellas que no contenían NaCl en el medio de cultivo (Fig. 10). El tratamiento en presencia del bioestimulante a los 7 días contenía una medida aproximada del 10 % menos oxidación con respecto a la muestras control. Por otro lado, se mostró un comportamiento interesante a los 7 días de inducción en las muestras sometidas a estrés salino en presencia del bioestimulante, las mismas que presentaron indirectamente niveles de oxidación 40 % menores al comparar con las muestras sometidas únicamente a NaCl (Fig.11).

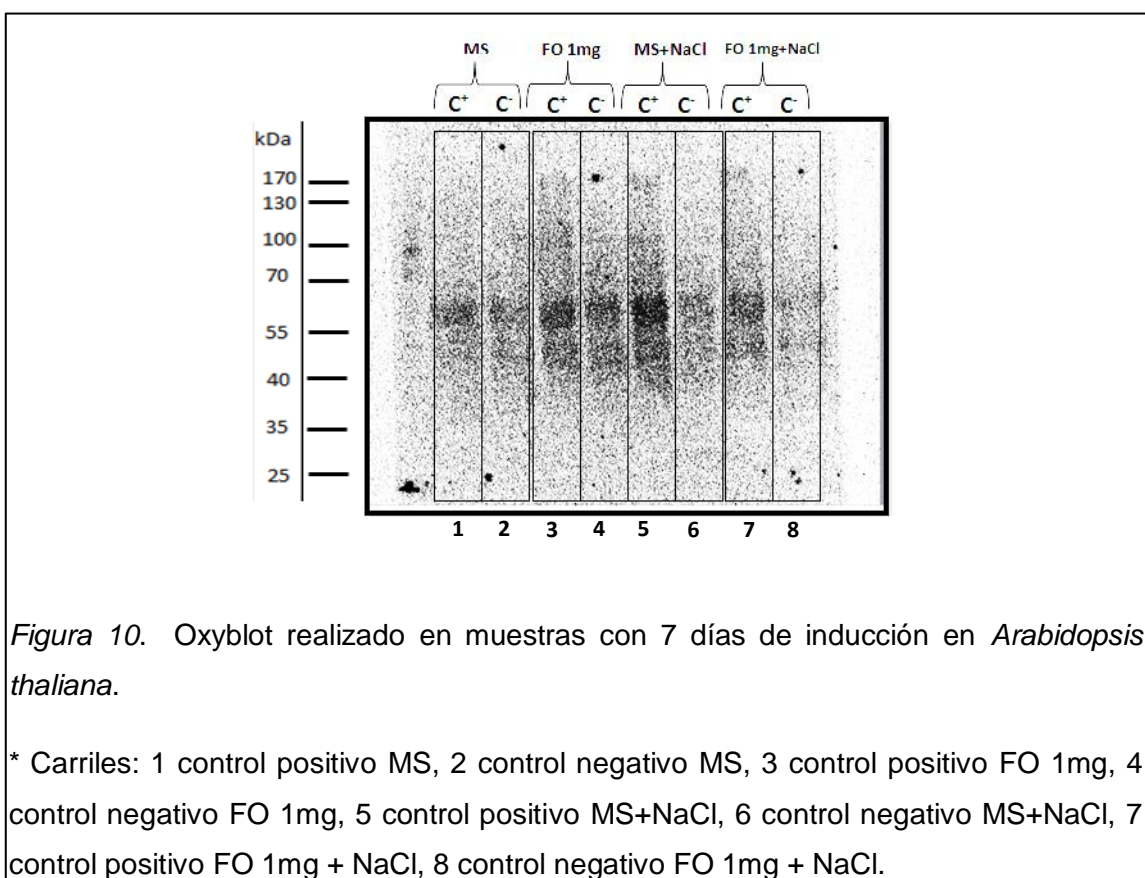
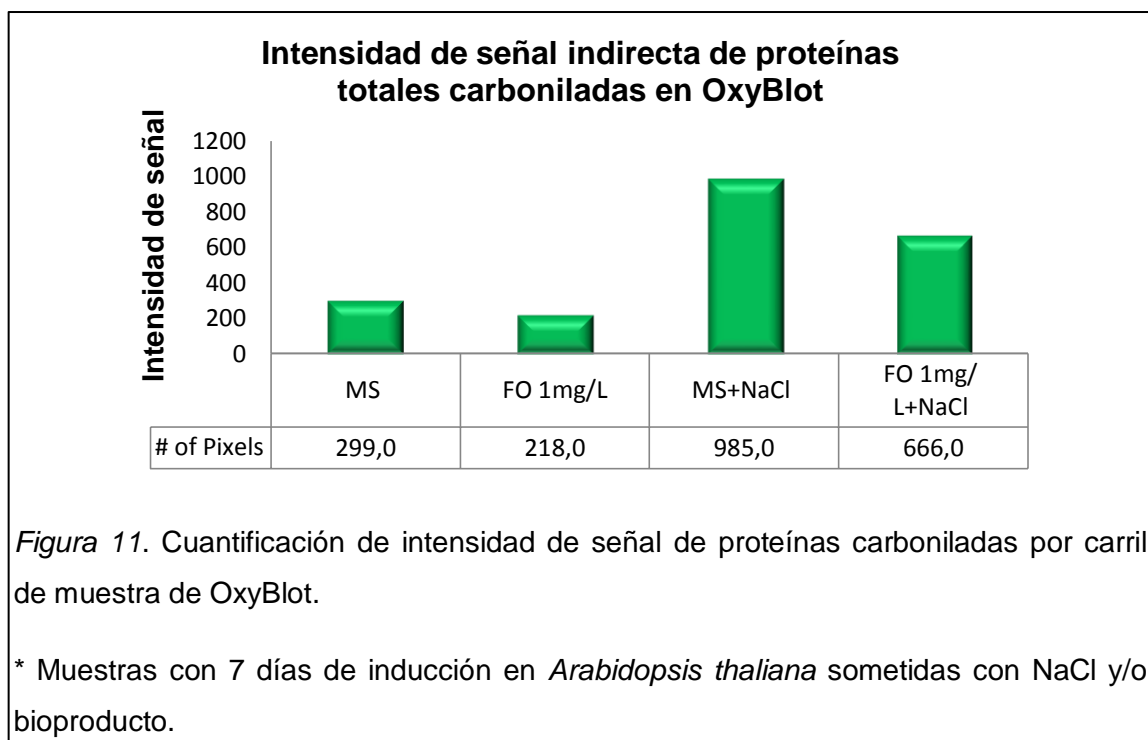


Tabla 8. Intensidad de señal indirecta de proteínas totales carboniladas en muestras con 7 días de inducción en *Arabidopsis thaliana* sometidas a NaCl y/o bioproducto.

Muestra	Control +	Control -	Intensidad de señal relativa de OxyBlot
MS	13482	13183	299,0
FO 1mg.L ⁻¹	13287	13069	218,0
MS+NaCl	14172	13187	985,0
FO 1mg.L ⁻¹ +NaCl	13733	13067	666,0



4.6 Funcionalidad del sistema ubiquitina-proteasoma

4.6.1 Niveles de proteínas ubiquitinadas

Los resultados del Dot Blot realizado (Fig.12), en primera instancia presentaron mayor intensidad de ubiquitina tanto a las 24 horas como a los 7 días de inducción en las muestras con el bioestimulante comparándolas con las

muestras control. Así también las muestras sometidas a NaCl en presencia del bioestimulante, presentan menor intensidad de señal que las muestras con NaCl únicamente (Tabla 9).

