



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ANÁLISIS DEL NIVEL DE DAÑO PROTEICO Y LIPÍDICO DE PLANTAS DE *NICOTIANA
TABACUM* BAJO ESTRÉS SALINO Y EN PRESENCIA DE OLIGOSACARINAS

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

Profesora Guía
PhD Gabriela Alexandra Viteri Espinoza

Autora
Ana María Mena Amores

Año
2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

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

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”

Ana María Mena Amores
CI: 1723250096

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por brindarme la mejor educación, la cual me ha permitido alcanzar esta meta tan importante en mi vida. A toda mi familia por su apoyo y cariño incondicional.

A Gabriela Viteri quien me permitió realizar este proyecto, por haberme guiado y apoyado con su conocimiento, paciencia y confianza.

Al centro de investigaciones CIEDI por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en sus instalaciones.

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a las personas que más han influenciado en mi vida; mi familia y amigos, principalmente a mis padres quienes me han brindado su apoyo, su confianza y los mejores consejos durante mi formación académica.

A mi hermana María Cecilia gracias por darme su soporte en los momentos más difíciles

A Bárbara por compartir los mejores momentos en mi vida universitaria y por apoyarme durante la realización de este proyecto.

RESUMEN

Uno de los grandes problemas a los que se enfrenta la humanidad en los últimos tiempos es la baja productividad de los cultivos, llevando a los agricultores a usar de manera excesiva agroquímicos para evitar una crisis alimentaria, el abuso de estos productos ha ocasionado problemas ambientales y de salud.

Entre las consecuencias más graves de este uso indiscriminado es la acumulación de sales en los suelos cultivables, imposibilitando la siembra en estos. La salinidad afecta a la germinación, crecimiento y desarrollo de la planta, causando graves pérdidas en el sector agrícola.

Para contrarrestar los efectos no deseados previamente mencionados, en la agroindustria se han desarrollado alternativas biológicas que reemplazan el uso de productos químicos, como es el caso de los bioestimulantes. El objetivo general de este trabajo fue la evaluación de la presencia de un bioestimulante (oligosacarinas) sobre el crecimiento de plantas de *Nicotiana tabacum* y los daños de sus componentes proteicos y lipídicos bajo condiciones de estrés salino, para lo cual se sembraron semillas en medio Murashigue y Skoog (MS) en presencia y/o ausencia de 100 mM de cloruro de sodio (NaCl) y 1 mg.L⁻¹ de oligosacarina derivadas de la pared celular de plantas (OP). Las variables morfológicas evaluadas fueron el porcentaje de germinación, longitud total y radicular, peso fresco, número de hojas y área foliar, en estas dos últimas variables se observó una afectación positiva provocada por el bioestimulante. También, se comparó la presencia relativa de grupos carbonilo en el material soluble total, donde se pudo observar una disminución en el contenido de carbonilos reactivos en presencia de las oligosacarinas. Las diferencias de oxidación de lípidos presentes en la muestra no mostraron ningún cambio significativo de oxidación en presencia del bioestimulante.

ABSTRACT

One of the biggest problems humanity has faced in the last decades is the low yield of agricultural production, this forced farmers to use, excessively, agrochemicals to improve production and avoid an alimentary crisis. The indiscriminate use of these products with little or no technical support has caused health problems and affected the environment.

An important consequence of the indiscriminated use is the accumulation of salts on cultivable soils, making it impossible to sow in these. The excess of salt affects the germination, growth and development of plants, causing great financial loses.

In these days consumers prefer products without agrochemicals for this reason in the agroindustry it's been developed biological alternatives to replace the use of the agrochemicals, like biostimulants. The objective of this project was to evaluate the effect of the presence of a biostimulant (oligosaccharines) on the morphological characteristics of plants of *Nicotiana tabacum* and the damage of its macromolecular components under salt stress conditions. The growth conditions generated to grow the *Nicotiana tabacum* plants from seeds were sowed in basic media Murahigue & Skoog (MS) in presence and/or absence of 100 mM of sodium chloride (NaCl) and 1 mg.L⁻¹ of oligosaccharine from plant cell wall (OP). The morphological characteristics evaluated were: the percentage of germination, total length and root length, fresh weight, number of leaves, and foliar area. The effect of the presence of the OP was evident in the number and area of the leaves of the plants. At the molecular level, it is observed a reduced content of total oxidized components in the samples grown in the presence of OP. That are not necessarily the lipidic components of the samples since we were not able to show significant oxidation changes in these fractions this fraction.

ÍNDICE

1. Introducción:	1
Hipótesis	3
Objetivo General	3
Objetivos específicos	3
2. Marco teórico:	4
2.1. Bioestimulantes	4
2.1.1. Definición e importancia	4
2.1.2. Tipos de bioestimulantes	6
2.1.2.1. Oligosacarinas derivadas de la pared celular de hongos	7
2.1.2.2. Oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas	8
2.1.3. Funcionamiento de los bioestimulantes	8
2.1.4. Importancia económica	9
2.2. Estrés salino en plantas y sus consecuencias	10
2.3. Estrés oxidativo	13
2.3.1. Especies reactivas del oxígeno	13
2.3.2. Sistemas antioxidantes	15
3. Metodología:	18
Obtención del material vegetal y oligosacarinas	18
3.1.1. Determinación de la concentración de cloruro de sodio a utilizarse	18
3.1.2. Comparación de las diferencias de crecimiento de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> tratadas con oligosacarinas mediante la medición de sus raíces, hojas y peso fresco	19
3.1.3. Análisis estadístico de las diferencias de crecimiento de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> en los distintos tratamientos	20
3.1.4. Extracción de proteínas a partir de muestras de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> tratadas con oligosacarinas y expuestas a estrés salino mediante espectrofotometría	21

3.1.5. Comparación de la presencia relativa de grupos carbonilos en el material soluble de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> tratadas con oligosacarinas y expuestas a estrés salino mediante espectrofotometría.....	22
3.1.6. Evaluación de las diferencias de oxidación de lípidos de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> tratadas con oligosacarinas y expuestas a estrés salino mediante espectrofotometría	23
4. Resultados:	25
4.1.1. Evaluación Morfológica	25
4.1.1.1. Determinación de la concentración de cloruro de sodio	25
4.1.1.2. Porcentaje de Germinación	26
4.1.1.3. Comparación del crecimiento entre plantas de <i>Nicotiana tabacum</i>	27
4.1.2. Extracción y cuantificación de proteínas	30
4.1.3. Determinación de grupos carbonilos de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i>	31
4.1.4. Evaluación de oxidación de lípidos en plantas de <i>Nicotiana tabacum</i>	32
5. Discusión	34
5.1. Porcentaje de germinación	34
5.2. Morfología de raíces, tallo y hojas	36
5.3. Determinación de grupos carbonilo en material soluble	38
5.4. Evaluación de las diferencias de oxidación de lípidos de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i>	39
6. Conclusiones:	41
7. Recomendaciones:	42
REFERENCIAS	42
ANEXOS	52

1. INTRODUCCIÓN:

La creciente demanda alimentaria de las últimas décadas ha obligado a la población mundial a desarrollar estrategias para incrementar la producción de alimentos, las cuales han logrado disminuir la brecha entre la cantidad de los recursos requeridos y la producción alcanzada. La extensión de las áreas de cultivo y el uso de productos químicos en los mismos han sido las principales maneras de aumentar la productividad agrícola hasta el momento. Durante las últimas décadas se ha desarrollado un fuerte interés para los consumidores para obtener productos con menos agroquímicos y en consecuencia, una conciencia ambiental por parte de los agricultores. Por estas razones se han buscado alternativas biológicas que sustituyan estos productos, como es el caso de los bioestimulantes(Diouf, Bishop, Branca, Brinkman, & Metzner, 2002).

Estos productos biológicos son grupos de sustancias variadas provenientes de un organismo vivo que promueven el crecimiento y el desarrollo de las plantas, además de mejorar su metabolismo. Dentro de este gran grupo se encuentran las oligosacarinas que son hidratos de carbono, como las pectinas o xiloglucanos, extraídos de la pared celular ya sea de plantas o de hongos (González-Pérez et al., 2012, p. 212).

Los bioestimulantes de manera general ejercen una influencia directa en la morfología de la planta, además pueden generar una respuesta de tipo hormonal o un aumento en los niveles de antioxidantes, permitiéndole a la planta adaptarse o crear una resistencia a los diferentes factores bióticos o abióticos que se pueden presentar en las plantaciones(Hamza & Suggars, 1999, p.2).

Uno de los grandes problemas que enfrentan los cultivos son los factores abióticos, como el aumento de la temperatura, sequías, acumulación de sales, contaminación, etc. Esto ocasiona un estrés en las plantas. La presencia de sales en el suelo afecta a la asimilación de nutrientes por parte de las plantas y afecta la actividad microbiana del suelo.

En América del Sur existen más de 129'000.000 de hectáreas de suelo afectado por la salinidad. Muchos que existen en la actualidad se deben al mal manejo de riego y al uso de agua contaminada con residuos orgánicos o químicos como fertilizantes y pesticidas (Centeno, 2012; Jouyban, 2012, p.14).

La exposición a concentraciones de sal fuera de lo normal detiene el crecimiento de las plantas a nivel radicular y longitudinal, además de inhibir la germinación y florecencia; afectando negativamente los procesos fotosintéticos. Como consecuencia de estas alteraciones, a nivel molecular las plantas pueden sufrir estrés oxidativo, lo que origina daños a nivel proteico, lipídico y genómico (Qados, 2011, p.8).

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la concentración de las especies reactivas del oxígeno y los componentes del sistema antioxidante. Las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) si bien pueden tener efectos nocivos, son productos del metabolismo celular necesarios para la activación de vías de señalización, por lo tanto, siempre van a estar presentes en las células. Para contrarrestar los ROS, los seres vivos cuentan con distintas estrategias antioxidantes como la presencia de sustancias como el glutatión o enzimas especializadas como la superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, entre otras (Poljsak, 2011).

Hipótesis

La presencia de bioestimulantes en el medio de cultivo, ocasiona una mejor tolerancia a los daños causados por presencia de cloruro de sodio en el mismo, a nivel de proteínas y lípidos de plantas de *Nicotiana tabacum*.

Objetivo General

Evaluar el efecto del tratamiento con oligosacarinas sobre el crecimiento de plantas de *Nicotiana tabacum* y los daños de sus componentes proteicos y lipídicos bajo condiciones de estrés salino.

Objetivos específicos

- Comparar las diferencias de crecimiento de plantas de *Nicotiana tabacum* tratadas con oligosacarinas mediante la medición de sus raíces, hojas y peso fresco de las plantas.
- Comparar la presencia relativa de grupos carbonilo en el material soluble de plantas de *Nicotiana tabacum* tratadas con oligosacarinas expuestas a estrés salino mediante espectrofotometría.
- Evaluar las diferencias de oxidación de lípidos de plantas de *Nicotiana tabacum* tratadas con oligosacarinas expuestas a estrés salino mediante espectrofotometría.

2. MARCO TEÓRICO:

2.1. Bioestimulantes

2.1.1. Definición e importancia

La población mundial ha venido creciendo sostenidamente en el último tiempo, de hecho se espera que la misma se triplique entre el 2009 y el 2050, especialmente en África, el Medio Oriente y en algunos países de América Latina. Este aumento traerá como consecuencia el incremento en la demanda de alimentos y producirá una disminución en la accesibilidad a los mismos, ocasionando una crisis alimentaria en algunos países. El crecimiento demográfico y la presión que ésta genera, ha hecho que grandes áreas cultivables sean transformadas en ciudades o poblados para acomodar a la población creciente. En este siglo, la agricultura tiene como desafío principal aumentar la producción de alimentos y fibras para abastecer a la población mundial usando menor mano de obra y materia prima más barata. Este objetivo se lo piensa cumplir con el desarrollo de nuevos métodos de producción que sean eficaces, sostenibles y adaptables al cambio climático (FAO, 2009).

El aumento del rendimiento de los campos y la producción de alimentos ha requerido que en las últimas décadas se usen agroquímicos como los fertilizantes y los pesticidas, que si bien han favorecido la obtención de buenos niveles de producción, han generado problemas en la salud humana y han demostrado que tienen un impacto negativo sobre el medio ambiente. Estas preocupaciones, han llevado a la búsqueda de nuevas tecnologías que incrementen la productividad de las plantaciones de una manera limpia, entre las cuales se encuentran los bioestimulantes y biofertilizantes (Bulgaria, Cocetta, Trivellini, Vernieri, & Ferrante, 2015, p. 10-11; Eskenazi, Bradman, & Castorina, 1999).

Los bioestimulantes son sustancias bioactivas capaces de mejorar la captación de nutrientes y promover la tolerancia al estrés biótico y abiótico, favoreciendo el crecimiento de las plantas. La aplicación de estos productos activan varios

procesos fisiológicos que estimulan el desarrollo y le permiten al agricultor reducir el consumo de agroquímicos (Bulgari, Cocetta, Trivellini, Vernieri, & Ferrante, 2015, p. 8-9; Calvo, Nelson, & Kloepper, 2014, p. 5; du Jardin, 2012).

La composición de estos productos es muy variable, de hecho muchos de los bioestimulantes comerciales están compuestos por una mezcla de fitohormonas, sustancias húmicas y extractos de algas marinas. La purificación de estos compuestos es un proceso muy complejo debido a la diversidad de estructuras químicas presentes y a las diferentes interacciones sinérgicas que éstas podrían tener; además estos procesos son altamente costosos provocando un mayor precio en el producto final, por lo cual no se los ha investigado en su totalidad y han sido utilizados de manera empírica (Hamza & Suggars, 1999).

Debido a la variabilidad en su composición, se ha reportado un comportamiento diferente para un mismo producto dependiendo de la especie vegetal y la concentración del mismo (Hamza & Suggars, 1999; Schmidt, Ervin, & Zhang, 2003, p.92). Los mecanismos de acción de estas mezclas son difíciles de identificar y siguen en investigación, sin embargo estos productos cada vez son más utilizados como sustitutos de los agroquímicos en los campos de cultivo (Bulgari et al., 2015, p. 7-9; du Jardin, 2015).

