



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GENÉTICA Y ENZIMÁTICA CAUSADOS  
POR ESTRÉS SALINO EN PLANTAS DE ARABIDOPSIS THALIANA  
TRATADAS CON OLIGOSACÁRIDOS DE XILOGLUCANOS

AUTORA

MAYRA CECILIA OBANDO ROJAS

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GENÉTICA Y ENZIMÁTICA CAUSADOS POR  
ESTRÉS SALINO EN PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana* TRATADAS CON  
OLIGOSACÁRIDOS DE XILOGLUCANOS

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

Profesora guía  
Ph.D. Lien González Pérez

Autora  
Mayra Cecilia Obando Rojas

Año  
2017

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

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

---

Lien González Pérez  
Doctora en Ciencias Agrícolas.  
CC: 1751321348

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los trabajos de titulación”.

---

María Alejandra Cruz Salazar

Máster en bioprocesos.

CC: 1719928572

## **DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTIFICO**

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

---

Lien González Pérez  
Doctora en Ciencias Agrícolas.  
C.C: 1751321348

## **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”.

---

Mayra Cecilia Obando Rojas

CC: 040123185-7

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar agradezco a mis padres por brindarme su cariño, confianza, apoyo y compañía a lo largo de mi vida. Por inculcar en mí el sentido de seriedad, persistencia, responsabilidad y rigor.

A Lien González Pérez por su gran apoyo, esfuerzo y dedicación. Porque sus conocimientos, sus orientaciones, su motivación y su paciencia han sido fundamentales para el desarrollo del presente trabajo de titulación.

## **DEDICATORIA**

Para Cristhian y Stephany, no solo por aportar felicidad y emociones a mi vida, sino por estar presentes en todos los procesos, tanto en los momentos felices y tristes.

También dedico la presente investigación a Grace, Darío, Joel y Timothy porque siempre estuvieron pendientes de mi progreso universitario, me brindaron su apoyo y su amistad sincera.

## RESUMEN

En la actualidad, existe una preocupación persistente por el uso de los pesticidas y agroquímicos en las actividades agrícolas, cuyos efectos tóxicos son fuente de aprehensión para la población a nivel mundial. Por ello, se presenta un incremento progresivo de la utilización de bioestimulantes, entre ellos los oligosacáridos de xiloglucanos. Estos se involucran en la estimulación de los procesos naturales que benefician el desarrollo de las plantas y generan respuestas bajo condiciones de estrés biótico y/o abiótico. En el presente trabajo experimental se analizó los cambios de la expresión génica y enzimática de catalasa (CAT) inducidos por el tratamiento con oligosacáridos de xiloglucanos (XGO), en condiciones normales y de estrés salino, en plantas de *Arabidopsis thaliana* sembradas *in vitro*. Se sembró plantas de *A. thaliana* en medio MS líquido, las mismas que crecieron por un periodo de 15 días, se realizó la recolección de muestras pertenecientes al T<sub>0</sub> (Control negativo de tiempo 0 antes de la inducción). Posteriormente se realizó una inducción en los medios de cultivo, adicionando 100 mM de NaCl  $\pm$  0.1 mg.L<sup>-1</sup> de XGO y se tomaron muestras a las 24 y 72 horas posteriores a la inducción. Para validar los cambios en la expresión génica se analizó la expresión relativa del gen *cat* mediante PCR en tiempo real. La presencia relativa de la enzima Catalasa se determinó por *Western blot* y la actividad de la enzima mediante espectrofotometría. Se evidenció que los niveles de expresión génica del gen *cat* aumentaron significativamente, en presencia de XGO y NaCl a las 24 horas después de la inducción. Así como también, la presencia relativa de la enzima CAT se incrementó en presencia de XGO  $\pm$  NaCl, a las 72 horas posteriores a la inducción. Finalmente, se observó un aumento en el patrón de la actividad de CAT a las 24 y 72 horas, con y sin estrés salino. Los resultados obtenidos en esta investigación, sugieren que los oligosacáridos de xiloglucanos se involucran en la estimulación y activación de mecanismos de defensa en las plantas frente al estrés oxidativo, que les permiten tolerar las condiciones desfavorables del estrés salino.

## ABSTRACT

At present, there is a persistent concern about the use of pesticides and agrochemicals in agricultural activities, whose toxic effects are a source of apprehension for the population worldwide. Therefore, a progressive increase in the use of biostimulants, among them the oligosaccharides of xyloglucans. These are involved in the stimulation of natural processes that benefit the development of plants and generate responses under conditions of biotic and / or abiotic stress in plants. This Project evaluates the changes of *catalase* (CAT) gene expression and relative presence of the CAT enzyme induced by xyloglucan oligosaccharide (XGO) treatment under normal conditions and saline stress in *Arabidopsis thaliana* plants planted *in vitro*. Plants of *A. thaliana* were planted in liquid MS medium, the same ones that were grown for a period of 15 days, samples were collected pertaining to T<sub>0</sub> (negative control of time 0 before induction). Subsequently an induction was performed in culture media, adding 100 mM NaCl ± 0.1 mg.L<sup>-1</sup> of XGO and samples were taken at 24 and 72 hours post-induction. To validate the changes in gene expression, the relative expression of the *cat* gene was analyzed by real-time PCR. The relative presence of the enzyme Catalase was determined by Western blotting and enzyme activity was determined by spectrophotometry. We demonstrated that levels of gene expression of the *cat* gene increased significantly, in the presence of XGO and NaCl at 24 hours post-induction. As well as, the relative presence of the CAT enzyme was increased in the presence of XGO ± NaCl, at 72 hours post induction. Finally, an increase in the pattern of CAT activity was observed at 24 and 72 hours post induction, with and without saline stress. The results obtained in this work suggest that xyloglucan oligosaccharides are involved in the stimulation and activation of different defense mechanisms in plants against oxidative stress, which allow them to tolerate unfavorable conditions of saline stress.

## ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Planteamiento del problema .....	4
1.3 Justificación.....	5
1.4 Objetivos .....	6
1.4.1 Objetivo general .....	6
1.4.2 Objetivos específicos.....	6
2. Capítulo II. Marco Teórico .....	7
2.1 Salinidad en los cultivos.....	7
2.1.1 Incidencia de la salinidad y riesgos en la agricultura.....	8
2.1.2 Modificaciones de las plantas frente al estrés salino .....	10
2.1.3 Métodos tradicionales utilizados en la recuperación de suelos salinos .....	16
2.1.4 Alternativas de recuperación de suelos salinos.....	17
2. 2 Bioestimulantes.....	18
2.2.1 Significado, composición de los bio estimulantes .....	18
2.2.2 Propiedades y características de los bioestimulantes .....	20
2.2.3 Oligosacáridos derivados de la pared celular de plantas .....	21
2.2.5 Importancia y aplicación .....	25
2.3 Arabidopsis thaliana como planta modelo .....	26
3. Capítulo III. Diseño del plan experimental .....	28

4. Capítulo IV. Procedimientos .....	32
4.1 Determinación de la población y muestra .....	32
4.2 Selección de instrumentos de medición.....	32
4.3 Procedimientos para obtención de datos .....	34
4.4 Pruebas de confiabilidad de datos .....	47
4.4.2 Análisis de la presencia relativa de la enzima CAT .....	48
4.4.3 Análisis de la actividad enzimática de Catalasa .....	49
4.4.4 Análisis estadístico .....	49
5. Capítulo V. Resultados y Discusión.....	51
5.1 Evaluación de la expresión relativa del gen cat .....	52
5.2 Evaluación de la presencia relativa de la proteína catalasa	57
5.3 Actividad enzimática de Catalasa .....	59
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	63
6.1 Conclusiones .....	63
6.2 Recomendaciones .....	63
REFERENCIAS .....	65
ANEXOS .....	86

## 1. Capítulo I. Introducción

### 1.1 Antecedentes

Los ingresos generados por el cambio dinámico de la productividad y el comercio de la actividad agrícola, difieren notablemente entre los distintos países a nivel mundial (Food and Agriculture Organization (FAO), 2013, p. 31). Se considera al desarrollo de la agricultura, como un instrumento para solucionar y erradicar el problema de la pobreza, puesto que, aproximadamente el 78 % de las personas de escasos recursos viven en zonas rurales, cuya única fuente de subsistencia es la producción agrícola (Banco Mundial, 2016, p.1). Asimismo, la agricultura influye directamente en el crecimiento económico de un país, ya que representa un tercio del producto interno bruto del mismo (PBI) (FAO, 2012, p. 28).

En la actualidad, la seguridad alimentaria, el crecimiento y la reducción de los niveles de la pobreza que promueve la actividad agrícola se encuentran en riesgo, por factores como las limitaciones de los recursos naturales y políticas, las presiones ambientales, los cambios climáticos, la volatilidad de precios y las condiciones abióticas en las que se incluye a la salinidad de los suelos. El principal desafío del sector agrícola es aumentar su productividad, tomando en cuenta todos los aspectos para que se realice de manera amigable con el ambiente (FAO, 2013, p. 35).

Específicamente, la salinidad presente en el suelo es uno de los principales factores que restringen la productibilidad en aproximadamente un tercio del total de tierras destinadas a la actividad agrícola en el mundo (Jiang, Bel, Cao, Smith y Harberd, 2013, p.1). Un suelo es considerado salino cuando presenta una conductancia eléctrica mayor a  $4 \text{ dSm}^{-1}$  (Roy y Tester, 2012, p. 5315). Las elevadas concentraciones de sal influyen en la disponibilidad agua y de los nutrientes, así como también, interfieren en el metabolismo celular puesto que los iones son acumulados en el interior de las células vegetales (Jiang, 2011,

p.2). Esto conlleva a que las plantas experimenten diversos cambios fisiológicos, moleculares y bioquímicos que finalmente provocan la disminución del rendimiento de los cultivos (Roy y Tester, 2012, p. 5316). Además, esta característica del suelo afecta la actividad y tamaño de la biomasa microbiana que se encuentra disponible en el suelo (Canfora et al., 2014, p. 1).

En vista de la prevaencia de la salinidad en los suelos, han surgido diferentes métodos en los que se incluyen a los lavados del exceso de sodio, en conjunto de drenajes eficientes (Aragüés y Alberto, 1978, p. 431), la aplicación de técnicas de labranza profunda (Provin y Pitt, 2012, p. 3), el empleo de tecnologías de fitorremediación (Hernández y Betancourt, 2013, p.2). Asimismo, otra estrategia es el uso de bioestimulantes, los mismos que están compuestos por materia orgánica e inorgánica y participan en el mejoramiento de los procesos fisiológicos de las plantas (Sharma, Fleming, Selby, Rao y Martin, 2014, p. 465).

Son extensos los resultados que se han evidenciado con el uso de bioestimulantes, puesto que actúan como reguladores del crecimiento, inductores de la actividad de auxinas y giberelinas, promueven la germinación de las semillas, la inducción del sistema de producción de flores y frutos, generan cambios en la morfología de las plantas y prolongan el tiempo de conservación post- cosecha (Calvo, Nelson y Kloepper, 2014, p. 3). También, poseen propiedades que se han utilizado para controlar y/o eliminar la propagación de enfermedades e inducir las defensas innatas de las plantas (du Jardin, 2015, p. 5). Adicionalmente, proporcionan tolerancia al estrés abiótico, en donde se involucran los mecanismos de osmorregulación, la reducción de la transpiración, la regulación térmica y las actividades enzimáticas mediadas por cofactores (du Jardin, 2012, p. 3).

Los bioestimulantes derivados de la pared celular vegetal (du Jardin, 2012, p.3), particularmente los oligosacáridos de xiloglucanos (XGO, de sus siglas en inglés *xyloglucan oligosaccharides*) se involucran en los diferentes procesos vegetales (Hayashi y Kaida, 2011, p.18). Sin embargo, el efecto de estos compuestos

cuando las plantas se encuentran sometidas a estrés salino aún no ha sido evaluado, así como tampoco el papel en el que se pueden involucrar para mitigar el estrés oxidativo que la salinidad provoca (Enríquez- Guevara y Aispuro-Hernández, 2010, p. 147).

Se conoce que las plantas frente a diversas condiciones desfavorables, incluyendo a la salinidad, dan origen a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS de sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*), que en situaciones normales de crecimiento son producidas en bajas cantidades, como el producto del metabolismo celular. Sin embargo, excesivas cantidades de ROS originan daños oxidativos que pueden desencadenar la muerte celular (Sharma, Jha, Dubey y Pessarakli, 2012, p.2).

En vista de la sobreproducción de ROS, las plantas utilizan distintos mecanismos de defensa antioxidante, que operan en el interior de las células, un ejemplo de esto es la función de las enzimas antioxidantes que ayudan a mitigar el daño celular mediante la limitación de ROS (Mhamdi, Noctor y Baker, 2012, p.182). una de las enzimas involucradas es la catalasa (EC 1.11.1.6) que presenta una masa molecular de 55 kDa en plantas y está involucrada, esencialmente, en la catálisis de  $H_2O_2$  que puede ser el resultados de los procesos relacionados con la beta-oxidación de los ácidos grasos y/o la fotorespiración (Bhaduri y Fulekar, 2012, p. 56). En la literatura se han descrito varias isoformas de la enzima en diferentes especies vegetales, por lo que la familia de genes de la catalasa, difieren en cuanto a secuencia, localización y regulación subcelular (Zhong y McClung, 1997, p.198). Las enzimas catalasas, al presentar una función clave involucrada en la protección de las células frente al estrés oxidativo, son consideradas objeto de estudio bajo condiciones de estrés y en las interacciones entre planta- patógeno, además, de ser analizadas en investigaciones referentes a la evolución, en plantas (Martínez, L, 2003, 35).

## 1.2 Planteamiento del problema

El desmesurado e inconsciente uso de pesticidas y agroquímicos en la agricultura moderna, involucra efectos tóxicos, considerados como una la fuente de aprehensión para la población a nivel mundial. Lamentablemente, la obtención de los niveles de la producción alimentaria necesarios para mantener los mercados abastecidos depende fuertemente de la aplicación de estos compuestos de origen sintético (Malusá y Vassilev, 2014, p. 5699). La proyección del aumento significativo en las necesidades energéticas, alimentarias e hídricas en un futuro cercano exige a la población, el cambio del enfoque referente a la agricultura, el mismo que permita obtener una mejora en la gestión de los recursos naturales, primando el rendimiento agrícola, de manera que se garantice la calidad de los alimentos. Sumado a esto, se estima que el problema de salinidad en el mundo incide en un área mayor a un billón de ha (FAO, 2015, p. 85). Esta situación origina un impacto negativo en la producción agrícola que, además, afecta las condiciones en la que los agricultores viven, el equilibrio de los recursos naturales y de la economía en distintos niveles (Sánchez, Dunel y Scherger, 2015, p. 28).

Otros impactos de la salinidad son la disminución del rendimiento de la productividad, el aumento de insumos de origen químico, el bajo rendimiento de los cultivos, la obtención de cultivos de alto riesgo y costo; el empleo de un alto número de mano de obra, la disminución de los ingresos económicos. Así también, la salinidad afecta directamente en la cantidad y en la diversidad de los organismos y en el aumento de las enfermedades transmitidas por vectores (FAO, 2014, p.1). La recuperación de los suelos salinos requiere la combinación de diversos enfoques y tecnologías, por lo que surgen diversas herramientas en las que se incluyen a las prácticas hidráulicas, los procedimientos físicos-mecánicos, las metodologías químicas y los métodos biológicos (FAO, 2014, p.4; Tejada, García, González y Hernández, 2016, p. 1413). Estos últimos son considerados como objeto de estudio en la actualidad, particularmente se enfoca

en distintos bioestimulantes, ya que su utilización podría ser una estrategia amigable con el medio ambiente y de múltiples beneficios.

Adicionalmente, los efectos de los oligosacáridos de xiloglucanos sobre las plantas han sido estudiados a nivel morfológico, de ciclo celular o de expresión génica a nivel global (González-Pérez et al., 2012, pp. 214-217; González- Pérez et al., 2014, pp. 6808-6812). Sin embargo, los efectos de los oligosacáridos de xiloglucanos cuando las plantas estas sometidas a estrés salino no han sido estudiados, en la literatura disponible. Por lo tanto, resulta interesante determinar si estos son capaces de inducir tolerancia en las plantas, específicamente modificando la expresión, cantidad y actividad de la enzima catalasa, lo cual ampliaría sus potencialidades como bioestimulantes (Rodríguez, Menéndez, Fundora y García, 2015, p.113). Es por ello que existe la necesidad de profundizar investigaciones en esta temática, como única alternativa para garantizar el éxito comercial de estos productos.

### **1.3 Justificación**

En vista del impacto remanente de la salinidad, es indispensable la aplicación de distintas metodologías de recuperación de suelos tanto químicas como físicas. Sin embargo, la ineficiencia por parte de estas metodologías y en base a diversos estudios (Mazumder, Lerouge, Louterir, Driouich y Ray 2005, p.238; Palazon, 2010, p.4; Rodriguez et al., 2015, p. 112) se considera que el uso de bioestimulantes podría ser una herramienta útil para disminuir los daños ocasionados por la salinidad en los cultivos de interés agronómico. Pese a la importancia que esta posible aplicación genera y aunque la actividad biológica de algunas oligosacarinas ha sido demostrada *in vivo*, aún no se comprende por completo, la forma en la que actúan estas moléculas.

Por lo antes expuesto, es importante el estudio de los efectos que presentan los XGO sobre la expresión relativa del gen *catalasa*, la presencia relativa de la enzima CAT y su actividad, ya que catalasa es una enzima que se destaca dentro

de la cadena de reacciones enzimáticas que se producen de manera intracelular como respuesta natural al estrés salino y constituye un marcador para determinar estrés oxidativo. Estos efectos podrían contribuir a la interpretación de los mecanismos ejercidos por esta clase de bioestimulante sobre la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Además, podría dar paso a futuras investigaciones dirigidas al estudio de respuestas bioquímicas ejercidas por la planta en los que estos bioproductos sean partícipes.

Tomando en cuenta la importancia de las diferentes clases de bioestimulantes, su aplicación y efectos, en el presente trabajo experimental se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

“Las plantas de *Arabidopsis thaliana* que crecen de forma *in vitro* bajo condiciones de estrés salino con cloruro de sodio, modulan la expresión relativa de los genes *Catalasa (cat)*, la cantidad y la actividad de la enzima que codifica el mismo gen”.

Para cumplir con la hipótesis formulada, se plantearon los siguientes objetivos:

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Comparar los cambios en la expresión génica y enzimática causados por estrés salino en plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacáridos de xiloglucanos.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Determinar la expresión relativa del gen *catalasa (cat)* de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacáridos de xiloglucanos en condiciones de estrés salino mediante PCR en tiempo real.

- Identificar la presencia relativa de la enzima Catalasa (CAT) de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacáridos de xiloglucanos en condiciones de estrés salino mediante ensayos inmunoquímicos.
- Comparar la actividad de la enzima Catalasa (CAT) de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacáridos de xiloglucanos en condiciones de estrés salino mediante ensayos enzimáticos de espectrofotometría.

## 2. Capítulo II. Marco Teórico

### 2.1 Salinidad en los cultivos

La salinidad constituye un problema de degradación de la tierra que el ser humano debe mitigar, intentando prevenir, controlar y/o mejorar las condiciones de los suelos afectados (Otero et al., 2007, p.2). Estos se caracterizan por tener propiedades físico-químicas particulares, como son la conductividad eléctrica superior a  $4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , el porcentaje de sodio intercambiable de 15 unidades y su pH es superior en comparación al de los suelos normales. Además, es conveniente medir la cantidad de extractos de saturación presentes para constatar la presencia de sales en el suelo (FAO, 1988, p.3).

Varias son las causas y ciclos que conllevan a la generación de suelos salinos, por ejemplo, los ciclos de movilización, acumulación y redistribución de sulfatos, carbonatos, cloruros y bicarbonatos sódicos. Estos son el resultado de las distintas condiciones del clima, como la humedad, la posición geomorfológica y el drenaje existente en el suelo afectado (Huerta, 2005, p.19). Por otro lado, los suelos pertenecientes a las llanuras cercanas a bahías y costas, presentan altas cantidades de sales marinas, especialmente el cloruro sódico, puesto que las sales provienen de las capas freáticas, de sales transportadas por el viento y por el agua de las mareas (Alcaraz, 2012, pp. 3-4). De manera similar, las microfallas o fracturas que atraviesan distintos materiales permiten que las aguas freáticas

profundas asciendan y den lugar a la salinización. También ocurre en las deltas de los ríos donde se presentan interacciones entre aguas dulces provenientes de los ríos y el agua salada proveniente del mar (Kölbl et al., 2013, p. 69). Finalmente, distintas actividades humanas contribuyen a la salinización como el empleo de agua de riego, la industria, la minería y la utilización de compuestos agroquímicos (Queensland, 2013, p.1).

Es por ello que se presentan dos tipos de salinidad en los suelos; la salinidad primaria cuyo origen se expone de manera natural, mientras que la salinidad secundaria es el resultado de las actividades humanas (Otero et al., 2007, p.4).

### **2.1.1 Incidencia de la salinidad y riesgos en la agricultura**

La salinización del suelo es uno de los principales riesgos para el desarrollo y el mantenimiento de la actividad agrícola (Toro y Gonzabay, 2015, p.5). Extensas áreas de suelo se ven afectadas por la salinidad primaria, mientras que la presencia de salinidad secundaria crece de manera exponencial. Factores como el cambio climático, la practica inadecuada de la agricultura intensiva, la mala calidad del agua destinada a riego, los sistemas ineficientes de drenaje y la introducción de fuentes de electrolitos, la eliminación de vegetación, entre otras, se involucran con la acumulación de sales en el suelo (Otero et al., 2007, p.4). Hasta el 2008, más de 45 millones de hectáreas de tierras de regadío fueron dañadas por la salinidad y aproximadamente 1.5 millones de hectáreas de producción son gravemente afectadas por la presencia de elevados niveles de sal en el suelo (Toro y Gonzabay, 2015, p.5).