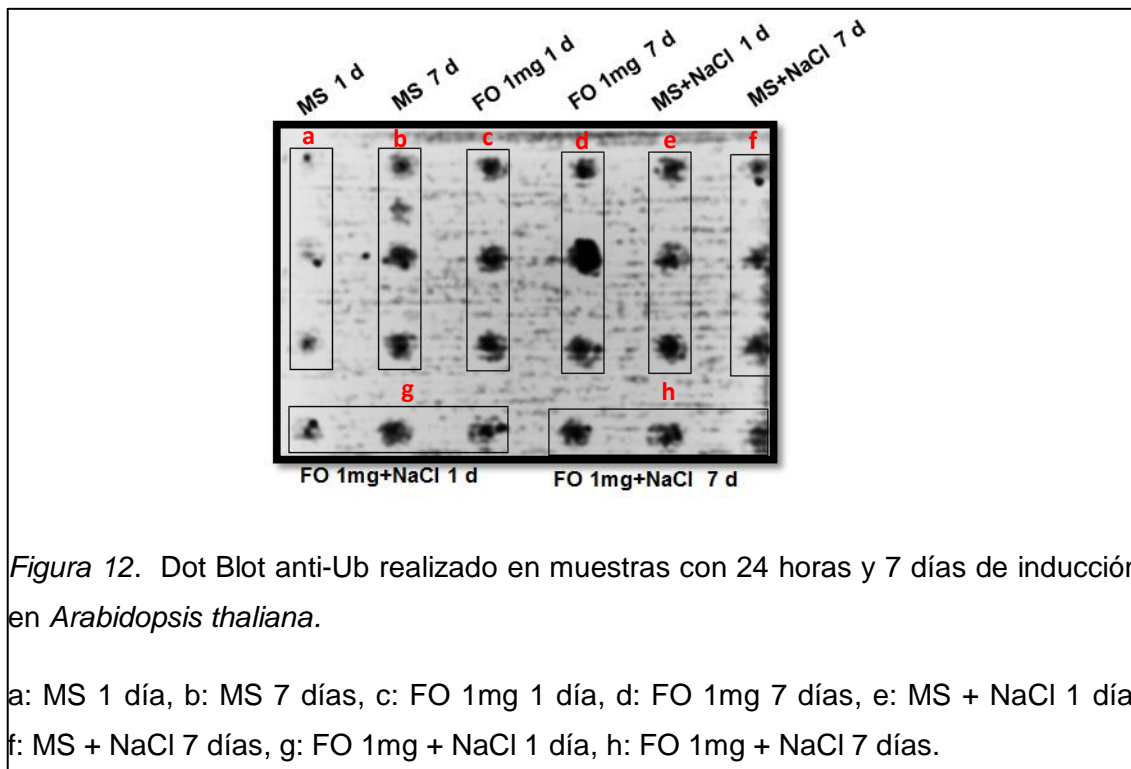


Figura 12. Dot Blot anti-Ub realizado en muestras con 24 horas y 7 días de inducción en *Arabidopsis thaliana*.

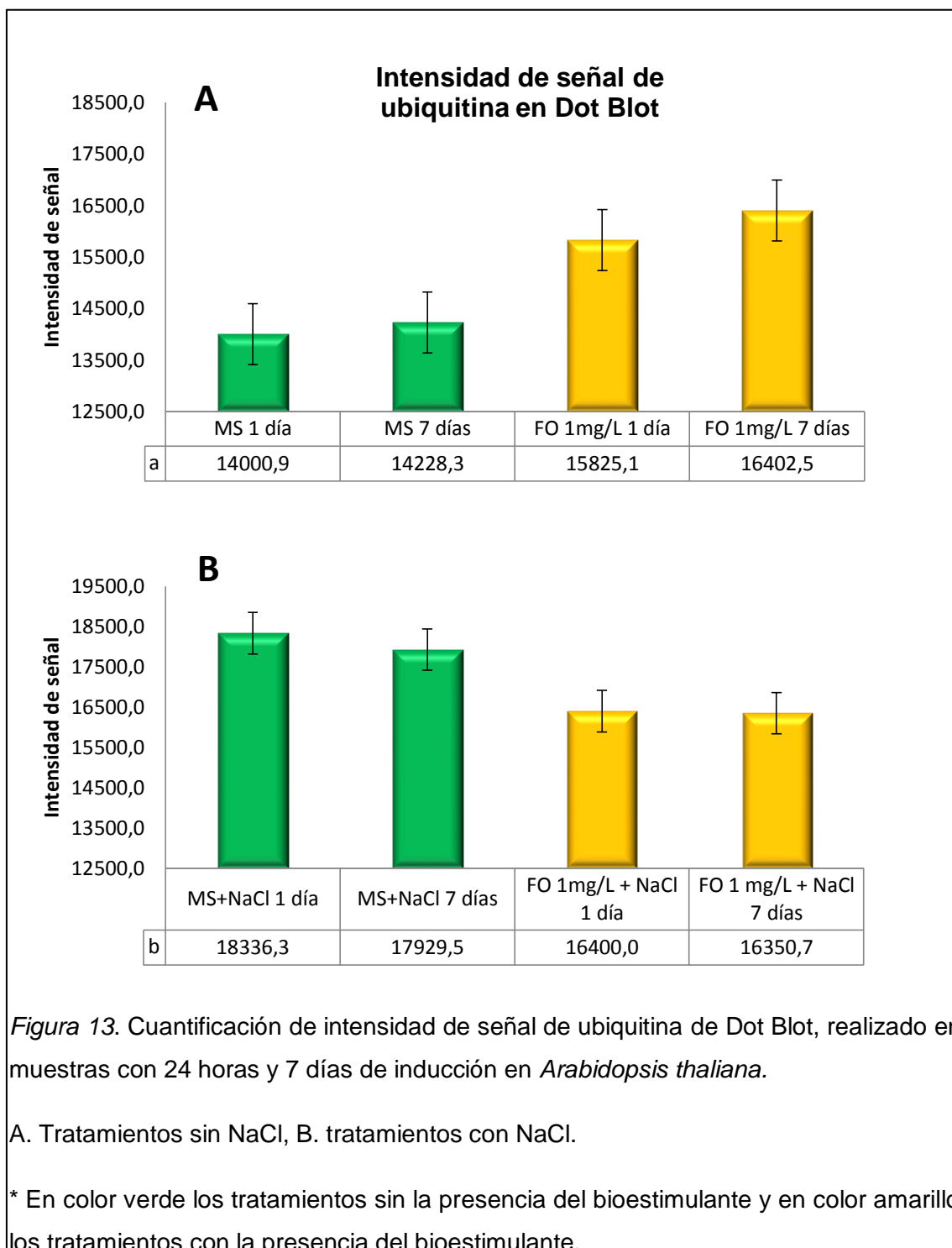
a: MS 1 día, b: MS 7 días, c: FO 1mg 1 día, d: FO 1mg 7 días, e: MS + NaCl 1 día, f: MS + NaCl 7 días, g: FO 1mg + NaCl 1 día, h: FO 1mg + NaCl 7 días.

Tabla 9. Intensidad de señal de niveles de proteínas ubiquitinadas en muestras con 24 horas y 7 días de inducción en *Arabidopsis thaliana* sometidas a NaCl y/o bioproducto, presentado en figura 12.

Muestras	Intensidad de señal de ubiquitina en Dot Blot
MS 1d	14000,9
MS7d	14228,3
FO1mg.L ⁻¹ 1d	14825,1
FO1mg.L ⁻¹ 7d	15402,5
MS+NaCl 1d	16336,3
MS+NaCl 7d	15929,5
FO1mg.L ⁻¹ +NaCl 1d	15400,0
FO1mg.L ⁻¹ +NaCl 7d	15350,7

