



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EFFECTO DE XILOGLUCANOS DERIVADOS DE PLANTAS SOBRE
NIVELES DE CLOROFILA Y EXPRESIÓN DEL GEN DE VACUOLIZACIÓN
DE CLOROPLASTOS EN PLANTAS DE ARABIDOPSIS THALIANA BAJO
ESTRES SALINO**



AUTOR

TIMOTHY WILLIAM PÁEZ WATSON

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EFFECTO DE XILOGLUCANOS DERIVADOS DE PLANTAS SOBRE NIVELES
DE CLOROFILA Y EXPRESIÓN DEL GEN DE VACUOLIZACIÓN DE
CLOROPLASTOS EN PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana* BAJO ESTRÉS
SALINO.

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

Profesor guía

PhD Lien González Pérez

Autor

Timothy William Páez Watson

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
Máster en Ingeniería en Bioprocesos y Biotecnología
CC: 1719928572

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”.

Timothy William Páez Watson

CC: 1721296075

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Julie y Patricio por haberme brindado la oportunidad de estudiar y que, junto con mis hermanos y novia, Alex, Charlie y Karola, han sido mi apoyo moral incondicional. A mis compañeros Dany, Vane, Pipe y Eddie por su gran amistad y apoyo en clases y en el laboratorio.

A Lien González, pues sin su apoyo este proyecto no sería posible. Por su amistad, enseñanza, dedicación y sobre todo paciencia tanto en el laboratorio como a la hora de escribir este proyecto.

RESUMEN

El sistema agronómico practicado en la actualidad, basado en un abuso de los recursos naturales presentes en el suelo, además de un uso indiscriminado de agroquímicos, ha ocasionado problemas relacionados con el suelo, entre ellos la salinidad. Los oligosacáridos de xiloglucanos (XGO) son un tipo de bioestimulante vegetal que promueven el desarrollo vegetativo y podrían ser una alternativa para mitigar los daños ocasionados a los cultivos a causa de la salinidad. El objetivo de este proyecto fue analizar el efecto que tiene la aplicación de XGO a la concentración de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ sobre la expresión relativa del gen de *vesiculación de cloroplastos (CV)* y los niveles de clorofila en plantas de *Arabidopsis thaliana* sembradas *in vitro* en medio líquido. Para ello se empleó un método de inducción a respuesta de las plantas a estrés salino y presencia del bioestimulante.

Se analizó el nivel de expresión del gen *CV* mediante PCR en tiempo real y se obtuvo como resultados que la presencia de los XGO reguló negativamente la expresión de este gen, tanto con o sin salinidad. También se midieron los niveles de clorofila *a* y *b* mediante un método espectrofotométrico y adicionalmente, se determinó la concentración de clorofila *b* mediante HPLC. Se observó que la presencia de los XGO mantuvo los niveles de clorofilas elevados. Mediante los datos más exactos de concentración de clorofila *b* obtenidos por HPLC, se observó que la presencia del bioestimulante evitó la alta tasa de degradación de este pigmento fotosintético bajo condiciones salinas. Los resultados obtenidos indican que los XGO utilizados estimulan un proceso de protección del sistema fotosintético de las plantas de *Arabidopsis thaliana* provocando una mayor tolerancia a condiciones de estrés salino.

ABSTRACT

The agricultural system practiced for many years has been based in the abuse of natural resources from soil and an indiscriminate use of agrochemicals. This has caused soil related problems, for example soil salinity. Xyoglucan oligosaccharides (XGO) are a type of plant biostimulant that stimulates vegetable development and could be an alternative to mitigate the damage in plants caused by soil salinity. This project's aim was to analyse XGO application's effect on the relative expression of the *chloroplast vesiculation* gene (CV) and chlorophyll levels in *Arabidopsis thaliana* plants grown *in vitro* in liquid medium. For this matter a plant response to saline stress and biostimulant presence induction method was used.

CV gene expression was analysed with qRT-PCR, and the results indicate that the presence of XGO in the culture medium down regulates the expression of this gene with and without saline stress. Chlorophyll *a* and *b* levels were measured with a spectrophotometric method, and additionally chlorophyll *b* concentrations were measured with an HPLC. It was observed that XGO application maintained high chlorophyll levels and that it avoided the high rate of chlorophyll *b* degradation by free radicals or enzymatic degradation caused by saline conditions. These results indicate that the specific XGO used stimulate a process that protects *Arabidopsis thaliana*'s photosynthetic system and hence higher tolerance to saline stress conditions.

ÍNDICE

TÍTULO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	5
1.3. Objetivo General.....	5
1.4. Objetivos específicos.....	6
1.5. Justificación del trabajo	6
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 Bioestimulantes	8
2.1.2 Tipos de bioestimulantes por su naturaleza química.....	9
2.1.3 Regulación de los Bioestimulantes.....	17
2.1.4 Impacto económico mundial de los Bioestimulantes	18
2.1.5 Perspectivas y retos de los Bioestimulantes	19
2.2 Suelos en la agricultura	20
2.2.1 Salinidad del suelo.....	21
2.3 Sistema fotosintético de las plantas	26
2.3.1 Pigmentos fotosintéticos presentes en el cloroplasto.....	29
2.3.2 Degradación de cloroplastos	32
CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL	36
CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS	38
4.1. Oligosacáridos de Xiloglucanos utilizados	38
4.2. Material vegetal y desinfección de semillas	38
4.3. Siembra y obtención de muestras	39
4.4. Determinación de niveles de expresión relativa del gen de <i>Vesiculación de Cloroplastos</i> mediante PCR en tiempo real	39
4.5. Determinación de condiciones para la extracción de pigmentos fotosintéticos de hojas de plantas de <i>A. thaliana</i>	42

4.6. Cuantificación de concentración de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> de plantas de <i>A. thaliana</i> mediante espectrofotometría	44
4.7. Estandarización y determinación de la concentración de clorofila <i>b</i> mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	45
4.8. Análisis estadístico de resultados	46
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1. Medición de niveles de expresión relativa del gen <i>CV</i> de <i>A. thaliana</i>	47
5.2. Establecimiento de condiciones para la extracción de pigmentos fotosintéticos de <i>A. thaliana</i>	55
5.3. Cuantificación de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> mediante métodos espectrofotométricos	57
5.4. Estandarización y medición en HPLC de concentración de clorofila <i>b</i>	64
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	75
6.1. Conclusiones	75
6.2. Recomendaciones	76
REFERENCIAS	77

TÍTULO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Efecto de xiloglucanos derivados de plantas sobre niveles de clorofila y expresión del gen de *vacuolización de cloroplastos* en plantas de *Arabidopsis thaliana* bajo estrés salino.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La salinidad del suelo es uno de los problemas agrícolas más preocupantes, especialmente en regiones áridas y semiáridas, debido a sus efectos adversos sobre la producción agrícola y el desarrollo sustentable. En muchas regiones del mundo el suelo se vuelve salino con el pasar de los años debido a un mal uso de los sistemas de irrigación y fertilización del mismo (Gorji, Tanik, y Sertel, 2015, pp. 24-33). Concentraciones de sales en suelo que hacen que la conductividad eléctrica sea mayor a 4 dSm^{-1} (deciSiemens por metro) son consideradas suficientes como para catalogar a un suelo como salino. Este tipo de suelos ocasionan un aumento en la presión osmótica, disminución de la biodisponibilidad de agua y finalmente efectos adversos sobre la micro flora y el desarrollo vegetativo (Food and Agricultural Organization [FAO] e Intergovernmental Technical Panel on Soils [ITPS], 2015, pp-124-127).

Varios estudios han analizado el efecto que tienen las altas concentraciones de sal en suelo sobre el desarrollo de plantas de importancia agronómica. Estos estudios demostraron una disminución en la tasa de crecimiento, la tasa fotosintética, una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno y por ende oxidación de proteínas y de membrana, en plantas de *Solanum lycopersicum* y de *Vicia faba* (Chen et al., 2016; Qados y Amira, 2011, pp.452-457).

Con el fin de sobrellevar el problema de salinización de suelos se han desarrollado distintas tecnologías. Entre estas se encuentran la lixiviación directa de sales (Lin, Ishikawa, Akoh, Yang, y Zhang, 2016, p.29), el uso de variedades vegetales resistentes a condiciones salinas (Guo et al., 2015, pp. 432-439), la domesticación de nuevos cultivares resistentes a condiciones salinas, la

biorremediación, el uso de agroquímicos y finalmente el uso de compuestos de origen natural (FAO e ITPS, 2015, p.172).

Los compuestos de origen natural tienen distintos efectos sobre las plantas. Por un lado, existen compuestos orgánicos que pueden enriquecer con nutrientes al suelo para que la planta pueda tolerar las condiciones de estrés salino a las que se encuentra. Como ejemplo, en un caso de estudio en Egipto se demostró que el uso de estiércol y yeso en suelos salinos permitía un mejor desarrollo de plantas originarias de la zona (Abd Elrahman, Mostafa, Taha, Elsharawy, y Eid, 2012, pp. 89-95). Otro enfoque totalmente distinto es el uso de productos denominados bioestimulantes. Los bioestimulantes son formulaciones que contienen sustancias o microorganismos cuya función es estimular procesos naturales de las plantas para mejorar o favorecer la absorción de nutrientes, la eficiencia nutritiva, la tolerancia a estrés abiótico y la calidad del cultivo (European Biostimulant Industry Council [EBIC], 2013).

El uso de bioestimulantes en la industria agrícola ha ganado gran interés con el pasar de los años (Wilson, Xu, y Taylor, 2015). Se han reportado distintas formas mediante las cuales varias formulaciones de bioestimulantes actúan para ayudar a las plantas durante su desarrollo, entre las cuales destacan la modificación de rutas metabólicas para incrementar el rendimiento, tolerancia o resistencia a factores de estrés abiótico, facilidad en la asimilación y transporte de nutrientes, un uso más eficiente de sus recursos hídricos, entre muchos otros. A pesar de que ha sido complicado analizar el impacto global que tiene el uso de bioestimulantes en el mercado global, se estima que en Europa en el año 2011 el mercado de los bioestimulantes representó un valor alrededor de 200 millones de euros y en el 2015 tuvo un valor cercano a 500 millones de euros (EBIC, 2015).

En las últimas tres décadas se han realizado estudios analizando el efecto del uso de bioestimulantes sobre las plantas para su potencial uso agrícola. Algunos de ellos realizados en la década del 90, demostraron un efecto positivo de ciertos estimulantes biológicos, como extractos que contenían vitaminas y ácido húmico obtenidos de algas marinas (Russo y Berlyn, 1992, pp. 231-248). Así mismo, el

producto comercial "ROOTS®" (Poincelot, 1993, p.116) mejoró la tasa de germinación de varias especies vegetales, aceleró la aparición de hojas y provocó un aumento del rendimiento de la producción.

En el siglo XXI, junto con el desarrollo de nuevas tecnologías, se desarrollaron estudios de análisis más exhaustivos sobre los efectos específicos del uso de bioestimulantes en las plantas, los cuales demostraron que ciertos bioestimulantes no solo mejoraban su rendimiento, sino que también le conferían resistencia ante factores bióticos y/o abióticos. En un estudio realizado en 2005 se demostró que el uso del bioestimulante "ROOTS3®" (LebanonTurf) le permitía a plantas de *Betula papyrifera* tolerar condiciones de estrés por sequedad aumentando su tasa fotosintética y produciendo lípidos impermeables a nivel cuticular para evitar evapotranspiración (Richardson, Aikens, Berlyn, y Marshall, 2003, pp.36-48). En la actualidad, las herramientas tecnológicas permiten realizar estudios más profundos, tanto bioquímicos como moleculares, con el fin de entender los mecanismos específicos de acción de estos compuestos sobre el metabolismo de las plantas.

Un tipo de bioestimulantes son los oligosacáridos, que actúan de manera natural en las células como parte de los mecanismos de señalización molecular que regulan el metabolismo (Fry et al., 1993, pp. 1-3; Pattanagul y Madore, 1999, pp. 132-141). Los oligosacáridos de glucanos son un grupo de moléculas que han sido analizados como un potente bioestimulante. En un estudio se utilizó sulfato de β -1,3 glucano obtenido de algas y se observó que este producto promovió la señalización de la ruta del ácido salicílico y por ende, una mejor respuesta de defensa frente a estrés (Menard, 2004, pp. 93-98). Otro ejemplo de oligosacáridos que ha sido estudiado son los derivados de los xiloglucanos de las plantas.

La degradación de polisacáridos de xiloglucanos en las células vegetales, tanto por un efecto propio celular o por ataque de patógenos, libera oligosacáridos de xiloglucanos, que tienen la capacidad de interactuar con receptores de membrana, activando una cadena de reacciones con efecto de defensa natural de las plantas. Sus potencialidades han sido empleadas con fines comerciales,

como es el caso de un producto cuya formulación está basada en una mezcla de xiloglucanos obtenido de la corteza del tamarindo (*Tamarindus indica* L.). El mismo puede ser usado como pesticida, para mantener la frescura de las plantas y como protector de la envoltura de semillas sintéticas (Lienart, 2008; Marcus et al., 2008, p. 60).

Adicionalmente, se han realizado algunos estudios para determinar la relación que tiene la aplicación de bioestimulantes sobre los niveles de clorofila y por ende en la tasa fotosintética de la planta (Przybysz, Gawrońska, y Gajc-Wolska, 2014, pp. 5-16). La clorofila es el principal pigmento fotosintético presente en la mayoría de las plantas, responsable del color verde de las mismas. Es un compuesto químico con un centro de magnesio, que permite que se exciten electrones con la irradiación de la luz y así que inicien las reacciones de la fotosíntesis (Ohmiya, Hirashima, Yagi, Tanase, y Yamamizo, 2014, pp. 9-14).

Existen distintos tipos de clorofila dependiendo de su arreglo molecular y el rango de luz que pueden absorber para transformarla en energía química. Según su estructura molecular, existen dos tipos de clorofilas (*a* y *b*), que se encuentran en los cloroplastos formando agrupaciones proteicas. Estas agrupaciones en complejos permiten que las hojas utilicen rangos de luz más variados para generar energía química en la fotosíntesis y representa la proporcionalidad existente entre cantidad de clorofila *a* y clorofila *b* en plantas (Horie, Ito, Kusaba, Tanaka, y Tanaka, 2009, p. 284).

Por otra parte, en el año 2014 se realizó un estudio en el que se identificó y caracterizó un gen de gran importancia en procesos de respuesta en plantas que se encuentran bajo estrés, relacionado directamente con la concentración de clorofila de las plantas. Este es el gen de *Vesiculación de los cloroplastos* (CV) que se activa a manera de respuesta ante cambios en el ambiente que pueden suponer un daño a la planta. La proteína CV es un péptido corto que viaja desde las mitocondrias hasta el interior de los cloroplastos y destruye el sistema fotosintético de la planta con el fin de canalizar todas las biomoléculas contenidas en el hacia las semillas de las plantas y, de esta forma, asegurar que las semillas puedan germinar sin problemas en otro ambiente menos hostil. Cuando este gen

es silenciado, o su expresión es minimizada, se ha logrado obtener plantas que consigan tolerar el estrés abiótico de mejor manera (Wang, Blumwald, 2014, p-475-488).

Existe gran cantidad de información sobre bioestimulantes específicos y se ha logrado elucidar en parte los mecanismos mediante los cuales interactúan con las plantas a nivel molecular. Sin embargo, existen aún más cantidad y variedad de formulaciones de bioestimulantes que se utilizan, pero no se conocen sus mecanismos moleculares de acción o todos sus efectos sobre las plantas.

1.2. Planteamiento del problema

A finales del 2015 se determinó que más de 100 países a nivel mundial están afectados por problemas de salinidad en el suelo y se estima un área mayor a un billón de hectáreas de suelo afectados (FAO e ITPS, 2015, p. 125). Esta condición afecta a la mayoría de cultivos sensibles a salinidad de importancia agrícola estimándose una pérdida de al menos 12 billones de dólares americanos anuales (Pitman y Läuchli, 2002, p.3). El uso de bioestimulantes, como los oligosacáridos de xiloglucanos, podría ser una estrategia útil para mitigar los daños ocasionados a los cultivos a causa de la salinidad del suelo. Sin embargo, no se conocen los efectos o el mecanismo específico de acción de muchas de estas mezclas, con el fin de apuntar a estrategias de aplicación de los mismos en distintos cultivos para mitigar o conferir tolerancia en las plantas a los distintos tipos de estrés que las afectan. El desconocimiento las vías mediante las cuales distintos bioestimulantes actúan sobre las plantas es un impedimento para el desarrollo de nuevos productos, o el uso de los ya disponibles en los cultivos afectados por estrés abiótico como el salino u otro tipo de estrés.

1.3. Objetivo General

Analizar los cambios en los niveles de clorofila y expresión del gen de *vesiculación de cloroplastos* en plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacáridos de xiloglucanos bajo estrés salino.

1.4. Objetivos específicos

- Determinar la expresión relativa del gen de *vesiculación de cloroplastos* (CV) en hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacáridos de xiloglucanos en condiciones de estrés salino mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.
- Determinar las concentraciones de *clorofila a* y *b* en hojas de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacáridos de xiloglucanos en condiciones de estrés salino mediante métodos espectrofotométricos.
- Estandarizar un método cromatográfico para la cuantificación de *clorofila b* en hojas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con oligosacáridos de xiloglucanos en condiciones de estrés salino mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

1.5. Justificación del trabajo

El estudio del el efecto que tienen los oligosacáridos de xiloglucanos (XGO) sobre los niveles de *clorofila a* y *b*, así como la expresión del gen de *vesiculación de cloroplastos* en las plantas, permitirá determinar si los mismos influyen sobre la concentración de estos pigmentos y la degradación de cloroplastos. Estos oligosacáridos son compuestos con efectos que han sido caracterizados a nivel morfológico y de expresión génica global, pero no se conocen sus efectos o vías de acción sobre la fotosíntesis en presencia de estrés salino.

Por tanto, los resultados que se obtengan podrán contribuir a elucidar en parte las rutas sobre las cuales actúan los XGO para que las plantas puedan tolerar las condiciones de estrés salino. Esto a su vez conllevará a nuevos estudios dirigidos a conocer rutas bioquímicas específicas en las que actúan estos productos, lo que ayudará a plantear estrategias de aplicación de estos bioestimulantes, ya sea por el modo de acción o la etapa de desarrollo de la planta en la cual se los debe aplicar. Por otro lado también permitirá proponer estructuras similares para nuevos procesos de purificación con potencial

actividad biológica como bioestimulantes. Hasta la fecha esto no ha sido posible, tanto a nivel nacional como internacional, debido a la poca información existente respecto al uso de oligosacáridos como bioestimulantes que ayuden al crecimiento de plantas en situaciones de estrés abiótico.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Bioestimulantes

Durante décadas se ha practicado un sistema agronómico basado en el uso y abuso de recursos naturales presentes en el suelo, además del empleo excesivo de fertilizantes y plaguicidas. El uso extensivo de agroquímicos comenzó con la gran revolución verde en el siglo XX, siendo un factor de gran importancia para aumentar el rendimiento de los cultivos maximizando el uso del área cultivable. A pesar del potencial aparente que presentaron los agroquímicos, con el pasar de los años y gracias a estudios realizados desde su aparición, se han puesto en evidencia ciertos inconvenientes presentes debido al abuso de estos compuestos. Se ha demostrado que ciertos plaguicidas pueden llegar a ser tóxicos para el ser humano o animales que se alimenten de vegetales irrigados con estos productos. Es también conocido que el uso de fertilizantes aumenta la susceptibilidad de plantas a ser atacadas por patógenos, además de contaminar el ecosistema en el que son aplicados (Giller et al., 2015, pp. 870–892; Liebman y Davis, 2000, pp. 27–47; Pingali, 2012, pp. 12302–12308).