Casi todos los cultivos importantes en el mundo son sensibles a altas concentraciones de sal, generándose un problema que afecta aproximadamente un tercio de las tierras de regadío destinadas a la agricultura y constituye una fuerte limitación para la productividad agrícola a nivel mundial (Jiang et al., 2013, pp. 35-37). Se estima que el 7 % de la tierra se ve afectada por la salinidad y que en el futuro se podría aumentar hasta un 20 % de salinización, como

consecuencia de las distintas actividades y la ineficiente gestión de los suelos (Kiirika, Schmitz y Colditz et al., 2014, p.3). Esta es una dificultad prevalente en varias regiones como en las zonas áridas, las estepas, las regiones climáticas templadas, los trópicos secos y en lugares cercanos a domos, manantiales salinos y mantos freáticos (Mata, Rodríguez, López y Vela, 2014, p. 31). Fundamentalmente, la salinidad se presenta en zonas donde la evaporación de las aguas subterráneas poco profundas constituye el principal componente del balance hídrico. Además, en las zonas donde se originan movimientos ascendentes de las sales contenidas en las aguas subterráneas, debido a que la absorción de agua mediante las plantas excede el nivel de precipitación del suelo. De esta manera se limita la fertilidad química y, a la vez, se confieren características desfavorables a los suelos (Fierro et al., 2014, pp. 1-2). Entre los países con regiones áridas y mayor afectación podemos citar a México, Chile, Egipto, Irán, India, Perú y países de clima húmedo como Bélgica y Holanda (Miliarium, 2004, p.1).

Los suelos salinos experimentan abultamiento cuando se humedecen, posteriormente se endurecen y cuando están totalmente secos presentan una costra agrietada y dura. Este daño reduce la disponibilidad de oxígeno y disminuye la capacidad de oxigenación en la zona radicular de las plantas. Además, los suelos salinos tienen una alta tendencia a la erosión, la que generará la pérdida de suelo y sus nutrientes disponibles (Canfora et al., 2014, p.13).

Las elevadas cantidades de sal asimismo interfieren en la disponibilidad de agua y de nutrientes para las plantas, lo que las afecta tanto en los aspectos fisiológicos como metabólicos (Mata et al., 2014, p. 4). Así también, perjudica la actividad y el tamaño de la composición microbiana disponible en el suelo (Canfora et al., 2014, p. 2). Sumado a esto, la salinidad es responsable de causar el estrés osmótico, el desequilibrio iónico y puede llegar a romper la homeostasis del potencial hídrico en las plantas, lo que conlleva a afectar las actividades que suceden en el citoplasma y las membranas celulares (Alcaraz,

2012, p.4). También, ocurre la acumulación excesiva de sodio en el citoplasma y la deficiencia de iones como el potasio.

### **2.1.2 Modificaciones de las plantas frente al estrés salino**

Las plantas que se encuentran bajo condiciones de estrés salino experimentan cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Munns y Gilliam, 2015, pp. 668-669). Problemas como el bajo crecimiento, quemaduras en las hojas, inhibición de la absorción de nutrientes, agua y nitratos; presencia de áreas foliares pequeñas, bajo número de raíces y hojas, disminución de la fotosíntesis y la acumulación de iones en el interior de los tejidos vegetales, son algunos de los cambios que las plantas presentan a nivel morfológico en presencia de sal (Jian-Kang, 2011, p. 249).

A nivel celular, las plantas desarrollan un extenso número de mecanismos bioquímicos y moleculares. Dentro de las estrategias bioquímicas se incluye el control de la absorción, la acumulación y distribución de iones, los cambios en la fotosíntesis, la síntesis de solutos compatibles, la inducción de enzimas antioxidantes y hormonas vegetales (Parida y Das, 2005, p.326).

Asimismo, altas concentraciones de sal provocan que el nivel hormonal de las plantas incremente, tales como el ácido abscísico (ABA, de sus siglas en inglés *Abscisic acid*), los jasmonatos, las giberelinas, las auxinas, el ácido salicílico, el etileno, las estrigolactonas y las citoquininas. Estas, son las responsables de promover distintas funciones, como el cierre de estomas para detener el flujo de iones, la regulación del crecimiento y la senescencia, el rendimiento de los cultivos y la tolerancia al estrés (Albacete, Martínez y Pérez, 2013, pp. 19-22). ABA es la hormona que predomina bajo condiciones de estrés abiótico y se relaciona estrechamente con ciertas modificaciones en la expresión génica y con la disminución del efecto inhibitorio que tiene el NaCl sobre la fotosíntesis (Osakabe, Yamaguchi, Shinozaki y Tran, 2013, p.p. 36-37). Adicionalmente, La salinidad inhibe la fotosíntesis, ya que se disminuye el potencial de agua. Frente

a esto, ciertas plantas han modificado su modo de fotosíntesis, es decir, cambian de C3 a un metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM de sus siglas en inglés *Crassulacean Acid Metabolism*) o de C3 a C4, de manera que evitan la pérdida de agua que generalmente ocurre por la apertura de estomas, esta medida reduce la pérdida de H<sub>2</sub>O por transpiración (Stepien y Klobus, 2005, p. 32).

Por otro lado, el estrés salino es capaz de imponer déficit de agua sobre las actividades metabólicas. Este déficit conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*), en donde se incluye el peróxido de hidrógeno, el oxígeno molecular y los radicales libres (Parida y Das, p.328). De manera similar ocurre cuando las vías bioquímicas no se encuentran en equilibrio, los electrones que presentan altos estados de energía se transfieren al oxígeno molecular y forman ROS (Miller, Suzuki, Ciftci y Mittler, 2010, p.452). Estas son moléculas de alta toxicidad que pueden generar daños oxidativos en las proteínas, los ácidos nucleicos y en los lípidos (Gar y Machanda, 2009, p.83). También se conoce que, en condiciones normales de crecimiento, se generan bajas cantidades de ROS en los orgánulos celulares, ya que son importantes en procesos de señalización celular durante la fotosíntesis y la respiración (Miranda y Castro, 2009 p.7-10). Mientras que, en presencia de condiciones abióticas desfavorables, la tasa de producción de ROS incrementa drásticamente (Apel y Hirt, 2004, p.5).

La formación de ROS ocurre en orgánulos específicos, por ejemplo, en el interior de los tilacoides de los cloroplastos, en los centros de reacción, tanto del fotosistema I, como del fotosistema II y se da por la limitación de la fijación del CO<sub>2</sub>, en conjunto con la excesiva reducción de la cadena de transporte de electrones (Miller et al, 2010, p.453). Además, en las mitocondrias la cantidad de ROS generada es baja y se origina por el aumento de la respiración mitocondrial durante la exposición a las condiciones de estrés, esto sucede en la cadena de transporte de electrones (complejos I y II) (Ahmad, Jaleel, Salem, Nabi y Sharma 2010, p. 163). Otros orgánulos en los que se generan cantidades considerables de ROS son los peroxisomas como resultado de distintos procesos metabólicos,

la baja disponibilidad de agua en las reacciones, entre otras causas (Del río et al, 1996, p.434).

En vista de ello, como medida de defensa para disminuir la sobreproducción de ROS, las plantas generan sustancias antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Dentro de estas últimas se encuentra el ácido ascórbico, el glutatión, los carotenoides, los flavonoides, los fenoles, entre otros (Pitzschke et al., 2009, p. 120). Del mismo modo, se genera una cadena de reacciones enzimáticas pertenecientes al sistema antioxidante celular. En donde enzimas como la Superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y peroxiredoxina (PRX), son las responsables de la degradación de las especies reactivas de oxígeno (Miller et al, 2009, p.452). Estas enzimas se localizan en casi todos los compartimentos celulares, indicando de esta manera la importancia de la desintoxicación de ROS para la supervivencia celular (Gar y Machanda, 2009, p.83).

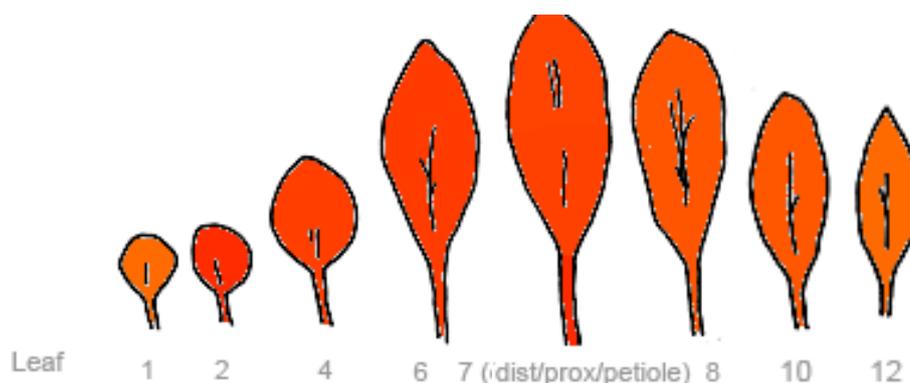
- **Enzima catalasa**

La catalasa (CAT) es una enzima tetramérica, en donde cada monómero presenta un grupo hemo (Gill y Tuteja, 2010, p. 11) y alcanzan una masa de entre 50 a 70 kDa (Tellez, 2015, p.30). Esta enzima es la encargada de transformar el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno molecular ( $O_2$ ), reacción que ocurre en los peroxisomas, en conjunto con peroxidases (Arora et al., 2002, p. 1235).

De esta manera se realiza la detoxificación de ROS, que pueden ser el resultado de los procesos correspondientes al catabolismo de purinas, a la fotorespiración y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (Gar y Machanda, 2009, p.86). Distintas investigaciones en plantas superiores, se han enfocado en el estudio de las isoenzimas de CAT, arrojando distintos resultados. Sin embargo, se presentan fundamentalmente tres isoformas (CAT 1, CAT 2 y CAT 3), las mismas que se distribuyen en cromosomas separados, por lo que, se expresan de manera diferente y se regulan de forma independiente (Tellez, 2015, p.3). Además, CAT

1 y 2 se localizan en el citosol y en los peroxisomas, mientras que la isoforma CAT 3 se ubica fundamentalmente en las mitocondrias (Tellez, 2015, p.3). Por otro lado, se ha evidenciado que estas enzimas presentan una alta tasa de conversión en comparación al resto de enzimas pertenecientes al sistema oxidativo, puesto que tiene la capacidad de convertir aproximadamente seis millones de moléculas de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  por minuto (Gill y Tuteja, 2010, p. 11). CAT se involucra también, en los procesos biológicos de la respuesta celular por presencia de ciertos compuestos como el nitrógeno, los fosfatos y los sulfatos (Suzuqui, 2014, p.259) y respuestas frente a condiciones de estrés oxidativo como el frío, los estímulos de luz, entre otros (Mhamdi et al., 2012, p. 182).

Para evidenciar las respuestas genéticas de las plantas de *Arabidopsis thaliana*, se han estudiado diversos genes, fundamentalmente el gen *catalasa* (TAIR, 2016). En la Tabla 1 se presentan los niveles de la expresión del gen *cat*, utilizando muestras vegetales provenientes del tejido foliar en diferentes niveles (*Figura 1*), cuando la planta no es sometida a ningún tipo de estrés, es decir, en condiciones normales de crecimiento.



*Figura 1.* Material vegetal proveniente del tejido foliar en diferentes niveles de *Arabidopsis thaliana*, utilizados para la obtención de la expresión del gen *catalasa* en condiciones normales de crecimiento.

Adaptado de TAIR, 2016

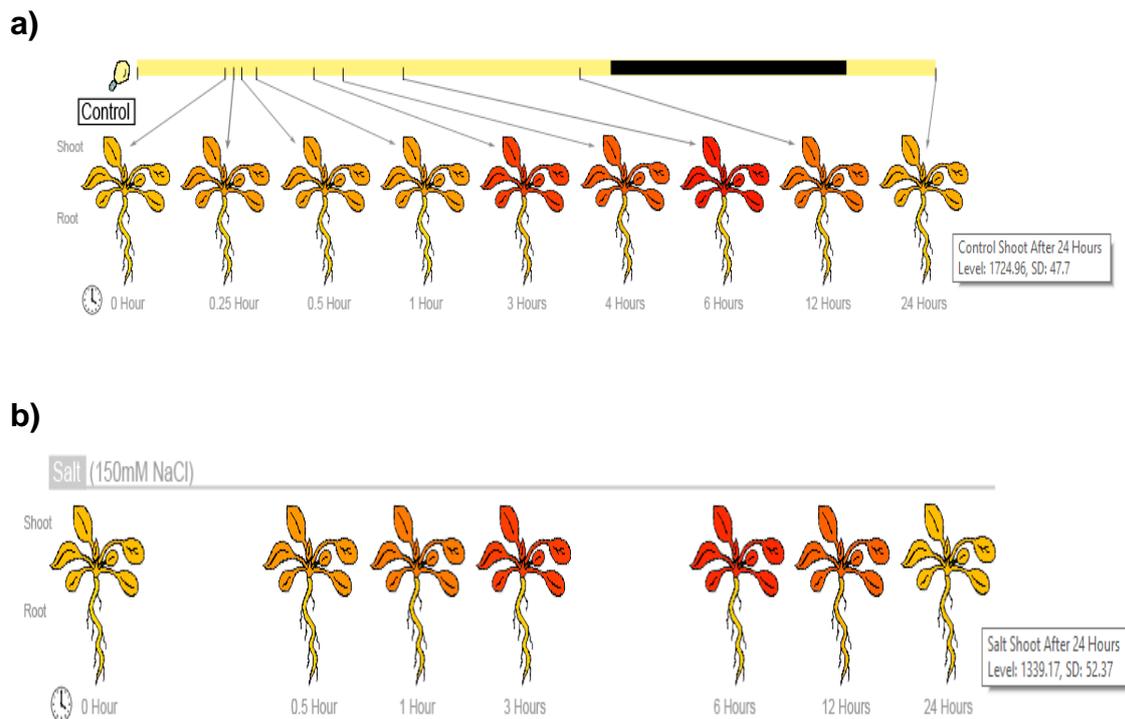
Tabla 1.

Niveles de expresión del gen *catalasa* del tejido foliar en *Arabidopsis thaliana* en condiciones normales

Tejido	Nivel de expresión	Desviación estándar
Leaf 1 + 2	2828.48	139.96
Rosette Leaf 4	3694.55	157.86
Rosette Leaf 6	3750.48	254.56
Leaf 7, Distal Half	3598.6	81.18
Rosette Leaf 8	3249.15	159.52
Rosette Leaf 10	3228.13	101.31
Rosette Leaf 12	2850.63	79.44

Adaptado de TAIR, 2016

Otra experimentación se enfocó en las respuestas de tolerancia generada por las plantas frente a distintas condiciones de estrés abiótico. En el marco del proyecto AtGenExpress de *Arabidopsis thaliana* (Kilian et al, 2007, p. 347) (*Figura 2*).



**Figura 2.** Variación de los niveles de expresión del gen *cat* a distintas condiciones de crecimiento de *Arabidopsis thaliana* en distintos tiempos.

Tomado de TAIR, 2016.

**a)** Nivel de expresión génica en hojas bajo condiciones normales de crecimiento de la planta a las 24 horas.

**b)** Nivel de expresión de *cat* en hojas bajo condiciones de sal (150 mM) a las 24 horas. Donde, level corresponde al nivel de expresión del gen analizado y SD es la desviación estándar.

Esta investigación logro identificar genes que se regulan de manera contemporánea por diferentes estímulos y también compararon patrones de la expresión génica inducida por distintas clases de estrés abiótico. De manera general, las alteraciones causadas por diferentes clases de estrés modulan rápidamente la expresión génica. Por ejemplo, la discrepancia del patrón de la expresión génica inducida por la aplicación continua de sal, demuestra que la planta es capaz de hacer frente a las condiciones de alta salinidad (Kilian et al., 2007, p.351).

### **2.1.3 Métodos tradicionales utilizados en la recuperación de suelos salinos**

Distintos métodos físicos y químicos son empleados para recuperar suelos con presencia de sal. Los resultados al igual que el tiempo requerido, dependerá del método empleado y de los daños presentados en la estructura del suelo (Provin y Pitt, 2012, pp. 3-12).

Es importante el lavado del exceso de sodio (Na) y el posible reemplazo del Na por calcio (Ca), para lo cual se debe disponer de un drenaje eficiente y garantizar que los suelos mantengan una permeabilidad remanente con el fin de que el lavado sea eficiente, de lo contrario sería necesario la aplicación de otras actividades como el arado, la subsolada, entre otras (García, 2015, p. 7). El calcio necesario puede provenir de distintas fuentes, entre ellas de la aplicación de enmiendas químicas que lo proporcionarán al momento de disolverse (yeso, polisulfuro de Ca, altas concentraciones de electrolitos y cal) (Flores et al., 2015, p. 3).

Otra metodología a emplear es la adición de material generador de ácidos, cuya composición presenta carbonatos de magnesio o silicio. Para ellos son necesarios estudios preliminares para determinar si las condiciones del suelo favorecen el desarrollo del proceso generador (presencia de microorganismos oxidantes de azufre, porosidad o humedad óptima) (García, 2015, p.4). Adicionalmente puede emplearse la labranza profunda, que es una técnica que produce una mezcla casi homogénea del suelo, modifica el pH del mismo y aumenta la disponibilidad del agua para las plantas, generando un aumento en el crecimiento de distintos cultivos (Provin & Pitt, 2012, pp. 3-12).

La recuperación de suelos con presencia de sal se puede facilitar cuando se mantienen cultivos de plantas con resistencia o tolerancia a la salinidad en el suelo afectado, por ejemplo la siembra de pastos tolerantes, de esta manera, se mejora la permeabilidad de los suelos, la reducción del Na intercambiable y las variaciones del pH (Provin y Pitt, 2012, pp. 3-12).

#### **2.1.4 Alternativas de recuperación de suelos salinos.**

La salinidad es una condición que altera las propiedades de los suelos, donde a pesar de la aplicación de ciertas técnicas para su recuperación, se ha visto necesaria la búsqueda de otros métodos, cuya aplicación genere mejores resultados en intervalos de tiempos más cortos (Wang et al., 2014, pp.1-9). La aplicación de técnicas de fitorremediación, adición de material orgánico e inóculos microbianos y la adición de material mineral como la zeolita, son métodos actualmente utilizados para mejorar las características tanto físicas, como químicas y biológicas de los suelos (Hernández et al., 2013 pp. 2-11).

Diversos estudios demuestran que la estabilidad estructural del suelo se puede mejorar mediante la adición de materia orgánica como abonos verdes, estiércol, desechos provenientes de aves de corral, desechos de procesamiento de alimentos y compost (Wang et al., 2014, pp. 1-9). Por ejemplo, en la adición de desechos de cultivos de maíz sobre un suelo afectado por sal, se observó que los efectos negativos causados por la salinidad se redujeron notablemente, puesto que el material orgánico actúa directamente sobre la comunidad microbiana y la mineralización (Wang et al., 2014, pp. 1-9). Otra investigación sugiere el uso de zeolita, un recurso mineral cuyas propiedades lo convierten en un factor corrector de suelos deteriorados por presencia de sal (Hernández et al., 2013, pp. 2-11).

Por otro lado, la fitorremediación busca eliminar, transformar o destruir contaminantes del suelo mediante el uso de plantas seleccionadas. Estas se eligen por su potencial fisiológico (presencia de enzimas capaces de tolerar y asimilar sustancias que generalmente resultan tóxicas), la tasa de crecimiento, la profundidad de las raíces y las características de bioacumulación y degradación de contaminantes que tenga la planta (Peña et al., 2013, p. 133).

Otros estudios se centran en la búsqueda de metodologías para mejorar el crecimiento de las plantas en suelos salinos, enfocándose en el análisis de las

bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, de sus siglas en inglés *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) (Compant et al., 2005, pp. 4952-4954). Específicamente estudian cepas que contengan la enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato desaminasa, puesto que ayudan a disminuir los niveles de estrés y mejoran el crecimiento de la planta (Chang et al., 2013, p. 636).

Además, resulta fundamental el desarrollo de nuevas formulaciones de productos, cuya composición incorpore materia orgánica e inorgánica con la finalidad de aumentar el control frente a distintas condiciones adversas en el crecimiento de las plantas (Sharma et al., 2014, pp. 469-470).

## **2. 2 Bioestimulantes**

El decrecimiento de los recursos naturales y el daño ambiental generado por las prácticas agrícolas convencionales se han convertido en una limitación para la agricultura (Le Mire et al., 2015, pp. 1-12). Es por ello que en la agricultura actual se buscan alternativas que disminuyan y/o eliminen la utilización desmesurado de plaguicidas, fertilizantes y reguladores del crecimiento generados por la industria química. Estas alternativas deben garantizar el incremento del rendimiento de los cultivos agrícolas y la tolerancia a los diferentes tipos de estrés que los afectan. Distintos autores proponen y sostienen que la agricultura orgánica y el uso de compuestos de origen biológico, son la visión holística del futuro del campo agrícola, ya que de esta manera se promueve la intensificación de los procesos naturales que logren el aumento de las producciones (Cabrera et al., 2011, p. 34). Una estrategia bajo estudio es el uso de compuestos que promuevan funciones bioestimuladoras y biorreguladoras en el desarrollo de cultivos, los cuales se denominan bioestimulantes (Enríquez et al., 2010, p.27).

### **2.2.1 Significado, composición de los bioestimulantes**

Según el *Consejo Europeo de la Industria Bioestimulante (EBIC, de sus siglas en inglés The European Biostimulant Industry Council)* (2011), “Los

*Bioestimulantes agrícolas incluyen diversas formulaciones de sustancias, compuestos y otros productos, que se aplican a los suelos o a las plantas para regular y mejorar los procesos fisiológicos de los cultivos, aumentando su eficiencia”.*

En este sentido, los bioestimulantes son sustancias de origen orgánico o biológico que tienen la capacidad de mejorar determinadas características fisiológicas y metabólicas de las plantas, al mismo tiempo que les confieren protección frente al estrés biótico y abiótico (Hiromi, 2015, pp. 2-15). Independiente del contenido de sustancias, nutrientes, compuestos o microorganismos por los que estén conformados los bioestimulantes vegetales, cuando son aplicados sobre la rizosfera, las plantas, las semillas o los sustratos de cultivo, actúan sobre el incremento del vigor, el rendimiento, el desarrollo y la calidad de los cultivos agrícolas (Palazon, 2010, pp. 1-9). Además, contribuyen en la expresión del potencial de crecimiento, la floración vegetal y la activación enzimática (Palazon, 2010, pp. 1-9). La efectividad de los bioestimulantes se debe a la formulación por la que están compuestos, ya sean hormonas (generalmente cantidades menores a  $0.1 \text{ g.L}^{-1}$ ), vitaminas, aminoácidos, enzimas, elementos minerales y azúcares. Las concentraciones y formulaciones de estas mezclas estarán en dependencia del origen y preparación de las mismas (Tayupanta, 2011, p. 7). Pese al número extenso de investigaciones que abordan a los bioestimulantes, los mecanismos de acción que estos rigen no son totalmente claros (Trinchera et al., 2014, pp. 1-15).