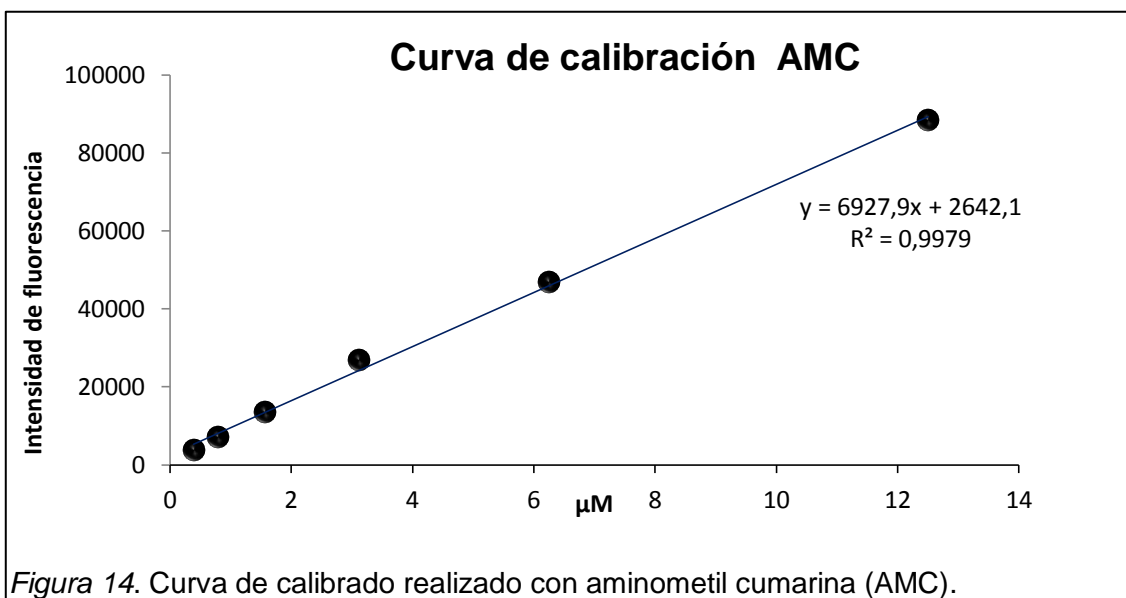
Los resultados indican que las muestras vegetales tratadas con el bioestimulante a las 24 horas presentaron aproximadamente 12 % más cantidad de ubiquitina que las muestras control, y a tiempos más largos (7 días) de inducción se observa un 14 % más ubiquitina en las muestras con

bioestimulante a comparación de las muestras control (Fig. 13.A). Los niveles de ubiquitina son mayores cuando la muestra se encuentra únicamente con el bioestimulante, de hecho, los tratamientos control mantienen niveles relativamente constantes de esta proteína, presentando un incremento del 2 % desde las 24 horas hasta los 7 días de inducción (Fig.13.A).



4.6.2 Actividad enzimática del proteasoma 20S

La curva de calibración de la 7-Amino-4-metil-cumarina (AMC) presentó linealidad en el rango entre 0 – 13 μM de AMC liberada como el ejemplo que se observa a continuación en la figura 14.



De acuerdo al análisis estadístico realizado en la actividad enzimática del proteasoma 20S, los datos expusieron un valor de $p\text{-value} = 0.0008799$, por lo que se procedió a realizar un ajuste de modelo lineal generalizado junto a un análisis de varianza de dos factores (Tabla. 10), los resultados mostraron que el factor tiempo presenta diferencias estadísticamente significativas de varianza, así como el factor tratamiento, que presenta diferencias estadísticamente significativas de varianza entre sus niveles (MS, MS + NaCl, FO 1mg.L^{-1} , FO 1mg.L^{-1} + NaCl), debido a que los valores de probabilidad son < 0.05 , el cual indica que cada factor analizado es significativo con $\alpha = 0.05$.

Por otro lado, el test de comparaciones múltiples de Duncan para un nivel de significancia $p \leq 0.001$ para el factor tratamiento presentó diferencias estadísticamente significativas en todos sus niveles (MS, MS + NaCl, FO 1mg.L^{-1} , FO 1mg.L^{-1} + NaCl).

Tabla 10. Resumen de análisis de varianza de 2 factores, para la variable de la actividad enzimática del proteasoma 20S

Factores	GI	F value	Pr (>F)
Tiempo	2	57,7	$< 2e^{-16} *$
Tratamiento	3	266,39	$< 2e^{-16} *$

Nota: Factores analizados: tiempo (3 días) y tratamiento (MS, MS + NaCl, FO 1mg.L⁻¹, FO 1mg.L⁻¹ + NaCl). GI se refiere a los grados de libertad y Pr (>F) es el valor de probabilidad, el cual indica que de cada factor analizado al menos uno de los niveles es significativo con $\alpha = 0.05$.

Los resultados mostraron un fuerte cambio en la actividad del proteasoma cuando la muestra se somete a estrés salino o es tratada con el bioestimulante. El tratamiento con FO, presenta 131 veces más actividad que la muestra control y el tratamiento con NaCl presenta 47 veces más actividad a comparación de la muestra control. Asimismo, se pudo observar que la muestra tratada con bioestimulante presenta 82 % más actividad de proteasoma 20S que las muestras tratadas únicamente con NaCl (Fig. 15 y tabla 11).

Tabla 11. Actividad relativa del proteasoma 20S en muestras con 72 horas de inducción en *Arabidopsis thaliana* sometidas a NaCl y/o bioproducto.

Muestra	Actividad del proteasoma 20S	Actividad relativa del proteasoma 20S
MS	96,5	1,00
MS+NaCl	4605,7	47,73
FO 1mg.L ⁻¹	12676,5	131,36
FO 1mg.L ⁻¹ +NaCl	-4176,0	0,00

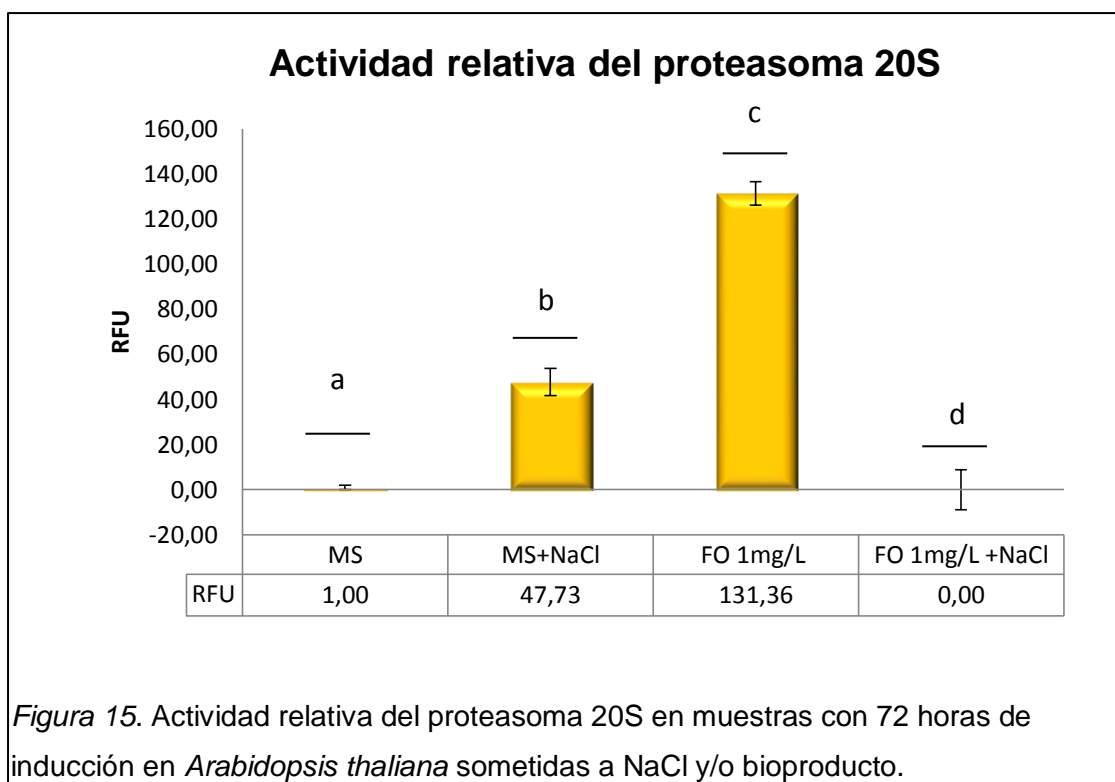


Figura 15. Actividad relativa del proteasoma 20S en muestras con 72 horas de inducción en *Arabidopsis thaliana* sometidas a NaCl y/o bioproducto.

4.6.3 Niveles de Proteasoma 26S

En los resultados se pudo observar claramente que los niveles de proteasoma 26S aumentan 17 % a las 24 horas cuando la planta es tratada con el bioestimulante a comparación de las muestras control, mientras que a los 7 días los niveles de proteasoma aumentan en un 8 % con respecto al control (Fig. 17. A y tabla 12).