Como respuesta ante estos problemas los científicos del siglo XXI han apuntado a buscar sistemas mucho más sustentables, ambientalmente amigables y orgánicos. Un ejemplo de tecnología utilizada para cumplir con estos objetivos son los programas de mejora de plantas, ya sea por fitomejoramiento clásico o por técnicas moleculares biotecnológicas, para obtener cultivares altamente productivos, resistentes a plagas o a condiciones ambientales adversas, para así evitar el uso de agroquímicos. Estas son alternativas viables, sin embargo, el fitomejoramiento clásico es un proceso que puede durar décadas sin obtener los resultados óptimos y la transgénesis, como técnica de mejora, ha sido cuestionada e inclusive prohibida como sistema de agricultura en varios países, como es el Ecuador. Otra alternativa que ha aumentado su interés considerablemente en la última década, es el uso de bioestimulantes (Bulgari, Cocetta, Trivellini, Vernieri, y Ferrante, 2015, pp. 1–17).

Según el Consejo de la Industria de Bioestimulantes Europea (EBIC, por sus siglas en inglés) los bioestimulantes son formulaciones que contienen una o más sustancias de origen biológico. Estos al ser aplicados directamente a una planta, simulan procesos naturales que logran mejorar la absorción y la optimización de los nutrientes, la tolerancia a estrés biótico y abiótico, la calidad del cultivo, entre otras características favorables. Los compuestos que producen este efecto en las plantas son denominados “bioactivos”, dentro de los cuales cabe mencionar elementos minerales, sustancias húmicas, vitaminas, aminoácidos, quitina, quitosanos, poli y oligosacáridos entre otros. El carácter biológico de los bioestimulantes involucra también células, por ejemplo hongos, bacterias y microalgas que al ser aplicadas a cultivos estimulan una respuesta natural beneficiosa para la planta (Calvo, Nelson, y Kloepper, 2014, pp. 3–41; European Biostimulants Industry Council, 2015).

Es importante mencionar que los compuestos de origen natural que tienen un efecto de tipo nutritivo o plaguicida no son considerados como bioestimulantes. Las comisiones Europea y Norteamericana de Bioestimulantes (las dos agencias más grandes en el mercado de los bioestimulantes) han designado que estos compuestos provocan que las plantas tratadas naturalmente presenten mayor tolerancia a ataque de patógenos, o mejor captación de nutrientes, y por tal razón no deben ser considerados como fertilizantes ni plaguicidas en el marco regulatorio. Como es un mercado creciente (tanto económicamente como en el ámbito investigativo) se espera que el concepto de bioestimulantes sufra de ciertas modificaciones con el pasar de los años (du Jardin, 2015, pp. 3–14; European Biostimulants Industry Council, 2016).

2.1.2 Tipos de bioestimulantes por su naturaleza química

Muchos autores clasifican los distintos tipos de bioestimulantes en grupos según la naturaleza química de su ingrediente activo, el efecto que tengan sobre la planta, su modo de aplicación y su origen. Según su naturaleza química, los principales tipos de bioestimulantes son sustancias húmicas, hidrolizados proteicos y aminoácidos, quitina y quitosano, poli- y oligosacáridos, inóculos de

microorganismos, entre otros. Algunos autores consideran a elementos minerales y a sustancias orgánicas (como el compost o desechos de la industria agrícola) como bioestimulantes. Sin embargo, estos componentes tienen un efecto fertilizante en los cultivos, por lo tanto no serán considerados como tal. A continuación se explica en detalle los tipos de bioestimulantes principales por su naturaleza química, con sus posibles efectos sobre plantas.

2.1.2.1 Sustancias húmicas

Las sustancias húmicas son compuestos liberados producto de la degradación de la materia orgánica de los microorganismos. Están considerados como los compuestos más abundantes que ocurren naturalmente en el suelo y numerosos estudios demuestran que tienen efectos de mantener el equilibrio de nutrientes del suelo, ayudan al intercambio de oxígeno o de otros gases en plantas y microorganismos y participan en el transporte de sustancias tóxicas en organismos vivos. La funcionalidad de las sustancias húmicas depende directamente de sus características químicas, dentro de las cuales tenemos los ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y las huminas (Calvo et al., 2014, pp. 87–102).

Los ácidos húmicos (HAs por sus siglas en inglés *Humic acids*) se diferencian de los ácidos fúlvicos en que son compuestos de alto peso molecular (miles de *Daltons* de tamaño) y son solubles en soluciones alcalinas. Se han realizado numerosos estudios que demuestran un efecto positivo de su aplicación sobre el crecimiento de distintas especies vegetales, entre ellas el tomate (*Solanum lycopersicum*), la soya (*Glicine max*), la papa (*Solanum tuberosum*), el arroz (*Oriza sativa*), entre otros. El principal efecto citado en estos estudios es un cambio morfológico en las plantas, principalmente una tendencia a aumentar el crecimiento radicular hasta cierta concentración de los HAs aplicados. Es notorio en estos estudios que dosis muy elevadas de estos compuestos tienen un efecto inhibitorio en la respuesta esperada. Otra consecuencia de la aplicación de los HAs es un aumento en el rendimiento y calidad del cultivo, debido principalmente a que estos compuestos ayudan a que exista un transporte efectivo de nutrientes al interior de las células vegetales. Otras sustancias húmicas con actividad

biológica son los ácidos fúlvicos y las huminas (Adani, Genevini, Zaccheo, y Zocchi, 1998, pp. 324–361; Calvo et al., 2014, pp. 87–102; Nardi, Carletti, Pizzeghello, y Muscolo, 2009, pp. 383–441).

2.1.2.2 Hidrolizados proteicos y aminoácidos

Mediante métodos enzimáticos, químicos o físicos se pueden obtener hidrolizados proteicos partiendo de una proteína animal o vegetal. Este tipo de hidrolizado contendrá varios péptidos de distinto tamaño, aminoácidos libres e inclusive, en algunas formulaciones, poseen residuos de ácidos grasos, carbohidratos y otras biomoléculas. Inicialmente se tomaba en cuenta este tipo de solución como un fertilizante, pues es una gran fuente de nitrógeno para que las plantas puedan sintetizar sus proteínas o pigmentos fotosintéticos. Sin embargo, más recientemente se han realizado estudios utilizando marcajes moleculares con isótopos radioactivos, en donde se detalla la forma en la cual las plantas utilizan ciertos péptidos y aminoácidos, no necesariamente para procesos de cata y anabolismo. Estos estudios dan un punto de partida para conocer el mecanismo específico de acción de ciertas formulaciones de hidrolizados proteicos y los engloban en el concepto de bioestimulante (Bulgari et al., 2015, pp. 1–17; Calvo et al., 2014, pp. 3–41).

El efecto que tienen los hidrolizados proteicos sobre distintas especies vegetales depende del tipo con el que se esté trabajando. Existen hidrolizados proteicos disponibles en el mercado, cuya aplicación ha sido extensamente experimentada con varias especies vegetales. Tomando por ejemplo el Siapton®, que contiene hidrolizado de tejido epitelial animal, el cual optimiza la captación y el uso de nutrientes por las plantas. De esta forma se obtienen cultivos altamente productivos en menor tasa de tiempo y con un menor uso de fertilizantes. Por otro lado, existen hidrolizados que modifican el patrón fitohormonal de las plantas, de esta manera iniciando una cadena de reacciones que mejoran la eficiencia del flujo de nitrógeno y fósforo en las células (Colla et al., 2012, pp. 845–861; Fan, Du, y Guo, 2012, pp. 127–133).

2.1.2.3 Microorganismos

La mayoría de inóculos de microorganismos utilizados en la agricultura tienen un efecto de biocontrol o biopesticida, lo cual no es considerado como bioestimulante. Por otro lado, existen aplicaciones de inóculos de microorganismos que tienen un efecto bioestimulante sobre las plantas. Las soluciones con microorganismos pueden ser aplicadas directamente sobre el suelo donde están creciendo las plantas, a nivel foliar o inclusive se realizan lavados de semillas antes de que germinen. El efecto estimulante que tienen sobre las plantas debido a una interacción entre compuestos producidos por los microorganismos involucra un aumento en la capacidad de captación de nutrientes, aumenta el área foliar y el tamaño de las raíces de las plantas (Calvo et al., 2014, pp. 87-102; du Jardin, 2015, pp. 3–14).

2.1.2. 4 Polisacáridos

Los polisacáridos son polímeros de azúcares (lineales o ramificados) que tienen varias funciones dentro de las células que dependen directamente de su estructura química. Al ser azúcares muchas veces se confunde su función como bioestimulante por una función más nutritiva. Existen varios métodos agronómicos mediante los cuales se aplican grandes cantidades de polisacáridos a cultivos vegetales mejorando la respuesta de crecimiento y producción. Sin embargo, el efecto de estas técnicas es brindar azúcares que las plantas pueden utilizar en sus procesos de síntesis y obtención de energía. Por otro lado, existen tipos de polisacáridos específicos que pueden ser utilizados como bioestimulantes (a muy bajas concentraciones) en cultivos vegetales. Como ejemplos de polisacáridos utilizados como bioestimulantes son los carragenanos obtenidos de microalgas marinas. Estos componentes tienen la capacidad de estimular la expresión de genes que conlleven a la síntesis de enzimas hidrolíticas que permiten una defensa ante los microorganismos patógenos (especialmente de hongos). Además, se ha probado también que estimulan la expresión del ácido jasmónico, por ende la señalización celular oxidativa de la planta (Trouvelot et al., 2014, pp. 592-621).

Otros estudios han determinado que el uso de carragenanos y sus oligosacáridos aceleran la tasa fotosintética, el crecimiento foliar y el metabolismo basal en plantas de *Nicotiana tabacum*. En este estudio se demostró que la aplicación de polímeros más pequeños de carragenanos (oligosacáridos) tuvo una mayor respuesta fisiológica que sus polisacáridos correspondientes, probablemente debido a la facilidad de absorción y de transporte de estas moléculas más pequeñas (Stadnik y Freitas, 2014, pp. 85–98; Trouvelot et al., 2014, pp. 592–621).

2.1.2.5 Oligosacáridos

A pesar de que algunos estudios indican la funcionalidad del uso de polisacáridos como bioestimulantes, se ha concluido que es mucho más eficiente tratar cultivos vegetales con moléculas de tamaño menor obtenidos de la hidrólisis enzimática de polisacáridos. Producto de esta degradación se obtienen moléculas que consisten en repeticiones cortas de monómeros de azúcares (hasta de 10 monómeros) denominados oligosacáridos. Estas moléculas son ampliamente utilizadas como bioestimulantes y su funcionalidad en las células varía dependiendo de la estructura química que tengan (Bulgari et al., 2015, pp. 1–17; du Jardin, 2015, pp. 3–14).

Los oligosacáridos ocurren naturalmente en las células vegetales producto de la degradación de polisacáridos presentes en la pared celular. Estos polímeros presentan funciones de señalización celular química que, al entrar en contacto con receptores específicos en la pared celular de otras células, inician una cadena de reacciones que conlleva a la activación de sistemas de defensa, crecimiento, diferenciación, morfogénesis, etc. Este tipo de eventos ocurren dentro de las células cuando existe una hidrólisis de los polisacáridos presentes en la pared celular, que puede deberse a un ataque de patógenos o a un mecanismo aún desconocido de la propia célula vegetal para enviar mensajes a sus células cercanas (S C Fry, Aldington, Hetherington, y Aitken, 1993, pp. 1–5).

Se conocen distintos mecanismos detallados a continuación, mediante los cuales los oligosacáridos actúan como bioestimulantes de las plantas (González, Castro, Vera, y Moenne, 2012, pp. 443–448; Katapodis et al., 2002, pp. 1413–1416):

- Síntesis de compuestos antimicrobianos en las células denominados fitoalexinas. Se producen como consecuencia de la cadena de reacciones que se activa en la célula debido al reconocimiento con ciertos oligosacáridos a nivel de membranas. Estos compuestos ayudan a la planta a defenderse ante el ataque de patógenos.
- Síntesis de inhibidores de proteasas que son excretadas al medio extracelular. Estos compuestos interfieren en el mecanismo de ataque de microorganismos patógenos que dependen de enzimas hidrolíticas de tipo proteasas para poder ingresar a las células o para degradar proteínas que puedan reconocerlos. Esta inactivación de proteasas de microorganismos patógenos es un mecanismo muy efectivo de defensa.
- Inducción de muerte celular hypersensible. Este tipo de respuestas sucede cuando el ataque del patógeno al interior de la célula es inevitable e impide que el microorganismo infecte otras células. De esta forma se liberan enzimas hidrolíticas encargadas de esta muerte celular (que podrán también afectar al microorganismo patógeno), además de que el microorganismo que ha iniciado la infección ya no tendrá una fuente nutritiva para sobrevivir.
- Activación de rutas de fenil-propanoides que conllevan a la síntesis de compuestos fenólicos, entre ellos el ácido salicílico, compuesto esencial en la activación de mecanismos de respuesta temprana en plantas.
- Regulación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*) presentes en las células. Algunos estudios han demostrado que un aumento en las ROS a nivel extracelular estimula la elongación celular al modificar las condiciones de la pared celular. Por otro lado, a nivel intracelular se ha visto una disminución en la concentración de estos componentes, efecto atribuido

a la sobreproducción de enzimas antioxidantes y compuestos antioxidantes.

A continuación se detallan los tipos de oligosacáridos existentes derivados de plantas, hongos y algas con actividad estimulante en las plantas:

Derivados del glucano

El glucano es un grupo de polisacáridos que consiste en monómeros de glucosa, ya sea lineal o ramificado. La celulosa y el glucógeno son ejemplos de polímeros de tipo glucanos. Existen numerosos estudios que han determinado que los oligosacáridos derivados de estos polímeros presentes en la pared celular de los hongos, las plantas y las algas presentan actividad biológica al ser reconocidas por receptores en las membranas de células vegetales. También se ha descrito la cadena de reacciones que se activan para generar una respuesta en el sistema inmune de los mamíferos al entrar en contacto con estos oligosacáridos del glucano y es posible que este mecanismo sea similar en las células vegetales, ocasionando la acumulación de compuestos antimicrobianos y antioxidantes tales como las fitoalexinas (Ayers, Valent, Ebel, y Albersheim, 1976, pp. 766–774; Brown y Gordon, 2003, pp. 311–315; Klarzynski et al., 2000, pp. 1027–1038).

Derivados de quitina

La quitina es un polímero que consiste de la repetición lineal de monómeros de N-acetilglucosamina, un derivado de la glucosa. Se encuentra naturalmente en las paredes celulares de los hongos, exoesqueletos de artrópodos e insectos, en el interior de estructuras fisiológicas de moluscos, etc., brindando principalmente soporte a estas estructuras debido al nivel de compactación y rigidez del polímero. El quitosano a su vez es también un polímero que se obtiene producto de la deacetilación de la quitina. Tanto la quitina como el quitosano son polímeros biodegradables y no presentan toxicidad para las plantas o los animales. Ambos

polímeros han demostrado tener propiedades antimicrobianas, pero no actúan directamente contra los microorganismos patógenos de las plantas, sino que aumentan los niveles de expresión de genes de respuesta de plantas frente a patógenos. (Zargar, Asghari, y Dashti, 2015, pp. 204–226; El Hadrami, Adam, El Hadrami, y Daayf, 2010, pp. 968–987; Malerba y Cerana, 2016, pp. 996–1031).

Derivadas de pectina

La pectina es un polisacárido heterogéneo que se encuentra presente en las paredes celulares de las plantas, conformado principalmente por repeticiones de monómeros de ácido galacturónico. La degradación parcial de este tipo de polisacáridos genera oligosacáridos de ácido galacturónico que desencadenan en reacciones biológicas como efecto estimulante. Algunas de las propiedades que se ha encontrado que tienen estos oligosacáridos en las plantas es estimular el crecimiento, el desarrollo y las reacciones de protección ante posibles ataques de patógenos (Aducci, 2012, pp. 65–91).

Derivadas del xiloglucano

El xiloglucano es un polímero perteneciente al grupo de polisacáridos de tipo hemicelulosa. Aparte del xiloglucano, existen también el xilano, glucoronoxilano, manano, entre otros como parte de la hemicelulosa. El xiloglucano consiste en residuos piranosidos que brindan rigidez a la molécula. En las paredes celulares de las plantas existen agregados de celulosa con xiloglucano formando especies de microfibrillas. Cuando el xiloglucano se degrada parcialmente en estos agregados, la pared celular pierde rigidez y de esta forma la turgencia de las células cambia permitiendo elongación celular (Ren, Picout, Ellis, y Ross-Murphy, 2004, pp. 2384–2391).

Mediante métodos enzimáticos (con endo- o exo-xilanasas) se puede degradar parcialmente los xiloglucanos presentes en la pared celular de plantas y obtener sus oligosacáridos. Un estudio realizado en el 2002 determinó que al utilizar

estos compuestos en medio de crecimiento con plantas de malva (*Malva silvestris*) y de algodón (*Gossypium hirsutum*) se estimulan los procesos de cayogénesis y embriogénesis somática, indicando que estos compuestos probablemente tienen un efecto similar al de hormonas en las plantas (Katapodis et al., 2002, pp. 1413–1416).

Otros estudios indican que la presencia de oligosacáridos de xiloglucanos incrementa la producción de etileno en las plantas, de esta forma acelerando el crecimiento y la expansión celular. También se ha apuntado la probabilidad de que la presencia de estas moléculas activen enzimas que actúan durante la degradación normal de xiloglucanos en la pared celular de las plantas y de esta forma promueven la elongación celular, tal como se detalló anteriormente. Finalmente, algunos estudios científicos han indicado que la presencia de bajas concentraciones de oligosacáridos de xiloglucanos sobre las células vegetales de Tabaco (*Nicotiana tabacum*) modulan la expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés de las plantas (Fry, 1989, pp. 1–11; González-Pérez et al., 2014, pp. 6803–6816; Van Sandt, Suslov, Verbelen, y Vissenberg, 2007, pp. 1467–1473).

2.1.3 Regulación de los Bioestimulantes

Debido a que el concepto de bioestimulante ha sufrido varias modificaciones con el tiempo y que es muy probable que se siga modificando a medida que se realizan nuevos estudios, es complicado analizar las regulaciones que rodean el uso de bioestimulantes según distintos países. Diversas zonas geográficas a nivel mundial tienen diferentes grados de desarrollo con respecto a la regulación específica del término, el uso y el control de bioestimulantes. Europa es el continente que presenta el mayor desarrollo en cuanto a la legislación correspondiente a los bioestimulantes, por lo que representa el mayor porcentaje del mercado de bioestimulantes a nivel mundial (cerca del 30 %), seguido de Norte América con el 23,4 % (Wood, 2015, p. 642).

A pesar de la distinción entre los bioestimulantes con los agroquímicos, al momento de realizar registros de productos de este tipo, tanto en Europa como en América, se debe seguir la vía de registro de tipo fertilizante o pesticida. Para evitar el uso del término bioestimulante, del cual no se ha llegado a un consenso con respecto a su terminología, a fines del 2015 en Europa se habilitó la posibilidad de registro bajo el nombre de “producto que protege a las plantas”. Este inconveniente es notorio en las zonas geográficas mencionadas, y en Latino América el problema es aún peor, debido a que en su gran mayoría el producto se rige bajo la misma legislación de los pesticidas (du Jardin, 2015, pp. 3–14; Malusá y Vassilev, 2014, pp. 6599–6607).

2.1.4 Impacto económico mundial de los Bioestimulantes

Estudios económicos indican que el mercado de los bioestimulantes está proyectado a alcanzar \$2,241 millones de dólares en ventas en el año 2018, con una tasa de crecimiento del 12,8 %. El mayor mercado donde se utilizan los bioestimulantes en un sistema de producción agrícola es el europeo, debido en gran parte al rechazo de su población hacia el uso de agroquímicos y de los cultivos transgénicos. Otro factor que ha favorecido el surgimiento de este mercado, aunque en menor proporción, son las regulaciones que se han creado que favorecen la libertad de venta de estos productos, como se mencionó anteriormente, sin ser considerados plaguicidas ni fertilizantes (*Figura 1*) (Mordor Intelligence, 2016; Wood, 2015, p.642).