El uso de estos productos biológicos en la producción agrícola mundial ha incrementado notablemente en los últimos años (Castillo, 2015, pp. 2-3), por lo que es necesario la presencia de organismos reguladores y promovedores de su consumo. Por ejemplo, EBIC promueve la aplicación de los bioestimulantes vegetales en miras de una agricultura resistente y sostenible. Esta organización fue fundada en el año 2011 y obtuvo identidad legal en el 2013, adquiriendo el nombre de “El Consorcio Europeo de la Industria Bioestimulante”, desde entonces, controla a las empresas dedicadas al desarrollo de estos bioproductos

agrícolas y a todas las investigaciones relacionadas que se desarrollan en universidades o institutos independientes, para que los bioestimulantes resultantes se ajusten al reglamento de la Unión europea n° 939/2010, vigente desde el 20 de octubre de 2010 (EBIC, 2014, p. 3). Ciertos datos estadísticos reflejan que, en el 2012, Europa fue el continente donde se produjo el mayor uso de estos bioproductos, ya que más de 6.2 millones de hectáreas fueron tratadas con bioestimulantes y se estima que anualmente los bioestimulantes vegetales presentarán una tasa de crecimiento del 12.5 %, alcanzando los 2,241 millones de dólares en el mercado mundial para el 2018 (Calvo et al., 2014, p. 2).

### **2.2.2 Propiedades y características de los bioestimulantes**

Los bioestimulantes se caracterizan porque generan efectos positivos en el campo agrícola (Malusá y Vassilev, 2014, p. 2) y en los últimos años, esto se ha reflejado en términos económicos (Market and Markets, 2013, p.1). Por lo que, se ha registrado que América Latina es el principal consumidor de bioestimulantes, mientras que, en México se realizan constantes programas de inducción para esta clase de productos (Fuentes y Caballero 2005, p.145). Asimismo, el uso de productos con efecto bioestimulante sobre las plantas, surge desde hace varias décadas atrás, con la finalidad de alcanzar una agricultura más sostenible (du Jardin, 2015, p.3). No obstante, el uso del término bioestimulante como tal, surgió en la década de los noventa y hoy en día, lo que más se conoce de este tipo de productos es su efecto en los cultivos, mientras que, el modo de acción que utilizan, resulta en algunos casos inciertos (Calvo et al, 2014, p.1).

Es por ello, que distintos estudios se centran en la comprensión de las interacciones y reacciones que los bioestimulantes originan en el interior de la planta y las realizadas entre la planta y su entorno inmediato, tanto en condiciones normales, como en condiciones de estrés abiótico. Estas relaciones son la base de la aplicación de los bioestimulantes y del posible reemplazo a los productos sintéticos tradicionales (EBIC, 2012, pp. 3-4). Distintas investigaciones

exponen que, si bien es cierto, los bioestimulantes contienen bajas cantidades de nutrientes, pero que la función principal no es la de proporcionar nutrientes a las plantas (Bonet, 2014, p.60). De manera similar, se caracterizan porque no poseen ninguna acción directa sobre el control de las enfermedades y las plagas, por el contrario, los bioestimulantes se involucran directamente sobre el vigor y la calidad de los cultivos, es decir, se relacionan sobre la mejora de las propiedades biológicas y químicas de las plantas (Villoria, 2014, pp. 60-61). Aunque también pueden intervenir en los procesos de producción de hormonas y reguladores de crecimiento en plantas y para mejorar las condiciones del suelo pueden involucrarse en las actividades de los microorganismos presentes en él (EBIC, 2012, p.4).

Por otro lado, las empresas que trabajan en la producción de los bioestimulantes, al buscar diversificación en su gama de productos, originan procedimientos variados (Villoria, 2014, pp. 60-61). En estos se incluye a las extracciones tanto mecánicas, como químicas, las mezclas, la síntesis de moléculas naturales y los cultivos de microorganismos (Bonet, 2014, p. 61). De esta manera los bioestimulantes contienen diversas formulaciones (compuestos, combinaciones), procesos de producción y aplicabilidad (EBIC, 2011, p.6). En relación a esto, las formulaciones que presentan los bioestimulantes, pueden ser de distinto origen, pero generalmente incluyen sustancias comunes de origen natural, por consiguiente, estas formulaciones no pueden ser patentadas (EBIC, 2011, p.7).

### **2.2.3 Oligosacáridos derivados de la pared celular de plantas**

La pared celular vegetal representa un factor determinante en la estructura de la planta, ya que, proporciona la integridad, la adhesión celular, el soporte físico, la flexibilidad y la textura. Además, se involucra con funciones importante puesto que participa en el crecimiento, el desarrollo, la calidad de los alimentos y la resistencia frente a fitopatógenos (Farrokhi et al., 2006, p.2). La composición de

la pared celular difiere de acuerdo a la función del tejido y la especie de la planta (Gilbert et al., 2013, p.1). Sin embargo, es una estructura compleja formada principalmente de polisacáridos, los mismos que están presentes en aproximadamente el 90 % del peso seco de las paredes celulares primarias, mientras que en las paredes celulares secundarias su presencia es de aproximadamente el 60 % del peso seco (Pettolino et al., 2012, p. 1590).

Aproximadamente el 90 % de la pared celular vegetal está formada de polisacáridos de tipo celulosa, pectinas y hemicelulosas (Fry, 2004, p.642). Siendo la celulosa el componente mayoritario, que forma fibras alineadas y estabilizadas, mediante los puentes de hidrógeno intramoleculares (Enríquez et al., 2010, p.146). En cambio, la pectina está formada por una mezcla de polímeros (Suárez y Orosco, 2014, p.31). Las pectinas abarcan tres dominios principales: ramnogalacturonano I, homogalacturonanos, y ramnogalacturonano II, que a la vez son ricos en arabinosa, galactosa y ramnosa (Fry, 2004, p.642). Finalmente, la hemicelulosa es un heteropolisacárido compuesto por diferentes polímeros de unidades de anhidroazúcares unidas mediante enlaces glucosídicos que forman cadenas más cortas y con ramificaciones (Peña, 2013, p.15). La cadena principal de las hemicelulosas puede estar formada por una sola unidad, los homopolímeros, o puede presentarse de manera heteropolímera, que es el resultado de una cadena principal compuesta de dos o más unidades (Oliva, 2003, p. 5). La hemicelulosa engloba a las pentosas, las hexosas, los ácidos hexurónicos y a las deoxihexosas (Prinsen, 2010, pp. 3-4). Además, el xiloglucano es el elemento principal de la hemicelulosa (Enríquez et al., 2010, p. 147).

Por otra parte, los oligosacáridos son glúcidos compuestos por cadenas cortas de unidades de monosacáridos unidas por enlaces glicosídicos (Melo y Cuamatzi, 2007, p.56). La estructura glicosídica que presente el oligosacárido lo relaciona con funciones biológicas específicas, es decir, existen distintos compuestos dentro de este grupo, que se caracterizan en base a su estructura y a su función (Yamada et al., 2006, p.1).

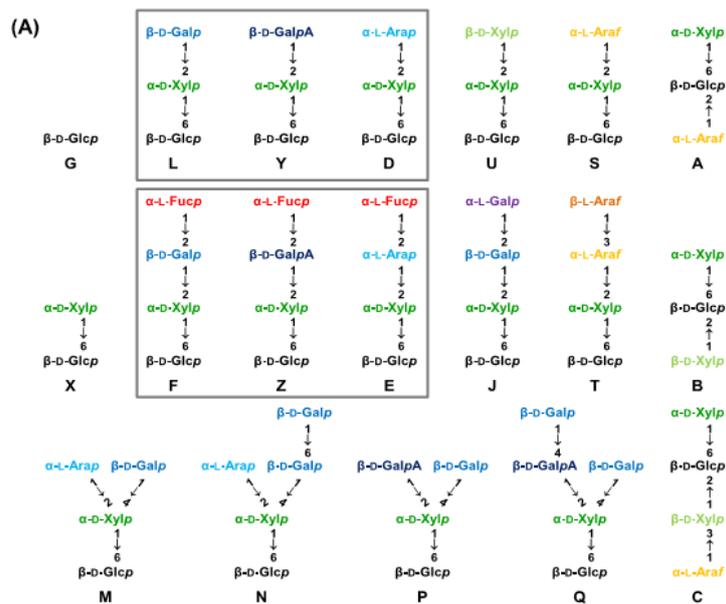
Hace más de 40 años, se descubrió la actividad biológica de los oligosacáridos de la pared celular vegetal (Hahn et al, 1981, p.1662), relacionándolos en funciones como la regulación en las interacciones planta-patógeno y en los procesos morfológicos. El término “Oligosacarinas” fue introducido por Albersheim et al. (1983) para definir a hidratos de carbono presentes en las paredes celulares vegetales, que además de ser polímeros estructurales y de reserva de energía, también son moléculas reguladoras del crecimiento, el desarrollo, la reproducción y en la resistencia a enfermedades en plantas (de Souza, 2012, p.64).

Distintos estudios realizados, demuestran el efecto de las oligosacarinas sobre el desarrollo y el crecimiento de la planta. Así como también, el rendimiento y la calidad en condiciones post cosecha de diversos cultivos (Falcón et al., 2015, p. 115). Por ejemplo, con oligopectanos se ha obtenido que el número de brotes y el enraizamiento incrementa en plantas de caña y banano (Nieves et al., 2006, p.26; Izquierdo et al., 2009, p.1). Mientras que en la uva de mesa causa el incremento de la coloración, por ende el contenido de antocianinas (Ochoa et al., 2011, p. 1929).

Específicamente, los oligosacáridos de xiloglucanos (XGO, de sus siglas en inglés *xyloglucan oligosaccharides*) se derivan de la descomposición de polisacáridos de las paredes celulares (Cabrera et al., 2013, p.201). Tuomivaara et al., (2015) exponen que se conocen las principales características de la mayoría de las glicosiltransferasas responsables de la biosíntesis de XGO, de las transglicosilasas que intervienen en el remodelamiento y de las glicosilhidrolasas relacionadas con la fragmentación de los oligosacáridos derivados de xiloglucanos.

Sin embargo, las características estructurales de todos los XGOs, resulta difícil de determinar. El interés de determinar estos compuestos surge, por el potencial que los XGOs presentan y por sus posibles aplicaciones en los distintos campos

industriales. Así mismo, este grupo de investigación explica que, los XGO presentan una cadena principal formada por la unión de (1,4) residuos de D- Glxp (D-glucosil-oligosacáridos de derivado de xiloglucano). Además, las cadenas laterales son diferentes y típicamente inician por residuos de  $\alpha$ -D-Xylp. Sin embargo, estas cadenas pueden ser sustituidas por otras que contienen hasta cuatro residuos de glucosil. Actualmente, se han descrito 19 tipos de cadena lateral, las mismas que se denotan mediante el uso de códigos de una sola letra (*Figura 3*). Es decir, en la nomenclatura propuesta se utiliza el código de letras para el patrón de sustitución de la cadena lateral.



*Figura 3.* Estructuras químicas y nomenclaturas pertenecientes a las cadenas laterales de D- Glxp.

Tomada de Tuomivaara et al., 2015, p.3

La eficiencia de XGO se refleja en distintas actividades que promueven en las plantas (Colla et al., 2014, p.2). Se encuentran implicados en el crecimiento celular, el metabolismo energético, la señalización celular y molecular en plantas (Enríquez et al., 2010, p.154). En guisantes (*Pisum sativum L.*) promueven el alargamiento del tallo, demostrado en bioensayos donde las cantidades adicionadas de XGO fueron bajas (McDougall y Fry, 1990, p. 1042). En

*Arabidopsis thaliana*, la aplicación de XGOs benefició la elongación de la raíz primaria, unido a una desaceleración en la formación de raíces laterales (González- Pérez et al., 2012, p. 217). En estudios realizados en cultivos celulares de BY-2 de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Bright Yellow*) se observó un acortamiento del ciclo celular mediante la reducción de la etapa G1 en la mitosis (González- Pérez et al., 2014, p. 214).

### **2.2.5 Importancia y aplicación**

En la actualidad, el desarrollo de la agricultura es posible debido al uso de productos de origen químico como plaguicidas, fertilizantes y sustancias que promueven y regulan el crecimiento de las plantas (Alarcón et al., 2000, p.192). La utilización de estos productos radica en los múltiples beneficios que originan, es por ello que esta tecnología química se impuso rápidamente en todo el mundo (Plimmer, 2007, pp. 3-4).

Se ha registrado que los primeros agroquímicos estuvieron disponibles desde la década de los 40's y que cada año se produce aproximadamente 2.5 millones de toneladas de esta clase de productos (van der Werf, 1996, pp.81-96). Además, la aplicación de fertilizantes químicos resulta un método económicamente viable para suministrar nutrientes y minerales a las plantas, pero son algunos los factores que limitan su efectividad. En vista de ello, los agricultores necesitan utilizar altas cantidades de los productos químicos (Halpern et al., 2015, p. 143). Sin embargo, el uso desmesurado de agroquímicos tiene graves inconvenientes que repercuten en el desarrollo agrícola (Alarcón et al., 2000, p. 193). A principios de 1960 comienzan a suscitarse distintas preocupaciones referentes a los efectos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente, desde entonces existe un debate continuo sobre el uso de este tipo de productos (van der Werf, 1996, pp. 81-96).

El impacto ambiental que un agroquímico genera dependerá del grado de exposición, es decir, la dispersión y la concentración resultante en el medio y de

sus propiedades toxicológicas (van der Werf, 1996, pp. 81-96). Por otro lado, el proceso de elaboración industrial de los agroquímicos ocupa un alto consumo energético, lo cual genera emisiones significativas de CO<sub>2</sub> (Halpern et al., 2014, pp.141-174).

En vista de esto, los agroquímicos podrían ser sustituidos por los bioestimulantes, puesto que han presentado resultados benéficos sobre las plantas (Guerrero, 2006, p.2). Estos intervienen en la mayor disponibilidad de nutrientes, la reducción de daños causados por diferentes clases de estrés, el desarrollo de diferentes órganos, en la estimulación de la fotosíntesis en condiciones adversas, en el incremento de la defensa natural de las plantas en presencia de fitopatógenos y también facilitan la síntesis de hormonas como citoquininas, auxinas y giberelinas (Brown y Saa, 2015, p. 2). A pesar de todos los estudios realizados, ciertos mecanismos de acción de los bioestimulantes sobre las plantas son difíciles de demostrar, esto en gran parte a la diversidad de fuentes de las que provienen y de la complejidad del producto final (du Jardin, 2015, pp. 1-14).

Sin duda alguna, los bioestimulantes vegetales contribuyen benéficamente a los agricultores, puesto que mejoran la calidad de los cultivos. Esta mejora también tiene un impacto positivo sobre los procesos de almacenamiento y de conservación de los productos, otorgando a los agricultores más tiempo para elegir el mejor momento para vender sus cosechas a precios ventajosos (Castillo, 2015, p. 2). Además, estos bioproductos ayudan a reducir los residuos de la cadena agroalimentaria, esto implica menores costes, beneficiando al consumidor que tendrá acceso directo a los alimentos de alta calidad a precios asequibles (EBIC, 2014, p.1).

### **2.3 *Arabidopsis thaliana* como planta modelo**

El estudio de organismos modelo ha sobresalido con el propósito de revelar e interpretar los mecanismos moleculares de procesos celulares, las variaciones

genéticas y las consecuencias funcionales que estas provocan (Gasch et al, 2015, p.1).

*Arabidopsis thaliana* pertenece al género de las plantas herbáceas de ciclo anual, de la familia taxonómica *Brassicaceae*, correspondiente al grupo *eudicotyledonous* de plantas vasculares angiospermas (Krämer, 2015, p.1). Fue descrita por primera vez por el médico Johannes Thal en 1577 en Alemania, años posteriores se realizaron distintas investigaciones sobre esta planta debido al potencial de *A. thaliana* como organismo modelo (TAIR, 2016, p.1). A pesar de que no presenta un alto valor agronómico, posee características como el ciclo de vida corto (figura 4), el pequeño tamaño del genoma que se organiza en cinco cromosomas, la fácil producción de semillas, la alta fecundidad de las mismas, la capacidad de autofecundarse, la generación de un gran número de líneas mutantes y el rápido cultivo en condiciones de laboratorio, que hacen de esta planta un organismo ideal para ser tomado como base para distintas investigaciones (Cuesta y Cires, 2014, p. 175).

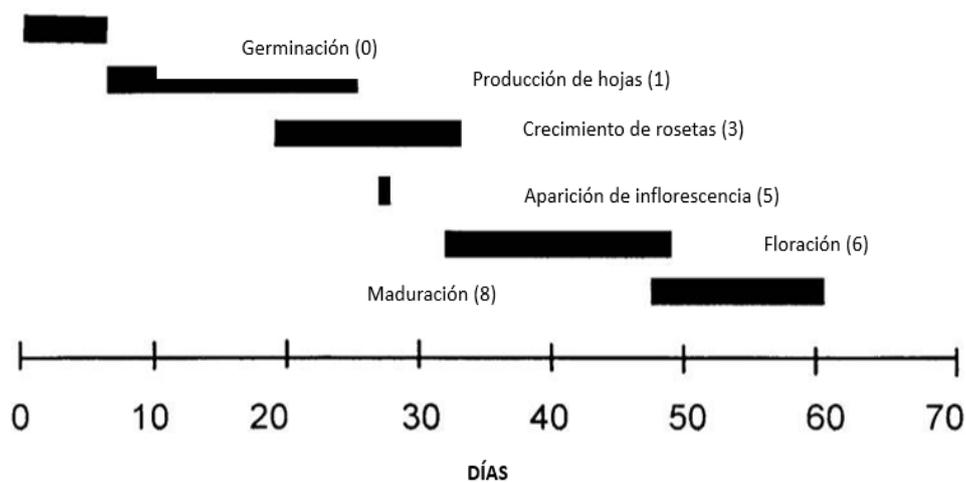


Figura 4. Etapas de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

Adaptado de Boyer et al, 2001, p. 1501.

La libre disponibilidad de la secuencia del genoma de *A. thaliana*, permite el desarrollo de diversas investigaciones, principalmente en el análisis de la expresión tanto transitoria como estable, en la genómica, en la mutagénesis

dirigida, en el análisis de carácter cuantitativo de *locus* y el mapeo genético; en la transcriptómica con el desarrollo de los microarrays; en la proteómica con la identificación y el análisis de proteínas; y en la metabolómica en la identificación y el análisis de los metabolitos y fitohormonas de interés (Cuesta y Cires, 2014, pp. 176-177).

Además, los avances en varias disciplinas han permitido observar la diversidad de ambientes abióticos, en donde *A. thaliana* crece sin presentar dificultades, así como también, la asociación de la planta con ciertas comunidades microbianas fitopatógenas, en contraste, con otras especies vegetales. Esto refleja que *A. thaliana* se aclimata gracias a su fisiología y que evolutivamente se ha adaptado a una amplia gama de entornos (Krämer, 2015, p.10).

### 3. Capítulo III. Diseño del plan experimental

Para el desarrollo del presente trabajo experimental se utilizó una cámara de crecimiento y germinación de plantas DAIHAN Scientific (WISD, Korea), el lector de placas multimodal FLUOstar Omega bAsic (BMG Labtech, Alemania), el termociclador CFX96 *Real-time PCR System* (Bio-Rad, Estados Unidos), la cabina de flujo laminar horizontal OptiMair™ (Esco, modelo OptiMair™, Malasia), la cabina de extracción de gases (Biobase, Estados Unidos), la cámara de electroforesis para proteínas Bio-Rad, el fotodocumentador Chemidoc (Bio-Rad, Estados Unidos), el espectrofotómetro de UV- visible (Thermo Scientific, Estados Unidos) y distintas micropipetas, como los principales equipos. Mientras que, como reactivos químicos se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), sacarosa, cloruro de sodio, tiosocianato de guanidina (*TRI Reagent® Solution*, Ambion), *DNase I RNase free* (Ambion), EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético), agarosa, el juego de reactivos *SuperScript III One-Step RT-PCR System Polymerase* (Life Technology), el inhibidor de proteasas SIGMAFAST Protease Inhibitor Cocktail Tablets (SIGMA- ALDRICH), el juego de reactivos QuantiPro BCA (SIGMA- ALDRICH) y la solución de peróxido de

hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30 % (SIGMA- ALDRICH). Además, los reactivos biológicos del proyecto fueron las semillas botánicas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, ecotipo Columbia 0 y los oligosacáridos de xiloglucanos (XGO de sus siglas en Inglés *Xyloglucan Oligosaccharides*).

Por otro lado, para este trabajo se estableció la concentración de sal (Cloruro de sodio a 100 mM), la presencia o ausencia de 0.1 mg.L<sup>-1</sup> de XGO en el medio de crecimiento y el tiempo como variables independientes (0, 24 y 72 horas posterior a la inducción) (Tabla 2). Mientras que las variables dependientes fueron la expresión relativa del gen *Catalasa (cat)*, la presencia relativa de la enzima Catalasa (CAT) y la actividad enzimática de CAT. Las plantas se crecieron en medio líquido MS (Murashige y Skoog, 1962), sometidos a distintos tratamientos (Tabla 3), considerando como el control del experimento antes de la inducción a la muestra de hojas tomada antes de poner los tratamientos (T<sub>0</sub> o tiempo 0 antes de la inducción).

Tabla 2.

Variables y niveles utilizados en la investigación. Las letras mayúsculas representan las variables independientes y las letras minúsculas representan los niveles.

<b>Variables</b>	A (Tiempo)		B (NaCl)		C (XGO)	
<b>Niveles</b>	a <sub>1</sub>	24 horas	b <sub>1</sub>	0	c <sub>1</sub>	0
	a <sub>2</sub>	72 horas	b <sub>2</sub>	100 mM	c <sub>2</sub>	0,1 mg.L <sup>-1</sup>

En la Tabla 3 se representa el diseño experimental aplicado en la presente investigación con la descripción de cada tratamiento.