Hasta el momento se ha descubierto que los bioestimulantes pueden actuar directamente en la fisiología y metabolismo de la planta o mejorar las condiciones del suelo, afectando a la microflora e influyendo indirectamente sobre el crecimiento de las plantas (Calvo et al., 2014, p.5; Corner, 2012.). A diferencia de los fertilizantes, los bioestimulantes logran influir sobre el metabolismo haciendo que fisiológicamente la planta cambie, incrementando el desarrollo radicular y modificando la conformación de las raíces (du Jardin, 2012).

Los bioestimulantes también pueden promover el incremento de aminoácidos y proteínas en las células además de aumentar la biosíntesis de azúcares, provocando un acrecentamiento en algunos procesos metabólicos como el

aumento de la concentración de clorofila, causando por consiguiente un aumento en la tasa fotosintética (Bulgari et al., 2015, p. 6; Corner, 2012; Russo & Berlyn, 1991, p.19-20).

Estos productos actúan en bajas concentraciones y su efecto puede ser diferente dependiendo de la especie vegetal y de las condiciones ambientales a las cuales está expuesta la planta y del tiempo de aplicación de los mismos (Bulgari et al., 2015, p.7; du Jardin, 2015). La variabilidad de respuesta de los bioestimulantes puede ser provocada por la formulación o composición del producto impidiendo que su uso sea generalizado (Calvo et al., 2014, p. 4.6; Hamza & Suggars, 1999; Saa, Sebastián, Olivos- Del Río, Andrés, Castro, Sebastián, 2015, p. 1)

Independientemente de la variabilidad en las respuestas de los cultivos a estos productos, el mercado global de los bioestimulantes está en constante crecimiento, de hecho se espera que para el 2018 este mercado recaude aproximadamente \$2.241 millones de dólares y presente un crecimiento anual del 12.5% entre el 2013 y 2018. Europa es el principal consumidor de estos productos desde 2012, según el Consejo Europeo de Bioestimulantes (EBIC) en este continente se vendió \$6.2 millones de dólares en ese año (EBIC, 2015).

2.1.2. Tipos de bioestimulantes

Como ya se mencionó anteriormente los bioestimulantes están compuestos por una mezcla de sustancias, la mayoría de éstas afectan al crecimiento radicular y a la toma de nutrientes (du Jardin, 2012b; Halpern et al., 2015). Entre las sustancias más usadas están:

- Ácidos húmicos
- Ácido fúlvico
- Sales inorgánicas
- Proteínas hidrolizadas y aminoácidos
- Extractos de algas
- Hormonas vegetales
- Microorganismos

Esta clasificación de bioestimulantes puede ser variable dependiendo del autor, todos estos compuestos tienen algunas respuestas semejantes en las plantas ya que todos estos bioestimulantes de alguna manera promueven el crecimiento y/o activan respuestas contra estrés, lo que se puede evidenciar en la fisiología, en la regulación genética y en el proteoma de la planta (Saa, Sebastián, Olivos- Del Río, Andrés, Castro, Sebastián & Saa, 2015). El grado de beneficio de los bioestimulantes es proporcional al nivel de nutrientes que la planta puede obtener del suelo, también la presión a la que está expuesta y a la presencia de algún estrés abiótico o biótico (du Jardin, 2012a; Gallant, 2004, p.1).

En las últimas décadas, se han desarrollado un nuevo tipo de bioestimulantes conocidos como oligosacarinas, las cuales son extraídas principalmente de la pared celular de plantas y microorganismos. Se ha reportado que estos productos actúan como moléculas señalizadoras en la activación de respuestas de defensas, de crecimiento y desarrollo de la planta (Halpern et al., 2015; Saa, Sebastian, Olivos- Del Rio, Andres, Castro, Sebastian, 2015; Varki, 1993).

2.1.2.1. Oligosacarinas derivadas de la pared celular de hongos

El quitosano es una oligosacarina derivada de la quitina, la cual es un polímero importante en la estructura de la pared celular de los hongos. El quitosano está conformado por un grupo de hetero-polisacáridos unidos, no tóxicos, biodegradables, biocompatibles e hidrofóbicos (Cabrera et al., 2012, p. 199; Enríquez-Guevara & E. Aispuro-Hernández, I. Vargas-Arispuro, 2010). Este derivado de la quitina es usado como un componente de muchos bioestimulantes comerciales, ya que regulan el crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos; además tiene un efecto directo como antimicrobiano, deteniendo el crecimiento de ciertos hongos y bacterias (Cabrera et al., 2012, p. 202; du Jardin, 2012b).

El quitosano genera dos respuestas diferentes cuando es aplicado en los cultivos (Enríquez-Guevara & E. Aispuro-Hernández, I. Vargas-Arispuro, 2010):

1. Puede generar resistencia en la planta contra patógenos
2. Puede inhibir el crecimiento y colonización de patógenos en las estructuras vegetales, evitando una posible infección.

2.1.2.2. Oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas

Las oligosacarinas provenientes de células vegetales se derivan de múltiples compuestos entre los que se encuentran pectinas y xiloglucanos (Saa, Olivos-Del Rio, Castro, 2015, p.2).

Se ha reportado que los derivados de pectina exhiben efectos biológicos en plantas, estimulando las respuestas de defensa y regulando el crecimiento y desarrollo de la planta y además son fáciles de usar en la agricultura debido a su forma de aplicación (Cabrera et al., 2012, p. 205; Enríquez-Guevara & E. Aispuro-Hernández, I. Vargas-Arispuro, 2010).

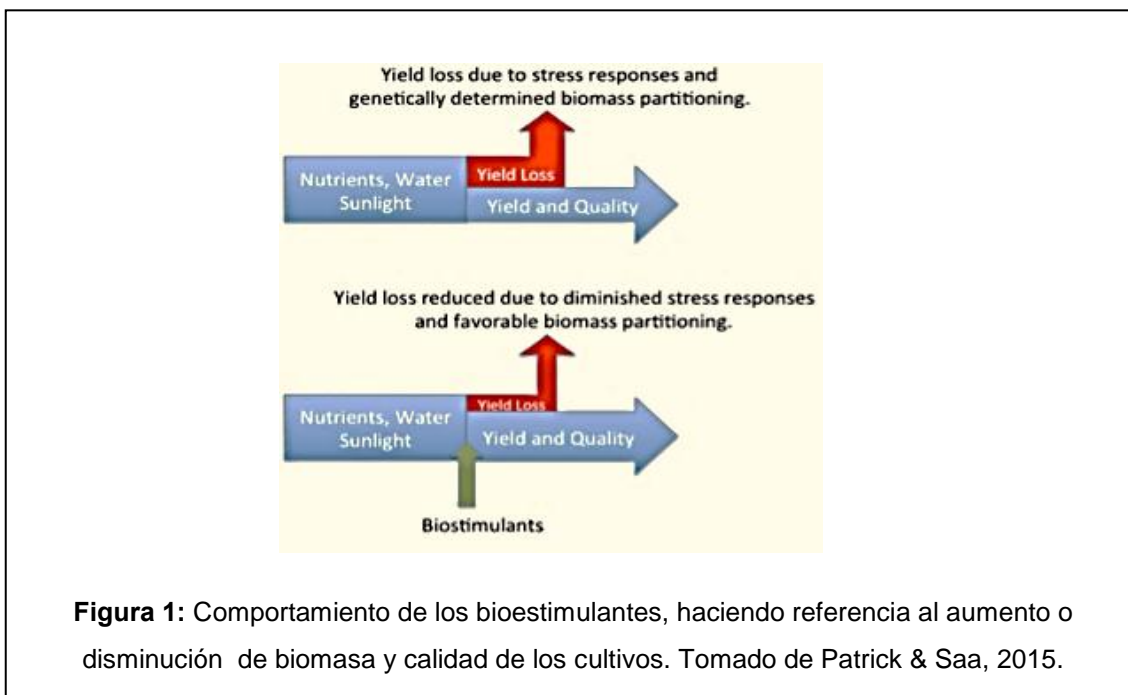
Los xiloglucanos son las moléculas de hemicelulosa más abundantes en las células vegetales, encargadas de la inmovilización de las microfibras de la pared celular. Este compuesto está dentro del grupo de las oligosacarinas, las cuales estimulan en crecimiento longitudinal de las células, modificando las propiedades de sus membranas (Cabrera et al., 2012, p.198; Calvo, Nelson, & Kloepper, 2014, p.15).

2.1.3. Funcionamiento de los bioestimulantes

El modo de acción de la mayoría de los bioestimulantes es poco o nada comprendido. Según los últimos reportes, el funcionamiento de algunos bioestimulantes se debe por:

- Una composición hormonal
- Presencia de moléculas señalizadoras
- Presencia de moléculas que facilitan el transporte y la eficiencia de la toma de nutrientes (Calvo et al., 2014, p. 20; Saa, Sebastian, Olivos-Del Rio, Andres, Castro, Sebastian, 2015)

Se ha reportado que el aumento o disminución de biomasa en las plantas cuando éstas se enfrentan a algún tipo de estrés está relacionado con la aplicación de bioestimulantes sobre las mismas. Este comportamiento puede deberse a la activación o bloqueo de algunas cascadas de señalización a nivel celular o a que estos compuestos puedan actuar sobre el comportamiento endofítico de los patógenos en las plantas, haciéndolos más susceptibles (Figura 1). En este último caso, el beneficio de los bioestimulantes en las plantas se derivaría en la disminución de producción de metabolitos secundarios para desviarlos hacia el metabolismo de defensa para dar una respuesta rápida al estrés (Saa, Sebastian, Olivos- Del Rio, Andres, Castro, Sebastian, 2015).



2.1.4. Importancia Económica

Como se mencionó anteriormente, en las últimas décadas en el continente europeo se ha remplazado el uso de agroquímicos por productos más amigables con el medio ambiente como es el caso de los bioestimulantes. Durante el 2012, estos productos fueron usados en aproximadamente 6.2 millones de hectáreas y se espera que para el 2018 el mercado global de los

bioestimulantes recaude \$ 2.24 millones de dólares y tenga una tasa de crecimiento anual del 12.5% en un periodo de 5 años empezando desde el 2013, siendo Europa su mejor mercado. El uso de bioestimulantes en la agricultura espera aumentar un 14.5% desde el 2014 en Estados Unidos, España e Italia mientras que en América Latina se espera un aumento de 15.6% entre el 2014 y 2019 (Wood, 2015).

En el reporte del período 2014- 2015 en Norte América se dio a conocer que la industria de los bioestimulantes creció más de lo esperado, siendo Estados Unidos el principal consumidor de estos productos, seguido por Canadá y México (Newswire, 2015).

En 2012 la Comisión Europea puso en conocimiento público, los siguientes puntos los cuales se proyectaron cumplir hasta el 2020 y estos hacen referencia principalmente a la investigación de bioproductos y su implementación en el campo de la agricultura sustentable (EBIC, 2015):

- Implementar un crecimiento inteligente desarrollado por una economía basada en el conocimiento e innovación teniendo como pilar fundamental la investigación de nuevas formulaciones de bioestimulantes.
- Implementar un crecimiento sustentable que promueva el uso de productos eficientes y limpios como son los bioestimulantes.
- Incrementar el crecimiento inclusivo mediante la implementación de compañías productoras de bioproductos.

2.2. Estrés salino en plantas y sus consecuencias

La salinidad en los suelos es uno de los factores limitantes más importantes para el desarrollo de las plantas, mientras el suelo sea más salino la productividad y el rendimiento del suelo serán menores. Como consecuencia de los cambios climáticos las zonas áridas y semiáridas a nivel mundial se han visto en aumento cada año, de hecho el último reporte del año 2011 muestra que más del 40% del área terrestre presenta problemas de salinidad (Parihar,

Singh, & Singh, 2014; Qados, 2011, p.8 ; Yokoi, Bressan, & Hasegawa, 2002, p. 26).

La salinidad tiene dos causas principalmente:

1. Salinidad primaria o natural, es causada por la acumulación de sal por un largo período de tiempo en un proceso natural.
2. Salinidad secundaria o inducida, se da como resultado de las actividades humanas principalmente la agricultura siendo India, China y Estados Unidos los países más afectados.

Según la FAO (Food and Agriculture Organization) más del 6% de los suelos del mundo están afectados por la salinidad, esto equivale alrededor de 45 millones de hectáreas distribuidas en más de 75 países, entre los que se encuentran Australia, India, Estados Unidos y España (Parihar et al., 2014). Los cultivos de mayor importancia a nivel mundial son: trigo, arroz, caña de azúcar y algodón, por lo tanto son los más afectados. Se ha registrado una pérdida de más del 40% del total de los cultivos sembrados debido a salinidad, generando una pérdida económica de \$12 billones de dólares en 1990, \$14.6 billones de dólares en 2002 y \$27.3 billones de dólares en 2013 (Figura 2) (Qadir et al., 2015).

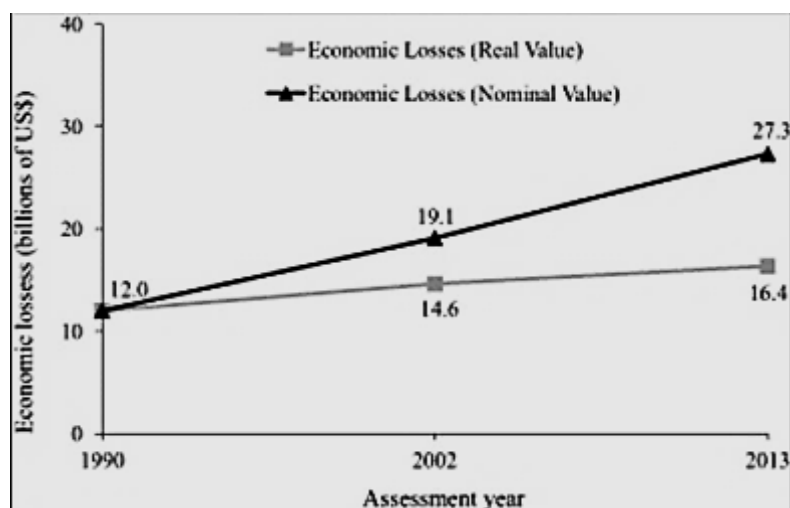


Figura 2: Pérdidas económicas obtenidas por la reducción de productividad en los cultivos causadas por la acumulación de sales en el suelo. Tomado de Qadir et al., 2015

El estrés salino es uno de los factores limitantes en el crecimiento y producción agrícola, afectando principalmente la fisiología y factores bioquímicos, como el incremento de iones tóxicos lo que provoca estrés oxidativo en las células de las plantas (Jouyban, 2012, p. 2).