Participación Global de Bioestimulantes de Plantas (2015)

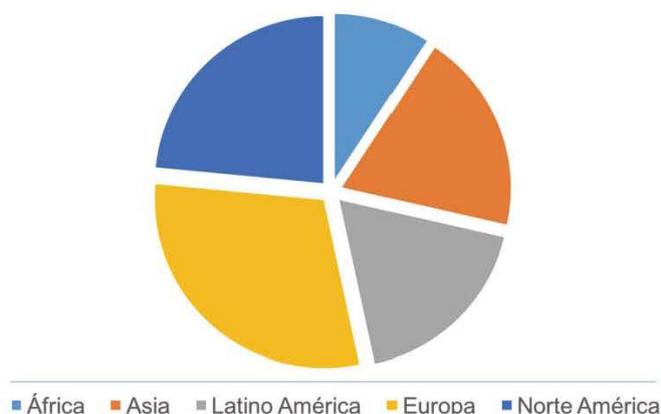


Figura 1. Porcentaje de participación por regiones a nivel global del mercado de Bioestimulantes en 2015.

Adaptado de Wood, 2015, p. 642.

Por otro lado, en Latinoamérica se estima que la tasa de crecimiento económico que represente el consumo de Bioestimulantes sea mayor a la tasa global. Estudios económicos estiman un 17,5 % de crecimiento anual, en comparación al 12,8 % a nivel mundial, debido principalmente al aumento en la demanda de productos orgánicos, los daños medioambientales ocasionados debido al uso de agroquímicos y una creciente necesidad de aumentar la producción agrícola que pueda sostener un crecimiento acelerado alarmante de la población mundial (Wood, 2015).

2.1.5 Perspectivas y retos de los Bioestimulantes

La intensificación ecológicamente sustentable de la producción agrícola requiere de tecnología que tenga la capacidad de proteger y preservar los recursos acuáticos, aéreos y del suelo. De esta forma es necesario mejorar las condiciones fisiológicas de las plantas para optimizar su captación y uso de nutrientes y la protección ante los diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. El cumplimiento de estos objetivos, de la mano con el uso de bioestimulantes, es evidente en los siguientes cultivos: maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, brócoli, zanahoria, coliflor, pepino, berenjena, ajo, melón, cebolla, pimiento, papa, lechuga, uvas y frutas cítricas; que son los cultivos de mayor uso de

bioestimulantes en Europa y Estados Unidos (du Jardin, 2015, pp. 3–14; European Biostimulants Industry Council, 2015).

A pesar del alto potencial que tiene el uso de bioestimulantes en los cultivos vegetales, uno de los grandes desafíos que aún tienen para su masificación en el mercado es el desarrollo científico-técnico. El principal reto científico es la complejidad de la respuesta fisiológica que se presenta debido a la aplicación de distintas concentraciones de cada producto, la especie a tratar e inclusive a la variabilidad genética entre individuos de una misma especie. Algunos productos actúan sobre el metabolismo principal de las plantas, lo que podría alterar un equilibrio osmótico de las mismas y tener un efecto negativo a largo plazo. Se debe conocer a fondo el mecanismo mediante el cuál cada bioestimulante específico actúa sobre una especie determinada para luego continuar con el desarrollo técnico (Calvo et al., 2014, pp. 3–41; du Jardin, 2015, pp. 3–14).

Dentro de los desafíos de tipo técnico está el desarrollo de formulaciones de bioestimulantes conjuntamente con materiales de tipo fertilizante o protector, e inclusive un agente estabilizante. Una vez superada la etapa de obtener formulaciones correctas, se encuentra la fase del desarrollo de métodos de aplicación del producto según la especie a tratar, las condiciones del terreno y ambientales, etc. Otro desafío técnico a largo plazo que se debe tomar en cuenta es la realización de estudios epidemiológicos que determinen cómo la aplicación del producto afecta la distribución geográfica de plagas sobre las plantas o a los agentes biológicos. Dichos estudios actualmente son de carácter obligatorio para la introducción de productos de tipo plaguicidas y deberán ser necesarios para comprobar la seguridad de cada formulación obtenida (Bulgari et al., 2015, pp. 1–17; du Jardin, 2015, pp. 3–14).

2.2 Suelos en la agricultura

El suelo forma parte de los recursos indispensables necesarios para mantener la producción y seguridad alimentaria. Es considerado como el filtro de agua más grande del mundo y el reservorio de agua más extenso. En él se encuentra

mayor cantidad de carbono que en toda la vegetación y vida animal presente en la superficie terrestre. El suelo le suministra a las plantas nutrientes, agua y soporte para su crecimiento y aloja una gran variedad de organismos vivos, siendo así de vital importancia para el equilibrio del ecosistema (FAO y ITPS, 2015, pp. 1–17).

Es indiscutible que el suelo es fundamental para mantener la vida en la Tierra, sin embargo, la búsqueda antropogénica de recursos presentes en él ha alcanzado límites críticos que podrían llegar a afectar irreversiblemente sus propiedades. El manejo cuidadoso del suelo es un elemento esencial en la agricultura sostenible para resguardar la biodiversidad que aloja y los servicios que brinda al ecosistema. Dichos sistemas de agricultura sostenible se están poniendo en práctica en un porcentaje muy bajo de sistemas agronómicos a nivel mundial y la mayoría de recursos del suelo a lo largo del mundo se encuentran en condiciones preocupantes (FAO y ITPS, 2015, pp. 120–125).

El 33 % del recurso del suelo en el mundo se encuentra moderadamente o altamente degradado debido a problemas de erosión, salinización, compactación, acidificación y contaminación química. La tasa sostenida de pérdida de área de suelo productivo afectará considerablemente a la producción y la seguridad alimentaria, encarecerá los productos dependientes de esta producción y potencialmente llevará a millones de habitantes a una condición de hambre y pobreza (FAO y ITPS, 2015, pp. 1–24; WWF, 2016).

2.2.1 Salinidad del suelo

Uno de los principales problemas que afectan la productividad de un suelo es la salinidad. Se define a un suelo como salino cuando la conductividad eléctrica exceda los 4 dSm^{-1} (deciSiemens por metro), o aquellos afectados por una concentración elevada de sodio (denominado *sodicity* en inglés) que sea mayor al 6 por ciento (ESP por sus siglas en inglés *Exchange sodium percentage*). La principal causa de salinidad del suelo es de fuente antropogénica, debido a sistemas de irrigación sin un procedimiento efectivo de drenaje del suelo. En la

Figura 2 se presenta un esquema de la causa antropogénica de la salinidad del suelo (FAO e ITPS, 2015, pp. 120–137).

Causas antropogénicas de Salinidad

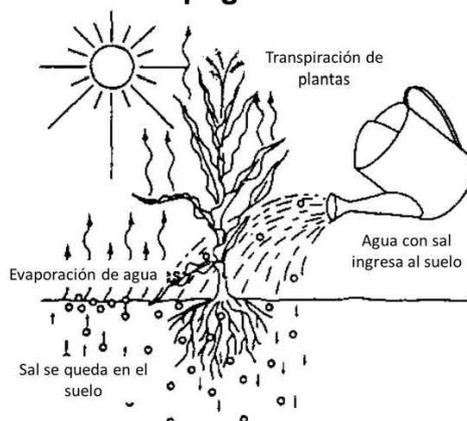


Figura 2. Esquema general de las causas antropogénicas de la salinidad en el suelo.

Adaptado de FAO e ITPS, 2015, p. 63.

Entre otras causas antropogénicas se encuentra el uso de acuíferos no tratados para irrigación de cultivos, períodos largos de irrigación (especialmente en regiones del Medio Oriente), entre otros. Existen además causas naturales para que un suelo se vuelva salino. La formación del suelo proviene en gran medida de la degradación de grandes rocas, y debido a que muchas de éstas tienen grandes cantidades de sales sódicas, estas se acumulan en la tierra. Las sales provenientes del agua del mar son también causa de la salinidad del suelo, que llegan debido a inundaciones o por fenómenos de evapotranspiración de la capa superficial de agua del mar (FAO y ITPS, 2015; Jiang et al., 2014, pp. 225–231).

A pesar de que los suelos salinos son un problema de preocupación creciente, no hay muchos datos estadísticos actuales sobre la situación del mismo a nivel global. Para el año 2006 se realizó un estudio completo en el que se determinó que cerca de 76 millones de hectáreas de suelo a nivel mundial son salinas debido a la irrigación con un mal sistema de drenaje y que 301 millones de hectáreas son regadas por un método ineficiente de irrigación o drenaje pobre del suelo. En la *Figura 3* se presenta un diagrama de barras obtenido con la información del informe de FAO e IPTS que caracteriza la distribución a nivel mundial de los suelos salinos y sódicos por continente. Los datos se presentaron

en millones de hectáreas afectadas (2015). Según este diagrama, Australia se ve afectado enormemente por sodicidad del suelo, mientras que Asia, África y América se ven igualmente afectados tanto por salinidad como por sodicidad.

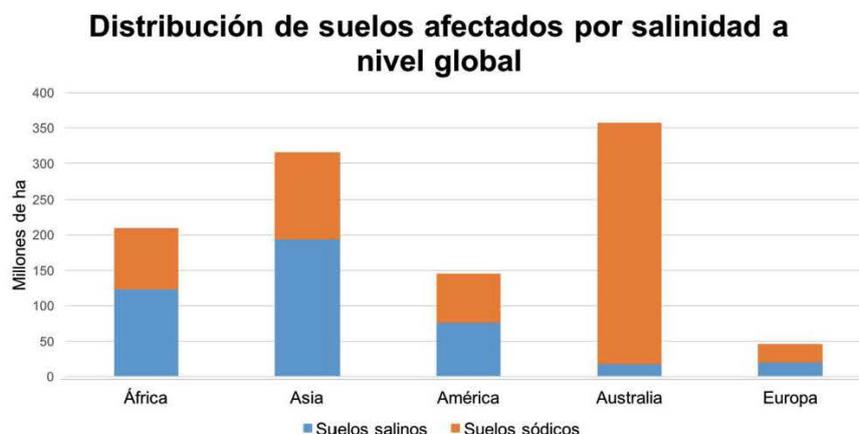


Figura 3. Diagrama de barras representando la distribución en millones de hectáreas de suelos afectados por salinidad y sodicidad a nivel mundial.

Adaptado de FAO e IPTS, 2015, p. 125.

Para afrontar los problemas ocasionados por la salinidad se han propuesto algunos tratamientos del suelo o tecnologías a ser aplicadas que incluyen la lixiviación directa de sales con productos químicos, la bio-remediación, el uso de componentes orgánicos que permitan la absorción de microorganismos de las sales, la plantación de variedades resistentes a condiciones salinas, entre otros (Cho et al., 2014, pp. 546–555; Li, Zhai, y Li, 2015, pp. 16–22; Muchate, Nikalje, Rajurkar, Suprasanna, y Nikam, 2016, pp. 96–105).

2.2.1.1 Efectos sobre las plantas

La salinidad en los suelos comúnmente se presenta con la acumulación de carbonato de calcio (CaCO_3), cloruro de sodio (NaCl), sulfato de calcio (CaSO_4) o sulfato de sodio (Na_2SO_4). Estas sales intervienen en la formación de capas del suelo extremadamente duras que limitan el crecimiento radicular de las plantas y de esta manera el alcance de obtención de nutrientes. Otras formas indirectas en las que las plantas se ven afectadas por esta condición es que la presión osmótica del suelo aumenta, lo que disminuye la disponibilidad biológica de agua (FAO y IPTS, 2015, p. 132; Munns, 2002, pp. 239–250).

La salinidad puede afectar directamente el desarrollo vegetativo al inhibir su crecimiento mediante varios mecanismos conocidos. Inicialmente, se conoce que la absorción de sales a nivel de la raíz cambia el equilibrio osmótico en las células radiculares y esto provoca que se desencadenen respuestas de tipo hormonal (similar a la provocada por presencia de ácido abscísico) que inhiben el crecimiento de la raíz. Interesantemente se ha demostrado que a mayores concentraciones de NaCl, este fenómeno ya no es perceptible (Munns, 2002, pp. 239–250).

Un cambio en la presión osmótica de las células provoca una acumulación de compuestos altamente reactivos como las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos ROS son componentes que pueden dañar irreversiblemente estructuras de gran importancia para la célula como son las proteínas, las enzimas, los lípidos o los ácidos nucleicos. La presencia moderada de sal en las plantas genera una respuesta que acumula componentes antioxidantes, tales como los compuestos fenólicos que inactivan radicales libres de ciertas moléculas en las células. De igual manera la actividad antioxidante de la planta se eleva con presencia de sal (NaCl); sin embargo, a concentraciones mayores de NaCl existe un fenómeno de reducción de compuestos fenólicos y de capacidad antioxidante. Esto se debe a la generación excesiva de ROS que ocupan la mayoría de los compuestos antioxidantes y que dañan irreversiblemente estructuras importantes celulares (Abdul Qados, 2011, pp. 7–15; Valifard, Mohsenzadeh, Kholdebarin, y Rowshan, 2014, pp. 92–97).

De la mano con el aumento de los compuestos antioxidantes en las células vegetales, también se incrementan los niveles de enzimas antioxidantes tales como la manganeso superóxido Dismutasa (MnSOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), o glutatión reductasa (GR). Cada una de estas enzimas actúa mediante un mecanismo específico, cuyo fin es inactivar los radicales libres formados debido al estrés en que se encuentra la planta. Se ha determinado que al aumentar la actividad de una enzima tipo peroxidasa (PRX),

el resto de las enzimas de la misma familia bajan su actividad considerablemente. Algunas enzimas actúan a ciertas concentraciones de NaCl presentes en el medio de cultivo, indicando que cuando los niveles de ROS son muy elevados se activan nuevas enzimas que puedan desintoxicar las células de radicales libres (Abdul Qados, 2011, pp. 7–15; Cao, Lv, Chen, Xing, y Lan, 2015, pp. 112–118).

Además, dado que el potencial de agua presente en las células disminuye bajo condiciones salinas, se producen en las plantas compuestos de tipo osmolitos como la prolina y glicinebetaina que tienen una función importante en la osmoregulación celular. La acumulación de estos compuestos se ha determinado que se debe a una sobreexpresión de genes involucrados en su síntesis. Debido a que se observan varios cambios en niveles de expresión genética, se ha propuesto que las condiciones salinas en las células pueden también modificar reversiblemente la estructura de las histonas promoviendo altos niveles de expresión de ciertos genes (Cao et al., 2015, pp. 112–118).

La concentración de iones Na^+ también se aumentan en las células y con ello el equilibrio entre Na^+/K^+ se ve alterado. Esto afecta la permeabilidad de las células, el mecanismo de comunicación a nivel de las membranas, el potencial de membrana existente en cloroplastos y en las mitocondrias. Este cambio de potencial de membrana afecta la síntesis de ATP que se produce en las mitocondrias (enzima ATP sintetasa) y se afectará por tanto el proceso normal de fotosíntesis de los cloroplastos. De esta forma es evidente una degradación de compuestos fotosintéticos tales como los fotosistemas y de la mano con ésta, la degradación de la clorofila (Sudhir y Murthy, 2004, pp. 481–486).

Las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis que ocurren en la membrana de los tilacoides también conllevan a la formación de radicales libres de tipo ROS. La acumulación de estos compuestos inhibe la reparación de daños en el fotosistema II, por lo que es probable que el estrés salino esté también involucrado en la rápida degradación de estructuras fotosintéticas mediante esta

vía. En la *Figura 4* se presenta un diagrama de la formación de ROS en los fotosistemas (Nishiyama, Allakhverdiev, y Murata, 2006, pp. 742–749; Sudhir y Murthy, 2004, pp. 481–486).

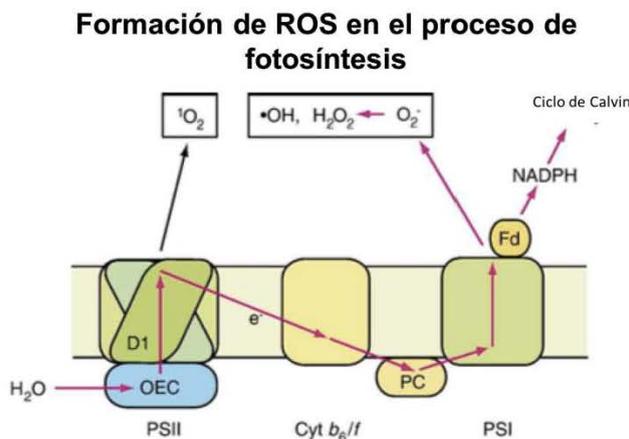


Figura 4. Esquema representativo del proceso de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis.

Adaptado de Nishiyama et al., 2006, p. 144.

2.3 Sistema fotosintético de las plantas

La fotosíntesis es un complejo proceso bioquímico mediante el cual los organismos fotosintéticos pueden captar la energía de la luz y transformarla en energía química. Debido a esta transformación de energía, la fotosíntesis es considerada la base de la vida tal y como la conocemos, inclusive para organismos que no puedan realizar fotosíntesis. En las plantas, la fotosíntesis debe ocurrir en presencia de oxígeno, por lo que se denomina fotosíntesis oxigénica (Lehninger, Nelson, y Cox, 2005, pp. 721–732; Stryer, 1995, pp. 631–647). El organelo citoplasmático principal de las plantas donde ocurre el proceso de fotosíntesis es el cloroplasto. El cloroplasto es una estructura membranal compleja que contiene tres membranas (externa, interna y tilacoide) y un espacio intermembranal denominado el estroma. Estas membranas presentan distintas características de permeabilidad y tienen proteínas en su estructura que permiten el transporte de iones específicos necesarios para el proceso de fotosíntesis. El tilacoide forma un compartimento membranal en forma compacta y varios compartimentos se apilan uno encima de otro, formando una estructura denominada granum (*Figura 5*) (Tanaka y Makino, 2009, pp. 681–683).

Estructura de un cloroplasto

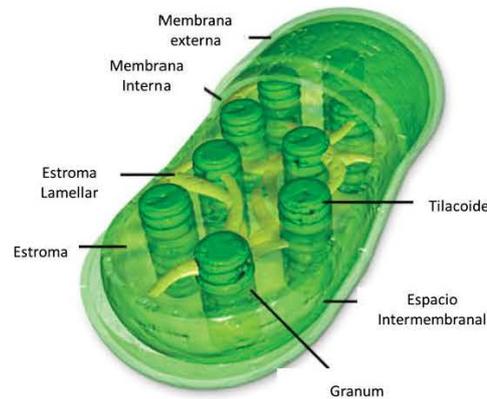


Figura 5. Esquema general de la estructura interna de un cloroplasto de células vegetales. Adaptado de Stryer, 1995, p. 643.

El proceso de fotosíntesis que ocurre en el cloroplasto de las plantas es separado en dos procesos principales, las reacciones dependientes e independientes de la luz. Las reacciones independientes de la luz ocurren en el estroma del cloroplasto y se basan en la captación del potencial químico que se ha generado de las reacciones independientes de la luz para sintetizar una molécula altamente energética, la glucosa. Las reacciones independientes de luz son denominadas también el ciclo de Calvin-Benson, en honor a los científicos que descubrieron este ciclo de reacciones bioquímicas. En este proceso interviene una enzima denominada rubisco, que cataliza la primera reacción de este ciclo. Esta enzima capta una molécula de CO_2 y lo incorpora a una de 1,5 bifosfato utilizando el DNAPH generado en los tilacoides. La enzima rubisco es considerada como una de las más importantes para la vida, debido a que es la única capaz de fijar carbono inorgánico en un ciclo bioquímico orgánico para generar biomasa (Lehninger et al., 2005, pp. 730–735).