Tabla 3.

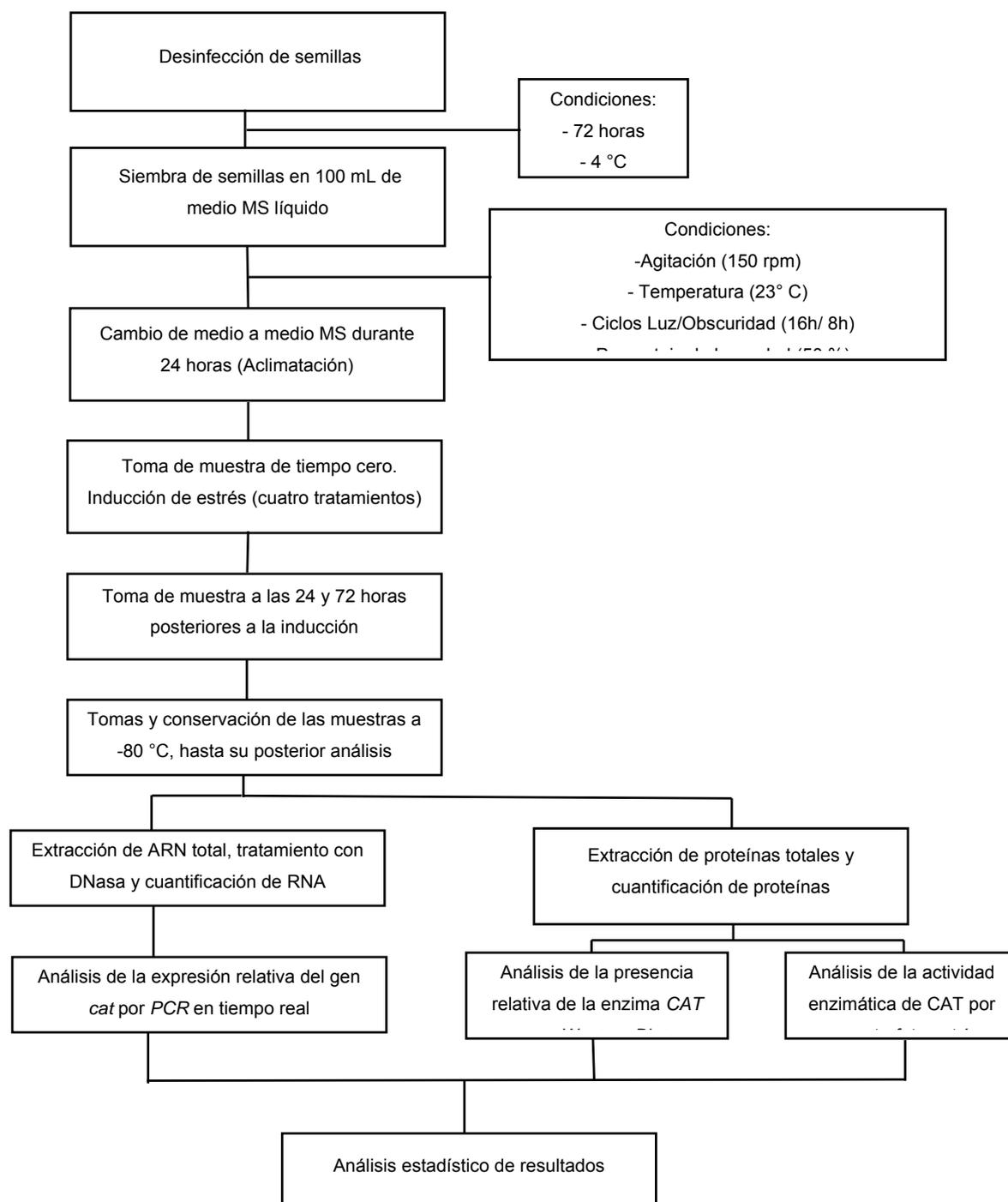
Tratamientos aplicados en la investigación.

Tratamiento	Código	Descripción
T <sub>0</sub>	-	Tiempo cero previo a la inducción
T <sub>1</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	Medio MS sin modificación a las 24 horas
T <sub>2</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>2</sub> c <sub>1</sub>	Adición de 100 mM de NaCl a las 24 horas
T <sub>3</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>	Adición de 0,1 mg.L <sup>-1</sup> de XGO a las 24 horas
T <sub>4</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>2</sub> c <sub>2</sub>	Adición de 100 mM de NaCl + 0,1 mg.L <sup>-1</sup> de XGO a las 24 horas
T <sub>5</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	Medio MS sin modificación a las 72 horas
T <sub>6</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> c <sub>1</sub>	Adición de 100 mM de NaCl a las 72 horas
T <sub>7</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>	Adición de 0,1 mg.L de XGO a las 72 horas
T <sub>8</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> c <sub>2</sub>	Adición de 100 mM de NaCl + 0,1 mg.L <sup>-1</sup> de XGO a las 72 horas

Con el fin de atenuar las variaciones experimentales se mantuvieron iguales todas las condiciones de crecimiento de las plantas y se realizaron tres réplicas biológicas del experimento en momentos distintos.

De las plantas tratadas se extrajo muestras de hojas para los análisis de expresión génica y los análisis bioquímicos. La expresión relativa del gen *cat* se analizó mediante comparación de los valores del coeficiente de cuantificación relativa que se calculó utilizando el modelo matemático de Pfaffl (2001), tomando como referencia, para la normalización, al gen de control endógeno *actina 2* y al T<sub>0</sub> como control para la expresión relativa. Por otro lado, la presencia relativa de la enzima CAT se evaluó de manera cualitativa por la señal observada por quimioluminiscencia con respecto al T<sub>0</sub>. La actividad de la enzima se realizó en base a la medición de la absorbancia de manera espectrofotométrica e igualmente se comparó con respecto al T<sub>0</sub>. Adicionalmente, se realizó una prueba de normalidad de datos de Shapiro- Wilk utilizando el software SPSS (Pedroza y Dicovalskyi, 2006, p.14). Complementariamente, se realizó pruebas estadísticas de contraste de diferencias significativas (U de Mann- Whitney). Todas con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

En la *Figura 5* se presenta el diagrama de bloques de la metodología realizada para cumplir con los objetivos del presente trabajo experimental.



*Figura 5.* Diagrama de metodología a ser utilizada para los análisis moleculares de la expresión relativa del gen *cat*, de la presencia relativa de la proteína CAT y la actividad enzimática de CAT.

## 4. Capítulo IV. Procedimientos

### 4.1 Determinación de la población y muestra

La población de plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizada en este trabajo fueron todas las sembradas para cada tratamiento evaluado (Tabla 3). Por lo tanto, para los cuatro tratamientos evaluados en el experimento se sembraron dos frascos de cultivo para cada uno de los tiempos a analizar, los que contenían de 20 – 30 semillas, un total de 8 frascos, más dos adicionales correspondiente al tiempo 0 ( $T_0$ ) o control antes de la inducción. La muestra fue 5 hojas procedentes de plantas distintas dentro de un mismo tratamiento, por lo que cada frasco representó una muestra diferente.

### 4.2 Selección de instrumentos de medición

El equipamiento utilizado en el presente trabajo experimental se encuentra localizado en el laboratorio de investigaciones de la Dirección General de Investigación (DGI) de la UDLA, por lo que son usados únicamente para fines de investigación y son operados por un técnico especializado que verifica diariamente el buen funcionamiento y los parámetros de los mismos.

Los principales instrumentos analíticos utilizados se describen a continuación.

- **Cámara de Crecimiento y Germinación de plantas**

El crecimiento bajo condiciones controladas de las plantas utilizadas en este experimento se desarrolló en una Cámara de Crecimiento y Germinación (DAIHAN Scientific, modelo WISD, Corea).

Este es un equipo automatizado las 24 horas, controla las condiciones requeridas como la humedad y la distribución uniforme de luz. No necesita de reprogramaciones y su estructura facilita el acceso y la visualización a su interior. La cámara de cultivo fue necesaria para la experimentación, ya que permitió

controlar las condiciones del crecimiento *in vitro* de *Arabidopsis Thaliana* que fueron una temperatura de 23 °C, ciclos Luz/obscuridad 16h/8h, respectivamente, y el porcentaje de humedad relativa al 50 %. De esta manera se garantizó que las réplicas biológicas realizadas no presentaran variación en cuanto a la germinación y el crecimiento entre ellas.

- **Lector de placas multimodal**

La cuantificación del ARN y proteínas obtenidas a partir de las muestras de plantas se realizó mediante el lector de placas multimodal (BMG LABTECH GmbH, modelo FLUOstar Omega, Alemania). Este es un lector que presenta cinco modos de detección, como son la intensidad de fluorescencia, la luminiscencia, la absorbancia UV/Vis, la fluorescencia en tiempo resuelto y la AlphaScreen®/AlphaLISA® (BMG Labtech, 2016, p. 2). La confiabilidad del equipo radica en los mantenimientos y pruebas de control que constantemente se realizan (Ej., la cuantificación de ADN control (Lambda DNA) de invitrogen™).

- **Termociclador de PCR en tiempo real**

Las reacciones de síntesis de la cadena complementaria de ARN (ARNc) y posterior amplificación en tiempo real del ADN se desarrolló en el Termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, modelo CFX96, Estados Unidos).

Este sistema combina una avanzada tecnología óptica con un control térmico preciso y, en consecuencia, es un equipo que ofrece una detección altamente sensible y fiable (Bio-Rad, 2013, p. 7). Además, es compatible a herramientas avanzadas de análisis de datos, como es el software CFX Manager™, en el que se configuró las condiciones necesarias para la amplificación.

- **Fotodocumentador**

La calidad del ARN extraído, la visualización del gel de proteínas y el revelado de las membranas del *Western Blot* se analizaron con el uso del equipo Fotodocumentador Chemidoc™ MP (Bio-Rad, Estados Unidos). Éste se caracteriza por la detección de alta sensibilidad, por lo que arroja resultados

confiables y posee múltiples métodos de detección destinados para una amplia gama de muestras. El sistema puede ser controlado mediante el software Image Lab™ que permite optimizar el rendimiento de la captura y el análisis de las muestras. Además, es un sistema pre-calibrado que garantiza un beneficio constante, y reproducible (Bio-Rad, 2010, pp.1-2).

- **Espectrofotómetro**

La actividad de la enzima catalasa fue obtenida a través de la lectura de la absorbancia en una longitud de onda de 240 nm, para lo cual se utilizó el espectrofotómetro de UV- visible (Shimanzu, modelo UVmini-1240, Australasia). La accesibilidad de su software para un control directo y por medio del ordenador, permiten que el equipo se mantenga actualizado (Shimanzu, 2016, pp.4-5).

Los instrumentos analíticos utilizados en la presente investigación, son calibrados con una frecuencia anual y cuentan con el soporte técnico de los proveedores para cualquier falla técnica o reparación inmediata.

### **4.3 Procedimientos para obtención de datos**

#### **4.3.1 Obtención de la muestra vegetal**

Para este trabajo experimental se emplearon semillas botánicas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, ecotipo Columbia 0, y oligosacáridos de xiloglucanos (XGO de sus siglas en inglés *Xyloglucan Oligosaccharide*), los cuales fueron obtenidos y cedidos gentilmente por el Dr. Juan Carlos Cabrera (Unité de Biotechnologie, Materia Nova, Bélgica).

Los XGO fueron extraídos a partir de semillas botánicas de tamarindo (*Tamarindus indica* L.), donde, su purificación, caracterización y composición de la mezcla son los descritos por González -Pérez et al., 2014.

Se preparó medio de cultivo líquido MS (Murashige y Skoog, 1962, pp. 473-497) para el crecimiento de *Arabidopsis Thaliana* de manera *in vitro*, ya que contiene macronutrientes, micronutrientes y vitaminas requeridos (Sigma- Aldrich, 2015, p.1). Se prepararon un total de 10 frascos Erlenmeyer, con 100 mL cada uno. Cabe mencionar que, los frascos utilizados tenían la misma capacidad de volumen (300 mL) con el fin de evitar variaciones en las condiciones de crecimiento. Para un volumen de 100 mL de medio líquido MS, se disolvió 0.43 g de sales MS (Sigma- Aldrich), 3 g de sacarosa en agua destilada y el pH del medio se ajustó entre 5.7 y 5.8. Los recipientes que contenían los medios líquidos MS se esterilizaron siguiendo el programa para líquidos del esterilizador Hirayama (Hirayama, modelo HVA-110, Japón) que fue de calentamiento-esterilización- escape de vapor automático, enfriamiento y finalización (Amerex Instruments Inc., 2014, p.1).

De manera simultánea, se realizó la desinfección de las semillas botánicas de *Arabidopsis thaliana* (L.). Se tomó una alícuota de estas y se colocaron en un microtubo de 1,5 mL al que inmediatamente se le adicionó una solución de cloro y agua destilada (1:10 v/v) en un volumen de 1 mL, se mezcló mediante vórtex y se las dejó reposar por el tiempo de 5 minutos. Se le retiró la solución añadida y se le agregó una mezcla de composición de etanol, agua destilada y cloro en proporción 7:2:1 (v/v). Se repitió el proceso de mezclado y de reposo anteriormente mencionado. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, siguiendo el mismo proceso de mezcla y reposo con una diferencia de 5 minutos entre cada lavado. Finalmente, las semillas desinfectadas permanecieron sumergidas en agua estéril y fueron almacenadas a 4 °C durante 72 horas hasta la siembra en los medios líquidos, ya que se conoce que estas condiciones permiten la germinación uniforme de las semillas (Russell et al., 2002, p.1)

Transcurrido este tiempo se procedió a sembrar las semillas previamente desinfectadas en los medios líquidos MS ya preparados. Con la ayuda de una micropipeta de 1000 µL, se depositaron de 20 – 30 semillas en los frascos Erlenmeyer y al finalizar estos fueron sellados con papel aluminio y parafilm. Esto

se realizó bajo condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar horizontal OptiMair™ (Escó, modelo OptiMair™, Malasia). Posteriormente, los frascos fueron dispuestos en un agitador orbital (Thermo Scientific, Estados Unidos) a 150 rpm en el interior de la incubadora de plantas (DAIHAN Scientific, modelo WISD, Corea), bajo condiciones controladas de luz oscuridad, 16 – 8 horas respectivamente, a 23 °C, con 50 % de humedad relativa, durante 15 días.

Transcurridos los 15 días, se reemplazó el medio de cada uno de los frascos por medio MS fresco. Esta actividad se realizó con la finalidad de proveer a las plantas sustancias nutritivas nuevas y de evitar la inducción de algún tipo de estrés a las mismas debido al agotamiento de nutrientes. Los frascos fueron colocados nuevamente en la incubadora (Thermo Scientific) bajo las condiciones especificadas anteriormente, por un tiempo de 24 horas el cual fue denominado como periodo de aclimatación, puesto que el objetivo era que las plantas estuvieran en un medio con condiciones óptimas de nutrientes antes de someterlas a estrés. Posterior a este tiempo se procedió a realizar la inducción de los tratamientos (Tabla 4), tomando en cuenta la concentración de sal (Cloruro de sodio a 100 mM), la presencia o ausencia de 0.1 mg.L<sup>-1</sup> de XGO tanto para el tiempo de 24 horas como para el tiempo de 72 horas después de la inducción.

Tabla 4.

Disponibilidad de los medios líquidos con sus respectivas concentraciones.

Número de frascos	Medio	Concentración del medio
2	MS	Medio MS sin ninguna modificación en su composición luego de la aclimatación
2	MS con cloruro de sodio (NaCl)	Adición de 100 mM de NaCl
2	MS con oligosacáridos de xiloglucanos	Adición de 0,1 mg.L <sup>-1</sup> de XGO
2	Medio MS con oligosacáridos de xiloglucanos y cloruro de sodio	Adición de 0,1 mg.L <sup>-1</sup> de XGO + 100 mM de NaCl

La toma de todas las muestras, tratamientos y control, se realizó bajo condiciones de esterilidad en la cabina de flujo laminar horizontal OptiMair™ (Esco, modelo OptiMair™, Malasia). Para ello se tomaron 5 hojas procedentes de plantas distintas dentro de un mismo tratamiento y se las colocó en microtubos de 1.5 mL. Se tomó un total de 10 tubos por cada frasco para tener suficiente material para el análisis de ARN y proteínas. De manera inmediata se colocó la muestra tomada en nitrógeno líquido y se almacenó en un ultracongelador a - 80 °C (VWR International, España), hasta su procesamiento.

El procesamiento de las muestras fue diferente, tanto para el análisis de la expresión relativa del gen *cat*, para el análisis de la presencia relativa de la enzima CAT y para el análisis de la actividad enzimática de la enzima CAT.

#### **4.3.2 Procesamiento de la muestra para el análisis de la expresión relativa del gen *cat***

En primer lugar, se realizó la extracción de ARN total, para lo cual se utilizó como reactivo principal el tioisocianato de guanidina (*TRI Reagent® Solution*) (Ambion,

Life technologies, Estados Unidos). Este procedimiento se realizó en una cámara de extracción de gases marca Biobase (modelo FH1500, China).

Previo a la extracción, cada muestra se mantuvo en nitrógeno líquido para su enfriamiento, mejor macerado y evitar la degradación del ARN. Seguidamente, a cada tubo se le agregó 1 mL de *TRI Reagent® Solution* y se homogenizó con la ayuda de pistilos estériles. Una vez que las muestras fueron correctamente maceradas, se las incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, se les agregó 200 µL de cloroformo a cada microtubo, se agitó manualmente por inversión durante 15 segundos y se los incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente, las muestras fueron sometidas a centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C en una centrífuga refrigerada 5804 R marca Eppendorf. Posteriormente, se extrajo la fase inorgánica y se las colocó en diferentes microtubos estériles que contenían 300 µL de alcohol isopropílico. Se incubó por un tiempo de 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 rpm a 4° C por 10 minutos. Se removió el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol absoluto para precipitar los ácidos nucleicos. Mediante vórtex se mezcló y se procedió a centrifugar a 7.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se dejaron secar los precipitados por 45 minutos. El precipitado de ácidos nucleicos resultante en cada microtubo se resuspendió con 40 µL de agua libre de ARNasa. Se incubó a 55 °C por 10 minutos para facilitar la resuspensión del precipitado.

El ARN extraído se trató con *DNase I RNase free* (Ambion, Life technologies, Estados Unidos) para eliminar el ADN residual durante la purificación. Para ello se adicionó 4 µL de 10X *DNase I* tampón y 1 µL de *DNase I* ( $2 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) y se incubó a 37 °C por 1 hora. Consecutivamente, se utilizó EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) en una concentración de 5 mM para la inactivación de la enzima. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1 % a 100 voltios) de voltaje constante por 30 minutos, con el fin de determinar la calidad del ARN extraído (Sambrook y Russel, 2001, p.p. 1-34). Asimismo, se cuantificó el ácido nucleico mediante espectrometría haciendo uso del lector de

placas multimodal (BMG LABTECH GmbH, modelo FLUOstar Omega, Alemania) en un barrido de 230, 260, 280 y 340 nm, y la concentración del ARN total se estableció en unidades de  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ . Además, la pureza del ARN se valoró en base a la relación 280-260 arrojada por el equipo, la cual debía encontrarse entre 1.8-2.0 (Sambrook y Russel, 2011, p.p. 1-34).

Finalmente, se procedió a realizar la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, de sus siglas en inglés *Reverse transcription Polymerase Chain Reaction*) en tiempo real, para lo que se diluyeron las muestras con el fin de que éstas presentasen una misma concentración de  $300 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ . Los cebadores utilizados para el gen *cat* fueron diseñados por medio del programa primer 3, disponible *on line* ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)). Su diseño se basó en la secuencia expuesta en la base de datos TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, <https://www.arabidopsis.org/>). También, se procedió a calcular los parámetros óptimos de cada cebador como la temperatura de fusión ( $T_m$ ), trectos de polipurinas (A, G) y pirimidinas (C, T), secuencias complementarias y secuencias 3' terminales, mediante el programa OligoAnalyzer 3.1 disponible de manera libre *on line* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). La secuencia y características de los cebadores empleados para el gen *cat* se detallan en la tabla 5 y el anexo 1.

Tabla 5.

Cebadores específicos diseñados para la amplificación del gen que codifica para la enzima *catalasa*. En donde D: Directo; R: Reverso; pb: pares de bases; Ini.: Posición de inicio; Lg.: longitud del oligo; Tm: Temperatura de fusión y %G-C: Porcentaje de guanina- citosina.

Nombre del Gen	No. Accesoión TAIR	Secuencia (5'-3')	Longitud del fragmento	Características			
				Ini.	Lg	Tm	% G-C
<i>Catalasa</i> 3	AT1G20620	D: GATCATGGGCACCAGACAGG	148 pb	514	20	63.8	60.0
		R: CGGCTTGCAAGTTTCTGTCC		661	20	63.1	55.0

Los cebadores del gen constitutivo usado en este estudio se obtuvieron de la casa comercial Sigma-Aldrich®, con número de referencia C 3615 para la pareja control de *Arabidopsis thaliana* del gen *Actina-2* (ACT, At3g18780). El juego de cebadores del gen *Actina-2* está diseñado como un control para genes que se expresan en alta abundancia y está destinados para uso como control interno de la PCR en tiempo real cuantitativa en el análisis de expresión de cualquier gen de *Arabidopsis*.

La síntesis del ADN complementario (ADNc) y la amplificación del gen *cat* se efectuó en un solo paso mediante el juego de reactivos *SuperScript III One-Step RT-PCR System Polymerase* (Life Technology), siguiendo el protocolo adjunto al mismo. Se preparó 24 µL por reacción, en donde se incluyó 0.5 µL de cebador directo, 0.5 µL de cebador reverso, 1 µL de ARN de cada tratamiento a una concentración de 300 ng.µL<sup>-1</sup>; 12.5 µL de 2X SYBR® *Green Reaction Mix*, 0.5 µL de la enzima *SuperScript® III RT/Platinum® Taq* polimerasa y se adicionó agua PCR hasta completar el volumen requerido.

La amplificación se llevó a cabo en el equipo CFX96 *Real-time PCR System* (Bio-Rad), bajo las siguientes condiciones de amplificación:

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

La curva de *menting* o curva de temperatura de fusión, se realizó con su iniciación a los 65 °C hasta los 95° C con un incremento de 0.5 ° C cada 10 segundos.