Se observó también que las muestras sometidas a estrés con NaCl en presencia del bioestimulante a las 24 horas y 7 días de inducción presentaron 2 % y 3 % respectivamente mayor concentración del proteasoma 26S que aquellas muestras sometidas únicamente a NaCl (Fig. 17. B y tabla 12).

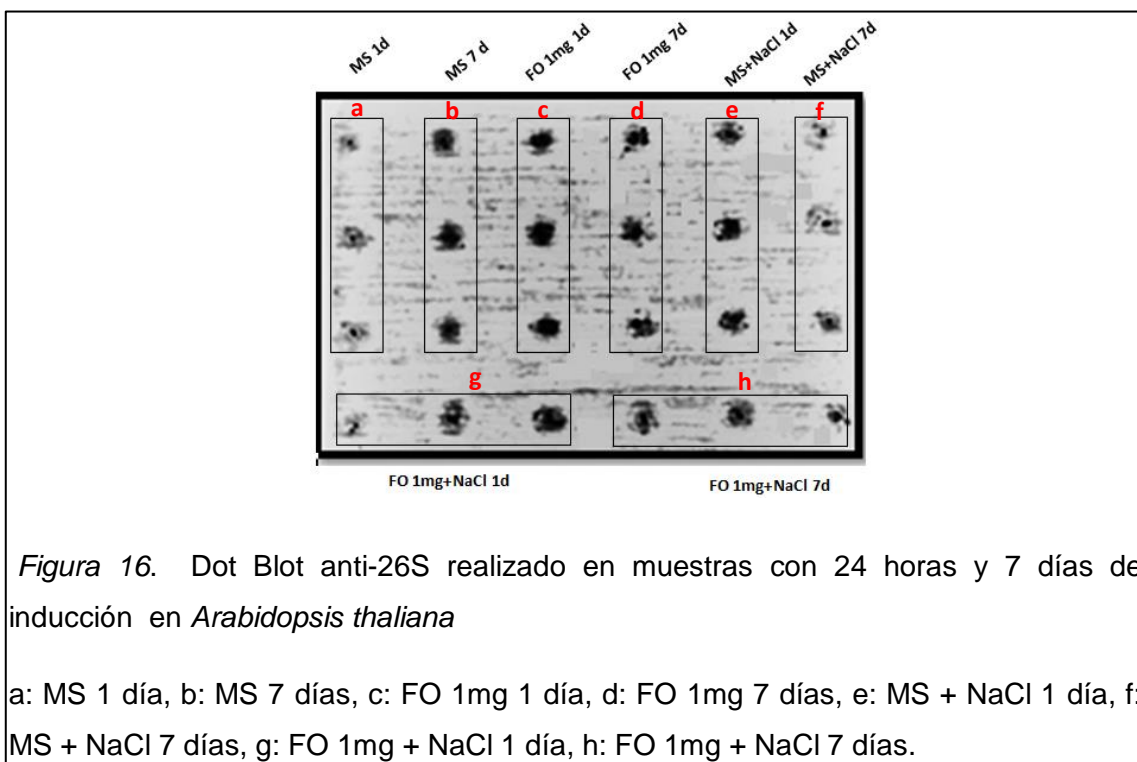
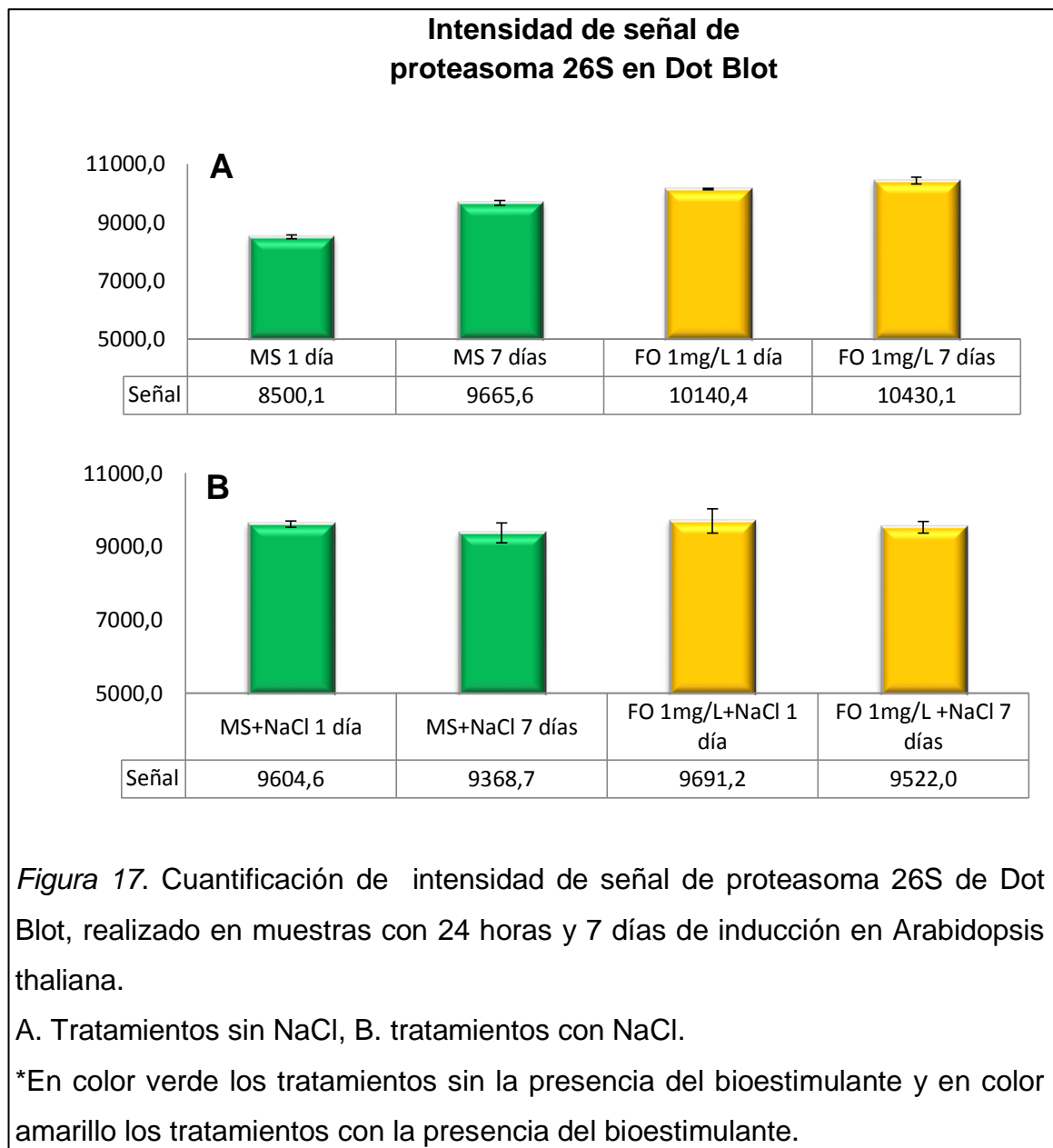


Figura 16. Dot Blot anti-26S realizado en muestras con 24 horas y 7 días de inducción en *Arabidopsis thaliana*

a: MS 1 día, b: MS 7 días, c: FO 1mg 1 día, d: FO 1mg 7 días, e: MS + NaCl 1 día, f: MS + NaCl 7 días, g: FO 1mg + NaCl 1 día, h: FO 1mg + NaCl 7 días.

Tabla 12. Intensidad de señal de niveles de proteasoma 26S en muestras con 24 horas y 7 días de inducción en *Arabidopsis thaliana* sometidas a NaCl y/o bioproducto, presentado en figura 16.