Las reacciones dependientes de luz, por otro lado, son las encargadas de canalizar la energía de la luz en un potencial químico a través de las membranas del tilacoide y de esta forma poder generar una molécula de ATP (molécula portadora de energía química) y una molécula de NADPH. La energía de la luz del sol es captada por dos estructuras proteicas denominadas fotosistemas I y II. En cada uno de estos fotosistemas se encuentran pigmentos fotosintéticos

cuyos electrones se excitan con la radiación de luz a cierta longitud de onda. El electrón energéticamente excitado del fotosistema II es captado por una molécula denominada plastoquinona que se reduce y lleva el electrón al citocromo b6f, donde reduce una molécula de plastocianina. La plastocianina reducida viaja por la membrana del tilacoide hacia el fotosistema I, donde reduce a su vez el pigmento de esta estructura que también perdió un electrón producto de su excitación con la luz. El electrón que se perdió del fotosistema I viaja hacia el exterior del tilacoide, a través de la ferredoxina, donde es utilizado para sintetizar una molécula de NADPH a partir de una molécula de NADP^+ y H^+ . La molécula de NADPH es necesaria para las reacciones independientes de la luz. El electrón que se perdió del pigmento del fotosistema II a su vez se recupera mediante la ruptura de una molécula de agua, liberando una molécula de oxígeno diatómico gaseoso (O_2) (Lehninger et al., 2005, pp. 730–735). Este proceso se ejemplifica de mejor forma en la *Figura 6*.

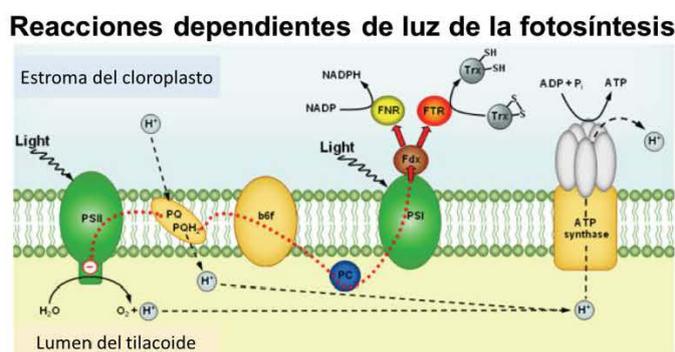


Figura 6. Esquema representativo de las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis que tienen lugar en el cloroplasto.

Adaptado de Schürmann, 2009.

En la *Figura 6* se pueden observar los sucesos que ocurren en los fotosistemas I y II y el citocromo b6f descritos anteriormente; sin embargo, se puede apreciar un proceso extra con una proteína que atraviesa la membrana del tilacoide que genera ATP. Este es un proceso adicional de las reacciones independientes de la luz, en la cuál la enzima ATP sintetasa, que atraviesa la membrana del tilacoide, utiliza el potencial electroquímico que se acumula en el interior del tilacoide (también llamado lumen) para sintetizar moléculas de ATP a partir de

una molécula de ADP y una molécula de ácido fosfórico. El potencial electroquímico se debe a la diferencia de concentración de iones H^+ y carga entre el lumen y el estroma. Esto se genera porque con cada una de las reacciones que involucren el paso de electrones por la membrana del tilacoide se bombean protones al interior del lumen y la membrana del tilacoide es impermeable a estos iones, por lo que el único canal por el que este potencial se libera es a través de la enzima ATP sintetasa (Hisabori, Sunamura, Kim, y Konno, 2013, pp. 1846–1854).

2.3.1 Pigmentos fotosintéticos presentes en el cloroplasto

Dentro del proceso completo de la fotosíntesis es fundamental que la energía de la luz pueda ser transformada a energía química. Tanto para las reacciones dependientes como las independientes de luz es necesario que se genere un potencial electroquímico en el tilacoide. Como se ha detallado anteriormente, las moléculas que se encargan de este proceso de transformación de tipos de energía son los pigmentos fotosintéticos.

Existen distintos tipos de pigmentos fotosintéticos y cada uno de ellos absorbe energía a distintas longitudes de onda de la luz visible por diferencias estructurales en su centro de captación. A pesar de que son distintos pigmentos, sobre todos ellos incide un fotón de luz que lleva uno o varios electrones en su estructura a un estado excitado. Si existen moléculas cercanas que puedan tomar este electrón el potencial es transferido a otras moléculas, pero si no existen dichas moléculas la energía es irradiada en forma de luz o energía calórica. Cada pigmento refleja el tipo de luz que no puede absorber y este es su color característico. Por ejemplo, la mayoría de las hojas de las plantas son de color verde, porque contienen clorofila como su pigmento principal que emite luz de color verde pues no absorbe luz en esta longitud de onda (Lehninger et al., 2005, pp. 730–735; Stryer, 1995, p. 641; Tanaka y Makino, 2009, pp. 681–683). En la *Figura 7* se presenta el espectro de absorbancia de algunos pigmentos fotosintéticos.

Espectro de absorción de pigmentos fotosintéticos

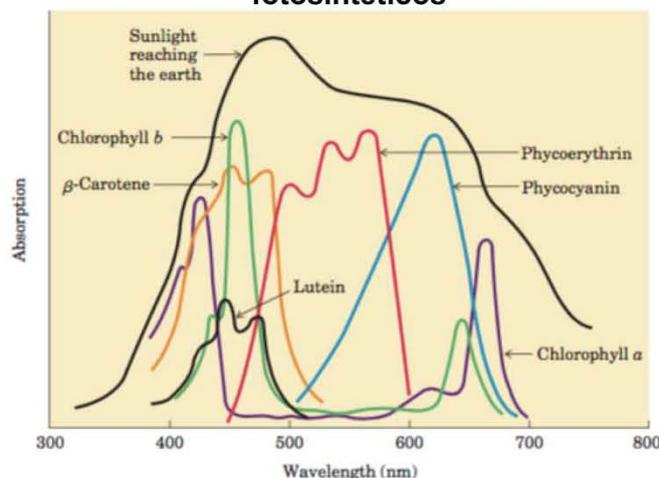


Figura 7. Espectro de absorción de los principales pigmentos fotosintéticos, y el espectro de absorción de la energía electromagnética irradiada por la luz del sol.

Adaptado de Lehninger et al., 2005.

2.3.1.1 Clorofila

El pigmento fotosintético principal presente en los cloroplastos de las plantas es la clorofila. Estructuralmente son moléculas planas policíclicas muy semejantes a la porfirina de la hemoglobina, con la diferencia de que en su posición central posee un ion de Mg^{2+} , mas no de Fe^{2+} . Posee alternancia de dobles enlaces entre átomos de carbono, lo que le confiere fuerte absorción en un amplio espectro de luz visible y las hace adecuadas para el proceso de la fotosíntesis. Existen dos tipos principales de clorofila debido a cambios en su estructura y por ende en la longitud de onda que puedan absorber.

Clorofila a

La clorofila *a* es considerada como el pigmento fotosintético de mayor importancia en las plantas, a pesar de que junto con la clorofila *b* puede captar energía de la luz visible a distintas longitudes de onda y en ambos casos se genera un potencial electroquímico. La clorofila *a* posee un espectro de absorbancia distinto del espectro de *clorofila b*, una diferencia en la que cada tipo de clorofila complementa a la otra donde no absorba en el espectro de luz

(Figura 7). La molécula de clorofila *a* se encuentra ligada con los complejos fotosintéticos denominados fotosistemas y es esta la molécula que dona su electrón producto de la excitación a moléculas cercanas que puedan transferir este potencial a través de la membrana del tilacoide. Probablemente a lo largo de la evolución de las plantas se ha ligado la clorofila *a* a estos complejos fotosintéticos debido a que éste es el primer pigmento que se sintetiza y a partir de ella se sintetiza la clorofila *b* (Lehninger et al., 2005, pp. 730–735; Stryer, 1995, pp. 631–647).

Clorofila *b*

En las plantas comúnmente se presenta el doble de moléculas de clorofila *a* que de clorofila *b*. Este pigmento no se encuentra ligado directamente a los complejos fotosintéticos (fotosistemas), Sin embargo, se ubica formando parte de complejos proteicos denominados LHCs (por sus siglas en inglés, *Light-Harvesting complexes*), que contienen cierto número de moléculas de clorofila *a*, de clorofila *b* y de otros pigmentos accesorios. En estos complejos, cuando el electrón de la clorofila *b* es excitado, se canaliza esta energía electroquímica a moléculas de clorofila *a* para que pueda así continuar con el proceso fotosintético. Es por esta razón que existe mayor cantidad de clorofila *a* en los tilacoides. Igualmente para que inicie el proceso de degradación de estos pigmentos es necesario que mediante reacciones enzimáticas la clorofila *b* se transforme en clorofila *a* (Stryer, 1995, pp. 631–647).

2.3.1.2 Pigmentos accesorios

A pesar de que en las plantas los pigmentos principales y de mayor concentración en los cloroplastos son las clorofilas, también están presentes otros pigmentos que pueden absorber energía de la luz visible en distintas longitudes de onda (como se puede observar en la Figura 7). Estos pigmentos captan la energía de la luz de la misma forma que el la clorofila y el mecanismo mediante el cual este potencial electroquímico es transferido a la clorofila *a* para que continúe con la fotosíntesis es básicamente el mismo que ocurre en la

clorofila *b*. El principal grupo de estos pigmentos es el caroteno, dentro del cual están el β -caroteno o la luteína. Otros pigmentos que se encuentran en bajas concentraciones en los cloroplastos son las xantófilas y las faeofitinas. Dependiendo del tipo de luz con el que se les irradia a las plantas se favorecerá la síntesis de ciertos tipos de pigmentos y por ello las hojas exhiben distintas tonalidades de colores según la posición en la planta o la época del año (Lehninger et al., 2005, pp. 725–730; Tanaka y Makino, 2009, pp. 681–683).

2.3.2 Degradación de cloroplastos

En los cloroplastos se encuentran las proteínas necesarias para transformar energía lumínica en energía química, enzimas responsables del ciclo de Calvin-Benson (entre ellas la rubisco, enzima más abundante en el planeta Tierra), enzimas que catalizan reacciones adicionales dentro del cloroplasto y proteínas estructurales. Por esta razón, en tejidos fotosintéticos estos organelos citoplasmáticos contienen cerca del 75 % del contenido de nitrógeno de las células, mayoritariamente en forma de proteínas. De esta forma, cuando las plantas se encuentran bajo condiciones de estrés, cuando deben buscar nuevas fuentes de energía por una falla en la fotosíntesis o cuando han llegado al fin de su etapa vital y deben generar semillas, se estimulan mecanismos activos propios de las plantas para la degradación de cloroplastos. El objetivo de esta degradación es poder reciclar las moléculas (principalmente proteínas) de los cloroplastos para procesos de síntesis, catabolismo para obtener energía o movilizar estos componentes hacia las semillas para asegurar su germinación. Este proceso de degradación, que consecuentemente conlleva a una pérdida en la capacidad fotosintética de las plantas y finalmente muerte celular, se denomina senescencia (Ishida, Izumi, Wada, y Makino, 2014, pp. 512–521; Nishiyama et al., 2006, pp. 742–749; Schippers, Schmidt, Wagstaff, y Jing, 2015, pp. 914–930).

Se han determinado distintos mecanismos independientes mediante los cuales ocurre esta degradación: proceso de autofagia, vacuolización de cloroplastos y vesiculación de los cloroplastos.

2.3.2.1 Autofagia de cloroplastos

La autofagia es un proceso conocido en todos los organismos eucarióticos que es utilizado para degradar estructuras potencialmente dañinas, moléculas que han perdido su función dentro de la célula o para el reciclado de moléculas con alto contenido nutritivo. En las plantas, cuando inicia la senescencia se activan genes de tipo *ATG* y *TOR kinasa* que desencadenan en reacciones que reducen el tamaño de los cloroplastos por un proceso similar a la citocinesis en la división celular. Estas estructuras membranales de menor tamaño tienen un alto contenido de la enzima rubisco por lo que son llamados “cuerpos de rubisco”. Los cuerpos de rubisco ingresan a las vacuolas de las células vegetales en un proceso muy similar a la fagocitosis, en donde se encuentran enzimas proteasas que degradan las proteínas y luego se encargan de la movilización de los nutrientes para procesos de reciclado o hacia las semillas (Glick, Barth, y Macleod, 2010, pp. 3–12; Ishida et al., 2014, pp. 512–521; Wada y Ishida, 2009, pp. 565–567).

2.3.2.2 Vacuolización de cloroplastos

La vacuolización de cloroplastos es un proceso muy similar a la autofagia y por muchos años se pensó que eran el mismo; sin embargo, los genes y moléculas involucrados en este proceso son totalmente independientes de la autofagia. En este caso se generan pequeños organelos rodeados de una bicapa lipídica que contienen en su interior proteasas específicas que pueden degradar las enzimas y proteínas contenidas en los cloroplastos. Estas pequeñas vacuolas (también llamadas SAVs por sus siglas en inglés *Senescence-associated vacuoles*) se movilizan hasta los cloroplastos, en donde se conjugan las membranas de cada organelo y se liberan las proteasas que inician la degradación del cloroplasto. Algunas de las SAVs son de carácter ácido, lo que ayuda con la desnaturalización de proteínas de los cloroplastos (Martínez, Costa, Gomez, Otegui, y Guiamet, 2008, pp. 196–206).

2.3.2.3 Gen de Vesiculación de cloroplastos en plantas

Un último mecanismo mediante el cual se degradan los cloroplastos se descubrió en el año 2014, el cual es un proceso independiente de la autofagia y de la formación de vacuolas asociadas a la senescencia. Este fue descrito en la especie *Arabidopsis thaliana*, en donde un único gen se expresa bajo condiciones de estrés abiótico y se sintetiza una proteína denominada CV (por sus siglas en inglés *Chloroplast Vesiculation*). La proteína CV posee en su extremo N terminal un péptido señal de tránsito específico para cloroplastos, además de un dominio transmembrana. La proteína CV se acumula en los cloroplastos, en donde forma vesículas con las membranas del propio organelo (gracias al dominio transmembrana). Estas vesículas contienen en su interior proteínas del tilacoide que son transportadas hacia las vacuolas para su degradación, mediante un proceso independiente de la autofagia. Durante la formación de la vesícula se separan los pigmentos clorofílicos de los complejos proteicos del tilacoide y estos ingresan a una ruta distinta de degradación (Wang y Blumwald, 2014, pp. 4875–4888).

Estos procesos descritos de degradación de cloroplastos no involucran la degradación de pigmentos fotosintéticos. Debido a que la excitación de las moléculas de clorofila genera electrones excitados y un elevado potencial electroquímico, si estas estructuras no se encuentran compartimentalizadas en los fotosistemas se generan radicales libres y ROS en el espacio citoplasmático de las células. Para evitar este problema, se activan genes en las células que se encargan de la degradación de la clorofila antes y durante la desintegración del cloroplasto. Estos cinco genes codifican para cinco enzimas que degradan la clorofila hasta un compuesto no fluorescente que puede ser fácilmente degradado en la vacuola. Una vez que la clorofila ha sido catabolizada, la degradación proteolítica del cloroplasto es un proceso más sencillo (Christ y Hörtensteiner, 2014, pp. 4–20). En la *Figura 8* se presenta un esquema de las reacciones que proceden para la degradación de la clorofila.

Proceso de degradación enzimática de clorofila

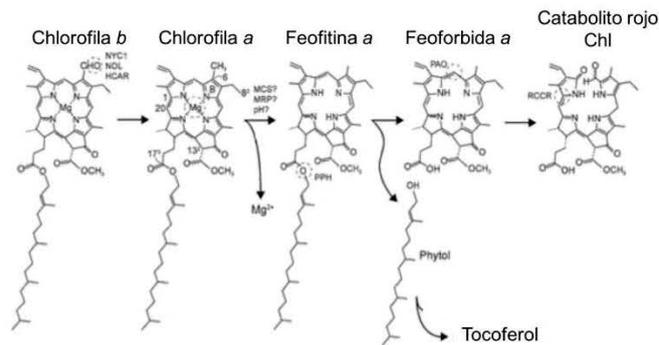


Figura 8. Cadena de reacciones que se desencadenan para la degradación de la clorofila. Proceso inicia con la clorofila *b* hasta obtener compuestos más polares y menos fototóxicos. Tomado de Christ y Hortensteiner, 2014, p. 7.

Como se puede apreciar en la *Figura 8*, para que inicie la degradación de este pigmento fotosintético se debe transformar la clorofila *b* en clorofila *a* y a partir de este punto, la fototoxicidad de la molécula disminuye con cada paso en la cadena de reacciones.

CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

Para el desarrollo del proyecto los equipos principales utilizados fueron una cabina de flujo laminar, cámara de aclimatación de plantas, balanza analítica y técnica, agitador vórtex, centrífuga refrigerada, cámara de electroforesis horizontal, bloque térmico, equipo para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), lector de placas multimodal y termociclador de tiempo real. Como reactivos químicos se utilizaron medio de cultivo Murashige y Skoog (MS), sacarosa, NaCl, acetona, metanol, etanol, cloroformo, agarosa, DNase I RNase free (Ambion, Life Technologies), tris(hidroximetil)aminometano, ácido bórico, EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) y los juegos de reactivos *PureLink RNA mini kit* (Ambion, Life Technologies) y *SuperScript III One-Step RT-PCR System Polymerase* (Life Technologies).

El reactivo biológico del proyecto fueron plantas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia 0. El control experimental se logró manteniendo iguales todas las condiciones de crecimiento de las plantas (temperatura, luz y humedad). Un factor de variabilidad no controlable fue la diferencia genética de cada semilla utilizada. Sin embargo, con el fin de obtener resultados que demuestren realmente el efecto de cada tratamiento sobre las plantas, se realizaron tres repeticiones de cada análisis por muestra y cuatro réplicas biológicas en distinto tiempo del experimento.

Dentro del presente trabajo experimental los efectos que se analizaron fueron la concentración de clorofila *a* y *b* y la expresión relativa del gen de *vesiculación de cloroplastos* (CV, AT2G25625). Las variables manipuladas para obtener estos efectos fueron la presencia o ausencia de 100 mM de NaCl, la presencia o ausencia de 0.1 mg.L⁻¹ de XGO y dos tiempos de respuesta de las plantas tras una inducción con los tratamientos específicos (24 y 72 horas). En la *Tabla 1* se presenta cada uno de los factores analizados y sus niveles respectivos.

Tabla 1.

Diseño experimental del proyecto de investigación con sus factores y respectivos niveles de análisis. Donde: XGO son oligosacáridos de xiloglucanos y NaCl es cloruro de sodio.

Factores					
NaCl (A)		XGO (B)		Tiempo de respuesta (C)	
Niveles					
0 mM (i)	100 mM (ii)	0 mg.L ⁻¹ (i)	0,1 mg.L ⁻¹ (ii)	24 h (i)	72 h (ii)

De esta forma se tuvo un diseño factorial completamente al azar de tipo 2³, obteniendo en total 8 tratamientos presentados a continuación en la *Tabla 2* con las letras correspondientes a la *Tabla 1*:

Tabla 2.

Descripción de los tratamientos que componen el diseño factorial completamente al azar empleados en el presente trabajo de titulación. Se presentan los tratamientos por códigos correspondientes a las variables de la *Tabla 1*, y el código descifrado (niveles de cada variable).

Tratamiento	Código	Descifrado		
		NaCl	XGO	Tiempo
Control	A(i) B(i) C(i)	0 mM	0 mg.L ⁻¹	24 h
Tratamiento 1	A(ii) B(i) C(i)	100 mM	0 mg.L ⁻¹	24 h
Tratamiento 2	A(i) B(ii) C(i)	0 mM	0,1 mg.L ⁻¹	24 h
Tratamiento 3	A(ii) B(ii) C(i)	100 mM	0,1 mg.L ⁻¹	24 h
Tratamiento 4	A(i) B(i) C(ii)	0 mM	0 mg.L ⁻¹	72 h
Tratamiento 5	A(ii) B(i) C(ii)	100 mM	0 mg.L ⁻¹	72 h
Tratamiento 6	A(i) B(ii) C(ii)	0 mM	0,1 mg.L ⁻¹	72 h
Tratamiento 7	A(ii) B(ii) C(ii)	100 mM	0,1 mg.L ⁻¹	72 h

CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1. Oligosacáridos de Xiloglucanos utilizados

Los oligosacáridos de xiloglucanos (XGO) utilizados fueron obtenidos y cedidos gentilmente por el Dr. Juan Carlos Cabrera Pino (Unité de Biotechnologie, Bélgica). Brevemente, se realizó una digestión de xiloglucanos (XGs) obtenidos de semillas de tamarindo (*Tamarindus indica*, L.) con una solución que contenía enzima celulasa de *Thricoderma viridae*. Los XGO obtenidos se purificaron mediante ultrafiltración (tamaño de poro de 5,000 Da) y diálisis (tamaño de poro de 500 Da). La composición de la solución de XGO obtenidos se evaluó mediante espectrometría tipo MALDI-TOF, indicando cuatro tipos principales de estructuras en esta mezcla: XLLG, XXLG, XXXG y XXGG, de acuerdo a la clasificación descrita por Fry et al. (Fry et al., 1993, pp. 1-3; González-Pérez et al., 2014, pp. 6803-6816).