Dentro de la placa de PCR se colocó cada muestra por triplicado y el análisis de amplificación se realizó en base a los promedios de los valores dados de cada ciclo de cuantificación (Cq o Ct). Dichos valores fueron arrojados por el equipo en relación al método de base autocalculado y al límite simple, parámetros específicos que son determinados para el SYBR en uso. Los cálculos realizados con los datos obtenidos se describen en el acápite 4.4 de este capítulo.

#### **4.3.3 Procesamiento de la muestra para el análisis de la presencia relativa de la enzima CAT**

Las muestras destinadas para el análisis bioquímico se encontraron dispuestas en microtubos de 1.5 mL y se homogenizaron con la ayuda de pistilos estériles. Simultáneamente, se agregó 50 µL de una solución salina tamponada con fosfato 1X a pH 7,2 (PBS: 0,115 % de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,02 % de KCl, 0,8 % de NaCl y 0,02 % de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Esta contenía además el inhibidor de proteasas SigmaFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Sigma- Aldrich, Estados Unidos) en una concentración de 5X, con el fin de evitar la degradación de las proteínas presentes en las muestras por la acción de proteasas endógenas. Posterior a la homogeneización, las muestras se centrifugaron en una centrífuga refrigerada (Eppendorf, modelo 5804/5804 R, Brasil) a 14.000 rpm durante 30 minutos y 4 °C. Se tomaron los sobrenadantes y se pasaron a microtubos limpios.

- **Cuantificación de las proteínas**

Previo a la electroforesis de proteínas e identificación inmunoquímica, se realizó la cuantificación de las proteínas totales de las muestras. Para lo cual, se utilizó el juego de reactivos QuantiPro BCA (Sigma- Aldrich, Estados Unidos), que aplica un método colorimétrico basado en el ácido bicinconínico (BCA, de sus siglas en inglés *Bicinchoninic Acid*). Se preparó la solución de BCA, formada por 25 partes de tampón, 25 partes de reactivo BCA y 1 parte del reactivo de cobre. Consecuentemente, se colocó 200  $\mu$ L en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos marca Sterilin, de la solución de BCA preparada. Esto se realizó en un número de tres pocillos para cada muestra y el estándar.

Para la curva de calibración se utilizó una solución de proteína de suero bovino (BSA, de sus siglas en inglés *Bovine Serum Albumin*) de concentración 2 mg.mL<sup>-1</sup>, en un rango de 0 a 10  $\mu$ g de proteína. Por otro lado, de los extractos de proteína total, se preparó una solución de muestra procesada/ PBS 1X en proporción 1:20 y de esta solución se colocó 5  $\mu$ L en cada pocillo de una microplaca que contenía 200  $\mu$ L de la solución de BCA. Posteriormente, la microplaca con las muestras y los estándares, se incubó a 37 °C por 30 minutos en una incubadora marca Labnet international, Inc (I5311-DS, Estados Unidos) y, mediante un lector de placas multimodal marca BMG LABTECH FLUOstar Omega (GmbH, Alemania), se midieron las absorbancias a 560 nm.

- **Electroforesis SDS- PAGE de las proteínas**

Una vez obtenidas las absorbancias de las muestras y haciendo uso de la curva standard realizada, se obtuvieron las concentraciones iniciales de proteína total de cada muestra. El análisis inmunoquímico se realizó mediante la técnica de *Western Blot* de los extractos totales proteicos de todas las muestras. En primer lugar, se efectuó la separación de las proteínas mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), usando un método de Laemmli (Laemmli, 1970, p.p. 680-685).

Se preparó dos geles por cada réplica biológica, los mismos que presentaban un diámetro de 1mm y una concentración final de acrilamida del 12 %. Los compuestos y cantidades requeridos para la preparación de los geles desnaturizantes se describen en la Tabla 6.

Tabla 6.

Componentes de un gel desnaturizante de poliacrilamida: gel separador y gel concentrador.

Compuesto	Gel separador	Gel concentrador
H <sub>2</sub> O destilada	1,26 MI	1,4 mL
Acrilamida/bis-acrilamida 30 %	2,5 MI	335 µL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,24 MI	-
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

Para cargar las muestras, se prepararon las proteínas a una concentración final de 20 µg y se les adicionó 1 µL de tampón de carga 5X (0,5 mL de Tris 1M pH 7, 2 mL glicerol, 2,5 mL SDS 20 %, 500 µL β-mercaptoetanol, 0,2 mL de azul de bromofenol y H<sub>2</sub>O destilada hasta un volumen de 10 mL). La mezcla fue sometida a calentamiento en un bloque térmico (Labnet International, Inc., Estados Unidos) a 95 °C por cinco minutos. Transcurrido ese tiempo, las muestras fueron dispuestas sobre los carriles del gel desnaturizante que se encontraba en el sistema Mini-PROTEAN® Tetra vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Estados Unidos) con tampón de corrida 1X (30,3 g Tris base, 50 mL SDS 20 %, 144 g glicina y H<sub>2</sub>O destilada hasta llegar al volumen de 1 L). Adicionalmente, se cargó un marcador de peso molecular (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para estimar los pesos de las proteínas. La corrida se realizó a un voltaje de 150 V durante 90 minutos.

- **Método de inmunodetección**

Los geles corridos fueron utilizados para la transferencia de proteínas hacia las membranas de transferencia Fluoruro de polivinilideno (PVDF, de sus siglas en inglés *Polyvinylidene Difluoride*). En primer lugar, se preparó el tampón de transferencia 1X (25 mM Tris, 10 % metanol y 192 mM glicina) y se remojó la membrana en metanol al 95 % durante al menos 10 minutos. El tampón se colocó en un contenedor y se prosiguió a montar el sistema, de manera que se apiló sobre el casete de soporte la esponja, seguido por el papel filtro, el gel, la membrana y sobre ésta se colocó un papel filtro y una esponja. La membrana tomó la orientación hacia el cátodo y el gel hacia el ánodo y el sistema utilizado fue el Mini Trans-Blot® (Bio-Rad, Estados Unidos).

Una vez preparado el sistema, se colocó en la cámara de electroforesis y se adicionó tampón de transferencia 1X hasta cubrirla. También se colocó un bloque de hielo con el fin de conservar baja la temperatura. La cámara se colocó sobre una plancha de agitación marca Isotemp® (Fisher Scientific, Estados Unidos), con agitación a 200 rpm, con el fin de mantener una temperatura uniforme durante la transferencia y la transferencia se realizó en el cuarto frío a 4 °C. El voltaje programado en la fuente de poder fue de 100 V, durante 1 hora (Bio-Rad, 2016, p.10).

Posterior a la electrotransferencia, las membranas fueron colocadas en distintos recipientes, para el paso de bloqueo, con una solución de leche descremada al 5 % durante dos horas. Transcurrido ese tiempo, la primera membrana se incubó con anticuerpo primario anti-catalasa (AS09 501, Agrisera, Suecia) y la segunda membrana con anticuerpo anti-Actina-11 (AS10 702, Agrisera, Suecia) como control de referencia o control positivo, durante 24 horas a 4 °C en agitación. Las características de los anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7.

Anticuerpos utilizados en el ensayo inmunoquímico.

Nombre del anticuerpo	No. Accesoión Agrisera	Dilución recomendada	Peso Molecular Aparente	Características
<i>Catalase / CAT</i>	AS09501	1:1000	55-57 kDa	Anticuerpo primario policlonal que reconoce las tres isoformas de catalasa en <i>Arabidopsis thaliana</i> .
Actin 11	AS10 702	1:2000	41.6- 45 kDa	Anticuerpo primario monoclonal purificado por afinidad que reconoce la proteína actina (proteína altamente conservada).
Goat anti-Rabbit IgG (H&L), HRP conjugated	AS09602	1:25000	-	Anticuerpo secundario purificado por cromatografía de inmunoafinidad (antígeno-específico).

Consecuentemente, el anticuerpo fue retirado y se procedió a realizar tres lavados, con 15 minutos de diferencia entre cada uno de ellos, utilizando PBS 1X con tween 20 (2 mL de tween en 1 L de PBS 1X). Nuevamente, las membranas se sometieron a un proceso de incubación, para lo que se utilizó el anticuerpo secundario anti- IgG de conejo (H&L), HRP conjugado (AS09602, Agrisera, Suecia) en una dilución 1:25.000 (Tabla 4), con agitación constante durante dos horas. Seguidamente se realizaron tres lavados de manera similar a lo mencionado anteriormente e inmediatamente se adicionó la solución de quimioluminiscencia (Thermo Scientific, Estados Unidos) y se incubó durante un minuto.

Finalmente, la membrana se colocó en el fotodocumentador Chemidoc MP imaging system (Bio-Rad, Estados Unidos) y se utilizó el software Image Lab™ (versión 5.2), con la aplicación Blots-Chemi, para detectar las bandas y revelar la cantidad relativa de las proteínas presentes en cada membrana.

#### **4.3.4 Procesamiento de la muestra para el análisis de la actividad enzimática de Catalasa**

Las muestras destinadas para el análisis de la actividad enzimática de catalasa se colocaron en microtubos de 1.5 mL y se realizó la homogenización en presencia de PBS 1X que contenía inhibidor de proteasas *SIGMAFAST Protease Inhibitor Cocktail Tablets*. La centrifugación, la recolección del sobrenadante y la cuantificación de proteína total se realizó bajo las mismas condiciones y cálculos mencionados en el apartado 4.3.3 para la cuantificación de proteínas.

Independientemente, se prepararon dos soluciones stock: la primera (solución A) se preparó con 0.70 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en 100 mL de agua destilada. La segunda (solución B) se preparó con 0.80 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 100 mL de agua destilada. Adicionalmente, se preparó una solución de trabajo formada por 39 mL de solución A y 61 mL de B, a un pH de 7 y finalmente se aforó con agua destilada hasta llegar al volumen de 200 mL. Así mismo, se tomó 0.6 mL de la solución de peróxido de hidrógeno al 30 % (Sigma- Aldrich, Estados Unidos) y se llevó a un volumen final de 100 mL con la solución de trabajo.

Una vez que se prepararon las soluciones requeridas y listas las muestras, en una cubeta de cuarzo se colocó 1.5 mL de solución de trabajo y se dispuso en un espectrofotómetro UV- visible (Shimadzu, modelo UVmini-1240, Australasia) para realizar la medición de la absorbancia (longitud de onda de 240 nm). Consecuentemente, se colocó en una cubeta de cuarzo 990  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo, inmediatamente se agregó 500  $\mu\text{L}$  de la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 10  $\mu\text{L}$  de la muestra. Con el fin de homogeneizar la mezcla, se invirtió cuidadosamente la cubeta haciendo presión con el dedo pulgar y se midió la absorbancia, esto se realizó por triplicado para cada muestra. La medición se realizó tomando en

cuenta un tiempo de 10 segundos como tiempo inicial y 70 segundos como tiempo final.

#### 4.4 Pruebas de confiabilidad de datos

##### 4.4.1 Análisis de la expresión relativa del gen *cat*

Se conoce como cuantificación relativa al cambio de la expresión del gen diana en relación a un grupo de referencia, por ejemplo, la comparación con un control negativo, una muestra de tiempo cero de la investigación o un gen normalizador (Livak y Schmittgen, 2001, p. 402).

La expresión relativa de un gen de interés en relación con otro de referencia, por ejemplo, puede ser calculada mediante los valores de delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ). Sin embargo, se presentan diversos modelos matemáticos que permiten calcular la proporción relativa de la expresión de un gen (Pfaffl, 2004, p. 66). El coeficiente de cuantificación relativa en el presente trabajo se calculó utilizando el modelo matemático de Pfaffl (2001), el mismo que consiste en un modelo de cálculo de una eficiencia corregida, basado en los valores de eficiencia y de Ct de una muestra desconocida, con relación a un gen de referencia (Ecuación 1).

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(Control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde, E target es la eficiencia del resultado de la PCR en tiempo real del gen de interés, E ref es la eficiencia del resultado de la PCR en tiempo real del gen de referencia.  $\Delta CP_{target}$  representa la desviación Ct del control menos el Ct de la muestra.  $\Delta CP_{ref}$  corresponde a la desviación del Ct del control menos el Ct perteneciente al gen de referencia (Pfaffl, 2001, p. 3). Además, una eficiencia del 100 % significa que el blanco se está duplicando con cada ciclo, entonces una eficiencia de dos es equivalente a una duplicación perfecta (Bio-Rad, 2016).

La expresión normalizada es la cantidad relativa del gen de interés normalizada con las cantidades de los genes de referencia. El cálculo de la expresión normalizada se obtiene mediante el uso de la ecuación 2.

$$Normalized\ Expression_{sample\ (GOI)} = \frac{RQ_{sample\ (GOI)}}{(RQ_{sample\ (Ref\ 1)} \times RQ_{sample\ (Ref\ 2)} \times \dots \times RQ_{sample\ (Ref\ n)})^{\frac{1}{n}}}$$

(Ecuación 2)

Dónde, RQ es la cantidad relativa de la muestra, Ref es el blanco de referencia o el gen de referencia. GOI es el gen de interés.

#### 4.4.2 Análisis de la presencia relativa de la enzima CAT

Las membranas de PVDF que contenía a las proteínas y fueron procesadas por *Western blot*, fueron colocadas en el fotodocumentador Chemidoc MP imaging system (Bio-Rad, Estados Unidos). Mediante este equipo fue posible la detección de la señal por quimioluminiscencia de la presencia de proteínas en la membrana y de manera sucesiva se realizó la captura de la imagen para finalmente ser guardada y analizada, puesto que es un análisis cualitativo.

Adicionalmente, para evidenciar la presencia relativa de las proteínas CAT se utilizó el visor de imágenes del software Image Lab™ (versión 5.2) compatible con el fotodocumentador Chemidoc MP imaging system (Bio-Rad, Estados Unidos). Para lo cual se eligió la aplicación de Blots- Chemi. Cabe mencionar que para la detección de la presencia relativa de las proteínas fue necesario detectar e identificar las bandas en los distintos carriles.

#### 4.4.3 Análisis de la actividad enzimática de Catalasa

La medición de las absorbancias se realizó utilizando una longitud de onda de 240 nm (SIGMA- ALDRICH, 2014, p.1; Li y Schellhorn, 2007, p.187), en una cubeta de cuarzo.

En el presente trabajo se midió la absorbancia por el tiempo final de 70 segundos, midiendo cada 10 segundos. Por lo que, se toma en cuenta las absorbancias generadas en los 10 y 70 segundos.

La actividad de la enzima fue calculada aplicando la ecuación 3.

$$\text{Units \ mL enzyme} = \frac{\text{Abs} \times (\text{df})}{(\text{time}) \times (\mu\text{g enzyme})} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde, df es el factor de dilución, en el caso de que la muestra fuera diluida y Abs es la absorbancia.

#### 4.4.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado para cada uno de los procedimientos, se ejecutó en el software SPSS (de sus siglas en inglés *Statistical Packet for Social Science*). A continuación, se describen los estadísticos de prueba utilizados en el análisis de los datos de la expresión relativa del gen *catalasa* y los resultados pertenecientes a la actividad enzimática de CAT.

- **Prueba de contraste de normalidad de datos Shapiro- Wilk**

Una vez obtenidos los datos de los diferentes procedimientos realizados, se procedió a realizar una prueba de contraste de normalidad de datos. Inicialmente, se formuló dos hipótesis:

**H0:** Los datos de la población se ajustan a la normalidad.

**H1:** Los datos de la población no se ajustan a la normalidad.

Se utilizó el test de Shapiro- Wilk, porque el número de muestras fue pequeño ( $n < 50$ ). Esto se realizó con el fin de contrastar la normalidad de los datos, es decir, conocer si las muestras provienen de la población con distribución normal (Razali y Wah, 2011, p. 26). Para este análisis fue necesario calcular la media y la varianza muestral, siendo el estadístico de prueba la ecuación 4.

$$Wc = \frac{b^2}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde  $b$  equivale a  $\sum_{i=1}^k a_i [X_{(n-i+1)} - X_i]$ , siendo  $a_i$  = al valor de un coeficiente tabulado según el tamaño de la muestra y la posición  $i$  de cada observación. También, el término  $[X_{(n-i+1)} - X_i]$  es el resultado de las diferencias sucesivas que se obtienen de restar el primer valor al último, el segundo al antepenúltimo valor, y así sucesivamente.

La hipótesis nula planteada fue rechazada tanto para el análisis estadístico de la expresión génica como para la actividad enzimática de CAT, ya que los valores estadísticos de la prueba ( $Wc$ ) fueron menores al valor de significancia de  $\alpha=0.05$ .

- **Prueba U- de Mann- Whitney**

Una vez determinada la naturaleza de los datos con respecto a la normalidad, fue necesario establecer e interpretar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos (Saldaña, 2013, p.77).

El estadístico de U de Mann-Whitney compara la tendencia central de dos muestras independientes, partiendo de la formulación de dos hipótesis, en donde la hipótesis nula hace referencia a que en las dos muestras y la media central es la misma; mientras que en la hipótesis alternativa es lo contrario (Guisande, 2006, p. 128). Además, esta prueba estadística guarda una analogía con el contraste paramétrico  $t$  de *Student*.

El estadístico de la prueba es el valor  $Z$  que se expresa en la Ecuación 5.

$$Z = \frac{U - \mu_u}{\sigma_u} \quad (\text{Ecuación 5})$$

La ecuación 5 se encuentra formada por las ecuaciones 6, 7 y 8.

$$U_i = n_1 n_2 + \frac{n_i(n_i+1)}{2} - R_i, (\text{donde } i = 1, 2 \dots) \quad (\text{Ecuación 6})$$

$$\mu_u = \frac{n_1 n_2}{2} \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$\sigma_u^2 = \frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12} \quad (\text{Ecuación 8})$$

En donde  $n_1$  es el número de elementos en la muestra uno y  $n_2$  es el número de elementos en la muestra dos;  $R$  es la suma de los rangos de los elementos en la muestra. Además,  $\mu_u$  representa la media de la distribución muestral de  $U$  y  $\sigma_u^2$  es el error estándar del estadístico  $U$  (Levin y Rubin, 2004, p. 630).

## 5. Capítulo V. Resultados y Discusión

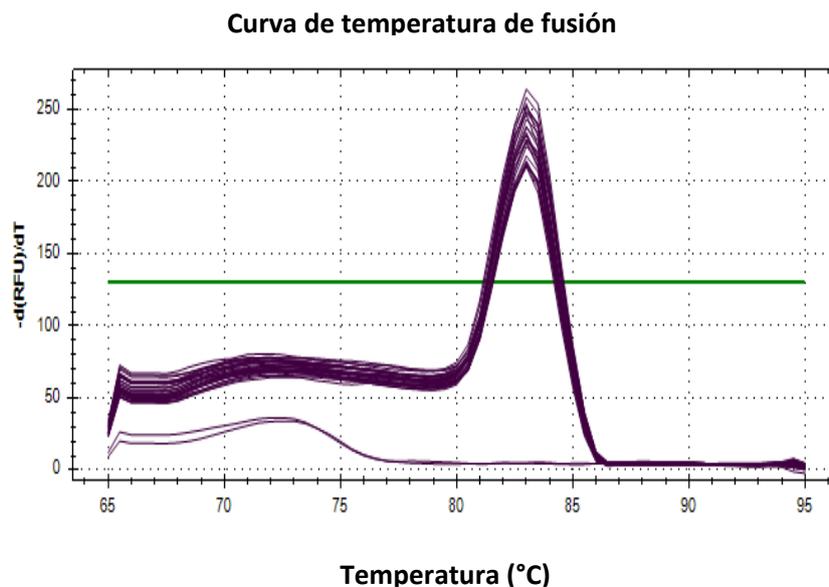
La experimentación se realizó de manera *in vitro*, usando los XGO a una concentración de  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$  con y sin presencia de sal. Se realizaron tres réplicas biológicas y en cada tratamiento las plantas fueron crecidas bajo las mismas condiciones. De esta manera se controló la influencia de los factores externos en las respuestas que presenta la planta.

Además, esta investigación se enfocó sobre la modificación de la expresión, cantidad y actividad de la enzima Catalasa, puesto que se conoce que CAT se relaciona con la acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , producido a través de diversas vías metabólicas (Mhamdi et al, 2012, p. 181). En este sentido la enzima Cat interviene en la generación de respuestas de la planta frente a condiciones

bióticas y/o abióticas en base a la señalización redox (Mhamdi et al, 2010, p. 4198).

### 5.1 Evaluación de la expresión relativa del gen *cat*

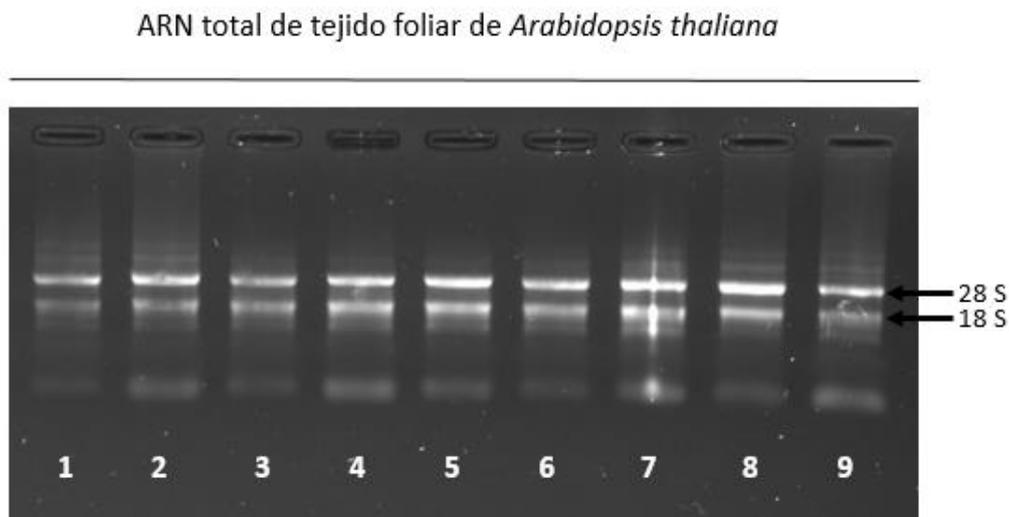
La especificidad y la calidad de los cebadores diseñados para el gen *cat* fueron evaluadas en base a la curva de temperatura de fusión, la misma que se encontró entre los 80 y 85 °C (*Figura 6*). Asimismo, la eficiencia de amplificación fue del 100 % ya que se observó claramente un pico, que correspondió a un único producto de amplificación. Además, no se percibió la amplificación de los controles de la RT-PCR, por consiguiente, se comprobó la inexistencia de la formación de dímeros entre cebadores o posibles contaminaciones.