Durante el estrés, las plantas deben mantener un potencial ósmico para ser capaces de captar agua y nutrientes del suelo. Por causa del exceso de sales en el citoplasma y vacuolas el balance iónico de las células se rompe lo que a largo plazo afectará de manera grave a las células vegetales (Parvaiz & Satyawati, 2008).

La morfología de la planta cambia en presencia de salinidad en el suelo, limitando procesos fisiológicos como:

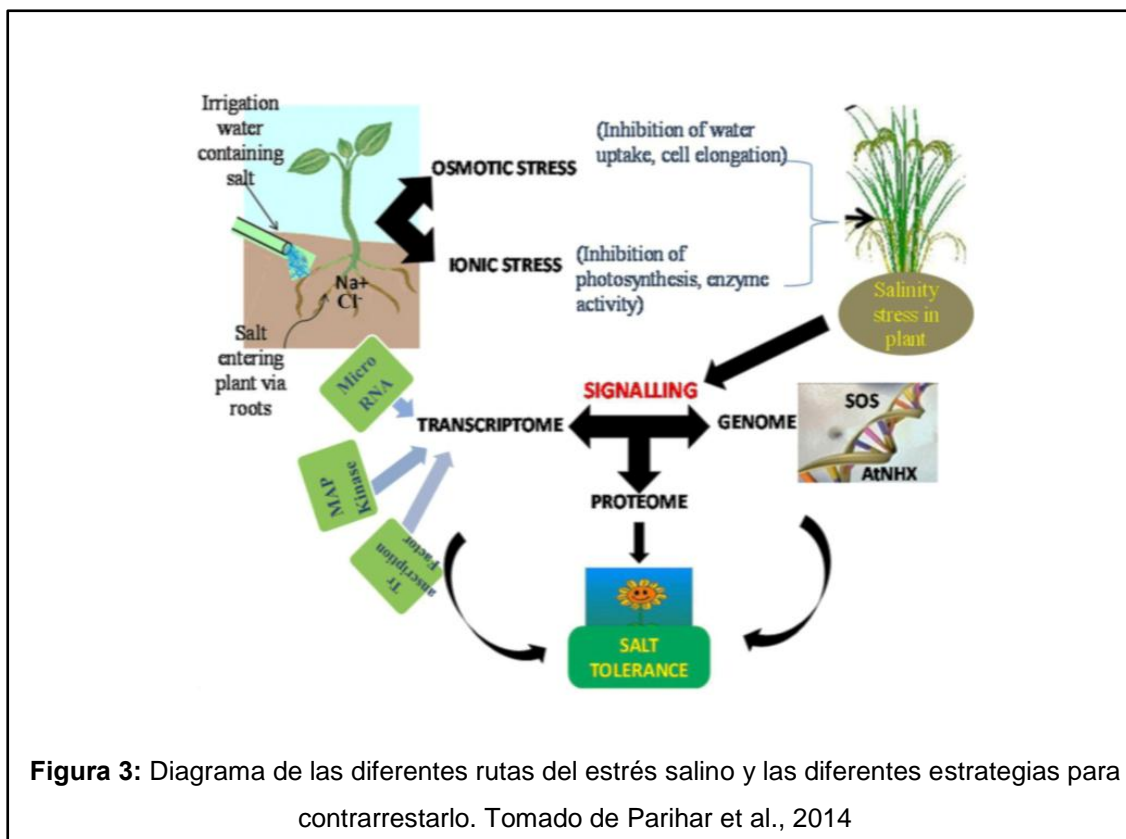
- Fotosíntesis
- Captación de nutrientes
- Germinación
- Crecimiento longitudinal
- Desarrollo de pigmentos fotosintéticos
- Captación de agua y nutrientes (Ahmad, Hakeem, Kumar, Ashraf, & Akram, 2012, p. 2696)

El estrés salino a su vez va a generar dos tipos de estrés a nivel celular:

1. El estrés osmótico que impide la toma de nutrientes.
2. El estrés iónico que inhibe la actividad enzimática y altera el proceso fotosintético.

Existen varias maneras de contrarrestar este estrés; una de ellas es la regulación del potencial ósmico por medio de la acumulación de solutos en el citoplasma como carbohidratos, proteínas, aminoácidos y amidas (Parvaiz & Satyawati, 2008). Otra manera de contrarrestar este fenómeno es la generación de una tolerancia al mismo, mediante varias vías de señalización, que le permiten a la planta sobrevivir en un ambiente hostil (Figura 3). Otra

manera de ayudar a la planta a tolerar de una mejor manera la sal en el suelo es mediante sustancias que interactúen en estas rutas y le permitan a la planta sobrevivir en este medio como es el caso de los bioestimulantes (Munns, 2002; Yokoi et al., 2002, p.27; J. K. Zhu, 2001).



2.3. Estrés Oxidativo

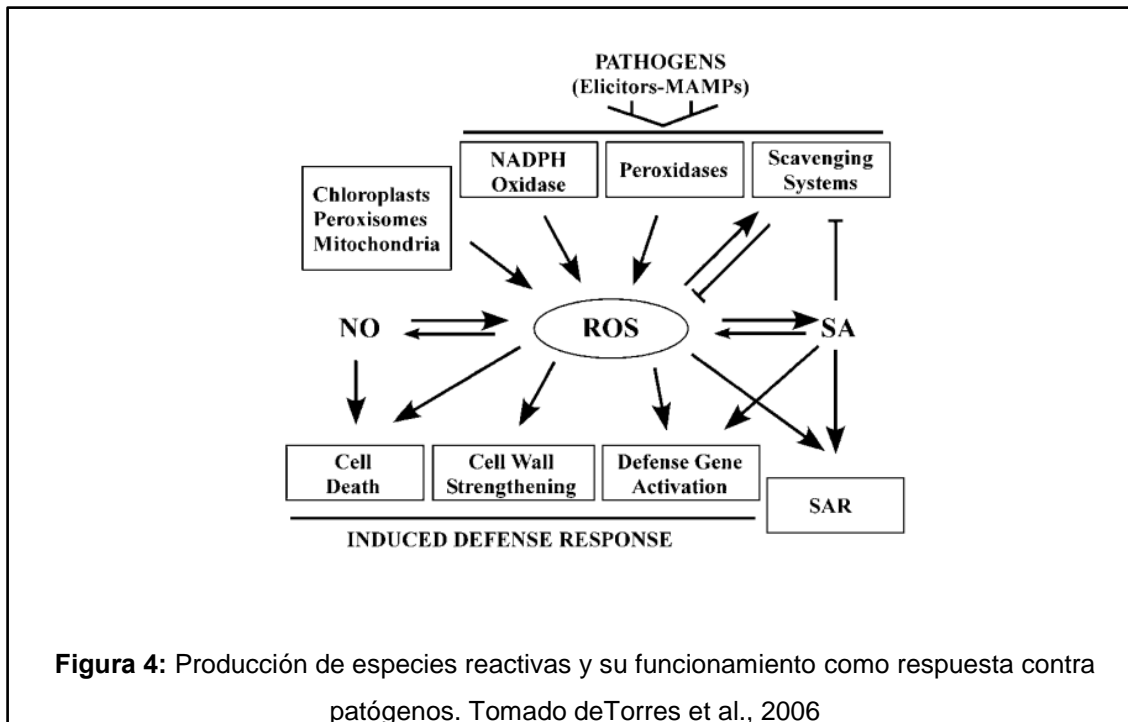
2.3.1. Especies Reactivas del Oxígeno

El oxígeno molecular al ser usado en las células para generar energía va a formar moléculas reactivas como es el caso del ion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el hidroxilo radical ($\cdot OH$), el peróxido de hidrógeno, los oxiradicales, entre otros. Todas estas moléculas se las conoce como especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales regulan varios procesos celulares tanto en células vegetales como animales. Aunque estos compuestos tengan un propósito fisiológico en las células, las altas concentraciones de estas moléculas pueden resultar

nocivas para el organismo (Macedo-Márquez, 2012). La fuente intracelular más importante de estos radicales oxigenados es la cadena de transporte de electrones ubicada en la mitocondria. Este proceso le permite a la célula generar energía pero a su vez produce una gran cantidad de ROS (Devlin, 2006).

Los daños producidos por estos compuestos se da principalmente en macromoléculas como los fosfolípidos presentes en la membrana, los que sufren una peroxidación, que consiste en la captura de electrones por parte de los radicales libres de los lípidos poliinsaturados; los ácidos nucleicos pueden sufrir de alteraciones como: mutaciones, deleciones, inserciones, además puede afectar las rutas de traducción o alterar los niveles de expresión de genes. Las proteínas sufren otro tipo de alteraciones como modificaciones en la estructura de los aminoácidos, causando una alteración de la estructura y mal funcionamiento de las mismas (Cabicol, Tamarit, & Ros, 2000; Uwalsky, 2006; Wiseman & Halliwell, 1996).

Los ROS son importantes en la señalización para activar vías de defensa como la producción de moléculas tales como el ácido salicílico (SA) o el óxido nítrico (NO) que son indicadores que originan diferentes respuestas contra el estrés oxidativo como la apoptosis, regulación de genes y fortalecimiento de la pared celular. Todas estas respuestas dependen de la concentración de ROS y pueden generar una resistencia sistémica (systemic acquired resistance SAR) o generar la muerte de la planta. Por otro lado en las paredes celulares, los ROS pueden ocasionar el fortalecimiento de estas mediante el entrecruzamiento de glicoproteínas, causando daños severos por rigidez en la membrana (Figura 4) (Torres, Jones, & Dangl, 2006).



La producción de altas concentraciones de ROS induce procesos de respuesta hipersensitiva en diversas plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas como el arroz, el tabaco, la soya y los abetos, la cual sirve para contrarrestar las infecciones de patógenos. Este aumento de especies reactivas se conoce como estallido oxidativo y consiste en acrecentar la producción de ion superóxido y peróxido de hidrógeno con la intención de dañar al patógeno atacante. Aunque esta respuesta es muy efectiva, las células que liberan esta gran cantidad de ROS también se ven afectadas (Gutiérrez, 2006).

Si bien en exceso las especies reactivas del oxígeno pueden causar graves daños, su presencia es necesaria y por este motivo los seres vivos han desarrollado sistemas antioxidantes con el fin de mantener los ROS bajo control (Ajay, R.K, & G.C, 2002, p. 1229; Bartosz, 1997; Inze & Montagu, 1995).

2.3.2. Sistemas antioxidantes

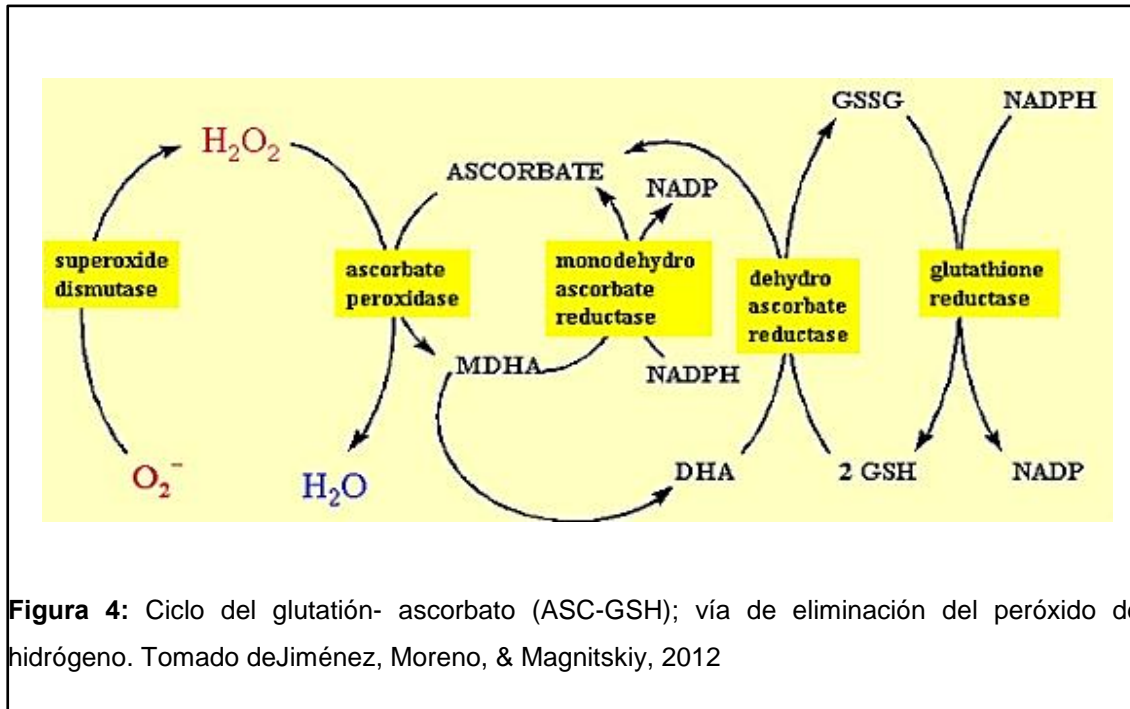
Existen dos mecanismos de respuesta contra el estrés oxidativo los cual son:

- Mecanismos de prevención
- Mecanismos de reparación

En el mecanismo de prevención la planta induce la activación de enzimas especializadas como la catalasa, la peroxidasa, la glutatión reductasa y la superóxido dismutasa (SOD) o producen sustancias de bajo peso molecular como es el caso del ascorbato, glutatión y compuestos fenólicos, con la finalidad de regular la concentración de especies reactivas. Enzimas como la ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa de Mn aumentan su concentración en las células, si éstas sufren estrés salino (Blokhina, Virolainen, & Fagerstedt, 2003; Parvaiz & Satyawati, 2008).

El ascorbato se encuentra en altas concentraciones en cloroplastos, citoplasma, vacuolas y en el espacio extracelular, éste es considerado uno de los antioxidantes más importantes en las plantas porque permite la eliminación de peróxido de hidrógeno, por medio de la producción de monodehidroascorbato que rápidamente se reduce a ascorbato nuevamente, lo que se conoce como el ciclo del ascorbato (Figura 4). Se ha reportado que este ciclo está presente en cloroplastos y en el citosol, aunque nuevos estudios han comprobado que también está presente en mitocondrias (Ajay et al., 2002, p. 1231).