4.2. Material vegetal y desinfección de semillas

Para el desarrollo de este trabajo de titulación se utilizaron semillas botánicas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn ecotipo Columbia 0. Las semillas fueron desinfectadas bajo condiciones estériles en una cámara laminar de flujo horizontal (ESCO ACB-4A2) en microtubos de 1,5 mL. Las semillas fueron suspendidas en 1 mL de solución de hipoclorito en agua (proporción 1:10 v/v), se agitó vigorosamente utilizando un vórtex (CORNING 6775) y se dejó actuar en reposo durante 5 minutos. Se retiró la solución de hipoclorito del microtubo con cuidado de no retirar semillas que sedimentaron y se agregó 1 mL de solución de etanol / agua destilada estéril / cloro (proporción 7:2:1 v/v). Se repitió el proceso de agitar vigorosamente con vórtex, se dejó sedimentar durante 5 minutos y se retiró la solución con los mismos cuidados descritos anteriormente. Finalmente, se realizaron tres lavados consecutivos de las semillas utilizando 1 mL de agua destilada estéril en cada lavado, repitiendo el procedimiento de agitación y sedimentación. Por último, las semillas fueron colocadas en agua destilada estéril y se mantuvieron a 4 °C durante 48 horas.

4.3. Siembra y obtención de muestras

Las semillas previamente desinfectadas de *A. thaliana* se sembraron en 100 mL de medio líquido Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962, pp. 473-497). Para la preparación del medio se pesaron 30 gramos de sacarosa, 4,6 gramos de sales MS (SIGMA-ALDRICH), se disolvieron en 1 L de agua destilada y se ajustó el pH a 5,7. Se dispensaron 100 mL de medios en matraces de 300 mL y se esterilizaron mediante autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Posteriormente se sembraron aproximadamente de 20-30 semillas por matraz en condiciones estériles, en una cámara laminar de flujo horizontal (ESCO ACB-4A2). Los frascos sembrados fueron entonces colocados en un agitador orbital a 200 rpm dentro de una cámara de crecimiento de plantas (DAIHAN Scientific, modelo WISD, Corea), con un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, 50 % de humedad relativa y 23 °C.

Las plantas de *A. thaliana* crecieron durante 15 días y, pasado este tiempo, se retiró el medio y se reemplazó por medio de cultivo fresco para permitir una aclimatación de las plantas antes de la inducción. Transcurridas 24 horas, se realizó una inducción con NaCl 100 mM \pm XGO 0,1 mg.L⁻¹ según cada tratamiento descrito en la *Tabla 2*. Se tomaron muestras de plantas antes de la inducción como tiempo cero (t_0), además de a las 24 y 72 horas después de la inducción. Se recogieron de 5 a 8 hojas por cada tratamiento en un microtubo de 1,5 mL y se congeló inmediatamente en N₂ líquido. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento y análisis.

4.4. Determinación de niveles de expresión relativa del gen de *Vesiculación de Cloroplastos (CV)* mediante PCR en tiempo real

Se tomaron aproximadamente 100 mg de hojas de muestras de cada tratamiento y se realizó una extracción de ARN total utilizando el juego de reactivos de *PureLink RNA mini kit* (Ambion, Life Technologies, Estados Unidos) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. El ARN obtenido se trató posteriormente con la enzima DNAsa (Ambion RNase free I, Life Technologies, Estados Unidos) con

la finalidad de eliminar el ADN residual que pudiera contaminar la muestra (Sambrook y Russel, 2011, p.p. 1-34).

Para determinar la calidad del ARN extraído y purificado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con las muestras en tampón de carga con *2X SYBR® Green Reaction Mix* (Life Technologies, Estados Unidos). La electroforesis se realizó a 100 voltios durante 30 minutos y las bandas se observaron en un Fotodocumentador Chemidoc™ MP (Bio-Rad, Estados Unidos). La concentración de ARN obtenida fue determinada mediante espectrofotometría en un lector de placas (BMG LABTECH GmbH, modelo FLUOstar Omega, Alemania), midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. La calidad de las muestras se determinó por la relación 260/280, la cual debía encontrarse entre 1.8-2.0. Las muestras de ARN fueron diluidas hasta la concentración de 300 ng/μL para ser utilizadas en el protocolo de PCR en tiempo real (Sambrook y Russel, 2011, p.p. 1-34).

El par de cebadores específicos de *A. thaliana* para el gen CV (AT2G25625) que se empleó fueron los especificados por Wang, et al. (2014), presentados en la *Tabla 3*. Como gen interno de referencia o gen constitutivo se utilizó la pareja de cebadores del gen *Actina-2* (ACT, At3g18780) de *A. thaliana* de la casa comercial Sigma-Aldrich®, con número de referencia C 3615.

Tabla 3.

Detalles del par de cebadores de *A. thaliana* para el gen CV (AT2G25625), tomados de Wang, et al. (2014). Donde: F es el cebador directo y R: cebador inverso.

Identificación de cebadores	Secuencia (5'- 3')	Nº de nucleótidos
CV-F	GGAAGCTGCGGTTGTGAAATC	21
CV-R	GAGCAGACGGACGAGGAAGAT	21

Los procesos de síntesis de la cadena de ADN complementario, amplificación por PCR del gen CV y su cuantificación se realizó en un solo paso utilizando el juego de reactivos *SuperScript III One-Step RT-PCR System Polymerase* (Life Technology, Estados Unidos) para PCR en tiempo real. La mezcla de reacción

se preparó en un volumen final 25 μL que contenía: 1 μL de muestra de ARN (300 ng/ μL), 12,5 μL de SYBR Green $\text{\textcircled{R}}$, 1 μL del par de cebadores (concentración final 2 μM), 1 U de la mezcla de enzimas *SuperScript $\text{\textcircled{R}}$ III RT/Platinum $\text{\textcircled{R}}$ Taq* polimerasa y H_2O grado PCR hasta complementar los 25 μL de volumen final. La reacción se desarrolló en el equipo CFX96 *Real-time PCR System* (Bio-Rad, Estados Unidos), siguiendo el protocolo de amplificación que se indica a continuación:

1. Síntesis de la cadena de ADN complementario: 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 minutos
2. Desnaturalización de la enzima Reverso Transcriptasa y de la doble cadena de ADN: 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos.
3. Ciclos de reacción de la enzima polimerasa (40 ciclos):
 - 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos.
 - 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 45 segundos.
 - 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto.
4. Curva de temperatura de fusión iniciando a 65 $^{\circ}\text{C}$ hasta 95 $^{\circ}\text{C}$ incrementando 0,5 $^{\circ}\text{C}$ cada 10 segundos.

Para verificar la especificidad de los cebadores utilizados, los productos de amplificación se analizaron en un gel de electroforesis al 0,8 % de agarosa a 100 voltios durante 30 minutos. El resultado se observó en un Fotodocumentador Chemidoc TM MP (Bio-Rad, Estados Unidos). También se analizaron los resultados de la curva de temperatura de fusión que se obtuvo de cada amplificado.

El valor de expresión relativa del gen *CV* se calculó mediante método matemático desarrollado por Pfaffl en 2001. Este modelo matemático utiliza los valores de Ct de una muestra y la normaliza con el valor de Ct de la misma muestra de un gen de referencia, que en este caso fue el gen de *ACT-2* (Pfaffl, 2001, p. 45; Sinha et al., 2015, pp. 948-967). Los cálculos según este modelo matemático se presentan en la *Ecuación 1*.

$$Expr. norm_{muestra (GOI)} = \frac{RQ_{muestra (GOI)}}{(RQ_{muestra (Ref 1)} \times RQ_{muestra (Ref 2)} \times \dots \times RQ_{muestra (Ref n)})^{\frac{1}{n}}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde GOI representa el gen de interés, RQ es la cantidad relativa de la muestra y Ref es la cantidad relativa del gen de referencia utilizado para la normalización.

4.5. Determinación de condiciones para la extracción de pigmentos fotosintéticos de hojas de plantas de *A. thaliana*

Se ensayaron dos métodos para la extracción de clorofila de las hojas de *A. thaliana*. El primer método consistió en una extracción utilizando acetona al 80 % en agua destilada (v/v). Este extracto obtenido se cuantificó mediante métodos espectrofotométricos detallados más adelante en este acápite. El segundo método ensayado se basó en la extracción de los pigmentos de clorofila en metanol al 99 % para su uso en HPLC. Para determinar las condiciones de cada extracción se realizaron ensayos preliminares con cada solvente, modificando variables tales como la relación peso de planta frente a solvente utilizado y el tiempo de extracción a 4 °C en la oscuridad (Porra, Thompson, y Kriedemann, 1989, pp. 384-394). Los resultados fueron analizados mediante cromatografía de capa fina en una placa de sílice de las dimensiones de la *Figura 9*.

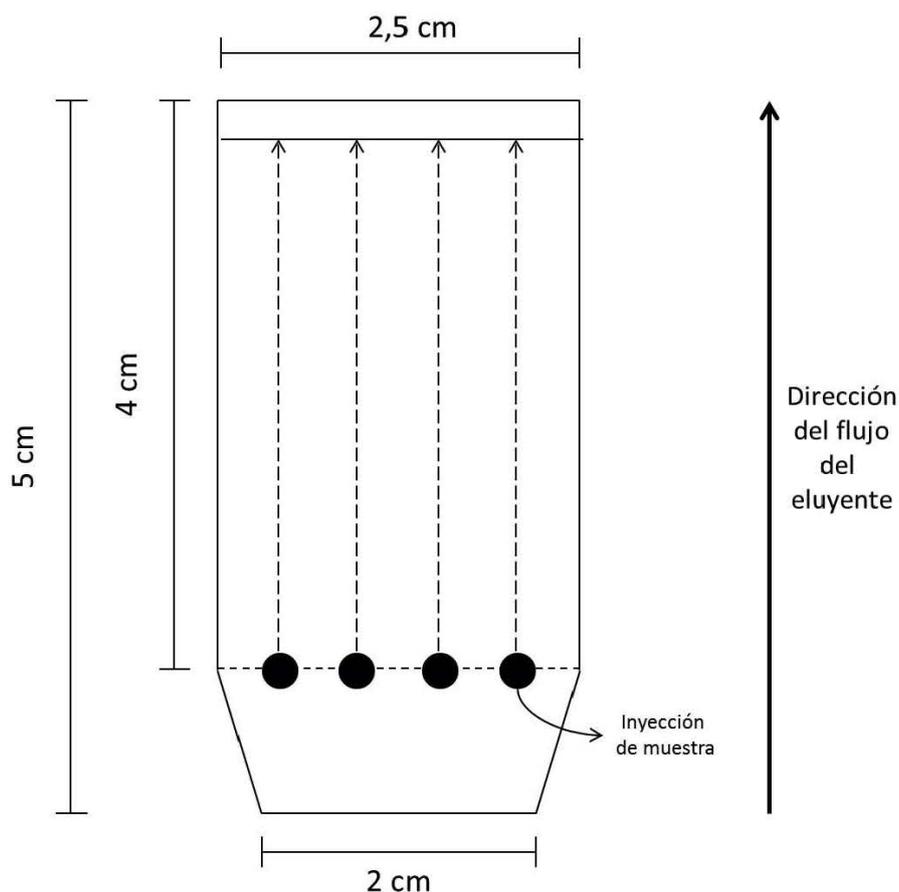


Figura 9. Dimensiones de la placa de sílica gel utilizada para realizar cromatografía en capa fina para la determinación de parámetros de extracción de clorofila de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Se presenta también el sitio de la inyección de la muestra (50 μL) y la dirección del flujo del eluyente.

La cromatografía en capa fina se realizó inyectando un volumen de muestra de 50 μL con capilares de vidrio (MarienField). El eluyente utilizado consistió en una solución de 3 mL de hexano, 1 mL de cloroformo y 1 mL de acetona que se colocó en la cámara cromatográfica junto con un papel filtro para que llegue a un punto de saturación. No se requirió de un sistema de revelado para observar la separación e intensidad de los componentes (Pocock, Król, y Huner, 2004, pp. 137-148).

4.6. Cuantificación de concentración de clorofila *a* y *b* de plantas de *A. thaliana* mediante espectrofotometría

Se tomaron hojas de *A. thaliana* de cada tratamiento y se homogenizaron en nitrógeno líquido, utilizando un mortero y pistilo hasta obtener un fino polvo. Luego se añadió 1 mL de acetona al 80 % en agua destilada (v/v) a 20 mg de este polvo en un microtubo de 1,5 mL y se mantuvo esta mezcla durante 16 horas a 4 °C (condiciones establecidas en el procedimiento detallado anteriormente). Pasado este tiempo, se centrifugaron los microtubos a 14 000 rpm durante 5 minutos y se obtuvo el sobrenadante. Se midió su absorbancia a 663 y 645 nm en un lector de placas multimodal BMG LABTECH GmbH (modelo FLUOstar Omega, Alemania). El contenido total de clorofila, además de las concentraciones individuales de clorofila *a* y *b* se calculan mediante las ecuaciones 6 – 9, las cuales son correcciones realizadas sobre ecuaciones antiguas utilizadas por Arnon para determinar la concentración de clorofila. Por esta razón, en primer lugar se deben realizar los cálculos de las ecuaciones 2 – 5 determinadas por Arnon en 1949, para luego utilizar las ecuaciones 6 – 9 determinadas por Porra en 1989:

$$[Chl a + b]^A = 20,21 * E^{645} + 8,02 * E^{663} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$[Chl a]^A = 12,70 * E^{663} - 2,69 * E^{645} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$[Chl b]^A = 22,90 * E^{645} - 8,02 * E^{663} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$(Chl a/b)^A = \frac{[Chl a]^A}{[Chl b]^A} \quad (\text{Ecuación 5})$$

(Arnon, 1949, pp. 1-15).

$$(Chl a/b)^T = 0,593 + 0,459 * (Chl a/b)^A + ((Chl a/b)^A)^2 \quad (\text{Ecuación 6})$$

$$[Chl a + b]^T = 0,895 * [Chl a + b]^A \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$[Chl a]^T = \frac{[Chl a+b]^T * (Chl a/b)^T}{(Chl a/b)^T + 1} \quad (\text{Ecuación 8})$$

$$[Chl b]^T = \frac{(Chl a+b)^T}{(Chl a/b)^T + 1} \quad (\text{Ecuación 9})$$

(Porra et al., 1989, pp. 384-394).

4.7. Estandarización y determinación de la concentración de clorofila *b* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizado fue un modelo 1260 Infinity (Agilent *Technologies*, Waldbronn, Alemania), con una bomba cuaternaria Agilent 1260, un módulo de 1260 Infinity *Standard Autosampler* y un detector de longitud de onda múltiple con arreglo de diodos acoplado a un sistema de procesamiento de datos HP ChemStation. La columna utilizada fue una Eclipse XDB-C18 (Agilent; 4,6x150 mm; 5 μ m) resguardada con una precolumna XDB-C18 (Agilent *Technologies*, Waldbronn, Alemania).

Las hojas de cada tratamiento fueron sumergidas en agua en su punto de ebullición durante 10 segundos para evitar la conversión de clorofila en clorofilida, la que puede ser detectada mediante HPLC e introducir errores en la determinación (Hu, Tanaka, y Tanaka, 2013, pp. 9-19). Luego de este tratamiento térmico, las hojas fueron homogenizadas utilizando nitrógeno líquido como se describió anteriormente. Posteriormente se añadió 1 mL de metanol grado HPLC a 20 mg de este polvo en un microtubo de 1,5 mL y se dejó durante 16 horas a 4 °C. Pasado este tiempo se centrifugaron los microtubos a 14 000 rpm durante 5 minutos y 10 μ L del sobrenadante de las muestras de cada tratamiento fueron inyectados en el HPLC.

Se experimentaron varios métodos de elución y separación de pigmentos, partiendo de un método descrito por Boonsong, Laohakunjit, Kerdchoechuen y Matta (Boonsong, Laohakunjit, Kerdchoechuen, y Matta, 2011, pp. 265-272). En estos métodos el eluyente A fue agua destilada (miliQ) filtrada y el eluyente B fue una solución de agua destilada-Metanol grado HPLC (1:1, v/v). El método cromatográfico utilizado fue modificado al finalizar el análisis con su método anterior, hasta obtener la elución de distintos componentes en picos separados en el cromatograma. Los métodos ensayados fueron:

- 15 minutos con 100 % del eluyente A (isocrático), y del minuto 15 hasta el minuto 50 un cambio sostenido hasta tener 0 % del eluyente A y 100 % del eluyente B.

- 5 minutos con 100 % del eluyente B (isocrático), y del minuto 15 hasta el minuto 50 un cambio sostenido hasta tener 100 % del eluyente A y 0 % del eluyente B.
- 20 minutos de 50 % de A y 50 % de B, gradiente hasta obtener 10 % de A y 90 % de B a los 25 minutos, isocrático hasta los 30 minutos, gradiente hasta obtener 100 % de B hasta los 31 minutos.
- 10 % de A y 90 % de B hasta 25 minutos, fase móvil llegue a 100 % de B hasta los 30 minutos, fase móvil llegue a 10 % de A y 90 % de B hasta los 31 minutos e isocrático hasta los 36 minutos.

Se empleó un flujo constante de 0,5 mL/min, midiendo la absorbancia a 410 y 445 nm, con almacenamiento total de espectro de luz desde 190 hasta 610 nm. Según los resultados obtenidos con cada método cromatográfico, se modificaron las condiciones de elución hasta obtener un cromatograma que representó la separación de los pigmentos obtenidos con picos individuales no superpuestos.

La identificación de la clorofila *b* de cada cromatograma se logró mediante la comparación del tiempo de retención y características espectrales de los analitos desconocidos con un estándar de clorofila *b* (Sigma, Aldrich), utilizando el software de procesamiento de datos HP ChemStation. Se utilizaron distintas diluciones del estándar de clorofila *b* (0,0049-0,0786 mM) para realizar una curva de calibración útil para calcular la concentración de clorofila *b* de las muestras.

4.8. Análisis estadístico de resultados

Para todas las variables evaluadas se analizó por separado la normalidad de sus datos utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Dependiendo del cumplimiento de la normalidad, se utilizaron pruebas de comparación de medias ANOVA, DMS, Tukey y Scheffe para datos paramétricos y prueba Kruscall Wallis para datos no paramétricos. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significancia del 5 % utilizando el software estadístico SPSS (IBM Statistics, 2012).

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Medición de niveles de expresión relativa del gen *CV* de *A. thaliana*

Los resultados obtenidos del análisis de la calidad del ARN purificado de las muestras de plantas de cada tratamiento demostraron una alta integridad, tal como se puede observar en la *Figura 10*.