*Figura 6.* Curva de la temperatura de fusión, resultado de la amplificación del gen *cat* con los cebadores específicos diseñados. Donde  $-d(RFU)/dT$  es la tasa negativa de cambio en RFU (Unidades Relativas de Fluorescencia) a medida que la temperatura (T) cambia.

El parámetro de calidad del ARN extraído y tratado con DNasa, fue la electroforesis de gel de agarosa al 1 %, en donde se evidenció la presencia de bandas claras y definidas, pertenecientes a las subunidades 18S y 28S del ARN

ribosomal (*Figura 7*). Esto se observó para los ARN de las tres réplicas biológicas. De manera simultánea, se obtuvo los valores de la cuantificación del ARN extraído, por medio de espectrofotometría. La relación de absorbancia 260/280 medida, osciló entre 1.8 y 2.1, indicando de esta manera que todos los ARN tenían un nivel de pureza adecuado, es decir, no presentaban contaminación con proteínas (Sambrook y Russel, 2001, p. 1-34).



*Figura 7.* Electroforesis de ARN total en gel de agarosa al 1 %, por 30 minutos a 100 voltios, del tejido foliar de *Arabidopsis thaliana*. Se observan dos bandas correspondientes a las subunidades 18S y 28S del ARN ribosomal en todos los tratamientos. En donde 1: T<sub>0</sub>, 2: T<sub>1</sub>, 3: T<sub>2</sub>, 4: T<sub>3</sub>, 5: T<sub>4</sub>, 6: T<sub>5</sub>, 7: T<sub>6</sub>, 8: T<sub>7</sub> y 9: T<sub>8</sub>.

Los resultados de la expresión relativa del gen *catalasa* fueron calculados a partir de los valores de Ct del gen *cat* y del gen *actina*, provenientes de la cuantificación de los productos de la RT-PCR derivados de todos los tratamientos, adicionalmente, se utilizó el tratamiento T<sub>0</sub> como control interno. Estos resultados de la expresión relativa de *catalasa* no presentaron una distribución normal según la prueba de Shapiro- Wilk (Tabla 8).

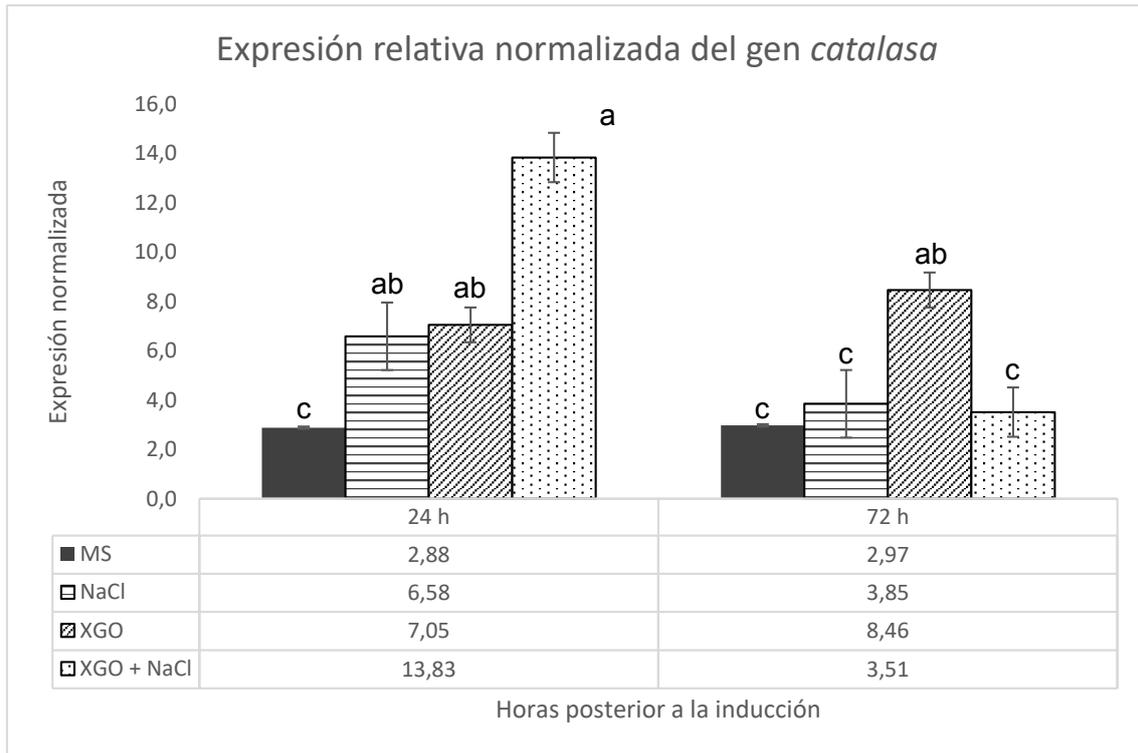
Tabla 8.

Pruebas de normalidad Kolmogorov- Smirnov<sup>a</sup> y Shapiro- Wilk de los valores de la expresión normalizada del gen *catalasa*.

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Expresión normalizada	0,168	24	0,077	0,839	24	0,001
a. Corrección de significación de Lilliefors						

Nota: El valor de significancia de  $\alpha=0.05$ . Un valor de Sig. ( $p$ )  $>$   $\alpha$  significa distribución normal de los datos.

Los niveles de expresión relativa del gen *catalasa* mostraron una diferencia significativa estadísticamente con un  $\alpha= 0.5$  para los distintos tratamientos, según el estadístico U de Mann- Whitney (*Figura 8*). Al comparar la expresión relativa entre todos los tratamientos, se obtuvo que *cat* presentó un aumento de la expresión en el tratamiento con XGO a las 24 horas posterior a la inducción, siendo 4.17 veces mayor en comparación al control MS no tratado del mismo tiempo (*Figura 8*). De la misma manera, se obtuvo una sobreexpresión 5.19 veces mayor en las 72 horas, con respecto al control MS no tratado correspondiente a ese tiempo. Además, en las 24 horas posterior a la inducción, se evidenció que la adición de XGO en presencia de estrés salino, incrementó la expresión de *cat* 7.25 veces con respecto al control de estrés salino (tratamiento NaCl). Sin embargo, este resultado disminuye a las 72 horas.



**Figura 8.** Niveles de la expresión relativa del gen *catalasa* en los diferentes tratamientos. Los valores ubicados en la parte inferior corresponden a la expresión relativa de *cat* en todos los tratamientos respecto al T<sub>0</sub> como control interno de la experimentación y al gen *actina* como control endógeno.

Las letras a, ab, c ubicadas en la parte superior de las barras (error estándar) indican las diferencias estadísticamente significativas en la expresión del gen *cat*, según el estadístico de prueba U de Mann-Whitney. Letras iguales indican la inexistencia de diferencias significativas

En el presente trabajo experimental, la expresión del gen *catalasa* en presencia de sal, aumentó con respecto al control no tratado, en los dos tiempos evaluados, por lo que la planta de manera natural podría activar ciertos mecanismos de respuesta a nivel transcripcional. Dado que, se conoce que diferentes vías de señalización conducen a la expresión génica, que a su vez se encarga de la codificación de las proteínas (Gharsallah et al., 2016, p.3). Además, la expresión génica no solo puede verse influenciada por los factores genéticos y de señalización propios de la planta, puesto que diversas condiciones ambientales como, por ejemplo, la patogénesis, las temperaturas extremas, las hormonas, la

salinidad, entre otros, pueden provocar cambios complejos en la regulación (Yang et al., 2016, p. 2).

El comportamiento de la expresión del gen *catalasa* en condiciones de salinidad, podría estar asociado con su función principal en la degradación de ROS. Esta idea puede apoyarse en los resultados reportados de distintas investigaciones, ya que, al ser la catalasa una enzima de gran importancia, varias investigaciones se han enfocado en su estudio, en una extensa variedad de plantas. Así pues, Willkends et al., (1994, pp. 1009-1011) demostraron que cuando *Nicotiana plumbaginifolia* fue expuesta a radiación UV- B los niveles de ARN mensajero (ARNm) de *cat3*, que inicialmente eran bajos en las hojas, se indujeron dentro de las 3 horas de exposición a la radiación. Además, estos autores observaron un aumento gradual y continuo hasta el final de la exposición, lo que sugiere que la formación de glioxisomas foliares si puede ocurrir durante condiciones de estrés y que puede desencadenar la senescencia temprana, la producción de etileno, la producción de citoquininas y de prolaminas (Willkedns et al., 1994, pp. 1009-1011). Así también, en maíz, el ARNm de *cat3* fue inducido rápidamente en condiciones de frío, por lo que se cree que el aumento de *cat3* es esencial para la aclimatación en condiciones de bajas temperaturas (Prasad et al., 1994, p. 68).

Por su parte, Xu et al. (2015, pp. 37-39) demostraron en la yuca (*Manihot esculenta*), la relación conjunta de la expresión de *superóxido dismutasa* y *catalasa*, la misma que se involucró en proveer a la planta resistencia a tensiones ambientales, como son el frío y la sequía, mediante la estabilización de homeostasis de ROS. Así mismo, observaron la acumulación de la prolina, la disminución del contenido de malondialdehído y la prolongación de vida útil de las raíces pos cosecha (Xu et al., 2015, pp.37-39).

Sin embargo, estudios del comportamiento de la expresión del gen *catalasa* en presencia de XGO no han sido reportados con anterioridad. En este sentido, los resultados observados sugieren que la aplicación de XGO promueve los

mecanismos de defensa de la planta frente a la salinidad. Esto se sustenta porque se observó un aumento significativo en el nivel de expresión relativa del gen, con o sin presencia de sal, fundamentalmente a las 24 horas posterior a la inducción. En la literatura científica no se dispone información acerca del efecto de los XGO solos o en combinación con sal, pero al conocer la función de CAT, se puede conjeturar que XGO desencadena la tolerancia a la salinidad en plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en presencia de salinidad.

## 5.2 Evaluación de la presencia relativa de la proteína Catalasa

La cuantificación de proteína total del extracto de cada muestra se evaluó con referencia a la preparación de una curva de calibrado previamente realizada (Figura 9). La curva de calibrado presentó un comportamiento lineal y, además, generó una ecuación (Ecuación 9) que permitió la transformación de los datos de absorbancia de las proteínas a valores de concentración proteica.

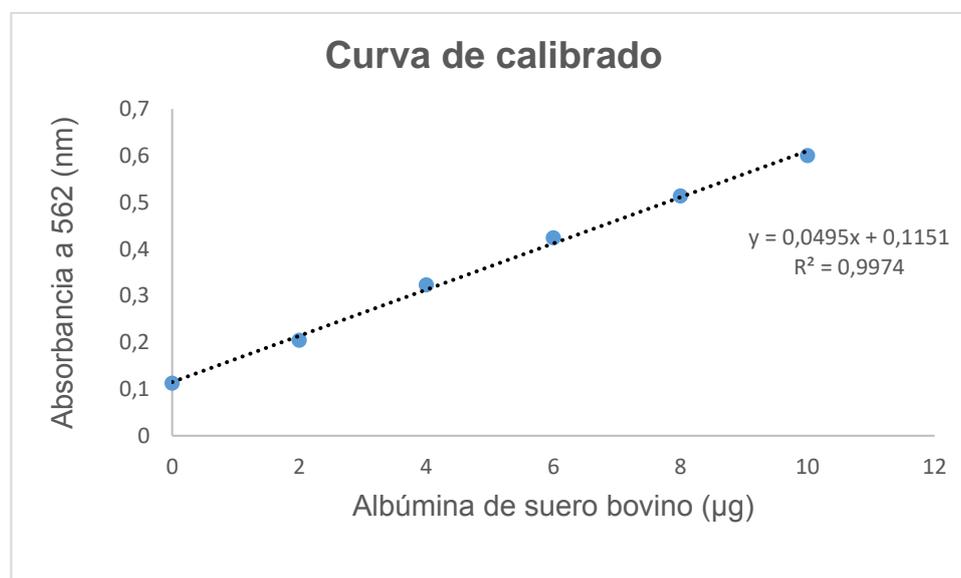
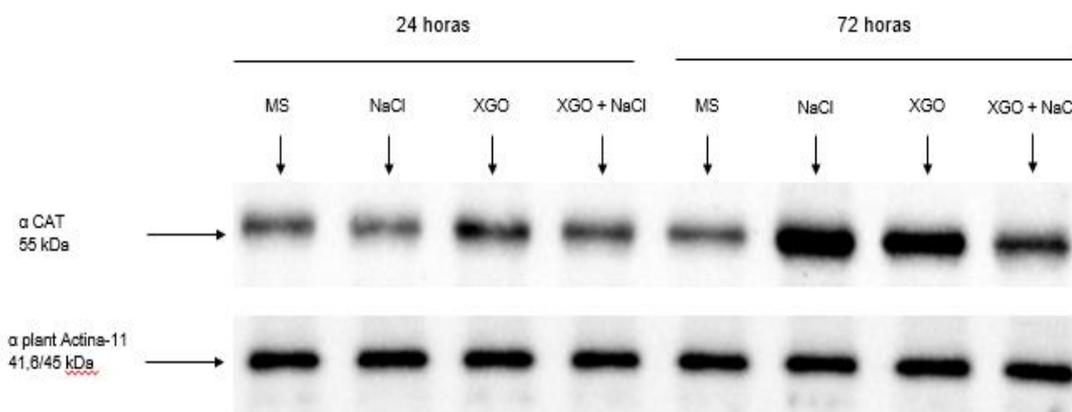


Figura 9. Curva de calibrado de la proteína albúmina de suero bovino de concentración final de 2 mg.mL<sup>-1</sup> usando el método del ácido bicinónico. El rango de la proteína es de 0 a 10 µg.

$$x = \frac{y - 0,1151}{0,0495} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Partiendo de las concentraciones de proteína total de las distintas muestras, se calculó y se preparó la concentración final de cada una para ser utilizadas en el ensayo inmunoquímico. La presencia relativa de CAT se realizó de manera cualitativa, en referencia a la intensidad de las bandas obtenidas.

En la *Figura 10* se puede observar de manera cualitativa las bandas pertenecientes a la proteína CAT, en donde se evidenció a las 72 horas la acumulación de CAT en el tratamiento de NaCl, XGO y también un aumento visible en el tratamiento XGO con sal, todo esto en comparación al control MS no tratado. Además, se observó la presencia relativa de la proteína ACTINA-11, mediante la visualización de las bandas, para todos los tratamientos como control de que la diferencia sea debida a la cantidad de proteína CAT y no por diferencias de concentración de las proteínas totales.



*Figura 10.* Presencia cualitativa de las proteínas CAT y ACT-11 usando el anticuerpo policlonal anti- catalasa y el anticuerpo monoclonal anti- actina-11. La proteína CAT presenta un peso molecular de 55 kDa y la proteína ACT-11 de 41.6/45 kDa

Se logró visualizar una mayor acumulación de proteína CAT en presencia de sal a las 72 horas. En efecto, investigaciones realizadas por Zhu y Xion en el año 2002, establecieron que las plantas generan distintos mecanismos para disminuir las especies reactivas de oxígeno, ante condiciones de estrés ambiental, además, de que la enzima catalasa, presenta una actividad

importante en la degradación del peróxido de hidrógeno (Zhu y Xion, 2002, p.136).

Se observó mayor presencia de proteína en el tiempo de 72 horas. Se podría suponer que estos resultados guardan relación con los obtenidos de la expresión del gen *cat*, puesto que, las muestras analizadas en los dos ensayos provienen del mismo tiempo de recolección. Sin embargo, se debe tener en cuenta la duración de los procesos de transcripción y traducción realizados en el interior de las células vegetales, además, de que los genes pueden ser transcritos y traducidos con diferente eficiencia. Por tanto, es lógico observar una mayor expresión del gen *catalasa* en presencia de XGO a las 24 horas y posteriormente mayor concentración de la proteína CAT en el tratamiento (presencia de XGO) a las 72 horas. De esta manera se evidencia que la célula podría generar grandes cantidades de algunas proteínas de acuerdo a las necesidades del momento (Alberts y Bray, 2006, p. 230).

Para confirmar el papel de la enzima CAT en presencia de XGO con y sin NaCl, se determinó finalmente su actividad en los diferentes tratamientos.

### **5.3 Actividad enzimática de Catalasa**

Para determinar las actividades enzimáticas de la enzima CAT en los distintos tratamientos, los datos fueron comparados con respecto al control negativo de la experimentación o al tratamiento T<sub>0</sub>. Los resultados correspondientes a la actividad enzimática no presentaron una distribución normal, de acuerdo al estadístico de prueba de Shapiro- Wilk (Tabla 9).

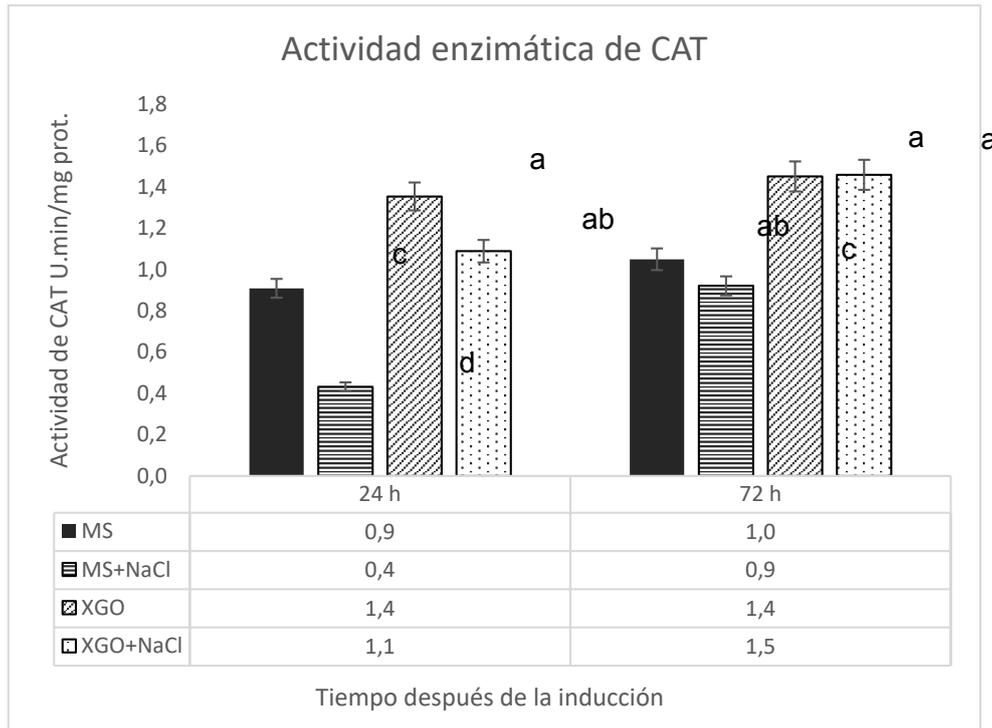
Tabla 9.

Pruebas de normalidad Kolmogorov- Smirnov<sup>a</sup> y Shapiro- Wilk de los valores de la actividad enzimática de CAT.

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Actividad enzimática	,244	74	,000	,587	74	,000
a. Corrección de la significación de Lilliefors						

Nota: el valor de significancia es de  $\alpha=0.05$ . Un valor de Sig. (p) >  $\alpha$  significa distribución normal de los datos.

Como primer resultado se evidenció que CAT presentó una disminución de su actividad en presencia de sal en comparación al control no tratado, esto en los dos tiempos analizados (*Figura 11*). Además, se pudo observar que la adición de XGO promovió una mayor actividad enzimática tanto a las 24 horas como a las 72 horas posteriores a la inducción. Así también, la actividad enzimática de CAT fue significativamente alta en presencia de XGO y sal. Finalmente, mediante el estadístico de prueba U de Mann- Whitney, con una significancia de  $\alpha=0.05$ , se constató la presencia de diferencias significativas de la actividad enzimática de CAT entre los tratamientos.



*Figura 11.* Actividad enzimática de Catalasa en los diferentes tratamientos. Los valores ubicados en la parte inferior corresponden a los valores de la actividad que presenta Cat.

Las letras a, ab, c y d ubicadas en la parte superior de las barras (error estándar) indican las diferencias estadísticamente significativas en la actividad CAT, según el estadístico de prueba U de Mann-Whitney. Letras iguales indican la inexistencia de diferencias significativas.

Los resultados obtenidos para la actividad enzimática, demostraron un aumento significativo de la actividad de CAT a las 24 y 72 horas posteriores a la inducción, en presencia de XGO con y sin estrés salino. Esto nos indica que los XGO están actuando de manera que prepararan a las plantas para soportar eventuales condiciones desfavorables o las existentes de salinidad, ya que les permite disponer de cantidades suficientes de enzima activa. Por ello, se puede estimar que los XGO promueven el mismo efecto mencionado anteriormente, de inducir la respuesta de defensa en las plantas frente a condiciones adversas de estrés salino.

La importancia radica en que es necesario generar un equilibrio entre la producción y degradación de las especies reactivas de oxígeno, para evitar daños en las plantas causados por el estrés oxidativo (Mukherjee y Choudhuri, 1983, p. 166). En vista de esto, las plantas poseen distintos mecanismos de defensa antioxidantes, entre los que se encuentran los procesos enzimáticos (Shim et al., 2003, p.1). En consecuencia, se conoce que la enzima CAT cumple un papel protector muy importante, por lo que, se espera mantener condiciones que favorezcan la actividad frente a ROS. De esta manera en el presente trabajo se observó la eficiencia generada por la presencia de los XGO sobre los niveles de la actividad de CAT, inclusive en presencia de sal (Figura 11). Esta idea se apoya en la investigación realizada por Lucini et al., (2015, p.125) en donde exponen que otros tipos de biostimulantes derivados de plantas son capaces de mejorar la tolerancia de los cultivos frente a condiciones de estrés abiótico.