Muestras	Intensidad de señal de 20S en Dot Blot
MS 1d	8500,1
MS7d	9665,6
FO1mg.L ⁻¹ 1d	10140,4
FO1mg.L ⁻¹ 7d	10430,1
MS+NaCl 1d	9604,6
MS+NaCl 7d	9368,7
FO1mg.L ⁻¹ +NaCl 1d	9691,2
FO1mg.L ⁻¹ +NaCl 7d	9522,0



5. Capítulo V: Discusión

5.1 Ajuste osmótico, niveles de sólidos solubles y proteínas solubles

Los sólidos solubles totales (SST) se definen como todas aquellas sustancias presentes en las células, entre los cuales se encuentran azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas, pectinas, entre otros. Estos componentes tienen múltiples funciones, entre ellas, un papel primario en el mantenimiento del potencial osmótico de la célula y están involucrados en la estabilidad de proteínas y estructuras celulares (Handa, Bressan, Handa, Carpita y Hasegawa, 1983, pp. 5-7).

Montaño y Méndez, 2009, afirman que los SST están presentes en condiciones normales, de hecho su concentración es utilizada por muchos agricultores como indicador de control de calidad y para determinar las condiciones de las plantas, mientras mayor sea su concentración dichos cultivos presentan mejores atributos (Montaño y Méndez, 2009, pp. 2-5). Ésta es la razón probable por la cual se observan tendencias de mayores niveles de sólidos solubles totales en la muestra tratada con bioestimulante al cabo de 7 días de inducción, a pesar de que dichos niveles no representan una significancia estadística (Fig.4.A). Así también, Costales y colaboradores en el año 2007, expusieron que las oligosacarinas estimulan respuestas de defensa en las plantas, así como también la estimulación del crecimiento y su desarrollo (Costales et al., 2007, p. 3). A pesar de que las plantas no se encuentren en un estado de estrés, el bioestimulante provoca una estimulación de respuestas de defensa. Este conocimiento da cabida para inferir que las oligosacarinas acondicionan a las plantas mediante este tipo de estimulación.

En los primeros días de inducción, las células vegetales tratadas con bioestimulante seguramente están en una etapa de adaptación y reconocimiento del mismo, por esta razón, al séptimo día de inducción es posible observar una tendencia de niveles más elevados de SST en la muestra con bioestimulante a comparación de la muestra control.

En cuanto a las plantas sometidas a estrés salino (Fig. 4.B), se pueden relacionar los resultados con la investigación realizada por Rodríguez, 2006, el mismo que expuso que los elevados niveles de SST son consecuencia de las altas concentraciones de sales en la solución externa de las células vegetales, entre los efectos negativos que provoca la salinidad se encuentran; el desbalance osmótico, toxicidad debida a la excesiva absorción de cloro y sodio y un desbalance nutricional (Rodríguez, 2006, pp. 4-6).

Ante la situación descrita previamente, la planta se ve en la necesidad de sintetizar mayores niveles de sólidos solubles osmóticamente activos, con la finalidad de facilitar una osmorregulación, mejorando la capacidad de tolerar condiciones de salinidad elevada. La disminución de la concentración de SST en muestras sometidas a NaCl al séptimo día de inducción, se da posiblemente por la toxicidad del NaCl en las células, lo que provoca una inhibición de la síntesis o del funcionamiento de los sólidos solubles activos en la respuesta de defensa de la planta (Rodríguez, 2006, pp. 4-6).

Las proteínas solubles (Fig. 6) forman parte de una fracción de los sólidos solubles totales, por lo que sus niveles son afectados por las mismas razones anteriormente explicadas. Probablemente ésta es la razón por la cual el tratamiento que contiene bioestimulante presenta en general niveles ligeramente mayores de proteínas solubles con respecto al tratamiento control. De la misma manera, los altos niveles de proteínas solubles en la muestra sometida a estrés salino en presencia del bioestimulante (Fig. 6.B), se pueden relacionar con la investigación de Wang y colaboradores en el año 2013, los cuales corroboraron que la síntesis de enzimas antioxidantes es un mecanismo para la reducción de radicales libres de oxígeno dentro de la célula, lo que teóricamente le conferiría una mayor tolerancia al estrés salino. Es posible especular, que los altos niveles proteicos son consecuencia de la mayor síntesis de enzimas antioxidantes en la célula (Wang, Wang, Liu y Meng, 2013, p. 1).

5.2 Niveles de oxidación en componentes solubles

Los elevados niveles de radicales libres de oxígeno en la célula reaccionan con biomoléculas tales como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos. Uno de los efectos resultantes de la interacción de los radicales libres de oxígeno con las biomoléculas, es la formación de grupos carbonilo sobre las mismas, lo que altera su estructura y capacidad de funcionamiento. La presencia de este grupo químico se ha utilizado como un indicador indirecto del daño oxidativo en las proteínas, así como en otros componentes sólidos solubles (González et al., 2000, pp. 3-4).

Los mayores niveles de oxidación en la muestra tratada con bioestimulante (Fig. 8.A), permiten inferir que probablemente, este bioestimulante acondiciona una respuesta similar al estrés en las plantas, lo que podría dar lugar a una adaptación de la planta para tolerar futuras situaciones de estrés. Esta idea concuerda con Acosta y colaboradores en el año 2007, los mismos que corroboraron que las oligosacarinas permiten una mejor tolerancia a situaciones de estrés, debido a la activación de numerosas señales de respuestas defensivas, como por ejemplo, la inducción de síntesis de jasmonatos, los cuales ayudan como moléculas señalizadoras de respuesta de las plantas a numerosas situaciones de estrés, o la inducción de la ruta del ácido salicílico, el cual contribuye defensas y resistencia a la plantas contra patógenos e insectos herbívoros (Acosta, González, Valdés, González, y Sánchez, 2007, pp. 1-2). A pesar de no estar en un estado de estrés, el bioestimulante posiblemente induce éste tipo de respuesta en la planta.

Por otro lado, cuando hay presencia de estrés salino (Fig. 8.B), normalmente se da lugar a una toxicidad en las células por los altos niveles de NaCl (Rodríguez, 2006, pp. 4-6), indudablemente, esta situación perjudicial da lugar a los altos niveles de oxidación en la planta sometida a estrés salino. No obstante, cuando la planta sometida a estrés salino se trata con bioestimulante, se observa que los niveles de oxidación se reducen progresivamente a medida que pasa el tiempo, tal como dijeron Acosta y colaboradores, las oligosacarinas permiten a la planta tener una mejor respuesta de defensa y resistencia al

estrés, dando cabida para inferir, que el bioestimulante de alguna manera permite un mejor procesamiento de la oxidación en la célula, dando lugar a una disminución de la oxidación en los componentes solubles (Acosta et al., 2007, pp. 1-2).

5.3 Niveles de oxidación en componentes lipídicos

Los peróxidos en biomoléculas lipídicas generan entre otros productos el malondialdehído (MDA). Los mayores de niveles de oxidación en la muestra tratada con bioestimulante, concuerdan con los resultados presentados previamente, el bioestimulante puede estar generando un cierto nivel de estrés en las plantas en cortos tiempos de exposición, tendencia que cambia cuando existe un mayor tiempo de exposición con el bioestimulante, ya que los niveles de MDA van decreciendo cuando pasa el tiempo. Esfandiari y colaboradores en el año 2007, presentaron investigaciones que afirman que a medida que se mejora la tolerancia al estrés oxidativo, los niveles de MDA decrecen (Esfandiari, Shekari, Esfandiari y Shekari 2007, pp. 2-3), esto podría explicar la disminución progresiva de MDA al paso del tiempo cuando la muestra se trata bioestimulante.

Por otra parte, los bajos niveles de oxidación en la muestra sometida a estrés salino tratada con bioestimulante en comparación con aquella tratada únicamente con NaCl, concuerdan con Minsarani en 2014, el cual presentó en su investigación, que la activación de vías de señalización por parte de las oligosacarinas mejoran la producción de moléculas antioxidantes, las cuales son capaces de reaccionar con especies reactivas de oxígeno, minimizando el daño a biomoléculas, esta afirmación da cabida a deducir que el bioestimulante en este caso permite la reparación de biomoléculas lipídicas (Miransari, 2014, p. 541).