Otro compuesto antioxidante es el glutatión que es la sustancia de menor peso y más abundante en la mayoría de las células. Esta molécula actúa como un reductor disulfuro con el fin de proteger los grupos tiol de las enzimas, para regenerar ascorbato y reaccionar con radicales hidroxilos. Otros compuestos antioxidantes son el alfa-tocoferol y los carotenoides, ya que estos pueden disminuir la oxidación en proteínas y lípidos. Al igual que el ascorbato el alfa-tocoferol tiene pocos electrones para donar lo que lo vuelve una sustancia antioxidante muy efectiva (Ajay et al., 2002, p. 1233).



La formación excesiva de ROS durante condiciones de estrés daña de manera irreparable a la célula. La generación de $O_2^{\bullet -}$ es controlada mediante una reacción catalizada por SOD generando peróxido de hidrógeno que a su vez es eliminado por la enzima catalasa que mediante una reacción química produce agua y oxígeno. Todas estas reacciones ocurren 10.000 veces más rápido que de forma espontánea en las plantas (Blokhina et al., 2003). Esta defensa no solo se da por las enzimas sino también por la regulación del flujo de electrones en la fotosíntesis (Hernández, Olmos, Corpas, Sevilla, & del Río, 1995).

En situaciones de crecimiento desfavorables, los niveles de antioxidantes aumentan dependiendo del estrés y las condiciones atmosféricas, no obstante los antioxidantes no siempre van a poder llegar al sitio requerido o simplemente no van a estar en las concentraciones necesarias, causando un deterioro en las células que puede llegar a ser notorio en la fisiología de las plantas. El aumento de las concentraciones de antioxidantes en las plantas podría incrementar la tolerancia a cualquier estrés al que sea sometida la planta (Ajay et al., 2002, p. 1235; Inze & Montagu, 1995).

3. METODOLOGÍA:

Obtención del material vegetal y oligosacarinas

En este proyecto de investigación se utilizaron semillas botánicas de *Nicotina tabacum* Lynch.

La mezcla de oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas se obtuvo gracias al trabajo del Dr. Juan Carlos Cabrera Pino de la Unité de Biotechnologie en Bélgica, quien gentilmente donó los productos. El Dr. Juan Carlos Cabrera es responsable de la purificación y caracterización de las oligosacarinas usadas en este trabajo, por lo cual la divulgación de las composiciones químicas o de la formación de esta mezcla está restringida hasta que no se patenten.

3.1.1. Determinación de la concentración de cloruro de sodio a utilizarse

Las semillas de *Nicotiana tabacum* fueron desinfectadas bajo condiciones de esterilidad en una cabina de flujo horizontal (Opti.MAIR). Éstas se colocaron en un tubo de 1,5 mL, al cual se le agregó 1 mL de una solución de hipoclorito de sodio y agua destilada (1:10). La mezcla fue agitada vigorosamente con el uso de un vórtex (Corning/LSE) hasta que se eliminen los agregados, luego de lo cual se las dejó reposar por un período de 5 minutos. Pasado este tiempo la solución fue retirada y se adicionó 1 mL de una solución de etanol, agua destilada e hipoclorito de sodio (7:2:1) y se repitió el proceso anterior. Por último se realizaron tres lavados con 1 mL de agua estéril durante un período de 5 minutos cada lavado.

Las semillas de *Nicotiana tabacum* desinfectadas se sembraron en medios con distintas concentraciones de cloruro de sodio (0, 100, 150, 200 mM) para determinar la concentración óptima para la realización de los experimentos. Se las dejó crecer en estanterías con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura entre 24°C y 27°C durante dos meses. Al terminar este periodo se midió la longitud total, radicular, el peso fresco, el

número de hojas y se las guardó en nitrógeno líquido en un congelador VWR modelo 5708 a -80°C .

3.1.2. Comparación de las diferencias de crecimiento de plantas de *Nicotiana tabacum* tratadas con oligosacarinas mediante la medición de sus raíces, hojas y peso fresco

Las semillas desinfectadas fueron sembradas en medio sólido Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962), con o sin oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas y sometidas o no a estrés salino. Los tratamientos realizados se describen en la siguiente tabla:

Tabla 1: Nomenclatura de los distintos tratamientos usados en el estudio.

Tratamiento	Contenido
MS o control negativo	Medio MS (Murashige y Skoog)
MS+NaCl	Medio MS + 100 mM de cloruro de sodio
MS+OP	Medio MS +1 mg.L^{-1} de oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas
MS+NaCl+OP	Medio MS + 100mM de cloruro de sodio + 1 mg.L^{-1} de oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas

Se preparó 1,2 L de medio base con 5,16 g de medio MS+ 36 g de sacarosa con un pH entre 5,7 y 5,8. A este medio se lo separó en cinco matraces con 240 mL cada uno para adicionar 240 μL del bioestimulante de un stock de 1mg.L^{-1} . Posteriormente se separaron los 240 mL en dos matraces con 120 mL cada uno y se adicionó 100 mg de cloruro de sodio. Los matraces fueron debidamente etiquetados y sellados para su posterior esterilización a 120°C en

un autoclave de marca Tuttnauer modelo 3870E por 5 minutos y se dispensaron 30 mL del medio en 4 magentas estériles de 6 cm x 6 cm x 10 cm de ancho, largo y alto, respectivamente por cada tratamiento. Una vez solidificado el medio se procedió a sembrar 9 semillas de *Nicotiana tabacum* desinfectadas en cada una de las magentas, las cuales se sellaron con cinta Parafilm y se colocaron en estanterías con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad con un rango de temperatura entre 24°C - 27°C.

El proceso de germinación y crecimiento de las plantas de tabaco duró 2 meses, en los cuales se monitorearon constantemente el porcentaje de germinación, el número de hojas y se tomaron fotografías de las plantas cada 15 días.

Al cabo de los 2 meses se sacaron todas las plantas de cada magenta y se evaluaron las siguientes variables para cada unidad vegetal: longitud total, longitud de la raíz, longitud del tallo y peso fresco, esta metodología fue modificada de Qados, 2011. Posteriormente, a cada planta se le retiraron 3 hojas, siendo éstas las primeras después de las hojas cotiledonares para realizar las mediciones del área foliar. Finalmente, las plantas se congelaron en nitrógeno líquido separándolas por tratamiento y se guardaron en un congelador VWR modelo 5708 a -80 °C.

Las imágenes de las hojas fueron adquiridas mediante el uso de un estereomicroscopio (Olympus, Modelo SZ2-ILTS) y la cámara Infinity Analyze. El área fue determinada mediante el programa Infinity Analyze 3.

3.1.3. Análisis estadístico de las diferencias de crecimiento de plantas de *Nicotiana tabacum* en los distintos tratamientos

El procesamiento de datos se lo realizó con el uso del programa STATISTICA (Stat Soft Inc, 2007). Se calculó la media de las distintas variables de cada magenta y se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, el cual se emplea para determinar si los diferentes tratamientos muestran diferencias significativas o por el contrario que no tengan diferencia mediante la verificación de la normalidad y la homogeneidad de varianzas. En vista de que

estas condiciones no se cumplieron, se aplicó un ANOVA de clasificación simple no paramétrico, conocido como prueba de Kruskal Wallis. Esta prueba cumple la misma función que el ANOVA pero sin asumir normalidad. Por otro lado, en las variables donde se detectaron diferencia se usó la prueba de comparación múltiple de medias de Dunn para determinar si existían diferencias entre los tratamientos. La variable número de hojas fue la única que presentó normalidad por lo que ésta fue procesada mediante el ANOVA de clasificación simple y prueba de Tukey Kramer.

3.1.4. Extracción de proteínas a partir de muestras de plantas de *Nicotiana tabacum* tratadas con oligosacarinas y expuestas a estrés salino y análisis mediante espectrofotometría

La extracción de proteínas se realizó en muestras de hojas de cada tratamiento para lo cual se tomó un peso entre 70 mg a 80 mg de material vegetal. Las muestras se procesaron usando un pistilo y con la adición de 150 μ L de buffer fosfato (PBS) pH 7,7 con inhibidor de proteasas a una concentración de 4x. Las muestras procesadas se centrifugaron a 14.000 rpm a 4 °C por 30 min y finalmente se recuperó el sobrenadante y se prosiguió a realizar la cuantificación de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas se hizo mediante el método del ácido bicínico (BCA) para lo cual se utilizó el kit QuantiPro BCA Assay (Sigma) que requiere realizar una curva de calibración usando albúmina de suero bovino a diferentes concentraciones.

Las muestras obtenidas fueron diluidas en un factor 1:10 y se mezclaron 5 μ L de la dilución, previamente realizada, con 200 μ L del reactivo de detección en una placa de 96 pocillos marca STERILIN, la cual se incubó por 30 minutos a 37°C y posteriormente se midió la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 562 nm en el equipo FLUOstar Omega (BMG Labtech). Este experimento se realizó por triplicado para su validación.

3.1.5. Comparación de la presencia relativa de grupos carbonilos en el material soluble de plantas de *Nicotiana tabacum* tratadas con oligosacarinas y expuestas a estrés salino mediante medidas espectrofotométricas

A partir de los extractos crudos de cada tratamiento se realizó un ensayo gravimétrico para determinar el contenido de sólidos solubles presentes en cada muestra para el cual se utilizaron recipientes de papel aluminio previamente secados por 24 horas a 60°C, las cuales se pesaron por triplicado hasta obtener un peso constante. En estos recipientes se colocaron 20 µL del extracto de plantas obtenido, como se describió anteriormente. Repitiendo el proceso de secado mencionado se obtuvo el valor de peso seco de las muestras. Mediante una relación se calculó el peso de muestra por unidad de volumen de la solución. Con esta información se determinó el volumen exacto en el cual se encontraban presentes 2 mg de sólidos solubles, los mismos que son necesarios para realizar la detección de grupos carbonilo en las muestras.

Para la determinación de la abundancia de grupos carbonilos en el material soluble se adaptó el protocolo de Luo & Wehr, 2009. Se colocaron 2 mg del extracto total soluble en tubos de ensayo de 5 mL a los cuales se les adicionó 2 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) preparada en ácido clorhídrico (HCl) 2N, al mismo tiempo el blanco se preparó con 2 mg de muestra y 2 mL HCl (2N), estas soluciones se las dejó reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las reacciones fueron detenidas luego de este tiempo con la adición de 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v), luego de lo cual la mezcla fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente y centrifugada a 5.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El precipitado fue separado, eliminando el sobrenadante, y se lavó por tres ocasiones usando 1 mL de una mezcla etanol/acetato de etilo (1:1) y centrifugando a las mismas condiciones descritas anteriormente. Por último, el pellet del lavado fue disuelto en 1 mL de hidróxido de sodio (Na (OH)) 2 N.

La formación de la hidrazona entre la 2,4-dinitrofenilhidrazina y los residuos de carbonilos presentes en las muestras se determinó en la solución del pellet disuelto mediante espectrofotometría en el equipo FLUOstar Omega (BMG Labtech) a una longitud de onda de 365 nm. Los resultados reportados se obtuvieron a partir de la diferencia entre la absorbancia de la muestra y la absorbancia de su respectivo blanco.

Para convertir los valores de absorbancia obtenidos anteriormente se realizó una curva de calibración utilizando formaldehído (C₇H₆N₄O₄) para sintetizar hidrazona. Se pesó 5 mg de la hidrazona sintetizada y se la disolvió en 1 mL de etanol absoluto mediante el uso del vórtex (Corning/LSE), formando una solución de concentración 5 mg.mL⁻¹. Al mismo tiempo se preparó el blanco con 100 mL de etanol absoluto. En una placa de 96 pocillos marca STERILIN se colocó 200 µL de la mezcla y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución 2 hasta completar 24 diluciones. Esta última llegó a una concentración de 1,5x10⁻⁴ mg.mL⁻¹. Se midió la absorbancia de las diluciones y sus respectivos blancos a una longitud de onda de 365 nm. Este proceso se lo realizó por triplicado para validarlo estadísticamente. A partir de las absorbancias obtenidas se realizó un cálculo matemático para transformarlas en concentraciones (nmol de hidrazona / g de muestra).

3.1.6. Evaluación espectrofotométrica de las diferencias de oxidación de lípidos de plantas de *Nicotiana tabacum* tratadas con oligosacarinas y expuestas a estrés salino

Este procedimiento fue adaptado del protocolo de Du & Bramlage, 1992. La extracción de lípidos se realizó adicionando 500 µL de acetona a 4°C a 100 mg de hojas de planta de cada tratamiento en tubos de 2 mL. Las muestras fueron homogenizadas con un pistilo en un baño de hielo. Al mismo tiempo se realizó un blanco para cada muestra reemplazando los 500 µL de acetona con 500 µL de agua destilada. Tanto las muestras como sus blancos fueron centrifugados a 14.000 rpm a 4°C, una vez concluido este proceso se extrajo el sobrenadante, el cual fue diluido hasta un volumen de 750 µL con agua destilada. A estas soluciones se les traspasó a tubos de ensayo de 20 mL

sellados donde se le adicionó 750 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v) y 380 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,67% y se las calentó en un baño de H_2O a ebullición (91°C) durante 15 minutos. Los tubos fueron enfriados inmediatamente en agua fría y luego fueron centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C . Al terminar la centrifugación el sobrenadante se extrajo y se lo llevó a un volumen de 3,75 mL con agua destilada.

La formación de malondialdehído (MDA) presente en las muestras se determinó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 532 nm en el espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech). Los resultados se calcularon mediante la diferencia de absorbancias entre las muestras y su blanco. Para transformar los valores de absorbancia en concentración de MDA $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ se utilizó la formula dada por Du & Bramlage, 1992 (Ecuación 1).

$$\text{MDA equivalente } \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \right) = \left[\frac{A_{532} - A_{600}}{157000} \right] 10^6 \quad (\text{Ecuación 1})$$

4. RESULTADOS:

4.1.1. Evaluación morfológica

4.1.1.1. Determinación de la concentración de cloruro de sodio

Al evaluar la concentración de cloruro de sodio en medio MS con semillas de *Nicotiana tabacum*, se observó que en el control negativo las semillas comenzaron a germinar a los 5 días, mientras que las semillas en medio con 100 mM de NaCl germinaron a los 10 días y las semillas expuestas a 150 mM y 200 mM germinaron aproximadamente a los 17 días. En base a estos resultados se decidió utilizar la concentración de 100 mM con el fin de obtener condiciones de estrés sin comprometer la posibilidad de conseguir material suficiente para los análisis (Figura 5).