Por otra parte, el tratamiento que contenía NaCl presentó un menor nivel de actividad de CAT, en comparación al tratamiento sin modificaciones, en los dos tiempos analizados. Esta disminución de actividad podría ser el resultado del consumo de la enzima como producto del estrés generado por la presencia de sal. La idea se apoya en los resultados reportados por otros investigadores, que han realizado sus ensayos bajo distintas condiciones desfavorables como el estrés hídrico, la acción herbicida, el estrés salino y la exposición a metales pesados (Mukherjee y Choudhuri, 1983, p. 166; Feierabend y Kemmerich, 1983, p. 346; Shim et al., 2003, p. 290; Iannone et al., 2015, p.206).

En resumen, es probable que los oligosacáridos de xiloglucanos utilizados en este trabajo experimental, se involucren en la estimulación y activación de distintos mecanismos de defensa en las plantas, que le permitan tolerar las condiciones desfavorables de estrés salino o predisponerlas ante el estrés oxidativo.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

Los oligosacáridos de xiloglucanos a  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$  promovieron un incremento significativo de la expresión relativa del gen *catalasa* en plantas de *Arabidopsis thaliana* a las 24 horas posteriores a la inducción, crecidas con y sin presencia de estrés salino.

La presencia relativa de la enzima Catalasa (CAT) se incrementó con la adición de oligosacáridos de xiloglucanos a  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$  en plantas de *Arabidopsis thaliana*, con y sin exposición a estrés salino, a las 72 horas posteriores a la inducción.

Los niveles de la actividad enzimática de CAT se incrementaron en presencia de oligosacáridos de xiloglucanos a una concentración de  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$  en plantas de *Arabidopsis thaliana*, con y sin presencia de estrés salino a las 72 horas posteriores a la inducción.

### 6.2 Recomendaciones

Analizar la expresión, presencia relativa y la actividad catalítica de otras enzimas que cumplan un papel importante dentro de los mecanismos enzimáticos de protección intracelular, como pueden ser la enzima superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión peroxidasa (GPX), la glutatión reductasa (GR), entre las más importantes.

Evaluar los efectos de XGO sobre antioxidantes no enzimáticos, involucrados en el estrés oxidativo, como el glutatión, el ascorbato, el tocoferol, los flavonoides, los carotenoides y los alcaloides.

Buscar y evaluar nuevos bioestimulantes derivados de la pared celular vegetal de plantas endémicas de la región amazónica del Ecuador.

## REFERENCIAS

- Ahman, P., Jaleel, C., Salem, M., Nabi, G., y Sharma, S. (2010). *Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 30(3), 161-175. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20214435>
- Alarcón, A., y Ferrera, R. (2000). *Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura*. *Agricultura Técnica En México*, 26(2), 191–203. Recuperado el 25 de abril de 2016 de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60826207>
- Albacete, A., Martínez-Andújar, C., y Pérez-Alfocea, F. (2014). *Hormonal and metabolic regulation of source-sink relations under salinity and drought: From plant survival to crop yield stability*. *Biotechnology Advances*, 32(1), 12–30. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <https://academic.oup.com/jxb/article/65/20/6081/2485462/Hormonal-and-metabolic-regulation-of-tomato-fruit>
- Alberts B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2013). *Introducción a la biología celular*. (2.<sup>a</sup> ed.). México: ed. Panamericana.
- Albersheim, P., Darvill, A., Augur, C., Jong- Joo, C., Eberhard, S., y York, W. (1983). *Oligosaccharins : Oligosaccharide Regulatory Molecules*. *American Chemical Society*, (5), 77–83. Recuperado el 7 de agosto de 2016 de: <https://www.ccruc.uga.edu/personnel/index.php?uid=19&personnel=..>
- Alcaraz, F. (2012). *Salinidad y vegetación*. Universidad de Murcia, 1–9. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de: <http://www.um.es/docencia/geobotanica/ficheros/tema18.pdf>
- Amerex Instrument, Inc. (2014). *HVA-85 AND HVA-110*. Recuperado el 8 de noviembre de 2016 de: <http://www.amerexinst.com/HVA-series.htm>
- Apel, K. y Hirt, H. (2004). *Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction*. *Annual Review of Plant Biology*,

- 55(1), 373-399. Recuperado el 12 de junio de 2016 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377225>
- Aragüés, R., y Alberto, F. (1978). *El proceso de recuperación de dos suelos salinos de la Depresión Media del Ebro I. Evolución de la conductividad eléctrica, conductividad hidráulica y pH durante el lavado*. Zaragoza. Recuperado el 23 de agosto de 2016 de:  
<http://digital.csic.es/bitstream/10261/21375/1/VOL.%2014%20N%C2>
- Arora, A., Sairam, R. K. y Srivastava, G. C. (2002). *Oxidative stress and oxidative system in plants*. *Current Science*, 82(10), 1227–1238. Recuperado el 12 de junio de 2016 de:  
<http://www.iisc.ernet.in/currsci/may252002/1227.pdf>
- Banco Mundial (2016). *Agricultura: panorama general*. Washington, D.C. Recuperado el 12 de abril de:  
<http://www.bancomundial.org/es/topic/agriculture/overview>
- BIO-RAD. (2014). *Gel Doc™ XR + and ChemiDoc™ XRS + Systems with Image Lab™*. *BIO-RAD*, 5.2, 1–232. Recuperado el 16 de junio de 2016 de:  
<http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10017218.pdf>
- Bio- Rad (2016). *CFX Manager™ Software Help Data Analysis Details*. Bio- Rad laboratories, Inc. Recuperado el 12 de abril de:  
<http://www.bio-rad.com/en-us/product/cfx-manager-software>
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., Mccaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., y Görlach, J. (2001). *Growth Stage – Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants*, 13(July), 1499–1510. Recuperado el 17 de Agosto de 2016 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11449047>
- Cabrera, M., Borrero, Y., Rodríguez, A., Angarica, E. y Rojas, O. (2011.). *Efecto de tres bioestimulantes en el cultivo de pimiento (Capsicum annun, l) variedad atlas en condiciones de cultivo protegido*. Centro de Información y Gestión Tecnológica, 32-42. Recuperado el 25 de abril de 2016 de: <http://www.redalyc.org/pdf/1813/181324323003.pdf>
- Cabrera, J. C., González, G., Nápoles, M. C., Rogers, H. J., Diosdado, E., Cabrera, G. y Wattiez, R. (2013). *Pactical use of Oligosaccharins in*

- Agriculture*. First World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture, 195–212. Recuperado el 25 de abril de 2016 de: <http://agris.fao.org/agrissearch/search.do?recordID=US20140015017>
- Calvo, P., Nelson, L. y Kloepper, J. W. (2014). *Agricultural uses of plant biostimulants*. *Plant and Soil*, 383(1-2), 3–41. Recuperado el 13 de abril de 2016 de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Canfora, L., Bacci, G., Pinzari, F., Papa, G. Lo, Dazzi, C. y Benedetti, A. (2014). *Salinity and Bacterial Diversity : To What Extent Does the Concentration of Salt Affect the Bacterial Community in a Saline Soil ?*. PLoS ONE. 9(9),1-15. Recuperado el 6 de Agosto de 2016 de: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0106662>
- Chang, P., Gerhardt, K. H., Ming Yu, X., Glick, B., Perry, G., y Greenberg, B. (2013). *Plant Growth- Promoting Bacteria Facilitate the Growth of Barley and Oats In Salt- impacted Soil: Implications for hytormediation of Saline Soils*. International Journal of Phytoremediation, 1133-1147. Recuperado el 13 de abril de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24933907>
- Cheeseman, J. M. (2007). *Hydrogen Peroxide and Plant Stress : A Challenging Relationship*. Global Science Books, 4–11. Recuperado el 3 de diciembre de 2016 de: <http://www.life.illinois.edu/cheeseman/main/publications/peroxidePubs/PIStressH2O2review.pdf>
- Colla, G., Rouphael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., y Cardarelli, M. (2014). *Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis*. *Frontiers in Plant Science*, 5(September), 448. Recuperado el 13 de abril de 2016: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4158787/>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Cle, C. y Barka, E. a. (2005). *Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects*. *Applied*

- and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951–4959. Recuperado el 25 de abril de 2016 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151072>
- Cuesta, C., y Cires, E. (2014). *Arabidopsis thaliana*. ResearchGate, 178, 175–177. Recuperado el 17 de agosto de 2016 de:  
<https://www.researchgate.net/topic/Arabidopsis-thaliana>
- Cutillas-iturralde, A., Fulton, D. C., Fry, S. C., Lorences, E. P., y Valencia, U. De. (1998). *Xyloglucan-derived oligosaccharides induce ethylene synthesis in persimmon (Diospyros kaki L.) fruit*, 49(321), 701–706. Recuperado el 18 de septiembre de 2016 de:  
<https://academic.oup.com/jxb/article/49/321/701/450350/Xyloglucan-derived-oligosaccharides-induce>
- De Souza, A. (2013). *Polymerization*. Edited by Ailton De Souza Gomes. Recuperado el 7 de Agosto de 2016 de:  
[http://www.academia.edu/14166525/Polymerization.\\_Edited\\_by\\_Ailton\\_De\\_Souza\\_Gomes](http://www.academia.edu/14166525/Polymerization._Edited_by_Ailton_De_Souza_Gomes)
- du Jardin, P. (2012). *Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation*. Scientia Horticulturae, 196, 3–14. Recuperado el 13 de abril de 2016 de:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423815301850>
- du Jardin, P. (2015). *Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation*. Scientia Horticultura, 196, 3–14. Recuperado el 25 de abril de 2016 de: <http://orbi.ulg.ac.be/handle/2268/187492>
- Dumas, B. (2014). *Foliar treatments with Gaultheria procumbens essential oil induce defense responses and resistance against a fungal pathogen in Arabidopsis*. Frontiers in Plant Science, 5(September), 1–8. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4172006/>
- Enríquez, E., Hernández, E., Vargas, I. y Martínez, M. (2004). *Oligosacarinas derivadas de la pared celular: actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de plantas*. México: revista mexicana de

- Fitopatología, 28,2, 26-32. Recuperado el 24 de agosto de 2016 de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61218468007>
- Enríquez-guevara, E. A., Aispuro-hernández, E., Vargas, I. y Victoria, L. (2010). *Cell Wall Oligosaccharine Derivatives: Biological Activity and Participation in the Response of Plant Defense*. Revista Mexicana de Fitopatología, 28, 144–155. Recuperado el 7 de agosto de 2016 de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092010000200007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000200007)
- European Biostimulants Industry Council. (2016). *Ebic position paper*, (April), 14. Recuperado el 2 de julio de 2016 de: <http://www.biostimulants.eu/wp-content/uploads/2016/04/EBIC-PP-Quality-April2016-FINAL.pdf>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2012). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación*. Roma. Recuperado el 6 de junio de 2016 de: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2013). *Perspectivas de la agricultura y del desarrollo rural en las Américas: una mirada hacia América Latina y el Caribe*. Recuperado el 6 de marzo de 2016 de: <http://www.fao.org/docrep/019/i3702s/i3702s.pdf>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2014). *Portal de Suelos de la FAO*. Recuperado el 2 de agosto de 2016 de: <http://www.fao.org/soils-portal/manejo-del-suelo/manejo-de-suelos-problematicos/suelos-afectados-por-salinidad/more-information-on-salt-affected-soils/e>
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2015). *Status of the World's Soil Resources (SWSR) - Main Report*. Italia. Recuperado 2 de agosto de: <http://www.fao.org/3/a-i5199e.pdf>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (1988). *Soil Resources Management Conservation Service FAO Land and Water Development Division*. FAO SOILS BULLETIN 39, 1-15. Recuperado el 23 de julio de 2016 de: <http://www.fao.org/nr/aboutnr/nrl/en/>
- Farrokhi, N., Burton, R. A., Brownfield, L., Hrmova, M., Wilson, S. M., Bacic, A., y Fincher, G. B. (2006). *Plant cell wall biosynthesis: genetic, biochemical and functional genomics approaches to the identification*

- of key genes*, 145–167. Recuperado el 7 de agosto de 2016 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17177793>
- Feierabend, J., Kemmerich, F., y Kemmerich, P. (1983). *Mode of interference of chlorosis-inducing herbicides with peroxisomal enzyme activities*. *Physiologia Plantarum*, 57, 346–351. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1983.tb02298.x/abstract>
- Fry, S. C., York, W. S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J. y An, A. (1993). *An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides*, 1–3. Recuperado el 7 de agosto de 2016 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.13993054.1993.tb01778.x/abstract>
- Fry, S. C. (2004). *Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells*. *New Phytologist*, 641–675. Recuperado El 7 de agosto de 2016 de:  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2004.00980.x/abstract>
- Fuentes-Ramirez LE, y Caballero-Mellado J. (2005) *PGPR: biocontrol and biofertilization The Netherland*. Springer; 2005. pp. 143–172. Recuperado el 6 de abril de 2016 de:  
<http://www.springer.com/us/book/9781402040023>
- Fulekar, (2012). *Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress*. Springer, 11, 55–69. Recuperado el 12 de noviembre de 2016 de:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11157-011-9251-x>
- Garcia-gonzalez, J., y Sommerfeld, M. (2016). *Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga Acutodesmus dimorphus*. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1051–1061. Recuperado el 7 de Agosto de 2016 de:  
<http://www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/2-Manejo-de-suelos-con-acumulacion-de-sales-Garcia-A.pdf>
- Garcia O., A. (1995). *Manejo de suelos con acumulación de sales*. VIII Congreso Ecuatoriano de La Ciencia Del Suelo, 1–21. Recuperado el 7 de

agosto de 2016 de: <http://www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/2->

[Manejo-de-suelos-con-acumulacion-de-sales-Garcia-A.pdf](#)

- Garg, N. y Manchanda, G. (2009). *ROS generation in plants: Boon or bane Plant Biosystems*. An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology, 143(1), 81–96. Recuperado el 6 de junio de 2016 de: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11263500802633626>
- Gasch, A. P., Payseur, B. A., y Pool, J. E. (2015). *The Power of Natural Variation for Model Organism Biology*. *Trends in Genetics*, xx, 1–8. Recuperado el 7 de Agosto de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26777596>
- Genet, M. G., Zhong, H. H., y McClung, R. (1996). *The circadian clock gates expression of two Arabidopsis catalase genes to distinct and opposite circadian phases*. *Sp*, 251, 196–203. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8668130>
- Gharsallah, C., Fakhfakh, H., Grubb, D., y Gorsane, F. (2016). *Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars*. *AoB PLANTS*, 1–21. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5091694/>
- Gill, S. y Tuteja, N. (2010). *Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870416>
- Gilbert, H. J., Knox, J. P., y Boraston, A. B. (2013). *Advances in understanding the molecular basis of plant cell wall polysaccharide recognition by carbohydrate-binding modules*. *Current Opinion in Structural Biology*, 1–9. Recuperado el 7 de diciembre de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23769966>
- González-Pérez, L., Vazquez-Glar, A. A., Perrotta, L., Acosta, A., Scriven, S. A. y Rogers, H. J. (2012). *Oligosaccharins and Pectinormf stimulate root elongation and shorten the cell cycle in higher plants*. *Plant Growth*

- Regulation*, 68(2), 211–221. Recuperado el 25 de abril e 2016 de:  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10725-012-9709-z>
- González-Pérez, L., Perrotta, L., Acosta, A., Orellana, E., Spadafora, N., Bruno, L. y Rogers, H. J. (2014). *In tobacco BY-2 cells xyloglucan oligosaccharides alter the expression of genes involved in cell wall metabolism, signalling, stress responses, cell division and transcriptional control*. *Molecular Biology Reports*, 41(10), Recuperado el 25 de abril de 2016 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25008996>
- Guerrero, A. (2006). *Efecto de Tres Bioestimulantes Comerciales en el Crecimiento de los Tallos de Proteas Leucadendron sp Cv. Safari Sunset*. Universidad Técnica del Norte, 1–94. Recuperado el 13 de Abril de 2016 de:  
<http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/190/2/03%20AGP%2024%20DOCUMENTO%20DE%20TESIS.pdf>
- Hahn, M. G., Darvill, A. G., y Albersheim, P. (1981). *Host-Pathogen Interactions*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1161–1169. Recuperado el 6 de Agosto de 2016 de: <http://www.springer.com/la/book/9781468411515>
- Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T. y Yermiyahu, U. (2015). *The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake*. *Advances i Agronomy* (Vol. 130). Elsevier Inc. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: [https://www.researchgate.net/publication/281717768\\_The\\_Use\\_o\\_fBiostimulants\\_for\\_Enhancing\\_Nutrient\\_Uptake](https://www.researchgate.net/publication/281717768_The_Use_o_fBiostimulants_for_Enhancing_Nutrient_Uptake)
- Hara, Y., Yokoyama, R., Osakabe, K., Toki, S., y Nishitani, K. (2013). *Function of xyloglucan endotransglucosylase / hydrolases in rice*. *Annals of Botany*, 1–10. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de:  
<https://academic.oup.com/aob/article/114/6/1309/2769046/Function-of-xyloglucan-endotransglucosylase>
- Hasegawa, P., Bressan, R., Zhu, J. y Bohnert, H. J. (2000). *Plant cellular and molecular responses to high salinity*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 463–499. Recuperado el 12 de junio de 2016 de:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15012199>

Hayashi, T. y Kaida, R. (2011). *Functions of Xyloglucan in Plant Cells*. *Molecular Plant*, 4(1), 17–24. Recuperado el 23 de agosto de 2016 de:

[http://www.cell.com/molecular-plant/abstract/S1674-2052\(14\)60558-X](http://www.cell.com/molecular-plant/abstract/S1674-2052(14)60558-X)

Hernández, R. J. y Betancourt-riera, R. (n.d.). *Mejorador de suelo a partir de una zeolita natural: Una propuesta sustentable para la agricultura Soil booster from to natural zeolite: A sustainable proposal for the agriculture*. *Nova Scientia*, 1–11. Recuperado el 1 de abril de 2016:

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-07052014000100001](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-07052014000100001)

Hiroimi, W. (2015). *Gelatin, A Biostimulant Seed Treatment And Its Impact On Plant Growth, Abiotic Stress, And Gene Regulation*. Cornell University, 1-2. Recuperado el 16 de abril de 2016 de:

<https://ecommons.cornell.edu/handle/1813/39345>

Huerta, L. (2005). *Estudio de la Salinidad de los suelos en las comunidades de Capula y Bandando Ixmiquilptan Hidalgo*. Universidad Autónoma Chapingo.

International Business Machines (IBM). (2016). *SPSS Statistics Standard*. IBM. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de: [http://www-](http://www-03.ibm.com/software/products/es/spss-stats-standard)

[03.ibm.com/software/products/es/spss-stats-standard](http://www-03.ibm.com/software/products/es/spss-stats-standard)

Jiang, C., Bel, E. J., Cao, Y., Smith, J. A. C., y Harberd, N. P. (2013). *An Arabidopsis Soil-Salinity – Tolerance Mutation Confers Ethylene-Mediated Enhancement of Sodium / Potassium Homeostasis*, 1–19.

Recuperado el 12 de marzo de 2016 de:

[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1850-20672011000200015](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-20672011000200015)

Jian-Kang, Z. (2011). *Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants*. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 247–273. Recuperado el 12 de junio de:

<http://www.plantcell.org/content/early/2013/09/22/tpc.113.115659>

Kaku, T., Tabuchi, A., Wakabayashi, K., y Hoson, T. (2004). *Xyloglucan Oligosaccharides Cause Cell Wall Loosening by Enhancing*

- Xyloglucan Endotransglucosylase / Hydrolase Activity in Azuki Bean Epicotyls*. *Plant Cell Physiology*, 45(1), 77–82. Recuperado el 12 de abril de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749488>
- Kiirika, L., Schmitz, U. y Colditz, F. (2014). *The alternative Medicago truncatula defense proteome of ROS — defective transgenic roots during early microbial infection*. *Frontiers in Plant Science*. 5, 1–17. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4101433/>
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O. y Harter, K. (2007). *The AtGenExpress global stress expression data set : protocols , evaluation and model data analysis of UV-B light , drought and cold stress responses*. *The Plant Journal*. 50, 347–363. Recuperado el 7 de Agosto de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376166>
- Krämer, U. (2015). *Planting molecular functions in an ecological context with Arabidopsis thaliana*. *eLIFE*, 1–13. Recuperado el 4 diciembre de 2016 de: <https://elifesciences.org/content/4/e06100>
- Kölbl, A., Schad, P., Jahn, R., Amelung, W., Bannert, A., Cao, Z. H. y Kögel-Knabner, I. (2014). *Accelerated soil formation due to paddy management on marshlands (Zhejiang Province, China)*. *Geoderma*, 228-229, 67–89. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001670611300333>
- Le Mire, G., Nguyen, M., Fassotte, B. d., Verheggen, P. F., y Jijakli, H. (2015). *Review: implementing plant biostimulants and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 1-12. Recuperado el 12 de marzo de 2016 de: <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=12717>
- Li, Y., y Schellhorn, H. E. (2007). *Rapid Kinetic Microassay for Catalase Activity*. *Journal of Biomolecular Techniques*, 18(4), 185–187. Recuperado el 15 de abril de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2062561/>

- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method*, 408, 402–408. Recuperado el 17 de septiembre de 2016 de:  
<http://www.gene-quantification.net/livak-2001.pdf>
- Lucini, L., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., y Colla, G. (2015). *Scientia Horticulturae The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. Scientia Horticulturae*, 182, 124–133. Recuperado el 6 de agosto de 2016 de:  
[https://www.researchgate.net/publication/269407031\\_The\\_effect\\_of\\_a\\_plantderived\\_biostimulant\\_on\\_metabolic\\_profiling\\_and\\_crop\\_performance\\_of\\_lettuce\\_grown\\_under\\_saline\\_conditions](https://www.researchgate.net/publication/269407031_The_effect_of_a_plantderived_biostimulant_on_metabolic_profiling_and_crop_performance_of_lettuce_grown_under_saline_conditions)
- Malusá, E., y Vassilev, N. (2014). *A contribution to set a legal framework for biofertilisers. Appl Microbiol Biothenol*, 98, 6599–6607. Recuperado el 12 de junio de 2016 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4108841/>
- Maceae, A., y Ferguson, I. (1985). *Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature. Physiologia Plantarum*, 65, 51–56. Recuperado el 12 de junio de 2016 de:  
<http://www.miliarium.com/Proyectos/SuelosContaminados/Manuales/Salinidadsuelos.asp>
- Markerts and Markets (2013). *Global biofertilizers market by types, applications geography—trends and forecasts to 2017*. Marketsandmarkets, Dallas TX, USA
- Marco, F., Bitrián, M., Carrasco, P., Rajam, M. V., y Alcázar, R. (2015). *for Abiotic Stress Tolerance in Plants* (Vol. II).
- Mata- Fernández, I., Rodríguez- Gamiño, M., López- Blanco, J., y Vela- Correa, G. (2014). Dinámica de la salinidad en los suelos. *Revista Digital Del Departamento El Hombre Y Su Ambiente*, 1, 26–35.
- Mazumder, S., Lerouge, P., Loutelier-bourhis, C., Driouich, A., y Ray, B. (2005).