Esfandiari en 2007, también presenta que cuando la planta está sometida a estrés salino, el exceso de NaCl puede provocar una disminución de la actividad enzimática o incluso la inactivación de algunas moléculas antioxidantes. (Esfandiari et al., 2007, pp. 2-3). Adicionalmente, según

González en el año 2000, los lípidos son particularmente susceptibles al ataque de los radicales libres (González, 2000, p. 5), seguramente éstas sean causas probables de los altos niveles de oxidación lipídica en las muestras tratadas con NaCl únicamente.

5.4 Niveles de oxidación en componentes proteicos

La técnica de OxyBlot permite identificar daño específicamente en componentes proteicos (Fig. 10). Los resultados presentados en los tratamientos sin estrés salino (Fig. 11), permiten inferir de manera indirecta que los bajos niveles de oxidación en la muestra con bioestimulante, son resultado de los mecanismos de defensa que permiten tolerar situaciones de estrés (Enríquez et al., 2010, pp. 1-2). Investigaciones realizadas por Enríquez y colaboradores en 2010, demostraron que oligosacarinas derivadas de hongos promueven la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa, la misma involucrada en la síntesis de metabolitos secundarios como ligninas, taninos y flavonoides. Se sabe que estos metabolitos entre sus múltiples funciones, protegen a las plantas de daños oxidativos (Enríquez et al., 2010, p. 2).

En el caso de los tratamientos que se encuentran sometidos a estrés salino (Fig. 11), la significativa disminución de la oxidación en la muestra tratada con bioestimulante concuerdan con las investigaciones de Enríquez y colaboradores, los cuales afirman que las oligosacarinas derivadas de los hongos, favorecen la actividad de enzimas peroxidasas en las plantas. Las peroxidasas se caracterizan por catalizar la reacción de ruptura del peróxido de hidrógeno. Bajo las premisas descritas previamente, se da la posibilidad de que el bioestimulante permita la reparación de estructuras proteicas (Enríquez et al., 2010, pp. 3-5).

Como dato adicional, Daly y colaboradores realizaron en el 2010 una investigación sobre la existencia de antioxidantes, formados por pequeños péptidos con Mn^{2+} en la célula y su capacidad para eliminar especies reactivas de oxígeno. Estos péptidos están fuertemente implicados en la protección del

proteoma y esta ruta es muy importante para la resistencia a la oxidación mediante la protección de proteínas celulares.

Aunque esta investigación fue realizada en la bacteria *Deinococcus radiodurans*, se asegura que las células eucariotas también están involucradas en estos procesos antioxidantes mediados por péptidos y Mn^{2+} (Daly et al., 2010, pp. 2-5). También es posible pretender que el bioestimulante podría ser capaz de inducir dichas rutas metabólicas como un mecanismo implicado en la protección de proteínas cuando la célula se encuentra bajo algún tipo de estrés oxidativo.

La validación de los resultados preliminares de éste ensayo mostraron una tendencia, la misma que muestra un efecto del bioestimulante sobre las muestras vegetales, sin embargo, es importante señalar que dichos resultados son preliminares y por lo tanto se espera validar su protocolo en tejidos vegetales.

5.5 Funcionalidad del sistema ubiquitina-proteasoma

Los altos niveles de ubiquitinación en el tratamiento con bioestimulante en las muestras sin estrés salino (Fig. 13.A), indican una mayor cantidad de proteínas de alto peso molecular dañadas o innecesarias en las células vegetales. Investigaciones realizadas por Shang y Taylor en el año 2011, expusieron que mayores niveles de ubiquitina conjugada en la célula parece ser un indicador de estrés oxidativo, esto se da por una inhibición del proteasoma 26S, dando lugar a la acumulación de sustratos ubiquitinados (Shang y Taylor, 2011, pp. 2-3), no obstante, se observa la peculiaridad de que a los 7 días de inducción, el tratamiento con bioestimulante también presenta niveles altos del proteasoma 26S (Fig. 17.A).

Los altos niveles tanto de proteasoma 26S como de proteínas ubiquitinadas, y así también la alta actividad enzimática del proteasoma 20S pueden indicar una respuesta celular a condiciones que requieran mayor degradación proteica, no precisamente debido a situaciones de estrés. Es contradictorio pensar que los altos niveles de ubiquitina y de proteasoma, así como su alta actividad, se debe

a una mayor oxidación de proteínas, ya que en los resultados previamente presentados es posible apreciar que el tratamiento con bioestimulante presenta los menores niveles de oxidación proteica. Es viable especular que el bioestimulante de alguna manera induce ciertas respuestas en la planta, las mismas que necesitan de la síntesis y degradación sistemática de enzimas catalizadoras de reacciones metabólicas (Enríquez et al., 2010, p. 2).

Enríquez y colaboradores afirman que las oligosacarinas originan una inducción del crecimiento y desarrollo de células vegetales, debido a una mayor actividad auxínica. Se conoce también que las auxinas junto a las citoquininas forman parte del control del ciclo celular de las células vegetales (Enríquez et al., 2010, pp. 2-4). Es factible pensar que los altos niveles de ubiquitina y proteasoma así como su alta actividad en el tratamiento con bioestimulante, podrían ser causados indirectamente por un aceleramiento del ciclo celular.

Por otro lado, los altos niveles de proteínas ubiquitinadas y los bajos niveles de proteasoma, así como de su actividad en la muestra sometida a estrés salino (Fig. 13. B, 15 y 17. B), nos indican una inhibición parcial de la actividad del proteasoma. Wang y colaboradores en el 2011 afirman que el proteasoma, muestra vulnerabilidad frente a componentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno H_2O_2 , dando lugar a la acumulación de sustratos ubiquitinados cuando las células se encuentran bajo estrés oxidativo (Wang, Yen, Kaiser, y Huang, 2011, pp. 2-4). Esta afirmación tiene concordancia con los mayores niveles de proteínas carboniladas obtenidas (Fig.11) cuando la planta está sometida a estrés salino.

La muestra tratada con bioestimulante y NaCl, presenta un comportamiento que permite relacionar al bioestimulante con respuestas de defensa frente a situaciones de estrés. El hecho de observar menores niveles de ubiquitinación y mayores niveles de proteasoma, da la idea de la existencia de un buen funcionamiento de degradación de proteínas oxidadas en las células vegetales. Sin embargo, los ensayos de medición de la actividad del proteasoma 20S, no mostraron actividad detectable en las muestras tratadas con bioestimulante + NaCl. Este resultado puede ser contradictorio al observar que la muestra de

dicho tratamiento presenta una reducción significativa (40 %) de proteínas carboniladas, es decir, existe una mejor actividad proteolítica en el interior de la célula en comparación con la muestras con NaCl. La escasa actividad del proteasoma 20S en el tratamiento con bioestimulante + NaCl, se pudo haber dado por múltiples factores.

Existe la posibilidad de que la falta de actividad del proteasoma 20S, se haya dado debido a la formación de agregados proteicos producidos por el estrés salino. Shang y colaboradores afirman en su investigación que el estrés oxidativo provoca agregados proteicos difíciles de degradar, estos agregados afectan al proteasoma indirectamente, ya los mismos dificultan su entrada al interior del núcleo proteolítico. Se provoca una situación en la cual existen niveles altos de proteasoma, mientras que su actividad es baja. Esta puede ser una razón probable de que existan niveles de proteasoma, a pesar de la ausencia de su actividad en la muestra tratada con bioestimulante + NaCl (Shang y Taylor, 2011, pp. 3-4).

Por otra parte, se considera que el hecho de que las muestras no contengan inhibidor de proteasas y la adición del bioestimulante juntamente con el NaCl, dan lugar a condiciones en las cuales probablemente se degradó el proteasoma por la acción de otras proteasas. Se sabe que al haber una lisis celular, la homeostasis interna se ve interrumpida, en ese momento las proteasas empiezan a degradar rápidamente proteínas. Normalmente, para preservar la funcionalidad de las proteínas después de la lisis celular, una combinación de inhibidores de proteasas se utiliza en los ensayos bioquímicos. No obstante, para el ensayo de la medición de la actividad del proteasoma no es posible utilizar dichos inhibidores, ya que los mismo privan la actividad de las proteasas, entre ellas el proteasoma. A pesar de no observar actividad del proteasoma, muy seguramente existe alta actividad de otro tipo de proteasas. Las proteasas provenientes del lisosoma, también participan tanto en la hidrólisis de proteínas no deseadas así como en la regulación de diferentes procesos fisiológicos (Shang y Taylor, 2011, pp. 2-3).