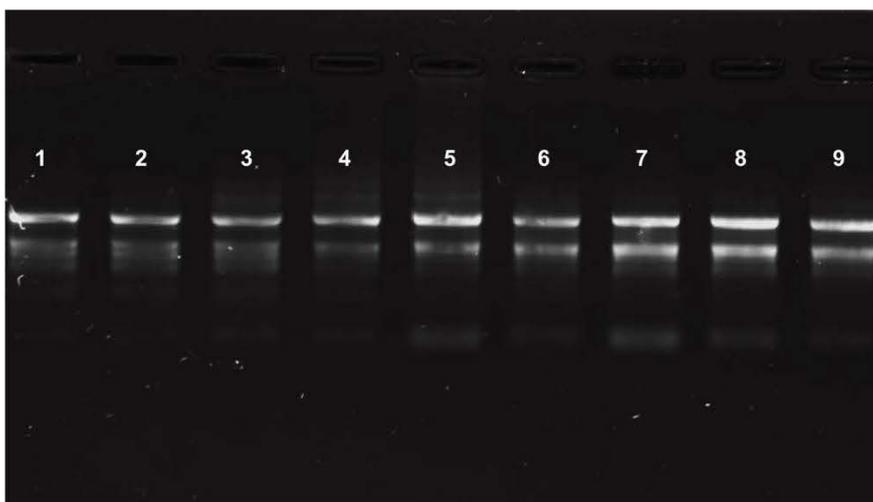


Figura 10. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de muestras de ARN de hojas de A. thaliana de una réplica biológica. Las muestras se cargaron en el siguiente orden: (1) T0, (2) MS 24h, (3) MS + NaCl 100 mM 24h, (4) XGO 0,1 mg.L-1 24h, (5) XGO 0,1 mg.L-1 + NaCl 100 mM 24h, (6) MS 72h, (7) MS + NaCl 7100 mM 2h, (8) XGO 0,1 mg.L-1 72h, (9) XGO 0,1 mg.L-1 + NaCl 100 mM 72h.

Al observar la *Figura 10* de la electroforesis se pueden apreciar claramente las dos bandas de ARN características de una extracción de células eucariotas (correspondientes a las subunidades 18 y 28 S del ARN ribosomal, respectivamente). En la imagen de la electroforesis se podría inferir que las muestras contenían moléculas de ARN con una adecuada integridad, debido a que no se observó degradación visual (comúnmente relacionado con la difuminación de las bandas o el también denominado *smear* o barrido de las bandas). Este resultado se mantuvo en todas las muestras biológicas analizadas, por lo que en todos los casos la calidad de la extracción fue buena para los ensayos moleculares posteriores (Surzycki, 2000, pp. 119-145).

En la cuantificación del ARN se obtuvieron concentraciones suficientemente elevadas (por encima de los 500 ng/ μ L) para poder utilizar en el protocolo de qRT-PCR. Adicionalmente, el índice de absorbancia o la relación 260/280 nm arrojó valores dentro del límite de 1.8 – 2,0. Estos indicaron que la muestra no presentó contaminación por azúcares ni aminoácidos aromáticos (proteínas en general), luego del proceso de extracción de ARN (Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989; Surzycki, 2000, pp. 119-145).

Una vez comprobados los parámetros de calidad de las muestras de ARN extraídas se procedió a realizar el protocolo de qRT-PCR. La especificidad de los cebadores utilizados a la cadena molde de ADN complementario (ADNc) sintetizada se evaluó mediante dos métodos, cuyos resultados se representan en la *Figura 11*.

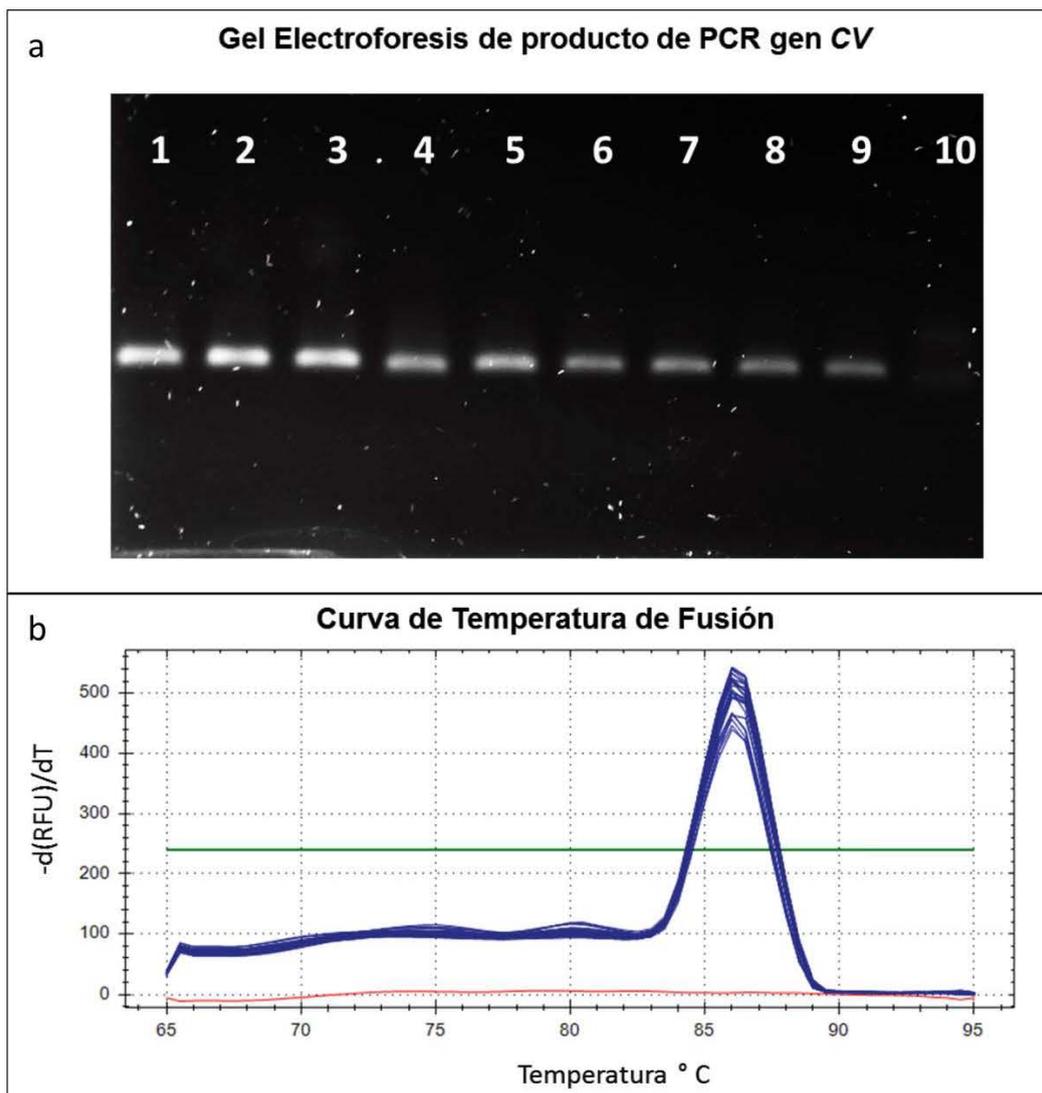


Figura 11. Pruebas de especificidad de los cebadores utilizados con los productos de amplificación obtenidos de la PCR en tiempo real.

(a) Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % a 100 voltios por 30 minutos. Amplificación del gen CV de cDNA de muestras de *A. thaliana* de una réplica biológica. Las muestras se cargaron en el siguiente orden: (1) T0, (2) MS 24h, (3) MS + NaCl 100 mM 24h, (4) XGO 0,1 mg.L-1 24h, (5) XGO 0,1 mg.L-1 + NaCl 100 mM 24h, (6) MS 72h, (7) MS + NaCl 7100 mM 2h, (8) XGO 0,1 mg.L-1 72h, (9) XGO 0,1 mg.L-1 + NaCl 100 mM 72h, (10) control negativo de la mezcla sin muestra de ARN.

(b) Curva de temperatura de fusión de los cebadores utilizados. Líneas azules representan a las muestras de cada tratamiento, línea roja representa el control negativo de la mezcla sin muestra de ARN.

La electroforesis presentada en la *Figura 11.a* demuestra que el proceso de amplificación fue específico hacia un solo segmento de ADN, en este caso la

región del gen CV flanqueada por el par de cebadores. Este resultado era de esperarse porque el set de cebadores que se utilizaron fueron los mismos empleados en previas investigaciones en el estudio donde se descubrió la funcionalidad de dicho gen (Wang y Blumwald, 2014, pp. 4875–4888). Así mismo, las curvas de temperatura de fusión (*Figura 11.b*) igualmente indicaron la amplificación de un solo fragmento de ADN en el 100 % de las muestras analizadas. Debido a que el control negativo (que no contenía muestra de ARN, *Figura 11.B*) no presentó amplificación detectable por el equipo de análisis, se pudo inferir que los reactivos utilizados para la reacción de PCR o la manipulación durante el montaje de las reacciones no introdujeron contaminaciones, ni tampoco se formaron amplificaciones entre los cebadores utilizados (hetero-dímeros, homo-dímeros o *Hairpins*) (Surzycki, 2000, pp. 406-423).

La cuantificación de la cantidad de ADN amplificado con cada ciclo se midió mediante la fluorescencia emitida por el compuesto SYBR® Green presente en la mezcla de reacción. Los valores utilizados para realizar la cuantificación relativa de los niveles de expresión fueron los del ciclo de umbral límite (*Threshold cycle* o CT) de cada muestra analizada. Al realizar los cálculos respectivos de la *Ecuación 1* en base a los valores CT de cada réplica y tratamiento se obtuvieron los promedios de expresión del gen CV normalizado con respecto al nivel de expresión del gen ACT-2 y del tiempo cero (t_0) para cada tratamiento. Estos valores de expresión en base logarítmica (\log_{10}) con su respectivo error estándar se presentan en la *Tabla 4*.

Tabla 4.

Valores promedio del logaritmo de expresión relativa del gen *CV* en plantas de *A. thaliana* calculados aplicando la *Ecuación 1* a partir de los datos del valor CT de las tres réplicas biológicas. Los valores representan un promedio y error estándar obtenidos de los mismos datos de cada réplica biológica independiente.

Horas después de la inducción	Tratamiento	Promedio Expresión gen <i>CV</i> ($\exp^{\Delta\Delta CT}$)	Error Estándar
24h	Control 24 h	0,75	0,0036
	NaCl 100 mM	0,86	0,0040
	XGO 0,1 mg.L ⁻¹	0,39	0,0027
	XGO 0,1 mg.L ⁻¹ + NaCl 100 mM	0,74	0,0064
72h	Control 72 h	0,71	0,0042
	NaCl 100 mM	1,01	0,0026
	XGO 0,1 mg.L ⁻¹	0,80	0,0023
	XGO 0,1 mg.L ⁻¹ + NaCl 100 mM	0,32	0,0007

Para poder realizar un análisis estadístico comparativo de los valores presentados en la *Tabla 4* se analizó la normalidad de los datos en el programa estadístico SPSS. En la *Tabla 5* se presentan los valores de *p* con un 5 % de significancia para las pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk.

Tabla 5.

Resultado de las pruebas estadísticas de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para los valores de expresión relativa del gen *CV*. Valores *p* con un nivel de significancia del 5%.

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
ExpresiónGen <i>CV</i>	0,167	24	<u>0,081</u>	0,952	24	<u>0,301</u>

Las pruebas de normalidad demostraron, con un nivel de significancia del 5 %, que los datos de expresión relativa del gen *CV* se ajustaron a una distribución

normal. En base a este resultado se realizaron comparaciones de medias utilizando pruebas estadísticas paramétricas. La prueba estadística de Diferencia de Medias Significativas (DMS) mostró diferencias entre tratamientos. Con los valores obtenidos de la prueba DMS se generaron dos subgrupos estadísticos, representados con las letras a y b. En la *Figura 12* se presentan los diagramas de barras de niveles de expresión relativa del gen CV por tratamiento con sus respectivos subgrupos estadísticos.

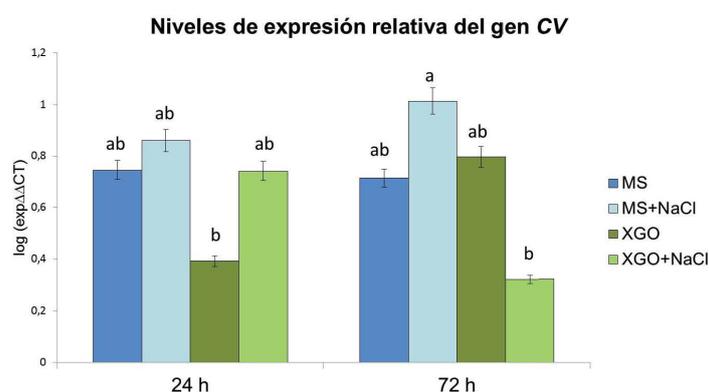


Figura 12. Diagrama de barras representando el nivel de expresión relativa del gen CV por cada tratamiento. Barras de error con un 5% de error y subgrupo estadístico al que pertenece según la prueba estadística de comparación de medias (DMS) de pruebas paramétricas, con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

Debido a que la qRT-PCR es una técnica con alta sensibilidad es indispensable utilizar un gen de expresión basal (o *housekeeping*) para normalizar los niveles de expresión de un gen de interés. Existen varios genes descritos de expresión basal, sin embargo, se ha probado que varios de estos genes pueden presentar patrones distintos de expresión bajo ciertas condiciones o tratamientos. En el presente trabajo se utilizó el gen *ACT-2* tomando en cuenta que en estudios similares donde se han analizado cambios de expresión génica en plantas de *A. thaliana*, *Oriza sativa* y *Solanum lycopersicum* bajo condiciones de estrés salino se utilizó el mismo gen como referencia con resultados satisfactorios (Hichri et al., 2014, pp. 1967–1990; Narsai, Castleden, y Whelan, 2010, pp. 262–270; Sinha et al., 2015, pp. 948–967).

La base logarítmica utilizada para analizar los datos de expresión relativa fijó el valor de la expresión del tiempo cero (t_0) en un valor de 0. Teniendo en cuenta este dato todos los tratamientos analizados sobre-expresaron el gen *CV* con respecto al tratamiento control (t_0). Debido a que el gen en estudio fue descrito como un gen que se activa ante condiciones de estrés o senescencia, el efecto de su sobreexpresión podría indicar un estrés adicional al cual se encuentran expuestas las plantas en su desarrollo o al propio mecanismo de senescencia. Dentro de los posibles factores que puedan representar estrés a las plantas durante su crecimiento *in vitro* está el agotamiento de nutrientes del medio de cultivo donde se desenvuelven. Para evitar que este problema afecte el metabolismo de las plantas e interfiera en el objetivo de la investigación se planteó un sistema de inducción en el cual, 24 horas antes de someter a las plantas a su tratamiento específico, se refrescó el medio de cultivo para su aclimatación y permitir que las mismas tuvieran las condiciones óptimas de nutrientes (Wang y Blumwald, 2014, pp. 4785–4788).

Adicionalmente, cuando las plantas se ven afectadas por problemas tanto bióticos como abióticos, el metabolismo de sus células se ve modificado y se generan varios tipos de metabolitos secundarios que pueden ser útiles para sobrellevar el problema con el que se encuentran (por ejemplo, defensa ante patógenos), o iniciar con un proceso de senescencia y muerte celular programada (Axelos, Curie, Mazzolini, Bardet, y Lescure, 1992, pp. 123–128). El mecanismo de algunos metabolitos secundarios es regular el nivel de expresión génica en el núcleo celular. Un efecto similar sucede por la acumulación de compuestos relacionados al estrés como especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (NOS) (Du Fall y Solomon, 2011, pp. 64–78). Es probable que durante sus primeros días de crecimiento o en el momento en el que se realizó el cambio de medio de cultivo, las plantas hayan iniciado un proceso de producción de metabolitos secundarios y acumulación de especies relacionadas con estrés, los cuales están presentes en las plantas inclusive cuando tienen medio de cultivo fresco y por este motivo el gen *CV* se encontraba sobreexpresado en todos los tratamientos. Independientemente de estas

evidencias, la sobreexpresión del gen *CV* en los tratamientos con NaCl 100 mM fue estadísticamente mayor al resto de tratamientos, indicando que el sistema de inducción propuesto en el presente trabajo es adecuado y permite observar el efecto directo de la respuesta en las plantas con respecto al estrés salino. El sistema de inducción utilizado es además un método previamente estandarizado por Axelos et al. para el análisis de expresión genética en el cultivo líquido de *A. thaliana* y empleado por diversos autores (Filippou et al., 2016, pp. 1259–1274; M. I. R. Khan, Fatma, Per, Anjum, y Khan, 2015, pp. 462–470).

La sobreexpresión del gen *CV* en los tratamientos de MS + NaCl, tanto a las 24 y 72 horas posteriores a la inducción, concuerda con la teoría de la función de este gen, debido a que el mismo se expresa bajo condiciones de estrés en las plantas, en este caso estrés salino (Wang y Blumwald, 2014, pp. 4875–4888). Los tratamientos a los que se les colocó el bioproducto no presentaron una sobreexpresión del gen *CV* tan elevada (especialmente los tratamientos de XGO 24 horas y XGO + NaCl 72 horas, que pertenecen a grupos estadísticos distintos), en comparación con los tratamientos que no tuvieron el bioproducto. El bioestimulante aplicado a las plantas sin estrés salino mantuvo inicialmente bajos los niveles de expresión de *CV* (XGO 24h). Igualmente, el tratamiento al que se le agregó XGO y NaCl a las 72 horas presentó un nivel mucho menor de expresión del gen *CV* que el resto de tratamientos, a pesar de encontrarse en condiciones salinas.

Es probable que las reacciones que se desencadenan tras el contacto de los XGO con la pared celular de las plantas conlleven a la regulación de la expresión del gen *CV*. A pesar de que este fenómeno en específico no ha sido investigado, existen varias investigaciones en las que se ha probado que la aplicación de XGO en plantas de *A. thaliana* y células de *Nicotiana tabacum* altera los niveles de expresión de varios genes (entre ellos genes de peroxidasas, anhidrasas carbónicas y polifenoloxidasas). No se conoce el mecanismo de acción mediante el cual estos oligosacáridos interactúan con las células vegetales para inhibir o inducir la expresión de ciertos genes. Probablemente este mecanismo se basa

en fenómenos epigenéticos, tales como patrones de metilación de secuencias de ADN o la modificación covalente de proteínas de histonas (Fingerman et al., 2013, pp. 221–225; Guan, Yue, Zeng, y Zhu, 2014, pp. 438–453).

Para poder conocer el mecanismo de acción de los bioestimulantes en cuestión sobre el gen *CV* se requiere de análisis más minuciosos y concluyentes. Sin embargo, el hecho de que se regule su expresión puede indicar que los XGO ayudan a las plantas a tolerar condiciones de estrés salino al no degradar sus cloroplastos y, de esta forma, mantener su tasa fotosintética elevada. La aplicación de estos bioestimulantes podría inclusive reemplazar una técnica agronómica patentada en el 2015 que se basa en generar plantas transgénicas que no puedan expresar su gen *CV*, brindándoles así tolerancia a estrés abiótico (Blumwald y Wang, 2015). Para comprobar que la regulación observada del gen *CV* en los tratamientos de XGO tuvo un efecto positivo en la maquinaria fotosintética de las plantas, se analizó la concentración de clorofilas en las hojas de las plantas tratadas.

5.2. Establecimiento de condiciones para la extracción de pigmentos fotosintéticos de *A. thaliana*

Los pigmentos fotosintéticos son inestables y fotosensibles, y al encontrarse en solución son fácilmente oxidados por la presencia de radicales libres o degradados debido a cambios en el pH y la temperatura de la solución en la que se encuentran (Hu, Tanaka, y Tanaka, 2013a, pp. 9–19). Por ello, se utilizó primeramente la técnica de cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés *Thin Layer Chromatography*), como análisis preliminar para el establecimiento de las condiciones del tiempo de extracción de pigmentos fotosintéticos en hojas de *A. thaliana*. El resultado del estudio de distintos tiempos de extracción de estos pigmentos se observa en la *Figura 13*, utilizando dos solventes orgánicos distintos.