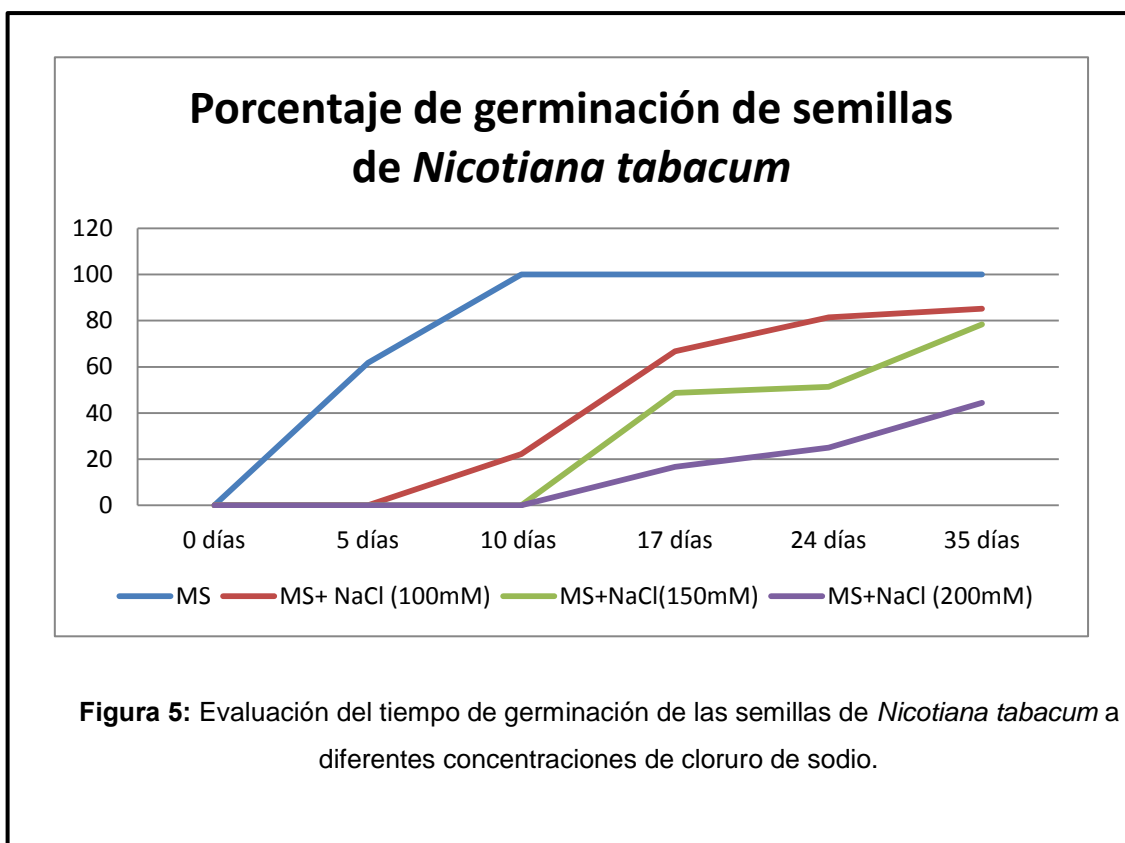
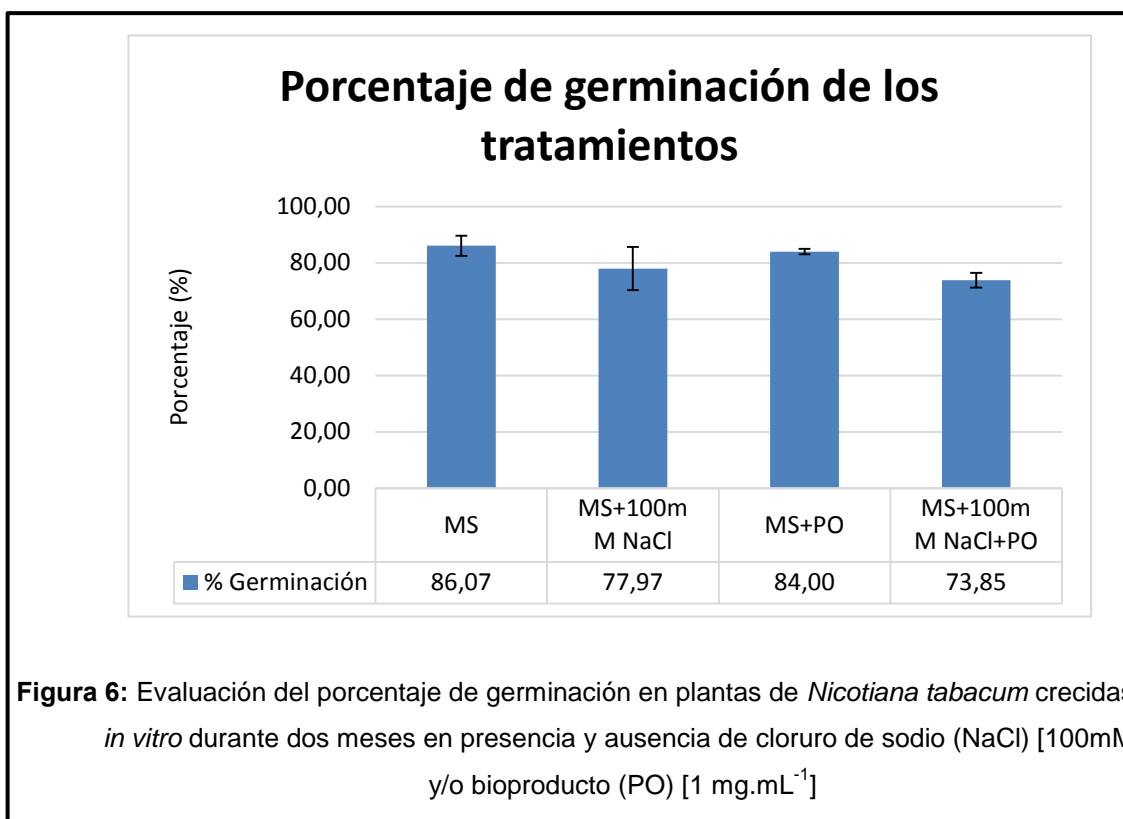


Figura 5: Evaluación del tiempo de germinación de las semillas de *Nicotiana tabacum* a diferentes concentraciones de cloruro de sodio.

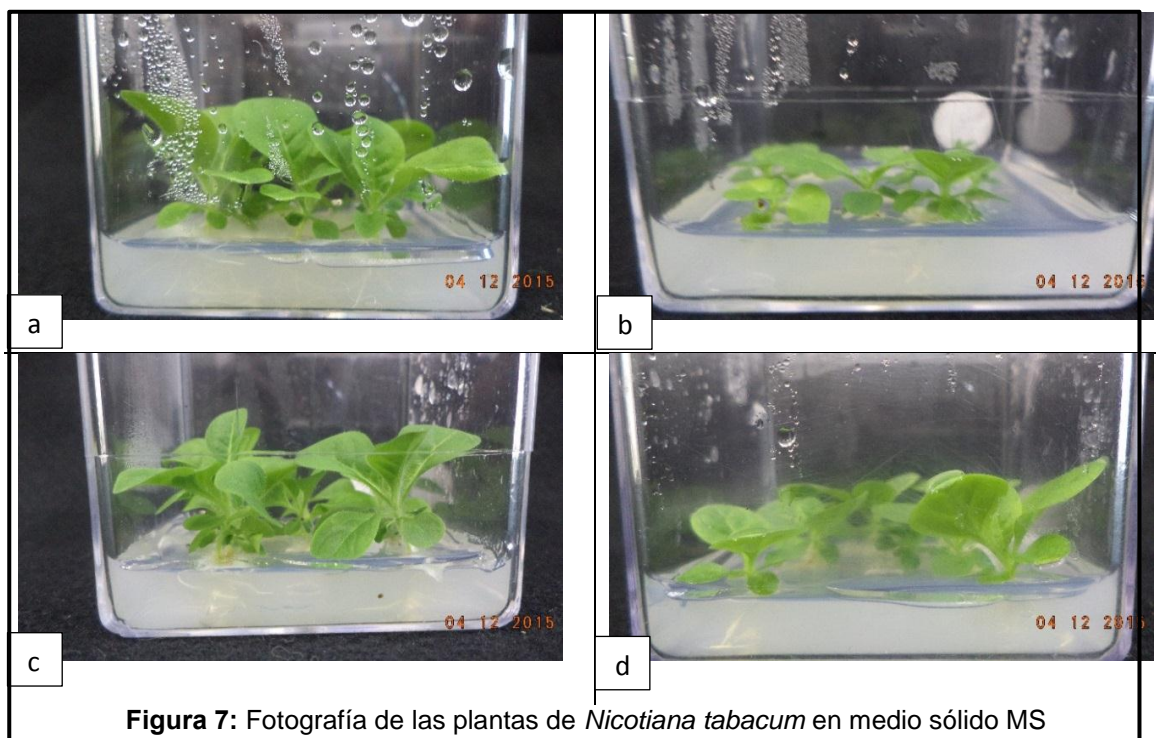
4.1.1.2. Porcentaje de germinación

Al analizar el porcentaje de germinación de semillas de *Nicotiana tabacum* en presencia y ausencia de oligosacarinas y estrés salino se determinó que en todos los casos analizados, la germinación fue mayor al 70% como se muestra en la Figura 6. La mayor eficiencia de germinación se obtuvo en el medio MS (86%) mientras que el valor más bajo fue de 74% para el medio que contenía bioproducto y cloruro de sodio (NaCl). Tanto el control negativo y el tratamiento MS + PO obtuvieron porcentajes de germinación mayores al 80% con una diferencia del 2,07% entre ellos. Al realizar esta misma comparación entre los tratamientos con sal se observó una disminución del 4,12% al añadir la oligosacarina derivada de la pared celular de plantas (PO) (Figura 6). Sin embargo ninguna de las diferencias encontradas fue estadísticamente significativa.



4.1.1.3. Comparación del crecimiento entre plantas de *Nicotiana tabacum*

Las plantas de *Nicotiana tabacum* mostraron diferencias en su crecimiento como se puede observar en las fotografías, las mismas que permiten observar las diferencias que se mantuvieron a lo largo del seguimiento durante los dos meses de cultivo (Figura 7).



Los resultados obtenidos del análisis morfológico de las plantas de *Nicotiana tabacum* en los tratamientos previamente descritos se muestran en la Tabla 2. Las variables evaluadas para este análisis morfológico fueron:

- Peso fresco
- Longitud total

- Longitud del tallo
- Longitud de la raíz
- Número de hojas

Los resultados de este análisis muestran que en la adición la oligosacarina (PO) no generó diferencias significativas para el valor $p < 0.05$, es decir muestra el nivel de significancia de los datos obtenidos con el fin de probar que el bioestimulante influencia en los parámetros medidos. Cabe mencionar que en todas las réplicas se observó una mejor respuesta en el control negativo, pero al observar los tratamientos con cloruro de sodio (NaCl) se observó dos grupos estadísticamente diferentes.

El primero de estos grupos se compuso del control negativo y el medio con bioproducto, a los cuales se les asignó la letra “a” por ser las plantas mejores resultados en las variables analizadas y el segundo grupo se formó por el medio con cloruro de sodio y el medio con bioproducto y cloruro de sodio a los cuales se les asignó la letra “b” por ser las plantas con menores respuesta en las variables medidas.

El área foliar fue la única variable que mostró diferencia significativa entre los tratamientos. El análisis estadístico mostró que para esta variable, se formaron tres grupos estadísticos. El primero lo conformó el control al cual se le asignó la letra “a”, el segundo grupo se formó por los tratamientos con bioestimulantes y el tercero donde se encuentra el medio con cloruro de sodio.

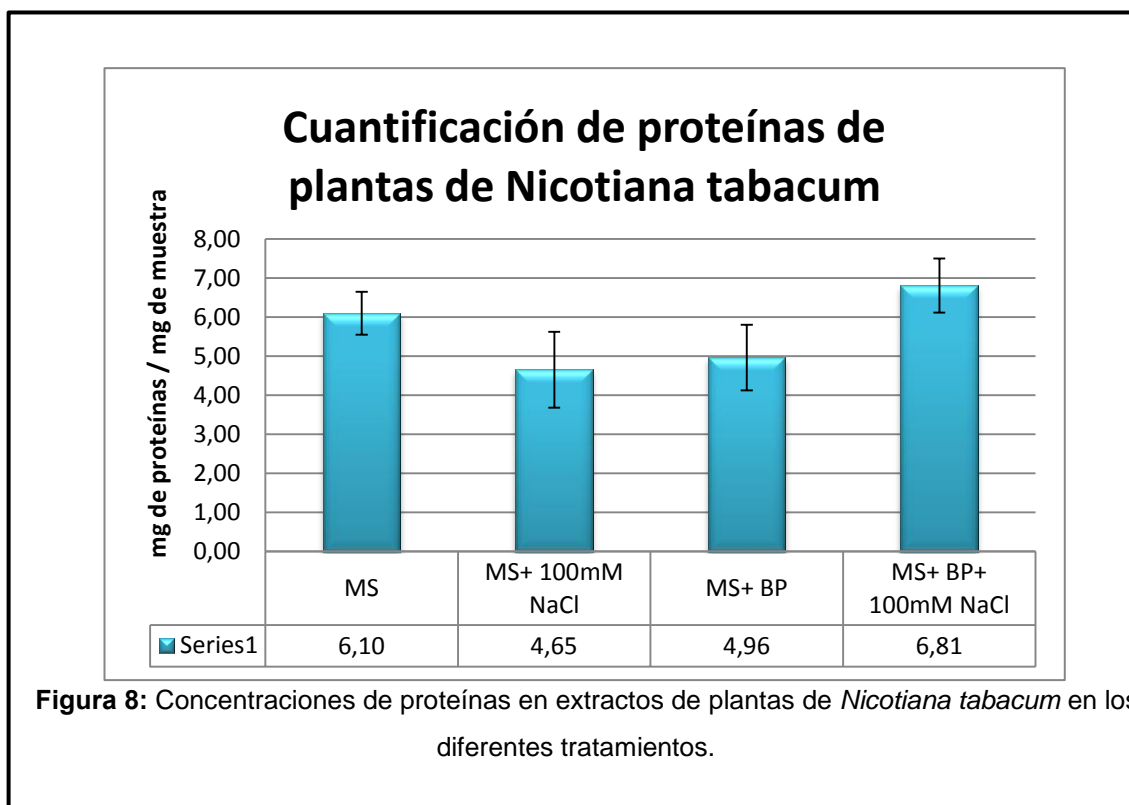
Tabla 2: Valores medios y la desviación estándar de las variables analizadas en la evaluación morfológica de raíces, tallos y hojas de planta de *Nicotiana tabacum* con 1mg.L^{-1} de oligosacarinas y 100 mM de cloruro de sodio. Este análisis se lo realizó mediante la prueba de comparación múltiple de medias de Dunn y la prueba de Tukey y Kramer. Las letras muestran la diferencia entre medias con respecto a