6. Capítulo VI: Conclusiones

El bioestimulante utilizado en este proyecto permite la inducción de un mayor contenido de sólidos solubles totales en las plantas tratadas con y sin NaCl, dando lugar a una mejor tolerancia al estrés salino mediante sólidos osmóticamente activos.

Los niveles de oxidación en los lípidos y en componentes solubles de las muestras sin NaCl son ligeramente más altos en el tratamiento con bioestimulante con respecto al control, probablemente porque dicha oligosacarina genera una respuesta similar al estrés, dando lugar a la estimulación de vías de defensa, permitiendo a la planta soportar futuras situaciones de estrés.

La presencia simultánea de NaCl y bioestimulante genera un mejor manejo del estrés salino que se demuestra con los menores niveles de oxidación en los lípidos y en componentes solubles de las muestras.

El bioestimulante muestra una tendencia de disminuir la oxidación en componentes proteicos, a pesar de que los ensayos realizados fueron preliminares. Pese a observar mayor actividad del proteasoma 20S en la muestra con bioestimulante, indirectamente esta actividad no se da debido a proteínas oxidadas en la célula. Así también, la inhibición de la actividad del proteasoma y la acumulación de sustratos ubiquitinados en las muestras sometidas únicamente a NaCl, concuerdan indirectamente con los altos niveles de proteínas oxidadas en este tratamiento.

Por último, la escasa actividad del proteasoma 20S en la muestra con estrés salino en presencia del bioestimulante, muy probablemente se dio por la acción de otro tipo de proteasas sobre el proteasoma, no obstante, resulta evidente la existencia de actividad del proteasoma al observar la disminución en los niveles de proteínas oxidadas en comparación con la muestra tratada únicamente con NaCl.

Por lo tanto, se concluye: 1. el bioestimulante utilizado en este proyecto probablemente estimula vías de defensa en la planta, provocando una mejor tolerancia en situaciones de estrés y 2. cuando el bioestimulante se encuentra conjuntamente con NaCl, claramente este ayuda a la planta a disminuir los niveles de oxidación en componentes lípidos y proteicos con respecto a la muestra tratada únicamente con NaCl en su medio de cultivo.

7. Capítulo VII: Recomendaciones

Los resultados de la determinación de los niveles de oxidación en componentes solubles, proporcionan una idea general del estado de la célula frente al estrés salino. Sin embargo, a pesar de haber determinado la oxidación específicamente en componentes proteicos y lipídicos, se recomienda realizar ensayos de determinación de los niveles de oxidación en ácidos nucleicos, este complemento permitiría dilucidar un poco más sobre el mecanismo de acción del bioestimulante utilizado en este proyecto.

El estudio del funcionamiento del sistema ubiquitina-proteasoma mostró resultados interesantes del mecanismo de degradación de proteínas en las células. No obstante, el estudio de la actividad de algunas enzimas antioxidantes, proporcionaría información adicional en cuanto al funcionamiento del bioestimulante sobre la respuesta antioxidante de la planta.

En este proyecto se realizó un estudio general de la planta de *Arabidopsis thaliana*, es decir, se utilizó todas las partes de la misma (raíz, tallo, hojas) en los experimentos desarrollados. Se recomienda realizar un estudio de cada segmento de la planta por separado, debido a que es posible que los efectos del bioestimulante sean diferentes en cada parte de la planta estudiada. De esta manera se puede obtener información más detallada sobre el mecanismo de acción del bioestimulante utilizado en este proyecto.

Se recomienda también utilizar diferentes concentraciones de NaCl, con el fin de estudiar más detalladamente los niveles de tolerancia de las plantas sometidas a estrés salino, cuando éstas son tratadas con el bioestimulante.

Se recomienda utilizar técnicas de Western Blot con su respectiva normalización, de modo que se puedan detectar las proteínas específicas a lo largo del carril, así las mismas no estarán acumuladas en un solo espacio como ocurre en la técnica de Dot Blot.

Por último se recomienda validar un protocolo de OxyBlot para utilizarlo en tejidos vegetales, de esta manera los resultados serán más certeros y podrán ser cuantitativos.

Referencias

- Acosta, A., González, L., Valdés, M., González, C. y Sánchez, L. (2007). *Efecto de dos oligosacarinas sobre la expresión isoenzimática al ser aplicadas sobre dos variedades de tabaco (Nicotiana tabacum L.)*. Recuperado 26 de Septiembre del 2015 de <https://www.ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/viewFile/297/pdf>
- Adams, J. (2003). *The proteasome: structure, function, and role in the cell*. Recuperado el 10 de Octubre del 2015 de [http://www.doi.org/10.1016/S0305-7372\(03\)00081-1](http://www.doi.org/10.1016/S0305-7372(03)00081-1)
- Bela, K., Horváth, E., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I. y Csiszár, J. (2015). *Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.doi.org/10.1016/j.jplph.2014.12.014>
- Costales, D., Martínez, L. y Núñez, M. (2007). *Efecto de oligogalacturónidos sobre el crecimiento de plántulas de tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <https://www.ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/viewFile/334/pdf>
- Daly, M., Gaidamakova, E., Matrosova, V., Kiang, J., Fukumoto, R., Lee, D., Viteri, G. y Levine, R. (2010). *Small-molecule antioxidant proteome-shields in Deinococcus radiodurans*. Recuperado el 21 de Mayo del 2016 de <http://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0012570>
- Davey, M., Stals, E., Panis, B., Keulemans, J. y Swennen, R. (2005). *High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues*. Recuperado el 26 de Mayo del 2016 de <http://www.doi.org/10.1016/j.ab.2005.09.041>
- Dong, W., Zhang, X., Wang, H., Dai, X., Sun, X., Qiu, W. y Yang, F. (2012). *Effect of different fertilizer application on the soil fertility of paddy soils in red soil*

- region of southern China*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0044504>
- Du, Z. y Bramlage, W. (1992). *Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts*. Recuperado el 3 de Mayo del 2016 de <http://www.doi.org/10.1021/jf00021a018>
- 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*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a7.pdf>
- Esfandiari, E., Shekari, F., Shekari, F. y Esfandiari, M. (2007). *The effect of salt stress on antioxidant enzymes' activity and lipid peroxidation on the wheat seedling*. Recuperado el 3 de Mayo del 2016 de <http://www.notulaeobotanicae.ro/index.php/nbha/article/viewFile/251/243>
- Espinoza, E. (2012), *Ecuador con superficie agrícola de 7.300374 Ha*. Recuperado el 2 de Mayo del 2016 de <http://www.revistaelagro.com/2012/01/05/ecuador-con-superficie-agricola-de-7%E2%80%999300-374-ha/>
- Finley, D. (2012). *Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome*. Recuperado el 25 de Octubre del 2015 de <http://www.doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607>. Recognition
- Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO) (2015), *Salt-affected soils*, Recuperado el 25 de Octubre del 2015 de <http://www.fao.org/soils-portal/manejo-del-suelo/manejo-de-suelos-problematicos/suelos-afectados-por-salinidad/more-information-on-salt-affected-soils/es/>
- Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO) (2012), *El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo*, Recuperado el 25 de Octubre del 2015 de www.fao.org/docrep/017/i3027s/i3027s.pdf