- Structural characterisation of hemicellulosic polysaccharides from Benincasa hispida using specific enzyme hydrolysis , ion exchange chromatography and MALDI-TOF mass spectroscopy*, 59, 231–238. Recuperado el 12 de octubre de 2016 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861704003601>
- Mcdougall, G. J., y Fry, S. C. (1990). *Xyloglucan Oligosaccharides Promote Growth and Activate Cellulase : Evidence for a Role of Cellulase*. 1042–1048. Recuperado el 7 de diciembre de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16667555>
- Mhamdi, A., Noctor, G., y Baker, A. (2012). *Plant catalases : Peroxisomal redox guardians*. ELSEVIER, 525(2), 181–194. Recuperado el 6 de Agosto de 2016 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986112001476>
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., y Mittler, R. (2010). *Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses*. Plant, Cell and Environment, 33(4), 453–467. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712065>
- Miller, J. y Gordon, C. (2005). *The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins*. FEBS Letters, 579(15), 3224–3230. Recuperado el 16 de mayo de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15943965>
- Miliarium. (2004). *Salinidad en Suelos*. Miliarium Aureum, 1-5. Recuperado el 14 de abril de 2016 de: <http://www.miliarium.com/Proyectos/SuelosContaminados/Manuales/Salinidadsuelos.asp>
- Miranda-ham, L. y Castro-concha, L. (2009). *El Estrés Oxidativo En Plantas*. Sociedad Mexicana De La Ciencia Del Suelo. Recuperado el 16 de abril de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10892343>
- Montagu, M. Van, Inze, D., & Breusegem, F. Van. (2000). *Dual action of the*

- active oxygen species during plant stress responses*. CMLS Cellular and Molecular Life Sciences, 57, 779–795. Recuperado el 13 de Agosto de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10892343>
- Mukherjee, S., y Choudhuri, M. A. (1983). *Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in Vigna seedlings*. Physiologia Plantarum, 58, 166–170. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1983.tb04162.x/abstract>
- Munns, R. y Gilliam, M. (2015). *Salinity tolerance of crops - what is the cost?* New Phytologist. 208(3), 668–673. Recuperado el 2 de Agosto de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26108441>
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiologia Plantarum Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/abstract>
- Oliva, J. (2003). *Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus*. Universidad Complutense de Madrid, 1–166. Recuperado el 13 de agosto de 2016 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/abstract>
- Ochoa-villarreal, M., Vargas-arispuro, I., Islas-osuna, A., Gonz, G., y Angel, M. (2011). *Pectin-derived oligosaccharides increase color and anthocyanin content in Flame Seedless grapes*, (March), 1928–1930. Recuperado el 13 de Agosto de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21484810>
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. y Tran, P. (2014). *ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity*. New Phytologist, 202(1),

- 35–49. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24283512>
- Otero, L., Francisco, A., Gálvez, V., Morales, R., Sánchez, I., Labaut, M. y Rivero, L. (2007). *Ministerio de la agricultura*. (537)1–9.
- Palazon, P. (2010). *Bioestimulantes e inductores de resistencia en el control de las enfermedades de madera*. 1-57. Recuperado el 13 de abril de 2016:  
[http://www.winetech-sudoe.eu/files/04\\_Pedro\\_Palazon\\_Presentacion.pdf](http://www.winetech-sudoe.eu/files/04_Pedro_Palazon_Presentacion.pdf)
- Parida, A. K. y Das, A. B. (2005). *Salt tolerance and salinity effects on plants: A review*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324–349. Recuperado el 14 de mayo de 2016 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15590011>
- Pedroza, H., y Dicovskyi, L. (2016). *Sistema de Análisis Estadístico*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1-153. Recuperado el 12 de marzo de 2016 de:  
<http://cenida.una.edu.ni/relectronicos/RENU10P372.pdf>
- Peña Salamanca, E., Madera Parra, C., Sanchez, J. y Medina Vásquez, J. (2013). *Biospecting of native plants for their use in bioremediation process - Heliconia psittacorum case (HELICONIACEAE)*. *Revista Académica Colombiana de Ciencias*, XXXVII(0370-3908), 469–481. Recuperado el 12 de mayo de 2016 de  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S037039082013000400004&script=sci\\_arttext&lng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S037039082013000400004&script=sci_arttext&lng=es)
- Peña, M. (2013). *Composición Química y degradabilidad in situ de residuos agrícolas de maíz inoculados con dos cepas del género Pleurotus. Finca La María*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 1–80. Recuperado el 12 de mayo de 2016 de:  
<http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/248>
- Pettolino, F. A., Walsh, C., Fincher, G. B. y Bacic, A. (2012). *Determining the polysaccharide composition of plant cell walls*. *Nature Protocols*, 7(9), 1590–1607. Recuperado el 12 de junio de 2016 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22864200>

- Pfaffl, M. W. (2001). *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Oxford University Press, 29(9), 16–21. Recuperado el 10 de abril de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
- Pfaffl, M. W. (2004). *Relative quantification*. International University Line, 63–82. <http://www.gene-quantification.de/chapter-3-pfaffl.pdf>
- Pitt, J. L. y Provin, T. (2001). *Managing Soil Salinity*. Texas A & M Agrilife Extension, 60, 3–12. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <http://aglifesciences.tamu.edu/baen/wp-content/uploads/sites/24/2017/01/E-60-Managing-Soil-Salinity.pdf>
- Pitzschke, A., Hirt, H. y Djamei, A. (2009). *A Major Role of the MEKK1 – MKK1 / 2 – MPK4 Pathway in ROS Signalling*. *Molecular Plant*. 2(1), 120–137. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2639734/>
- Povero, G., Mejia, J. F., Tommaso, D. Di, y Piaggese, A. (2016). *A Systematic Approach to Discover and Characterize Natural Plant Biostimulants*. *Frontiers in Plant Science*, 7(April), 1–9. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4820456/>
- Prasad, T. K., Anderson, M. D., Martin, B. A., y Stewart, C. R. (1994). *Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide*. *The Plant Cell*, 6(January), 65–74. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de: <http://www.plantcell.org/content/6/1/65.abstract>
- Przybysz, A., Gawro, H., y Gajc-wolska, J. (2014). *Biological mode of action of a nitrophenolates-based biostimulant : case study*. *Frontiers in Plant Science*, 5(December), 1–15. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4267195/>
- Queensland. (2013). *Types of salinity*. *Queensland Government home*. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de: <https://www.qld.gov.au/environment/land/soil/salinity/types/>
- Razali, N. M., y Wah, Y. B. (2011). *Power comparisons of Shapiro-Wilk , Kolmogorov-Smirnov , Lilliefors and Anderson-Darling tests*. *Journal*

of Statistical Modeling and Analytics, 2(1), 21–33. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de:

[http://www.de.ufpb.br/~ulisses/disciplinas/normality\\_tests\\_comparison.pdf](http://www.de.ufpb.br/~ulisses/disciplinas/normality_tests_comparison.pdf)

Rodríguez, A., Menéndez, D., Fundora, D. y García, C. (2015). *New natural products for agriculture : the oligosaccharins*. INCA, 36, 111–129.

Recuperado el 15 de Agosto de 2016 de:

[http://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/viewFile/1128/pdf\\_1](http://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/viewFile/1128/pdf_1)

Roy, S. y Tester, M. (2012). *Increasing Salinity Tolerance of Crop*. Springer New York, 5315-5331. Recuperado el 14 de noviembre de 2016 de:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26227817>

Russell, J., Fuller, J., Wilson, Z., y Mulligan, B. (2002). *Protocol for Growing Arabidopsis*. University of Nottingham, 31. Recuperado el 16 de abril de 2016 de:

<http://www.bio-protocol.org/e126>

Saa, S., Rio, A. O., Castro, S., y Brown, P. H. (2015). *Foliar application of microbial and plant based biostimulants increases growth and potassium uptake in almond*. *Frontiers in Plant Science*, 6(February), 1–9.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755660>

Sambrook, J., y Russell. (2012). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1, 2–34. Recuperado el 24 de julio de 2016 de:

<http://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>

Sánchez, R., Dunel, L., y Scherger, M. (2015). *Evaluación de las áreas bajo riego afectadas por salinidad y / o sodicidad*. fao- Ministerio de Agricultura, Ganadería Y Pesca (Presidencia de La Nación), 1–67. Recuperado el

12 de junio de 2016 de: <http://www.fao.org/3/a-i5183s.pdf>

Serrano, R. (2003). *Introducción al Análisis de datos experimentales:*

tratamiento de datos en bioensayos. Uniersitat Jaume, 1- 173.

Recuperado el 12 de mayo de 2016 de:

[https://www.google.com.ec/search?q=\).+Introducci%C3%B3n+al+An%C3%A1lisis+de+datos+experimentales%3A+tratamiento+de+datos+en+bioensayos&oq=\).+Introducci%C3%B3n+al+An%C3%A1lisis+d](https://www.google.com.ec/search?q=).+Introducci%C3%B3n+al+An%C3%A1lisis+de+datos+experimentales%3A+tratamiento+de+datos+en+bioensayos&oq=).+Introducci%C3%B3n+al+An%C3%A1lisis+d)

e+datos+experimentales%3A+tratamiento+de+datos+en+bioensayo  
s&aqs=chrome..69i57.585j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8

- Sharma, H. S. S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. R. y Martin, T. (2014). *Plant biostimulants: A review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses*. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 465–490. Recuperado el 12 de mayo de 2016 de: [https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-013-0101-](https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-013-0101-0)
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., y Pessarakli, M. (2012). *Reactive Oxygen Species , Oxidative Damage , and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions*. Hindawi Publishing Corporation, 2012. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de: <https://www.hindawi.com/journals/jb/2012/217037/>
- Shim, I., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D., y Usui, K. (2002). *Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants*. *Plant Growth Regulation*, (1999), 285–292. Recuperado el 14 de octubre de 2016 de: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1022861312375>
- Suárez, D. y Orozco, M. (2014). *Obtención y Caracterización de Pectina a partir de cascarilla de cacao del Theobroma cacao L., subproducto de una industria chocolatera nacional*. Universidad Tecnológica de Pereira, 1–102. Recuperado el 6 de agosto de 2016 de: <https://prezi.com/plqypljavqv3/caracterizacion-de-la-cascarilla-de-cacao/>
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. y Miller, G. (2012). *ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress*, 259–270. Recuperado el 12 de mayo de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21486305>
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR). (2016). *Arabidopsis eFP Browser*. AT1G20620 Recuperado el 6 de agosto de 2016 de: <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?primaryGene=AT1G20620&modelInput=Absolute>.

- The Arabidopsis Information Resource (TAIR). (2016). *Arabidopsis eFP Browser*. AT1G20620 Recuperado el 6 de agosto de 2016 de: [http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Abiotic\\_Stress&modelInput=Absolute&primaryGene=At1g20620&secondaryGene=At3g27340&override=&threshold=4858.16&modeMask\\_low=None&modeMask\\_stddev=None](http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Abiotic_Stress&modelInput=Absolute&primaryGene=At1g20620&secondaryGene=At3g27340&override=&threshold=4858.16&modeMask_low=None&modeMask_stddev=None)
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR). (2016). *Arabidopsis eFP Browser*. AT4G38630. Recuperado el 6 de agosto de 2016 de: <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?primaryGene=AT4G38630&modelInput=Absolute>
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR). (2016). *Arabidopsis eFP Browser*. AT4G38630. el 6 de agosto de 2016 de: [http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Abiotic\\_Stress&modelInput=Absolute&primaryGene=At4g38630&secondaryGene=At3g27340&override=None&threshold=1078.34&modeMask\\_low=None&modeMask\\_stddev=None](http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?dataSource=Abiotic_Stress&modelInput=Absolute&primaryGene=At4g38630&secondaryGene=At3g27340&override=None&threshold=1078.34&modeMask_low=None&modeMask_stddev=None)
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR). (2016). *Locus*: AT1G20620. Recuperado el 6 de agosto de 2016 de: <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=30574&type=locus>
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR). (2016). *Locus*: AT4G38630. Recuperado el 6 de agosto de 2016 de: <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=127485&type=locus>
- Takeda, T., Furuta, Y., Awano, T., Mizuno, K., Mitsuishi, Y., y Hayashi, T. (2002). *Suppression and acceleration of cell elongation by integration of xyloglucans in pea stem segments*. *Plant Biology*, 99, 9055–9060. Recuperado el 12 de mayo de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC124422/>

- Taylor, P., Street, M., Wt, L., Signaling, P., Xu, J., Duan, X. y Zhang, P. (n.d.). *drought stresses Coupled expression of Cu / Zn-superoxide dismutase and catalase in cassava improves tolerance against cold and drought stresses* 2013 Landes Bioscience . Do not distribute, (February 2015), 37–41. Recuperado el 15 de abril de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3908942/>
- Tayupanta, D. (2011). *validación del efecto de tres bioestimulantes radicales en viveros de rosa de la asociación agropecuaria quinlata. Patate – Ecuador*. Escuela Politécnica del Ejército, 7-24. Recuperado el 5 de marzo de 2016 de: <http://documents.mx/documents/escuela-politecnica-del-ejercito-departamento-de-ciencias-de-la-vida-56eb727ae516f.html>
- Thermo Scientific (2010). *Espectrofotómetros Evolution 201-220*. Recuperado a partir de: [http://www.cienytec.com/PDFS/Espectrofotometro\\_evolution\\_201\\_22](http://www.cienytec.com/PDFS/Espectrofotometro_evolution_201_22)
- Toro, A. y Gonzabay, W. (2015). *Efectos de elicitores en el crecimiento y desarrollo de especies hortícolas cultivadas in vitro e in vivo sometidas a estrés salino*. Universidad Estatal Península de Santa Elena, 1–274. Recuperado el 3 de marzo de 2016 de: <http://repositorio.upse.edu.ec/xmlui/handle/46000/2233>
- Torre, A. La, Battaglia, V., y Caradonia, F. (2015). *An overview of the current plant biostimulant legislations in different European Member States*. Society of Chemical Industry, (August), 727–734. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26227817>
- Trouvelot, S., Héloir, M., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C. y Adrian, M. (2014). *Carbohydrates in plant immunity and plant protection : roles and potential application as foliar sprays*. *Frontiers in Plant Science*, 5(November), 1–14. Recuperado el 12 de mayo marzo de de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4219568/>
- Tuomivaara, S. T., Yaoi, K., Neill, M. A. O., y York, W. S. (2015). *Generation and*

- structural validation of a library of diverse xyloglucan-derived oligosaccharides , including an update on xyloglucan nomenclature. Carbohydrate Research*, 402, 56–66. Recuperado el 6 de julio de 2016 de: <http://www.sciencedirect.com/>
- Van Der Werf, H. (1996). *Assessing the impact of pesticides on the environment. Agriculture, Ecosystems and Environment*, 60(2-3), 81–96. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880996010961>
- Veiga, A. (2013). *Western Blot*. Abcam, 1–49.
- Villoria, D. (2014). *España es de los pocos países que regula los productos que se encuentran bajo la definición de bioestimulantes*”, 60–61. Recuperado el 10 de agosto de 2016 de: <http://www.phytoma.com/tienda/articulos-editorial/290-255-enero-2014/7551-d-enric-bonet-villoria-ceo-de-biovert-sa-y-miembro-de-la-junta-directiva-de-european-biostimulants-industry-council-ebicbr-espaa-es-de-los-pocos-pases-que-regula-los-productos-que-se-encuentran-bajo-la-definicion-de-bioestimulantes>
- Wang, L., Sun, X., Li, S., Zhang, T., Zhang, W. y Zhai, P. (2014). *Application of organic amendments to a coastal saline soil in north China: Effects on soil physical and chemical properties and tree growth*. PLoS ONE, 9(2), 1–9. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0089>
- Willekens, H., Van Camp, W., Montagu, M., Inzé, D., Langebartels, C., y Sandermann, H. (1994). *Ozone , Sulfur Dioxide , and Ultraviolet B Have Similar Effects on mRNA Accumulation of Antioxidant Genes in Nicotiana plumbaginifolia L*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 1007–1014. Recuperado el 7 de diciembre de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC159625/>
- Yamada, T., Takemura, K., Yoshida, J., y Yamago, S. (2006). *Dialkylphosphates as Stereodirecting Protecting Groups in Oligosaccharide Synthesis. Angewandte Chemie*, 7737–7740. Recuperado el 12 de junio de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891305>

- Yang, G., Zhang, W., Zexing, L., Yi-mAER, A., ZHAI, M., y Xu, Z. (2016). *JrWRKY2 and JrWRKY7 of Juglans regia mediate responses to abiotic stresses and abscisic acid by formation of homodimers and interaction*. P.Dietrich. Recuperado el 12 de Agosto de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891305>
- Yang, T., y Poovaiah, B. W. (2002). *Hydrogen peroxide homeostasis : Activation of plant catalase by calcium-calmodulin*. Plant Biology, 99, 4097–4102. Recuperado el 7 de marzo de 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891305>
- Zhu, J. (2007). *Plant Salt Stress*. Encyclopedia of Life Sciences, 1–3. Recuperado el 6 de abril de 2016 de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0001300/abstract>

## **ANEXOS**

ANEXO 1: Secuencia utilizada para la elaboración de cebadores, obtenida de la base  
TAIR

Nombre del Gen	Acceso en la base TAIR	Secuencia del gen
CAT3- Catalase 3.	AT1G20620	<p>1 ACTAAACCAA AATCCTCAAA AGCCTATTTG GGGGATCATC AACCTTCTAT  51 CATCACCATG GATCCTTACA AGTATCGTCC TTCAAGCGCG TACAACGCC  101 CATTCTACAC CACAAACGGT GGTGCTCCAG TCTCCAACAA CATCTCTTCC  151 CTCACCATCG GAGAAAGAGG TCCGGTTCTT CTTGAGGATT ATCATTGAT  201 CGAGAAGGTT GCTAATTTCA CCAGAGAGAG GATCCCTGAG AGAGTGGTTC  251 ATGCTAGAGG AATCAGTGCT AAGGGTTTCT TTGAAGTCAC CCATGACATT  301 TCAAACCTCA CTTGTGCTGA TTTTCTCAGA GCCCCTGGTG TTCAACTCC  351 GGTTATTGTC CGTTTCTCCA CCGTTGTCCA CGAACGTGCC AGTCTGAAA  401 CCATGAGGGA TATTCGTGGT TTTGCTGTCA AGTTTTACAC CAGAGAGGGA  451 AACTTTGATC TTGTTGGGAA CAACACTCCG GTGTTCTTCA TCCGTGATGG  501 GATTCAGTTC CCGGATGTTG TCCACGCGTT GAAACCTAAC CCGAAAACAA  551 ACATCCAAGA GACTGGAGG ATTCTGGACT ACATGTCCCA CTTGCCTGAG  601 AGTTTGCTCA CATGGTGCTG GATGTTTGAT GATGTTGGTA TTCCACAAGA  651 TTACAGGCAC ATGGAGGGTT TCGGTGTCCA CACTACTACT CTTATTGCCA  701 AATCTGAAA AGTTCTCTTT GTGAAGTCC ACTGAAAACC AACTTGTGGG  751 ATCAAGAATC TGACTGATGA AGAGGCCAAG GTTGTGGAG GAGCCAATCA  801 CAGCCACGCC ACTAAGGATC TCCACGATGC CATTGTATCT GGCAACTACC  851 CCGAGTGAAA ACTTTTCATC CAGACCATGG ATCCTGCAGA TGAGGATAAG  901 TTTGACTTTG ACCCACTTGA TGTGACCAAG ATCTGGCCTG AGGATATTTT  951 GCCTCTGCAA CCGGTTGGTC GCTTGGTTCT GAACAGGACC ATTGACAAC  1001 TCTTCAATGA AACTGAGCAG CTTGCGTTCA ACCCGGGTCT TGTGGTTCCT  1051 GGAATCTACT ACTCAGACGA CAAGCTGCTC CAGTGTAGGA TCTTTGCTTA  1101 TGGTGACACT CAGAGACATC GCCTTGACC GAATTATTTG CAGCTTCCAG  1151 TCAATGCTCC CAAATGTGCT CACCACAACA ATCACCATGA AGGTTTTATG  1201 AACTTCATGC ACAGAGATGA GGAGATCAAT TACTACCCCT CAAAGTTTGA  1251 TCCTGTCCGC TGCGCTGAGA AAGTTCCAC CCCTACAAAC TCCTACTCG  1301 GAATTCGAAC AAAGTGCCTC ATCAAGAAAG AGAACAACTT CAAACAGGCT  1351 GGAGACAGGT ACAGATCATG GGCACCAGAC AGGCAAGACA GGTGTGCAA  1401 GAGATGGGTG GAGATTCTAT CGGAGCCACG TCTCACCAC GAGATCCGC  1451 GCATCTGGAT CTCTACTGG TCTCAGGCTG ATCGATCCTT GGGACAGAAA  1501 CTTGCAAGCC GTCTGAACGT GAGGCCAAGC ATCTAGAGGC CAATCTCCAT  1551 ATAAGCTCAG TCTATGTGAG GTACAATCAA TCTCATCGAT CTATCATCGC  1601 TTGGTCGTTA AATCCGTCOA AAAGATAATC ACATGTGTTG TTGTTTCATG  1651 TCTATATAAT AATAATGCTT GTAATCCCAA AAATCATGT TTCCTTCCTT  1701 TCTAGTCTCA CTGTCTTTGT AATCTCTTTT TACAATAAAT CAATGTTTCT  1751 TGAAGC</p>