Tratamientos	Peso Fresco (g)	Longitud de Total (cm)	Longitud de Raíz (cm)	Longitud Tallo (cm)	Número de Hojas	Área Foliar cm^2
MS	0,339 $\pm 0,325$ a	6,234 $\pm 3,08$ a	3,758 $\pm 2,583$ a	0,851 $\pm 0,401$ a	7,905 $\pm 0,826$ a	0,235 $\pm 0,090$ a
MS+100mM NaCl	0,148 $\pm 0,100$ b	6,585 $\pm 2,583$ b	4,792 $\pm 2,791$ b	0,538 $\pm 0,156$ b	7,655 $\pm 1,217$ ab	0,135 $\pm 0,025$ b
MS+BP	0,295 ± 299 a	5,784 $\pm 0,837$ a	3,522 $\pm 1,198$ a	0,762 $\pm 0,529$ a	8,262 $\pm 0,911$ a	0,202 $\pm 0,028$ ab
MS+BP+100 mM NaCl	0,151 $\pm 0,159$ b	5,746 $\pm 2,146$ b	4,064 $\pm 2,555$ b	0,436 $\pm 0,093$ b	6,943 $\pm 0,515$ b	0,206 $\pm 0,098$ ab

4.1.2. Extracción y cuantificación de proteínas

La extracción de proteínas se realizó en tres ocasiones para cada muestra. La mayor concentración de proteína se obtuvo en las muestras que contiene bioproducto y cloruro de sodio (6,81 mg de proteína por mg de muestra), si comparamos este tratamiento con el medio control obtenemos que este fue 0,89 veces mayor. Al contrastar el tratamiento con el medio con bioproducto fue 1,31 veces menor que el medio MS, mientras que, la presencia de oligosacarinas ocasionó una disminución en 1,23 veces con respecto al control (Figura 8).

Por otro lado, al relacionar estos datos de concentración con los resultados de peso seco (Anexo 1) se determinó que la concentración de 6,10 mg de proteína/ mg de muestra del medio MS es el 13,4% del total de sólidos solubles, de igual los 4,65 mg de proteína/ mg de muestra equivale al 8,3% en el tratamiento MS+NaCl, manera los 4,96 mg de proteína/ mg de muestra es el 7,9% en el tratamiento MS+BP y los 6,81 mg de proteína/ mg de muestra es el 11,8% del total de sólidos solubles.



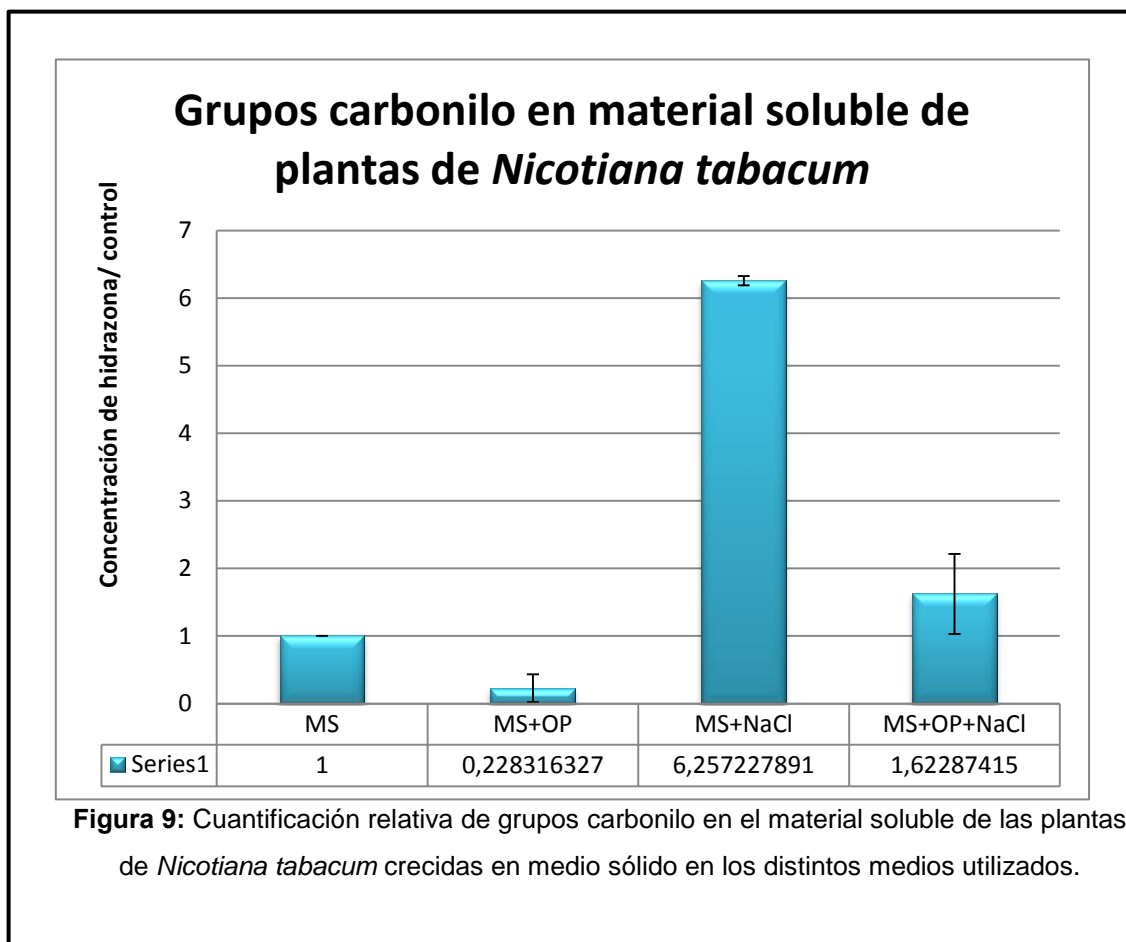
4.1.3. Determinación de grupos carbonilos de plantas de *Nicotiana tabacum*

La estimación de la oxidación relativa de compuestos solubles en los extractos muestra un claro aumento de la presencia de grupos carbonilo en el material soluble obtenido de las hojas de las plantas crecidas en medio salino al compararlas con el medio control.

La adición del bioproducto en ausencia y presencia de cloruro de sodio mostró una disminución de los componentes solubles oxidados, siendo la más evidente en el tratamiento con bioproducto. Por otro lado, al comparar los tratamientos con cloruro de sodio se determinó que bajo condiciones de estrés salino la adición de bioestimulante disminuye la oxidación 3,85 veces.

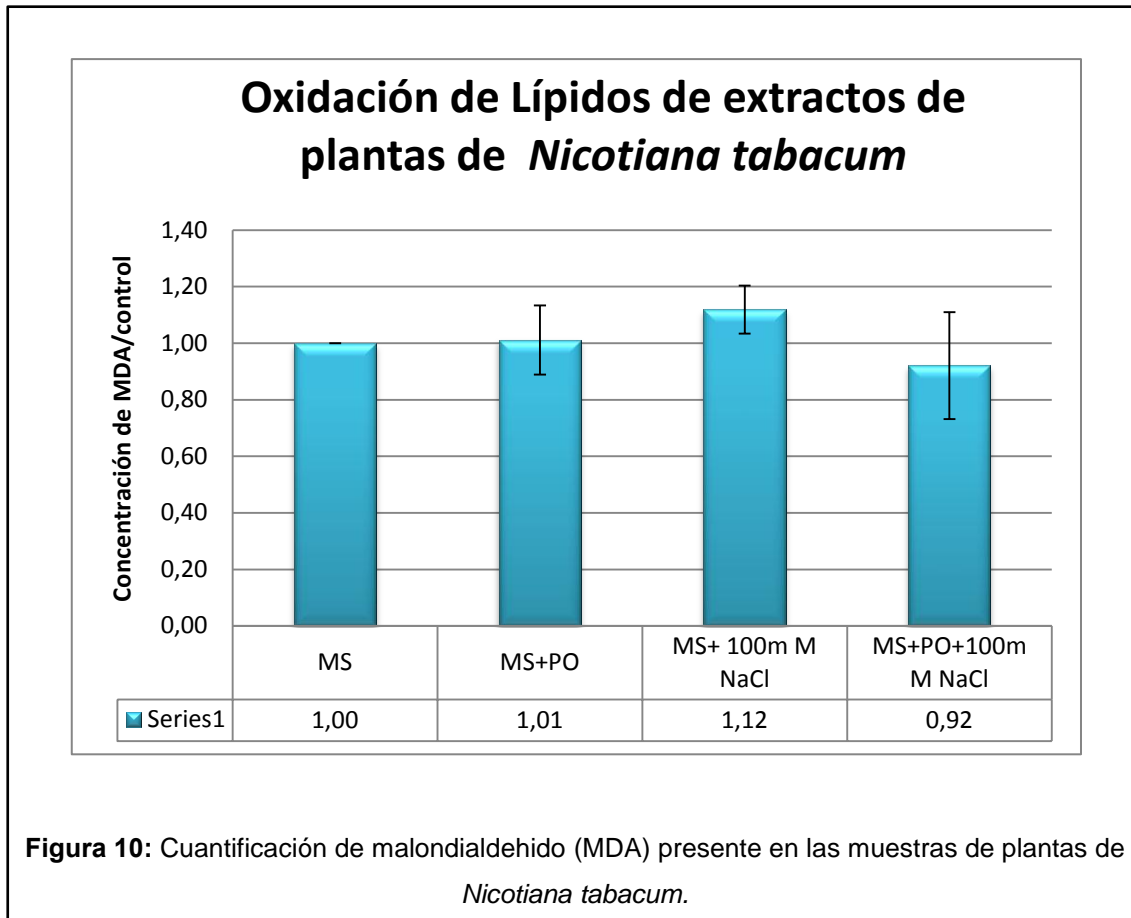
Si la comparación se realiza entre el medio solo con bioestimulante con el medio control se observó una diferencia del 78% atribuida a la adición de la oligosacarina. Finalmente, en la comparación del medio con bioestimulante y sal frente al control se obtuvo un incremento del 62%, mostrando que la oligosacarina disminuye los niveles de oxidación incluso bajo el rango normal (Figura 9).

Los resultados para su mejor manejo se los normalizaron tomando en base el valor obtenido en el control o MS.



4.1.4. Evaluación de oxidación de lípidos en plantas de *Nicotiana tabacum*

Todos los resultados obtenidos son similares entre sí en cuanto a la concentración de malondialdehído (MDA). El mayor resultado fue en el tratamiento con cloruro de sodio, el cual fue 0,89 veces mayor al control. Al adicionar el bioestimulante se observó un cambio mínimo alguno al confrontarlo con el medio MS, mientras que al utilizar bioproducto en el medio con sal se observó una ligera disminución con respecto al control, el valor de este tratamiento fue 1,08 veces menor al obtenido en el control (figura 10).



5. DISCUSIÓN

5.1. Porcentaje de germinación

Las oligosacarinas utilizadas en esta investigación son nuevas formulaciones y se encuentran bajo solicitud de patente. La bibliografía respecto a esta mezcla es inexistente y por este motivo se confrontó los resultados obtenidos con otros tipos de bioestimulantes.

Las semillas de *Nicotiana tabacum* sembradas en los medios correspondientes a los distintos tratamientos presentaron porcentajes de germinación diferentes, el mejor resultado reportado fue el control con un valor de 86%, mientras que, en el medio que contenía la oligosacarina (MS+PO) se alcanzó 84%. En estudios previos realizados en campo usando en semillas de algodón (*Gossypium*) a las cuales se les adicionó xiloglucanos derivados de la pared celular de plantas, se reportaron porcentajes de germinación de 79% en el control y 84% en las plantas con bioestimulante (Demir, Mavi, Ozcoban, & Okcu, 2001; Edwards, C.M. Dea, V. Bulpin, & Grant Reid, 1985, p.133-140). En este último se observó un ligero aumento en la variable estudiada, sin embargo no fue estadísticamente significativo. Existen otros estudios realizados con bioestimulantes obtenidos a partir de algas como *Ascophyllum nodosum*, *Ecklonia máxima*, *Durvillea potatorum*, *Durvillea antarctica*, *Fucus serratus*, *Himanthalia elongate*, *Laminaria digitata*, *L. hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* y *Sargassum spp*, que demostraron un aumento el porcentaje de germinación en semillas de *Arabidopsis thaliana*, debido a que estos compuestos promueven el movimiento de nutrientes hacia el interior de la semilla ayudando a este proceso (Sharma, Fleming, Selby, Rao, & Martin, 2013).

Por otra parte, en un estudio *in vivo* realizado con cultivos de rizobacterias como bioestimulantes se demostró que al sumergir semillas de *Cucumis sativus* por 60 minutos antes de la siembra en una solución con rizobacteria *Azospirillum brasilense* a una concentración de 10^8 - 10^{11} unidades formadoras de colonia (UFC) aumenta la tasa de germinación y el índice de vigor en la misma. El uso de este bioestimulante en especies vegetales como lechuga

(*Lactuca sativa*) mostró el mismo efecto inclusive a concentraciones menores (10^7 UFC). Estos estudios demuestran que las concentraciones del bioestimulante varían dependiendo de la especie vegetal, lo que indica que las respuestas de la planta no solo dependen del tipo de bioestimulante aplicado, sino también de la concentración de éste (Ruzzi & Aroca, 2015, p.1-9).