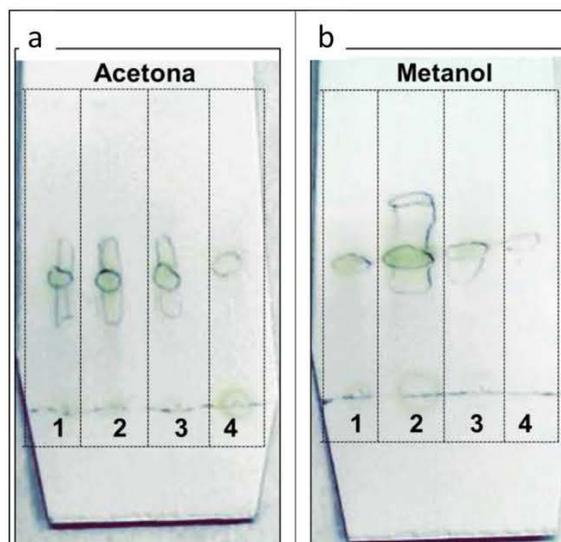


Figura 13. Placas de sílica gel obtenidas de la cromatografía de capa fina (TLC) de los extractos obtenidos. Eluyente utilizado para TLC: 3 mL de hexano, 1 mL de cloroformo y 1 mL de acetona; volumen de inyección: 50 μ L de extracto. Ensayo de tiempo de extracción de los pigmentos. Carriles (1) 14, (2) 16, (3) 18 y (4) 20 horas a 4 °C en oscuridad con los solventes
(A) Acetona y
(B) Metanol.

Las placas obtenidas en la *Figura 13* son solamente resultados iniciales que se utilizaron como punto de partida para llevar a cabo los métodos analíticos correspondientes. Sin embargo, en estos resultados se pudo observar claramente que la utilización de metanol como solvente a las 16 horas de extracción, permitió obtener una mayor concentración de pigmentos de coloración verdosa (muy probablemente clorofila). Es posible que pasado este tiempo en solución a 4 °C estos pigmentos se degradaron, por ende se observó menor intensidad a las 18 y 20 horas de extracción. Un efecto similar sucedió con acetona como solvente, en el cual pasadas las 18 horas de extracción fue evidente una disminución en la intensidad de coloración de pigmentos de coloración verdosa (Hu et al., 2013a, pp. 9–19).

El método de extracción de pigmentos fotosintéticos de hojas de *A. thaliana* varía considerablemente entre investigaciones con respecto a las condiciones tales como el tiempo y temperatura de extracción y el solvente utilizado. La temperatura de la extracción es un factor que juega un rol fundamental en este

proceso, pues es proporcional a la energía cinética de las moléculas en la solución. Esta movilidad en solución promueve la degradación parcial de moléculas como la clorofila en análogos como la clorofilida, que interfieren en los métodos analíticos de detección de pigmentos fotosintéticos. La naturaleza del solvente utilizado es también un factor importante debido a las interacciones moleculares entre solvente–pigmentos, además del pH de la solución. Por esta razón, dependiendo del método analítico a ser empleado se escogerá el solvente adecuado para la extracción de los pigmentos (Albert et al., 2009, pp. 2191–2202; Thrane et al., 2015, pp. 2–24; Yang, Worley, y Udvardi, 2014, pp. 4862–4874).

5.3. Cuantificación de clorofila *a* y *b* mediante métodos espectrofotométricos

Basado en los resultados preliminares obtenidos en la TLC se decidió realizar un análisis más específico examinando el tiempo de extracción de plantas en acetona al 80 % y cuantificando su resultado mediante espectrofotometría. En la *Figura 14* se presentan los resultados obtenidos de concentración de clorofila *a* y *b* por peso fresco de planta procesado obtenido de este análisis.

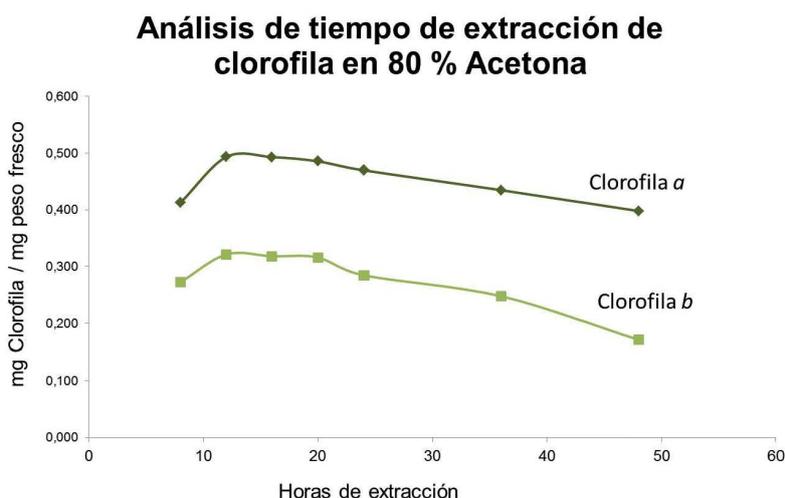


Figura 14. Diagrama de dispersión representando la concentración de clorofila *a* y *b* obtenida de la extracción de estos pigmentos en acetona al 80 % a 4 °C durante 8, 12, 16, 20, 24, 36 y 48 horas.

Este resultado confirmó la imagen obtenida en la TLC, demostrado que en un rango de 12 a 20 horas se obtuvo la mayor concentración de clorofila *a* y *b*. Es evidente que un tiempo menor a 12 horas de extracción de estos pigmentos mediante el sistema utilizado, no fue suficiente para obtener todos los pigmentos. Así mismo, se demostró el efecto similar visto en la TLC, en el que a un tiempo de extracción superior a 20 horas se observó la disminución de la concentración de clorofila *a* y *b*, que muy probablemente se debió a la degradación de estos compuestos fotosintéticos en solución a 4 °C.

La similitud que tienen estos resultados con respecto a la TLC se debe a que esta última técnica analítica puede ser utilizada para el estudio de pigmentos fotosintéticos, entre ellos clorofilas y carotenoides, dependiendo del tipo de eluyente utilizado. La TLC es un ensayo semicuantitativo para el análisis de niveles de clorofilas y de carotenoides. Sin embargo, esta técnica no es lo suficientemente sensible como para detectar componentes análogos producto de alteraciones moleculares pequeñas en los pigmentos, ni se utiliza para calcular la concentración de estos compuestos (Schoefs, 2002, pp. 361–371; Zarzycki et al., 2011, pp. 418–427).

Debido a que en un rango de 12 a 20 horas de extracción en 80 % de acetona a 4 °C en la oscuridad se obtuvo la mayor concentración de clorofilas *a* y *b*, se decidió realizar este procedimiento en un período de tiempo de 16 horas. En la *Tabla 6* se presentan los valores promedio obtenidos de la concentración de clorofila *a* y *b*, normalizado con respecto al valor del tiempo 0 (t_0) y con su respectivo error estándar.

Tabla 6.

Valores promedio de la concentración de clorofila *a* y *b* obtenidas por tratamiento en mg de clorofila por mg de hoja procesado. Valor normalizado al tratamiento tiempo cero.

Tiempo después de inducción	Tratamiento	Clorofila <i>a</i>		Clorofila <i>b</i>	
		Promedio (mg clorofila / mg hoja)	Error estándar	Promedio (mg clorofila / mg hoja)	Error estándar
24 h	Control	0,576	0,082	0,986	0,054
	NaCl 100 mM	0,583	0,045	0,978	0,020
	XGO 0,1 mg-L ⁻¹	0,717	0,026	1,021	0,023
	XGO 0,1 mg-L ⁻¹ + NaCl 100 mM	0,629	0,037	1,025	0,028
72 h	Control	0,962	0,078	1,047	0,005
	NaCl 100 mM	0,651	0,012	0,998	0,009
	XGO 0,1 mg-L ⁻¹	1,173	0,037	1,051	0,010
	XGO 0,1 mg-L ⁻¹ + NaCl 100 mM	0,838	0,043	1,004	0,011

Utilizando los datos de concentración de clorofila *a* y *b* se realizó la prueba estadística de normalidad de los datos, cuyo resultado se presenta en la *Tabla 7*.

Tabla 7.

Pruebas estadísticas de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para los valores de concentración de clorofila *a* y *b* por peso de planta utilizado. Valores *p* con un nivel de significancia del 5%.

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Clorofila <i>a</i>	,190	26	,017	,916	26	,037
Clorofila <i>b</i>	,143	26	,012	,927	26	,017

Las pruebas de normalidad demostraron, con un nivel de significancia del 5 %, que los datos de concentración de clorofila *a* y *b* no se ajustaron a una distribución normal. En base a este resultado se realizaron comparaciones de medias utilizando pruebas estadísticas no paramétricas. La prueba de

comparación de distribución y de medias entre grupos estadísticos Kruskal-Wallis ($k=9$ muestras) demostró diferencias significativas entre tratamientos. En la *Figura 15* se presentan los diagramas de barras de niveles de clorofila *a* y *b* por tratamiento, con sus respectivos subgrupos estadísticos.

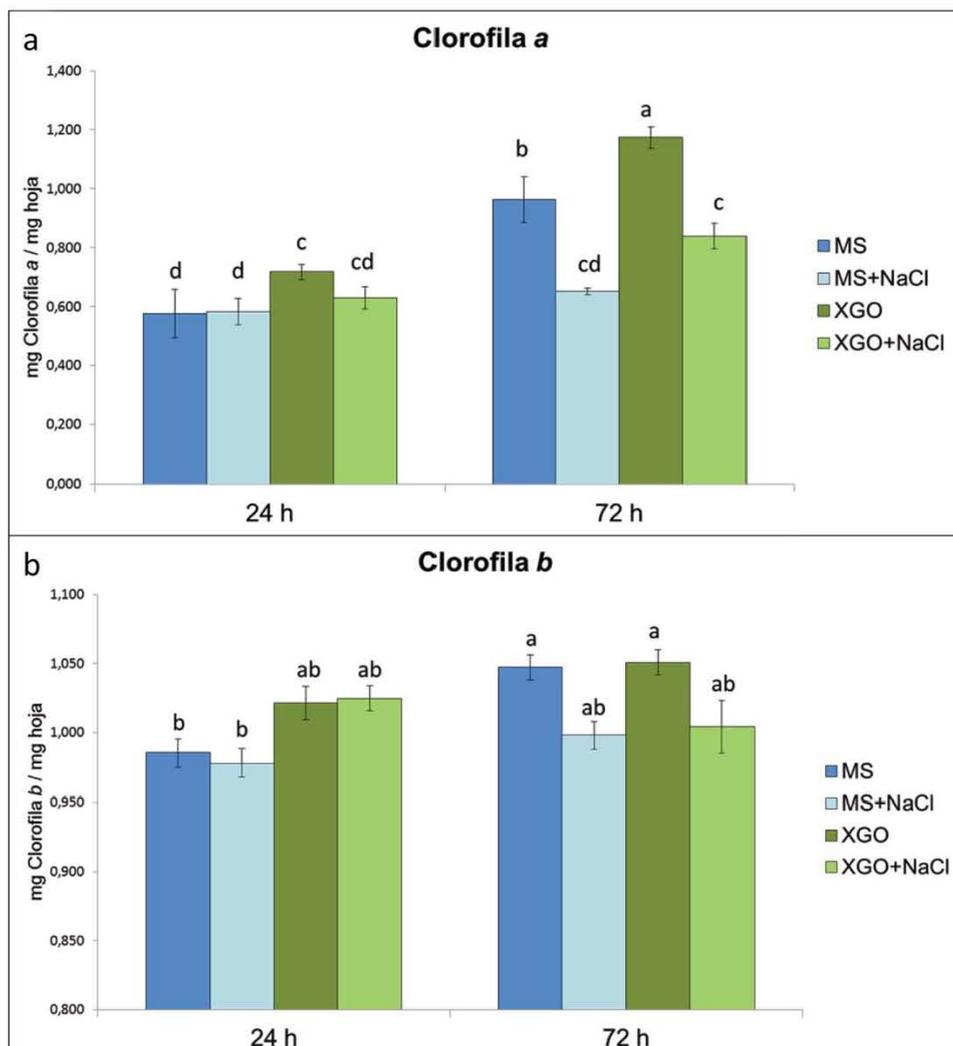


Figura 15. Diagrama de barras representando

(a) mg de clorofila *a* por mg de hojas utilizado por cada tratamiento, y

(b) mg de clorofila *b* por mg de hojas utilizado por cada tratamiento.

Subgrupo estadístico al que pertenece cada tratamiento según la prueba estadística Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas, con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

En la *Figura 15* se puede observar que existió cierta proporcionalidad entre los niveles de clorofilas *a* y *b* por tratamiento. El tratamiento control de MS mostró un aumento en la concentración de ambas clorofilas pasadas las 72 horas luego

de la inducción. Este efecto de síntesis de clorofila que se pudo observar en este tratamiento que no estuvo afectado por salinidad ni tuvo bioestimulante, podría deberse a que se están utilizando los nutrientes que se le suministró a la planta cuando se le refrescó el medio. La síntesis de clorofila es un proceso bioquímico complejo que consta de varias reacciones de acoplamiento enzimático de diferentes moléculas, tales como anillos de pirrol, porfirinas, aminoácidos no proteicos y el centro de magnesio. Como el medio de cultivo MS contiene alta concentración de sales de amonio y de magnesio, es evidente que las plantas podrían utilizar estos compuestos para sintetizar moléculas de clorofila (Murashige y Skoog, 1962, pp. 473–497; Von Wettstein, Gough, y Kannangara, 1995, pp. 1039–1057).

El tratamiento al que se le agregó NaCl a 100 mM presentó niveles de clorofilas *a* y *b* constantes desde las 24 hasta las 72 horas posteriores a la inducción. Al comparar este efecto con respecto al tratamiento MS se podría inferir que existe un efecto de inhibición de la síntesis de clorofilas, o que la síntesis de estos pigmentos ocurre de forma natural, pero a la par existe una alta tasa de degradación de estos pigmentos. Ambos efectos han sido descritos en varias investigaciones en las cuales se analizó el efecto de la salinidad sobre distintos cultivos. Debido al cambio osmótico ocasionado por la presencia de sal en las plantas, se acumulan niveles elevados de ROS que pueden llegar a alterar la estructura de las membranas, entre ellas de los cloroplastos. Este daño a los cloroplastos activa mecanismos de degradación de pigmentos fotosintéticos que podrían llegar a ser tóxicos (foto toxicidad de estos pigmentos) si se liberan en el citoplasma. De igual manera en ciertas plantas se ha observado que concentraciones de sal entre 100 – 200 mM, inhiben la actividad de las enzimas ácido δ -aminolevulinico deshidrogenasa y glutamato-semialdehido aminotransferasa, ambas involucradas en el proceso de síntesis de clorofila (N. A. Khan, 2003, pp. 437–440; Moschen et al., 2014, pp. 45–52; Radi, Farghaly, y Hamada, 2013, pp. 72–88; Von Wettstein et al., 1995, pp. 1039–1057).

Al analizar los tratamientos en los cuales se agregó el bioestimulante se pudo claramente observar que los niveles de clorofilas aumentaron con respecto a su tratamiento análogo, al que no se le añadió bioestimulante. Este efecto fue más notorio en los niveles de clorofila *a* que en los niveles de clorofila *b*, probablemente indicando que existen modificaciones en las rutas de degradación de clorofila. A pesar de que la clorofila *a* es el pigmento de mayor importancia en los cloroplastos e interactúa directamente con los fotosistemas, la clorofila *b* es también un pigmento accesorio que sirve para captar energía de la luz en un rango mayor de absorbancia. En base a que la degradación de la clorofila empieza por la conversión enzimática de clorofila *b* en clorofila *a*, el índice de clorofila *a/b* podría indicar en cierta forma la tendencia a la degradación o la síntesis en la que se encuentran estos pigmentos en las plantas. En la *Figura 16* se presenta un diagrama de barras representando el índice de concentración de clorofilas *a/b* por tratamiento, con sus grupos estadísticos obtenidos mediante la prueba de Kruskal-Wallis para pruebas no paramétricas.

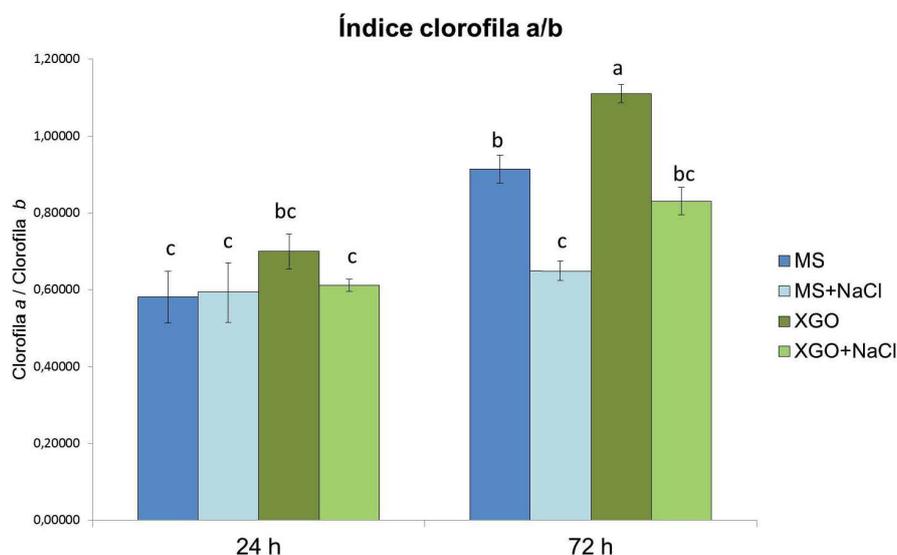


Figura 16. Diagrama de barras representando el índice de clorofila *a/b* de cada tratamiento analizado. Subgrupo estadístico al que pertenece cada tratamiento según la prueba estadística Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas, con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

El índice de clorofila *a/b* a las 24 horas posteriores a la inducción fue estadísticamente igual en todos los tratamientos, salvo el tratamiento con los XGO sin estrés salino (*Figura 16*). Sin embargo, pasadas las 72 horas se observó

un aumento en la concentración de clorofila *a* con respecto a la clorofila *b* en los tratamientos que no tenían presencia de sal. Este aumento fue más notorio y estadísticamente superior en el tratamiento que contenía solamente los XGO. Este índice parece no representar la degradación de la clorofila *b* debido a que en la Figura 15 (anterior) se pudo observar un aumento de la concentración de este pigmento en el mismo tratamiento. Al contrario, este efecto podría indicar un mecanismo de síntesis, no solo de pigmentos fotosintéticos, sino también de estructuras proteicas tales como los fotosistemas que albergan la clorofila *a* y en donde se realizan las reacciones dependientes de luz de la fotosíntesis. Por esta razón el aumento en el índice clorofila *a/b* podría indicar un proceso de sobreexpresión de genes relacionados con la biosíntesis de clorofila *a* en los tratamientos a los que se les agregó los XGO a 0,1 mg.L⁻¹.

Por otro lado, cuando se analizaron tanto las concentraciones de pigmentos clorofílicos como el índice *a/b* de las plantas que fueron tratadas con 100 mM de NaCl, se pudo observar que la presencia de los XGO en cierta medida protegió a estos pigmentos ante la degradación enzimática. Esto se infiere además porque fue evidente un efecto de degradación de los pigmentos clorofílicos en las plantas bajo estrés salino sin bioestimulante (pertenecieron a un grupo estadístico distinto en todos los casos), efecto que no fue tan notorio en las plantas que poseían el bioestimulante. Es probable que la presencia de los XGO en las células vegetales regule negativamente la expresión de genes de degradación de clorofila, genes de degradación de cloroplastos, o que se sobreexpresen genes relacionados con la biosíntesis de estos pigmentos. Para poder conocer en realidad el mecanismo de acción directo mediante el cual los XGO evitan esta degradación, se requiere de un análisis de la expresión de varios genes involucrados en estos procesos fotosintéticos (Marschall y Proctor, 2004, pp. 593–603; Yang et al., 2014, pp. 4862–4874; Zivcak, Brestic, Kalaji, y Govindjee, 2014, pp. 339–354).