- Fox, J. (2005). *The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R*. *Journal of Statistical Software*, 14(9), 1-42. Recuperado el 23 de Febrero del 2016 de <https://www.jstatsoft.org/article/view/v014i09/v14i09.pdf>
- García, Y., Rodríguez, A. y Peñaloza, N. (2005). *Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices*. Recuperado el 30 de Octubre del 2015 de <http://www.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.10.018>
- Gomero, L. y Velásquez, H. (1999). *Manejo Ecológico de Suelos: Conceptos, Experiencias y Técnicas*. Recuperado el 25 de Septiembre del 2015 de: http://www.cepes.org.pe/pdf/manejo_ecologico_de_suelos.pdf
- González, M., Betancourt, C. y Ortiz, R. (2000). *Daño oxidativo y antioxidantes*. Recuperado el 12 de Marzo del 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57611797001>
- Handa, S., Bressan, R., Handa, K., Carpita, N. y Hasegawa, P. (1983). *Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress*. Recuperado el 20 de Febrero del 2016 de <http://www.doi.org/10.1104/pp.73.3.834>
- Hasanuzzaman, M., Alam, M., Rahman, A., Hasanuzzaman, M., Nahar, K. y Fujita, M. (2014). *Exogenous Proline and Glycine Betaine Mediated Upregulation of Antioxidant Defense and Glyoxalase Systems Provides Better Protection against Salt-Induced Oxidative Stress in Two Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.doi.org/10.1155/2014/757219>
- Hernández, M., Fernández, N., Díaz, P. y Olmos, E. (2010). *A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 <http://www.doi.org/10.1093/jxb/erp321>
- Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC). (2012). *Ecuador destina 7 millones de hectáreas a la labor agrícola*. Recuperado el 5 de Mayo del 2016 de

http://www.inec.gob.ec/inec/index.php?option=com_content&view=article&id=623%3Aecuador-destina-7-millones-de-hectareas-a-la-labor-agricola&catid=56%3Adestacados&Itemid=3&lang=es

Jung, T., Höhn, A. y Grune, T. (2014). *The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part III—Redox regulation of the proteasomal system*. Recuperado el 10 de Octubre del 2015 de <http://www.doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.029>

Larrea, H. (2016). *La agricultura en el Ecuador*. Recuperado el 15 de Julio del 2016 de <http://www.eluniverso.com/opinion/2016/02/29/nota/5435295/agricultura-ecuador>

Lavagi, I., Estelle, M., Weckwerth, W., Beynon, J. y Bastow, R. (2012). *From Bench to Bountiful Harvests: A Road Map for the Next Decade of Arabidopsis Research*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.doi.org/10.1105/tpc.112.096982>

Lutenberg, O. (2016). *La salinidad y su influencia en suelos y plantas*. Recuperado el 10 de Octubre del 2015 de http://www.academia.edu/4632653/La_Salinidad_y_su_Influencia_en_Suelos_y_Plantas

Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP). (2011). *Proyecto de generación del mapa de cobertura y uso de suelo*. Recuperado el 10 de Octubre del 2015 de <http://www.agricultura.gob.ec/requerimiento-de-personal-para-contratacion-en-la-direccion-de-investigacion-y-generacion-de-datos-multisectoriales/>

Miransari, M. (2014). *Plant Signaling under Environmental Stress. Oxidative Damage to Plants*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00018-6>

Mite, F. (2012), *Problemas de acumulación de sales en suelos del ecuador*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.secsuelo.org/wp->

content/uploads/2015/06/3-
 %20Problemas%20de%20Acumulacion%20de%20Sales%20(Mite%20F).pd
 f

Montaño, N. y Méndez, J. (2009). *Efecto de reguladores de crecimiento sobre el epicarpo, mesocarpo y sólidos solubles totales del fruto de melón (Cucumis melo L.)* Recuperado el 7 de Mayo del 2016 de <https://www.dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3308221>

Munns, R. y Tester, M. (2008). *Mechanisms of salinity tolerance*. Recuperado el 25 de Septiembre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18444910>

National Research Council (U.S). (2006). *Global challenges and directions for agricultural biotechnology: workshop report*. Recuperado el 25 de Septiembre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK207930/>

Oliver, C., Ahn, B., Moerman, E., Goldstein, S. y Stadtman, E. (1987). *Age related changes in oxidized proteins*. Recuperado el 20 de Enero del 2015 de <http://www.jbc.org/content/262/12/5488.short>

Pagan, J., Seto, T., Pagano, M. y Cittadini, A. (2013). *Role of the ubiquitin proteasome system in the heart*. Recuperado el 23 de Mayo del 2016 de <http://www.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300521>

Pastor, J. (2014). *Efecto del uso del vermicompost para la biorremediación de suelos salino-sódicos del estado falcón*. Recuperado el 5 de Mayo del 2016 de http://www.academia.edu/10198151/Efecto_del_Uso_del_Vermicompost_para_la_Biorremediaci%C3%B3n_de_Suelos_Salino-S%C3%B3dicos_del_Estado_Falc%C3%B3n

Perkovskaya, G., Kravchuk, Z., Grodzinsky, D. y Dmitriev, A. (2004). *Induction of reactive oxygen species and phytoalexins in onion (Allium cepa) cell culture by biotic elicitors derived from the fungus Botrytis cinerea*. Recuperado el 25 de Septiembre del 2015 de

<http://www.link.springer.com/article/10.1023%2FB%3ARUPP.0000040745.17893.a7>

Petrov, V., Hille, J., Mueller, B. y Gechev, T. (2015). *ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.doi.org/10.3389/fpls.2015.00069>

Pierce, B. (2012). *Genetics: a conceptual approach* (4th ed). New York, USA: W.H. Freeman and Company.

Pontón, J. (2008). *La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de [http://www.doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](http://www.doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)

Ramírez, M., Rodríguez, A., Alfonso, L. y Peniche, C. (2010). *Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications*. Recuperado el 15 de Julio del 2016 de http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-28522010000400002

Rocha, M. (2013). *El sistema ubicuitina/proteasoma en la interacción planta-patógeno*. Recuperado el 18 de Octubre del 2015 de [http://www.doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72083-7](http://www.doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72083-7)

Rodríguez, L. (2006). *Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas*. Recuperado el 7 de Mayo del 2016 de <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v24n1/v24n1a04.pdf>

Saed, A., Pakniyat, H., Pirasteh, H. y Azooz, M. (2014). *Role of ROS as Signaling Molecules in Plants*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00020-4>

Shabala, S. (2013). *Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.doi.org/10.1093/aob/mct205>

- Shang, F. y Taylor, A. (2011). *Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress*. Recuperado el 15 de Abril del 2015 <http://www.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.031>
- Svilar, D., Goellner, E., Almeida, K. y Sobol, R. (2011). *Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3096496/pdf/ars.2010.3466.pdf>
- Szöllősi, R. (2014). *Superoxide Dismutase (SOD) and Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780127999630000034>
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de https://www.books.google.com.ec/books?id=7QIbYg-OC5AC&printsec=frontcover&hl=es&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Travella, M. (2013). *Uso de agroquímicos y salud humana: certezas, dudas y debate*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.bahiablanca.gov.ar/subidos/medio-ambiente/saneamiento-ambiental/2da-jornadas-agroquimicos-y-toxicologia/17-10/tas-toxicologia-dra-cecilia-travella.pdf>
- van, G., Dixon, L., Troein, C. y Millar, A. (2011). *Proteasome Function Is Required for Biological Timing throughout the Twenty-Four Hour Cycle*. Recuperado el 10 de Octubre del 2015 de <http://www.doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.060>
- Voet, D., y Voet, J. (2006). *Bioquímica*. Recuperado el 10 de Octubre del 2015 de https://www.books.google.com.ec/books?id=r5bedH_aST0C
- Wang, X., Yen, J., Kaiser, P. y Huang, L. (2011). *Regulation of the 26S Proteasome Complex During Oxidative Stress*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3140957/>

Wang, Z., Wang, M., Liu, L. y Meng, F. (2013). *Physiological and proteomic responses of diploid and tetraploid black locust (Robinia pseudoacacia L.) subjected to salt stress*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.doi.org/10.3390/ijms141020299>

Wańkiewicz, A., Beszterda, M. y Goliński, P. (2014). *Nonenzymatic Antioxidants in Plants*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00007-1>

World Bank. (2014). *Agricultura, valor agregado (% del PIB)*. Recuperado el 25 de Septiembre del 2015 de <http://www.datos.bancomundial.org/indicador/NV.AGR.TOTL.ZS>

Yoshikawa, M., Yamaoka, N. y Takeuchi, Y. (1993). *Elicitors: their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions*. Recuperado el 26 de Septiembre del 2015 de <http://www.pcp.oxfordjournals.org/content/34/8/1163.short>