En un estudio realizado en plantas de maíz (*Zea mays*) crecidas en medio MS con 150 mM de cloruro de sodio se utilizaron dos bioestimulantes diferentes, el primero un hidrolizado de alfalfa (1 mg.L^{-1}) y el segundo un hidrolizado de alfalfa con triacontanol (181,2 μM). En ambos casos se observó un incremento de la tasa de germinación como consecuencia de la adición de los bioestimulantes mencionados (Ertani & Schiavon, 2013, p.145-158). Como se puede observar la concentración del segundo bioestimulante fue mucho menor a la usada en nuestro estudio, lo que genera la posibilidad que la concentración usada no es la óptima para generar una respuesta sobre la germinación o que no tiene efecto sobre esto.

La adición de sal en el medio MS provocó una disminución en el porcentaje de germinación, el cual no se vio afectado por la adición del bioestimulante. Los resultados obtenidos en los tratamientos que contenían cloruro de sodio fueron de 74% para el medio MS+PO+ NaCl y 78% para el tratamiento MS+ NaCl. Esta reducción de la capacidad de germinación pudo resultar debido a que la alta concentración de sal reduce el potencial osmótico y provoca un desequilibrio iónico a nivel celular, dificultando a las semillas el proceso de absorción de agua del medio y generando dormancia (J. K. Zhu, 2001). Los resultados concuerdan con un estudio previo realizado *in vitro* con semillas de especies vegetales: *Beta vulgaris*, *Brassica oleracea capitata L.*, *Amaranthus paniculatus* y *Brassica campestris*, las cuales se mantuvieron en concentraciones de 0, 25, 50, 75 y 100 mM de cloruro de sodio por 36 días. Los resultados de este estudio mostraron que al aumentar la concentración de sal el porcentaje de germinación disminuye, llegando a valores inferiores al 70% en el medio con 100mM de cloruro de sodio (da Silva, Nogueira, de Araújo, de Melo, & de Azevedo Neto, 2008; Jamil et al., 2006).

Las observaciones de tiempo de germinación obtenido en tabaco son consecuentes con un estudio realizado *in vitro* con berenjena (*Solanum melongena*), donde las semillas fueron expuestas a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y se determinó que a medida que la concentración de este producto aumenta, la germinación se retrasa. El proceso de germinación comenzó a las 47 horas en el tratamiento control, a las 71 horas en los medios con concentraciones entre 35 mM a 70 mM de NaCl, y a las 95 horas aquellas en concentraciones entre 100mM y 140mM, manteniendo las mismas condiciones atmosféricas en todos los medios, lo cual es similar a nuestro estudio (Demir et al., 2001).

5.2. Morfología de raíces, tallo y hojas

Las distintas plantas de *Nicotiana tabacum* analizadas no mostraron valores estadísticamente significativos al analizar las variables de longitud radicular, longitud del tallo, longitud total y peso fresco, sin embargo tanto el número de hojas como el área foliar mostraron valores estadísticamente significativos como se mostró en la Tabla 2 de los resultados. Al contrastar los resultados obtenidos con los estudios realizados por Cabrera et al., 2012, p.198 y González-Pérez et al., 2012, p.216 se demostró que la adición de 0,5 mg.L⁻¹ xiloglucanos en el medio de cultivo en plantas *in vitro* de *Arabidopsis* incrementó la longitud total y la raíz primaria. Por el contrario, en las plantas de *Nicotiana tabacum* estos valores no cambiaron en presencia del bioestimulante estudiado, aunque se pudo observar un cambio en el número de hojas y en el área foliar. Es posible que el bioestimulante usado actúe de diferente manera estimulando diferentes receptores de la planta y por ello no se observa el mismo comportamiento en *Nicotiana tabacum*. Cabe mencionar que los xiloglucanos son otro tipo de compuesto proveniente de especies vegetales pero no poseen la misma estructura que las oligosacarinas usadas en este estudio (Calvo, Nelson, & Kloepper, 2014).

En un trabajo realizado *in vivo* en cultivos de espinaca (*Basella alba*) con la aplicación de quitosano en las hojas a una concentración de 75 mg.L⁻¹ se pudo observar un incremento en el peso fresco y seco obtenido, aumento en el

número de ramas, mayor número de hojas y área foliar, pero el uso de concentraciones superiores a 75 mg.L^{-1} produjo una inhibición en el crecimiento de las plantas. Estudios hechos en cultivos de okra (*Hibiscus esculentus*) demostraron que las concentraciones óptimas de quitosán se encuentran entre 100 y 125 mg.L^{-1} , los mejores resultados se obtuvieron con aplicaciones foliares sucesivas y en cultivos de orégano (*Origanum vulgare*) las concentraciones ideales varían entre 200 y 500 mg.L^{-1} (Pichyangkura & Chadchawan, 2015).

En un estudio realizado en cultivos de sorgo (*Sorghum bicolor*) en suelos salinos se aplicó una solución de aminoácidos libres y conductividad eléctrica (CE) al suelo para mejorar la productividad de los mismos. El bioestimulante fue aplicado en las semillas de sorgo y en sus hojas para mejorar su crecimiento. El procedimiento no tuvo resultados positivos sobre el porcentaje de germinación al usar cada uno de sus componentes por separado, pero su uso en conjunto originó una diferencia significativa en la altura final de las plantas, siendo las plantas control con cloruro de sodio las más pequeñas. La inhibición del crecimiento de las plantas de *Nicotiana tabacum* se pudo deber al desvío de energía del proceso de crecimiento para poder adaptarse a la salinidad (Achón Forno, Paniagua Alcaraz, Romero, & Romero Gavilán, 2014). Al contrastar los datos obtenidos con los resultados de este estudio, se pudo observar que al contrario del trabajo mencionado las plantas de tabaco no mejoraron en longitud pero si en número de hojas.

Durante un estudio realizado *in vitro* en lechuga (*Lactuca sativa*) se aplicó una solución de derivados de plantas como bioestimulante a una concentración de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ y un medio con cloruro de sodio a 25 mM , la aplicación del bioestimulante se realizó de dos maneras: en la raíz y en las hojas. Se determinó que tanto la biomasa como la longitud de la raíz fueron mayores en las plantas tratadas con bioestimulante en comparación con aquellas que crecieron solo en NaCl (Lucini et al., 2014, p.124-133). Al comparar estos extractos de plantas con las oligosacarinas se puede deducir que tienen mecanismos de acción diferentes aunque los dos compuestos tengan un origen

vegetal, se puede observar que la concentración determina la respuesta generada por la planta frente al estrés. A la concentración de 1 mg.L^{-1} se detectó una mejora en el número de hojas y área foliar, puede que a una concentración diferente el resultado sea distinto.

5.3. Determinación de grupos carbonilo en material soluble

La presencia de grupos carbonilo en los extractos crudos mostró una diferencia entre todos los tratamientos. Los grupos carbonilos funcionan como biomarcadores del estrés oxidativo presente en la célula, por lo que es posible evidenciar la influencia de la concentración de sal utilizada como fuente de estrés (Dalle-Donne, Rossi, Giustarini, Milzani, & Colombo 2003, p.23-38).

La presencia de estrés oxidativo afecta compuestos como: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Por medio de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) se pudo detectar el aumento de la concentración de grupos carbonilo la totalidad de solutos presentes en la muestra. Los resultados obtenidos muestran que la presencia de NaCl en el medio, ocasiona un aumento considerable en la abundancia de estos grupos funcionales. La comparación entre los tratamientos con cloruro de sodio con y sin bioestimulante hace evidente una disminución de la presencia de oxidación lo que indica que los tratamientos con oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas permiten, de alguna manera, contrarrestar la oxidación de los diferentes componentes de las células.

En un estudio realizado en arroz (*Oryza sativa*) se demostró que el estrés salino puede ser contrarrestado por la acción de algunos bioestimulantes como es el caso de los ácidos húmicos, los cuales provocaron un incremento en el contenido y actividad de las enzimas del sistema antioxidante (García et al., 2012). De la misma manera, Savvas & Ntatsi (2015) demostraron que la adición de silicio (1,0 mM) en plantas de pepino (*Cucumis sativus L.*) mostró actividad como bioestimulante, ya que incrementó la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APx), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR). Estos cambios en la célula

provocan el aumento de la concentración de ascorbato y en consecuencia un mejor control de los niveles de oxidación. Un comportamiento similar al descrito anteriormente se describió en un estudio realizado con arroz (*Oryza sativa L*), donde estas plantas *in vitro* fueron expuestas a dos concentraciones distintas de un bioestimulante a base de ácidos húmicos. Durante este estudio se observó un incremento en la actividad de la enzima peroxidasa (POX) en las raíces, esto se puede deber a que esta enzima funciona reduciendo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de esta manera disminuyendo el estrés oxidativo de las células. Es posible que el bioestimulante de oligosacarinas (PO) ayude al incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes, aunque el objetivo de este estudio no fue determinar cuáles enzimas fueron estimuladas o el efecto sobre sistemas de degradación de compuestos y biomoléculas alteradas. Es posible, que este bioestimulante afecte alguna otra ruta metabólica que ayudó a disminuir los daños causados por el estrés oxidativo (Calderín García et al., 2012).

5.4. Evaluación de las diferencias de oxidación de lípidos de plantas de *Nicotiana tabacum*

Los extractos utilizados para la evaluación de oxidación de lípidos no tuvieron una variación significativa entre tratamientos, sin embargo, muestran una tendencia similar a lo observado en la oxidación de compuestos totales, donde el mayor valor registrado fue en el medio con cloruro de sodio. La adición del bioproducto provocó una ligera disminución de la oxidación respecto al control y en el medio con presencia de sal y la oligosacarina se observó un nivel de oxidación menor al comparar con el medio salino. Este resultado concuerda con lo descrito en la bibliografía, a pesar de que en otros estudios la mitigación de la oxidación de lípidos es mayor con la adición de diferentes tipos de bioestimulantes.

En un estudio realizado en plantas *in vitro* de salvia (*Salvia officinalis L*) donde se usó como bioestimulante un extracto de semillas de *Ulva rigida* a concentraciones de 25%, 50% y 75%, se observó una disminución de la oxidación lipídica en presencia del mismo (Mansori et al., 2015). Los mismos

resultados fueron observados en un estudio en *Eruca vesicaria* y un extracto de *Moringa oleífera* al 1, 2 y 3% como bioestimulante, en esta investigación se observó que la aplicación del este producto tiene un efecto igual al extracto de *Ulva rigida* (Abdalla, 2013).

En un estudio de estrés oxidativo realizado en plantas *in vivo* en pepino (*Cucumis sativus L.*) en el cual se expusieron las mismas a concentraciones de silicio (Si) de 1 mM Si y 1 mM (Si) + 50 mM NaCl, se observó que la oxidación de lípidos incrementó considerablemente en el tratamiento con estrés salino mientras que el tratamiento con silicio obtuvo valores parecidos a los controles (Z. Zhu, Wei, Li, Qian, & Yu, 2004). Estos resultados se asemejan a los obtenidos en *Nicotiana tabacum* donde se muestra que el bioestimulante de oligosacarinas en presencia de cloruro de sodio disminuye los efectos de oxidación observados en la muestra sometida únicamente a estrés salino.

En base a estos resultados se puede sugerir que el modo de acción de estas oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas se basa en preparar a la célula aumentando los niveles de estrés para tolerar condiciones poco favorables, como el estrés salino, en vez de disminuir por completo los efectos nocivos causados por éste. Se sugiere en base a los resultados encontrados que las mezclas de oligosacarinas utilizadas provocan en la planta un estado similar al causado por condiciones adversas permitiéndole reaccionar de mejor manera a la exposición al estrés.

6. CONCLUSIONES:

La adición de oligosacarinas derivadas de plantas usadas en este estudio a una concentración de 1 mg.L^{-1} provocó un incremento significativo en el número de hojas y el área foliar de plantas de *Nicotiana tabacum*, lo cual podría favorecer la capacidad fotosintética de las plantas tratadas con el bioproducto y mejorar sus probabilidades de supervivencia de las mismas en condiciones desfavorables.

El bioestimulante no influenció el porcentaje de germinación, el peso fresco, longitud total, longitud de la raíz y el tallo en presencia y ausencia de estrés salino.

La presencia del bioestimulante a concentraciones de 1 mg.L^{-1} ocasionó una disminución en la concentración de los grupos carbonilo de los extractos de planta en ausencia y presencia de estrés salino, lo cual parece indicar que el mecanismo de acción de estas moléculas involucra a los sistemas antioxidantes de la célula o los sistemas de reparación de compuestos oxidados.

La presencia de oligosacarinas derivadas de plantas a una concentración de 1 mg.L^{-1} en los medios provocó una ligera disminución en la oxidación de los lípidos presentes en las plantas de *Nicotiana tabacum* tanto en presencia como en ausencia de cloruro de sodio, dejando abierta la posibilidad de que estas biomoléculas sean las causantes del mejor crecimiento de las plantas en condiciones desfavorables sin olvidar que habría que determinar en un futuro si el efecto se presenta también en otros compuestos macromoleculares.

7. RECOMENDACIONES:

Durante este estudio se observó mejoras en algunas variables morfológicas, según lo reportado en la bibliografía se recomienda disminuir la concentración de estas oligosacarinas derivadas de la pared celular de plantas.

Al observar que una de las variables que mejoraron debido a la presencia de la oligosacarina es el área foliar se recomienda realizar un estudio donde se determine si este aumento en el área de las hojas mejora la capacidad fotosintética de la planta para permitir su sobrevivencia en medios adversos.

Al observar los resultados en especial de la oxidación en el material soluble se puede considerar los sistemas antioxidantes están actuando de alguna manera para contrarrestar el estrés salino, por este motivo que abierta la posibilidad de continuar el estudio enfocándolo en la determinación de cuales enzimas antioxidantes son estimuladas por esta oligosacarina.

A lo largo de este estudio se logró obtener oxidaciones del material soluble y de lípidos pero no se realizó ningún ensayo exclusivo en proteínas por lo que se recomienda realizar análisis de daños estructurales o determinación de actividad enzimática para observar si la sal presente en el medio ocasiona alguna alteración directa en las proteínas.

REFERENCIAS

- Abdalla, M. (2013). The potential of *Moringa oleifera* extract as a biostimulant in enhancing the growth, biochemical and hormonal contents in rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*) plants. Recuperado el 18 de Junio del 2015.
- Achón Forno, I., Paniagua Alcaraz, P. L., Romero, N., & Romero Gavilán, M. (2014). Efectos de la aplicación de bioestimulantes sobre la tolerancia de *Sorghum bicolor* (L.) Moench al estrés salino. *Investig. Agrar.*, 16, 11–20. Recuperado el 10 de Febrero del 2016.
- Ahmad, P., Hakeem, K., Kumar, A., Ashraf, M., & Akram, N. (2012). Salt-induced changes in photosynthetic activity and oxidative defense system of three cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.). *Biotechnol*, 11, 2694–2703. Recuperado 20 de Septiembre del 2015.
- Ajay, A., R.K, S., & G.C, S. (2002). Oxidative stress and anti-oxidative mobilization. *Current Science*, 82, 1227–1238. Recuperado el 4 de Enero del 2016
- Bartosz, G. (1997). Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*. <http://doi.org/10.1007/s11738-997-0022-9>. Recuperado el 14 de Diciembre del 2015.
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany*. <http://doi.org/10.1093/aob/mcf118>. Recuperado el 11 de Enero del 2016
- Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, a., Vernieri, P., & Ferrante, a. (2015). Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture & Horticulture*, 31(1), 1–17. <http://doi.org/10.1080/01448765.2014.964649>. Recuperado el 5 de Febrero del 2016
- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*. <http://doi.org/10.2436/im.v3i1.9235>. Recuperado el 6 de Febrero del 2016

- Cabrera, J. C., Wégria, G., Onderwater, R. C. a, Napoles, M. C., Falcon-Rodriguez, a. B., Costales, D., ... Wattiez, R. (2012a). Practical use of oligosaccharins in agriculture. *Acta Horticulturae*, 1009, 195–212. Recuperado el 20 de Julio del 2015.
- Cabrera, J. C., Wégria, G., Onderwater, R. C. a, Napoles, M. C., Falcon-Rodriguez, a. B., Costales, D., ... Wattiez, R. (2012b). Practical use of oligosaccharins in agriculture. *Acta Horticulturae*, 1009, 195–212. Recuperado 20 de Julio del 2015.
- Calderín García, A., Louro Berbara, R., Portuondo Ferías, L., Guridi Izquierdo, F., Hernández, O., Hernández Campos, R., & Nora Castro, R. (2012). Humic acids of vermicompost as an ecological pathway to increase resistance of rice seedling to water stress. Recuperado el 5 de Marzo del 2016.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014a). Agricultural uses of plant biostimulants, 3–41. <http://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>. Recuperado el 18 de Junio del 2015.
- Centeno, S. (2012). INTA- Entrevista a especialista israeli en riego por goteo - Revista Ruralis13 (1).pdf. *RURALIS*, pp. 13–15. Recuerado el 19 de Junio del 2015.
- Corner, T. E. (2002). Biostimulants : What ' s behind. Recuperado el 15 de Julio del 2015.
- da Silva, E. C., Nogueira, R. J. M. C., de Araújo, F. P., de Melo, N. F., & de Azevedo Neto, A. D. (2008). Physiological responses to salt stress in young umbu plants. *Environmental and Experimental Botany*. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.11.010>. Recuperado 25 de Agosto del 2015.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Elsevier*, 329, 23–38. Recuperado el 4 de Febrero del 2016.
- Demir, I., Mavi, K., Ozcoban, M., & Okcu, G. (2001). Effect of Salt Stress on

- Germination and Seedling Growth of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*. <http://doi.org/10.3923/pjbs.2001.359.360>. Recuperado el 14 de Diciembre del 2015.
- Devlin, T. M. (2006). *Bioquímica* (Cuarta Edi). Mexico DF: Editorial Reverté, S.A. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=p3DCb9ITLx8C&pg=PA591&dq=Especies+Reactivas+del+Ox%C3%ADgeno&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjWsbmWiNzKAhVD2R4KHVotDmsQ6AEIITAB#v=onepage&q&f=true>. Recuperado el 5 de Julio del 2015.
- Diouf, J., Bishop, C., Branca, G., Brinkman, R., & Metzner, R. (2002). World agriculture towards 2015/2030. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura*. [http://doi.org/10.1016/S0264-8377\(03\)00047-4](http://doi.org/10.1016/S0264-8377(03)00047-4). Recuperado el 20 de Diciembre del 2015.
- du Jardin, P. (2012a). The Science of Plant Biostimulants - A bibliographic analysis : Final report. Recuperado el 16 de Julio del 2015.
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>. Recuperado el 10 de Octubre del 2015.
- Du, Z., & Bramlage, W. J. (1992). Modified Thiobarbituric Acid Assay for Measuring Lipid Oxidation in Sugar-Rich Plant Tissue Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1556–1570. Recuperado el 5 de Juilo del 2015.
- EBIC. (2015). About biostimulants and the benefits of using them. Recuperado el 19 de Junio del 2015.
- Edwards, M., C.M. Dea, I., V. Bulpin, P., & Grant Reid, J. S. (1985). Xyloglucan (amyloid) mobilisation in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination. *Planta Springer- Verlag*, 163(1), 133–140. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00395907>. Recuperado el 12 de Febrero del 2016.

- Enríquez-Guevara, E. A., & E. Aispuro-Hernández, I. Vargas-Arispuro, M. Á. M.-T. (2010). Oligosacarinas Derivadas de Pared Celular : Actividad Biológica y Participación en la Respuesta de Defensa de Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Recuperado el 25 de Octubre del 2015.
- Ertani, A., & Schiavon, M. (2013). Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L . plants, 145–158. <http://doi.org/10.1007/s11104-012-1335-z>. Recuperado el 18 de Febrero del 2016.
- FAO. (2009). La agricultura mundial en la perspectiva del 2050. Recuperado el 14 de Agosto del 2015 de http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf.
- Gallant, B. A. (2004). Biostimulants : what they are and how they work, (March), 1–4. Recuperado el 11 de Junio del 2015.
- García, A. C., Santos, L. A., Izquierdo, F. G., Sperandio, M. V. L., Castro, R. N., & Berbara, R. L. L. (2012). Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. *Ecological Engineering*. <http://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.06.011>. Recuperado el 23 de Febrero del 2016.
- González-Pérez, L., Vázquez-Glaría, A., Perrotta, L., Acosta, A., Scriven, S. a., Herbert, R., ... Rogers, H. J. (2012a). Oligosaccharins and Pectimorf® stimulate root elongation and shorten the cell cycle in higher plants. *Plant Growth Regulation*, 68(2), 211–221. <http://doi.org/10.1007/s10725-012-9709-z>. Recuperado el 24 de Octubre del 2015.
- Gutiérrez, C. (2006). Contra Patógenos. Recuperado el 7 de Junio del 2015.
- Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., & Yermiyahu, U. (2015). *The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake*. *Advances in Agronomy*. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/bs.agron.2014.10.001>. Recuperado el 18 de Diciembre del 2015.
- Hamza, B. Ben, & Suggars, A. (1999). Biostimulants : Myths and Realities.

Recuperado el 10 de Julio del 2015.

Hernández, J. a., Olmos, E., Corpas, F. J., Sevilla, F., & del Río, L. a. (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science*. [http://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)04047-8](http://doi.org/10.1016/0168-9452(94)04047-8). Recuperado el 14 de Enero del 2016.

Inze, D., & Montagu, M. Van. (1995). Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. [http://doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80024-7](http://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80024-7). Recuperado el 14 de Enero del 2016.

Jamil, M., Lee, D. B., Jung, K. Y., Ashraf, M., Lee, S. C., Shik Rha, E., & Rha, E. S. (2006). Effect of Salt (NaCl) Stress on Germination and Early Seedling Growth of Four Vegetables Species. *Journal of Central European Agriculture*. Retrieved from [https://jcea.agr.hr/articles/358_EFFECT_OF_SALT_\(NACL\)_STRESS_ON_GERMINATION_AND_EARLY_SEEDLING_GROWTH_OF_FOUR_VEGETABLES_SPECIES_en.pdf](https://jcea.agr.hr/articles/358_EFFECT_OF_SALT_(NACL)_STRESS_ON_GERMINATION_AND_EARLY_SEEDLING_GROWTH_OF_FOUR_VEGETABLES_SPECIES_en.pdf). Recuperado el 20 de Enero del 2016.

Jiménez, J. de la C., Moreno, L. P., & Magnitskiy, S. (2012). Respuesta de las plantas a estrés por inundación. Revisión. *SciELO*, 6. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S2011-21732012000100010&script=sci_arttext&tIng=en. Recuperado el 14 de Enero del 2016.

Jouyban, Z. (2012). The Effects of Salt stress on plant growth, 1–4. Recuperado el 12 de Agosto del 2015.

Lucini, L., Roupael, Y., Cardarelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., & Colla, G. (2014). The effect of plant derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Elsevier*, 182, 124–133. Recuperado el 4 de Marzo del 2016.

Luo, S., & Wehr, N. (2009). Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Report*, 14, 159–166. Recuperado el 30 de Agosto del 2015.

Macedo-Márquez, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno

- (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-888X2012000200003&script=sci_arttext. Recuperado el 14 de Enero del 2016.
- Mansori, M., Chernane, H., Latique, S., Benaliat, A., Hsissou, D., & El Kaoua, M. (2015). Effect of seaweed extract (*Ulva rigida*) on the water deficit tolerance of *Salvia officinalis* L. *Journal of Applied Phycology*. <http://doi.org/10.1007/s10811-015-0671-9>. Recuperado el 8 de Marzo del 2016.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*. <http://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>. Recuperado el 2 de Febrero del 2016.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 473–497. Recuperado el 28 de Diciembre del 2015.
- Newswire, P. (2015). North America Biostimulants Market by Modes of Application, by Active Ingredient, by End-User, by Geography - Analysis & Forecast To 2019. Retrieved from <http://www.researchandmarkets.com/reports/3215681/north-america-biostimulants-market-by-modes-of#description>. Recuperado el 14 de Octubre del 2015.
- Parihar, P., Singh, S., & Singh, R. (2014). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies : a review. <http://doi.org/10.1007/s11356-014-3739-1>. Recuperado el 20 de Enero del 2016.
- Parvaiz, A., & Satyawati, S. (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants – a review. *Plant Soil Environment*. Recuperado el 15 de Octubre del 2015.
- Pichyangkura, R., & Chadchawan, S. (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae*. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.031>. Recuperado el 2 de Marzo del

2016.

- Poljsak, B. (2011). Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <http://doi.org/10.1155/2011/194586>. Recuperado el 11 de Junio del 2015.
- Qadir, M., Quill rou, E., Nangia, V., Murtaza, G., Singh, M., Thomas, R., ... Noble, A. (2015). Economics of Salt- induced Land Degradation and Restoration. Recuperado el 5 de Julio del 2015.
- Qados, A. M. S. A. (2011). Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L .). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10(1), 7–15. <http://doi.org/10.1016/j.jssas.2010.06.002>. Recuperado el 12 de Agosto del 2015.
- Russo, R. O., & Berlyn, G. P. (1991). The Use of Organic Biostimulants to Help Low Input Sustainable Agriculture. *Journal of Sustainable Agriculture*, 1(2), 19–42. http://doi.org/10.1300/J064v01n02_04. Recuperado el 19 de Enero del 2016.
- Ruzzi, M., & Aroca, R. (2015). Plant growth- promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Elsevier*, 1–9. Recuperado el 18 de Enero del 2016.
- Saa, Sebastian, Olivos- Del Rio, Andres, Castro, Sebastian, B. P. H. (2015). Foliar application of microbial and plant based biostimulants increases growth and potassium uptake in almond (Mill.) D.A. Webb. Recuperado el 6 de Marzo del 2016.
- Saa, Sebastián, Olivos- Del Río, Andrés, Castro, Sebastián, B. P. H., & Saa, S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–3. Recuperado el 6 de Marzo del 2016.
- Savvas, D., & Ntatsi, G. (2015). Biostimulant activity of silicon in horticulture. Recuperado el 15 de Febrero del 2016.
- Schmidt, R. E., Ervin, E. H., & Zhang, X. (2003). Questions and answers about biostimulants, (June), 91–94. Recuperado el 12 de Agosto del 2015.

- Sharma, H. S. S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. R., & Martin, T. (2013). Plant biostimulants : a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. <http://doi.org/10.1007/s10811-013-0101-9>. Recuperado el 7 de Enero del 2016.
- Sigma. (2003). Technical bulletin QuantiPro BCA Assay Kit, 715824. Recuperado el 15 de Diciembre del 2015.
- Torres, M. A., Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*. <http://doi.org/10.1104/pp.106.079467>. Recuperado el 27 de Diciembre del 2015.
- Uwalsky, M. A. S. (2006). Radicales Libres, Antioxidantes naturales y Mecanismos de Protección. *Atenea*. <http://doi.org/10.4067>. Recperado el 25 de Septiembre del 2015.
- Varki, a. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*. <http://doi.org/10.1093/glycob/3.2.97>. Recuperado el 25 de Diciembre del 2015.
- Wiseman, H., & Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical Journal*. Recuperado el 6 de Enero del 2016.
- Wood, L. (2015). Global Turf & Ornamentals Biostimulants Market 2015-2019 - Active Ingredients, Application, End users Trends and Forecasts. Retrieved from <http://www.prnewswire.com/news-releases/global-turf--ornamentals-biostimulants-market-2015-2019---active-ingredients-application-end-users-trends-and-forecasts-300075982.html>. Recuperado el 19 de Agosto del 2015.
- Yokoi, S., Bressan, R. A., & Hasegawa, P. M. (2002). Salt Stress Tolerance of Plants, 25–33. Recuperado el 4 de Agosto del 2015.
- Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*. [http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01838-0](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01838-0). Recuperado el 12 de

Octubre del 2016

Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., & Yu, J. (2004). Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). Recuperado el 4 de Enero del 2016.

ANEXO

ANEXO 1:

Anexo 1: Peso seco de los distintos tratamientos expresado en mg de sólidos totales presentes en g de muestra

Peso seco				
Tratamiento	Experimento 12 Agosto	Experimento 16 Octubre	Promedio	Desviación Estándar
	mg sólidos solubles / g muestra	mg sólidos solubles / g muestra	mg sólidos solubles / g muestra	
MS	53.262	37.532	45.397	11.123
MS+NaCl	65.264	47.476	56.370	12.578
MS+BP	76.171	50.057	63.114	18.465
MS+BP+ NaCl	75.117	40.431	57.774	24.527