5.4. Estandarización y medición en HPLC de concentración de clorofila *b*

Los métodos espectrofotométricos utilizados para la medición de concentración de clorofila *a* y *b* pueden resultar útiles a la hora de tener una idea clara de lo que está sucediendo dentro de la maquinaria fotosintética de las plantas. Sin embargo, existen componentes producto de la degradación de pigmentos, tales como la clorofilida o inclusive alteraciones en la estructura molecular de los pigmentos por daños no enzimáticos (como daños por exposición a radicales libres), que no pueden ser detectables mediante estos ensayos y se requiere de técnicas analíticas más sensibles para determinarlas. Por esta razón, se midió la concentración de clorofila *b* en las muestras de plantas por HPLC para comprobar si en realidad el comportamiento obtenido por el análisis espectrofotométrico es conciso o si existe un proceso de degradación de estos pigmentos que no se haya podido detectar (Hu et al., 2013a, pp. 9–19; Mendes, Cartaxana, y Brotas, 2007, pp. 363–370; Zapata, Rodríguez, y Garrido, 2000, pp. 29–45).

El proceso de degradación enzimática de clorofila en las plantas inicia con la transformación de clorofila *b* en clorofila *a*, mediante la enzima clorofila *b* reductasa, y su biosíntesis sigue el proceso inverso. Por esta razón, analizar con exactitud la concentración de clorofila *a* podría indicar una medida de degradación de clorofila *a* (tanto enzimática como por daño ocasionado por radicales libres), degradación enzimática de clorofila *b*, e inclusive biosíntesis de clorofila *a* y *b*. Por otro lado, analizar con exactitud la concentración de clorofila *b* indicaría una relación directa con el proceso de degradación o biosíntesis de este pigmento. Tomando en cuenta esta consideración, se midió la concentración de clorofila *b* en las hojas de las plantas de *A. thaliana* de cada tratamiento, valores que se compararon con los datos obtenidos por espectrofotometría (Ruban et al., 2007, pp. 575–578; Sato, Ito, y Tanaka, 2015, pp. 249–259). En la *Figura 17* se presentan los cromatogramas obtenidos con cada método analizado hasta lograr una separación ideal de los pigmentos en extractos de hojas.

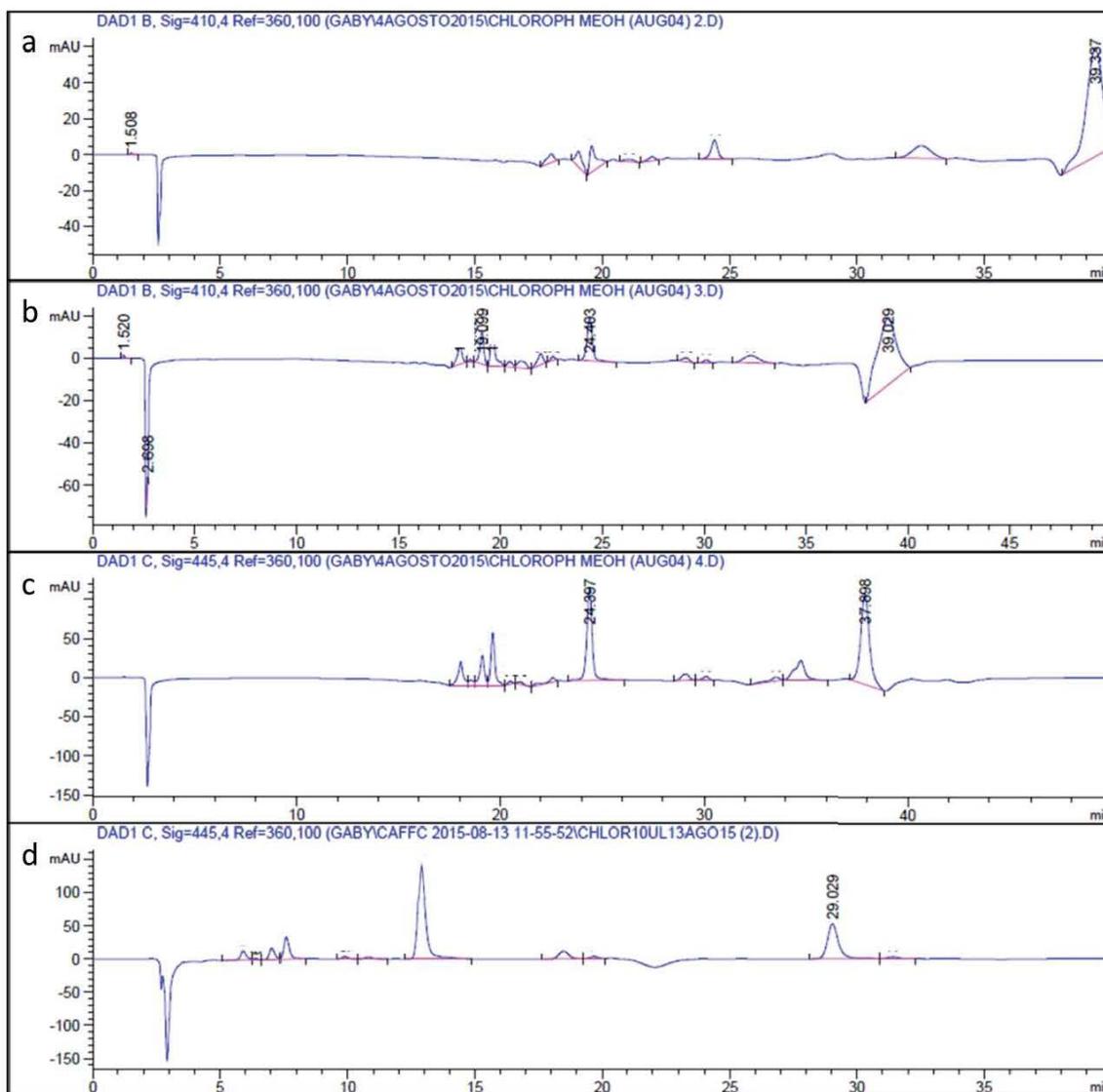


Figura 17. Cromatogramas obtenidos con la señal de longitud de onda a 445 nm del análisis del método de elución de pigmentos fotosintéticos extraídos en metanol. Eluyente A fue agua MiliQ destilada y el Eluyente B fue Agua Metanol (1:1). Métodos analizados

(a) 15 minutos con 100 % del eluyente A (isocrático), y del minuto 15 hasta el minuto 50 un cambio sostenido hasta tener 0 % del eluyente A y 100 % del eluyente B;

(b) 5 minutos con 100 % del eluyente B (isocrático), y del minuto 15 hasta el minuto 50 un cambio sostenido hasta tener 100 % del eluyente A y 0 % del eluyente B;

(c) 20 minutos de 50 % de A y 50 % de B, gradiente hasta obtener 10 % de A y 90 % de B a los 25 minutos, isocrático hasta los 30 minutos, gradiente hasta obtener 100 % de B hasta los 31 minutos; y

(d) 10 % de A y 90 % de B hasta 25 minutos, fase móvil llegue a 100 % de B hasta los 30 minutos, fase móvil llegue a 10 % de A y 90 % de B hasta los 31 minutos e isocrático hasta los 36 minutos.

Con el método de elución de la *Figura 17.d* se obtuvo una separación independiente de cada uno de los componentes. El método cromatográfico fue modificado al finalizar cada inyección tomando en cuenta la fuerza iónica que permitía la elución de distintos componentes. Debido a que en el método de elución de la *Figura 17.A* en los primeros 20 minutos no se detectó ningún compuesto a 445 nm, se decidió reducir el tiempo y contenido del solvente A y así sucesivamente se realizaron los cambios en el método (Lough y Wainer, 1995, pp. 149–166).

Una vez obtenido un método de separación eficiente se inyectaron distintas diluciones del estándar de clorofila *b* para conocer el tiempo de retención de este pigmento específico y realizar una curva de concentración del mismo. En la *Figura 18* se presentan el cromatograma obtenido de la inyección de estándar de clorofila *b* y la curva estándar de concentración de clorofila *b* vs el área integrada del pico obtenido (en unidades de mAbs*min).

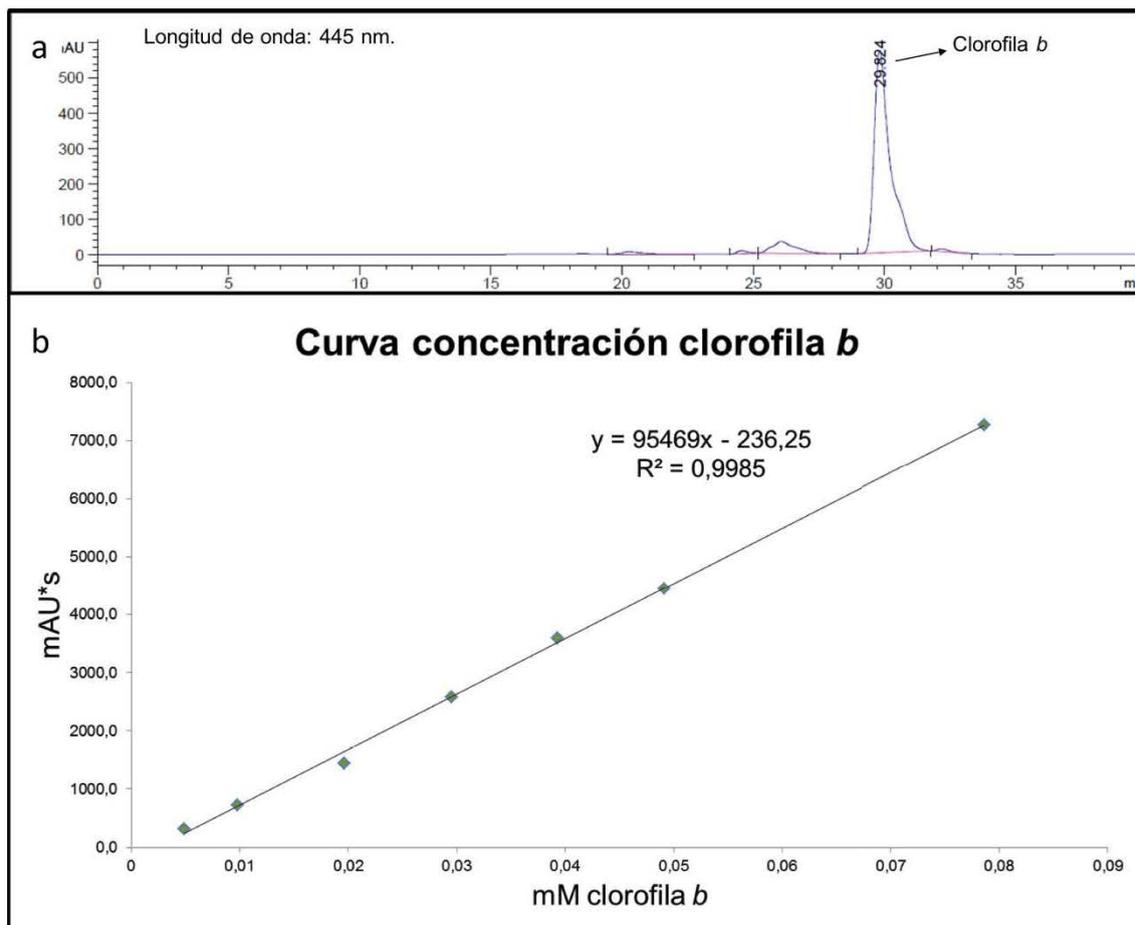


Figura 18. Análisis de estándar de clorofila b en HPLC mediante el método de elución estandarizado.

(A) Inyección de 10 μ L del estándar a la concentración 0,0786 mM, con un tiempo de retención de 29,84 minutos a 445 nm.

(B) Curva de concentración obtenida de la inyección 10 μ L del estándar de clorofila b a distintas concentraciones. Concentración de clorofila b en unidades de molaridad (mM) y las unidades del área integrada bajo la curva en unidades de mAU*s.

La curva que relaciona la concentración del estándar de clorofila b con respecto al área integrada bajo la curva del cromatograma obtenido presentó una fuerte correlación con un R^2 cercano a uno, por lo que indicó que la curva se podía utilizar para las calibraciones. Durante este análisis se observó que al utilizar soluciones con concentración mayor a 0,0786 mM del estándar, la curva dejaba de tener un comportamiento lineal. Debido a que las muestras analizadas presentaban un área dentro de los límites de la curva construida, no se utilizaron los datos obtenidos de soluciones más concentradas de clorofila b. Este efecto

de pérdida de linealidad es común al trabajar con analitos a concentraciones muy elevadas. Tanto en HPLC como en otros métodos analíticos existe un rango en el cual existe proporcionalidad entre la concentración del compuesto en análisis y su señal medible. Por esta razón, es recomendable que siempre al momento de validar un método analítico, se debe detectar este rango de proporcionalidad (Lough y Wainer, 1995, pp. 43–59).

El siguiente paso luego de identificar el tiempo de retención de la clorofila *b* y realizar su curva de concentración, fue analizar la proporción entre peso de planta – volumen de metanol necesarios para extraer la clorofila *b* de las hojas de *A. thaliana*. Para este ensayo se pesaron 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg de hojas de plantas de *A. thaliana* y se colocaron en 1 mL de metanol. Luego del proceso de extracción se inyectaron 10 μ L de cada extracto y analizó el área bajo la curva obtenida al tiempo de retención de la clorofila *b*. Adicionalmente, se observó el espectro de absorción de este componente al tiempo de retención establecido para el análisis de la pureza del pico. Los resultados del análisis de proporción entre peso y volumen de solvente y la pureza del pico se presentan en la *Figura 19*.

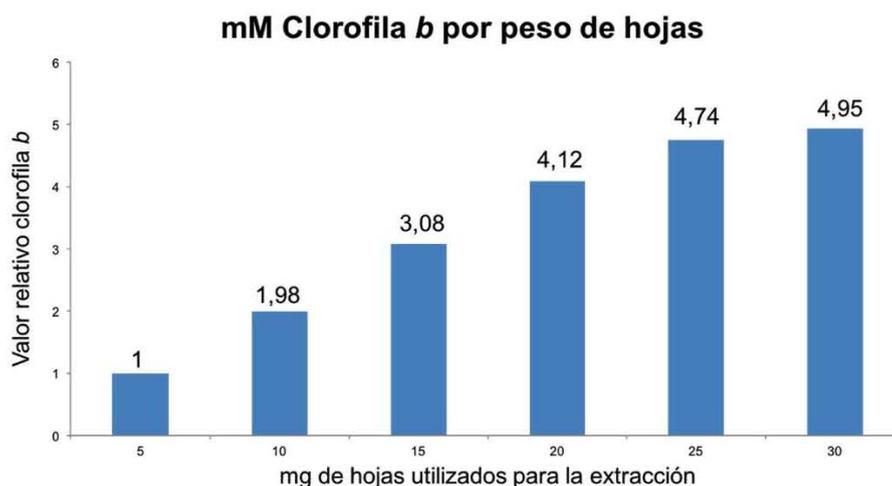


Figura 19. Análisis del peso de hojas de *Arabidopsis thaliana* (en mg) utilizados para la extracción de pigmentos fotosintéticos en 1 mL de metanol a 4 °C durante 16 horas. Valor representado con cada barra representa el valor normalizado de la concentración (en mM) de clorofila *b* con respecto al valor obtenido con 5 mg de hojas como referencia.

En esta figura se puede apreciar que existió una proporcionalidad entre los mg de hojas utilizados con respecto a la concentración de clorofila *b*, es decir que la concentración aumentó 2, 3 y 4 veces al utilizar 10, 15 y 20 mg de hojas, respectivamente, con respecto al valor obtenido con 5 mg de hojas. Sin embargo, al utilizar 25 y 30 mg de hojas esta proporcionalidad dejó de tener un comportamiento lineal y, por ende, resultó ser un peso demasiado elevado para utilizar en este proceso. En base a este resultado, la extracción de clorofila *b* a ser analizada en HPLC se realizó utilizando un valor menor a los 20 mg de hojas de *A. thaliana*.

Una vez estandarizados los métodos de extracción y separación cromatográfica de pigmentos fotosintéticos en HPLC, se procedió a analizar las muestras de *A. thaliana* de cada tratamiento. Los valores promedio de concentración de clorofila *b* por peso de planta utilizados por tratamiento se presentan en la *Tabla 8*, con el error estándar respectivo.

Tabla 8.

Promedio de la concentración de clorofila *b* obtenida mediante HPLC para cada tratamiento analizado. Se presentan los valores normalizados con respecto al tratamiento control t_0 . Valores representados con su error estándar. t_0 es el control del tiempo antes de inducción o control.

Horas después de la inducción	Tratamiento	Promedio de concentración de clorofila <i>b</i> por peso de hojas utilizado (mg/mg)	Error estándar
24 h	Control 24 h	1.01	0.08
	NaCl 100 mM	1.08	0.03
	XGO 0,1 mg-L ⁻¹	1.19	0.01
	XGO 0,1 mg-L ⁻¹ + NaCl 100 mM	1.11	0.02
72 h	Control 72 h	1.31	0.11
	NaCl 100 mM	0.96	0.12
	XGO 0,1 mg-L ⁻¹	1.46	0.35
	XGO 0,1 mg-L ⁻¹ + NaCl 100 mM	1.29	0.15

El resultado de análisis estadístico para la prueba de normalidad de los datos presentados en la *Tabla 8* se presentan en la *Tabla 9*.

Tabla 9.

Resultado de las pruebas estadísticas de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para los valores de concentración de clorofila *a* y *b* por peso de planta utilizado. Valores *p* con un nivel de significancia del 5 %.

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	GI	Sig.	Estadístico	GI	Sig.
Clorofila <i>b</i> HPLC	0,294	32	<u>0,000</u>	0,712	32	<u>0,000</u>

Las pruebas de normalidad demostraron, con un nivel de significancia del 5 %, que los datos de concentración de clorofila *b* obtenidos mediante HPLC no se ajustaron a una distribución paramétrica. En base a este resultado se realizaron

comparaciones de medias utilizando pruebas estadísticas no paramétricas. La prueba de comparación de distribución y de medias entre grupos estadísticos Kruskal-Wallis (k=9 muestras) demostró diferencias significativas entre tratamientos. En la *Figura 20* se presentan los diagramas de barras de niveles de clorofila *b* por tratamiento, con sus respectivos subgrupos estadísticos.

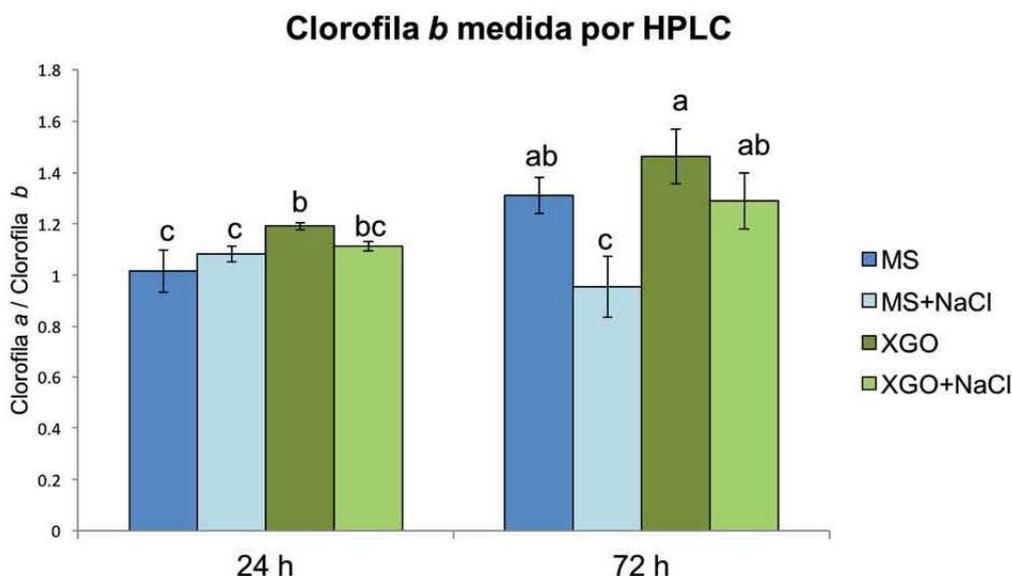


Figura 20. Diagrama de barras representando mg de clorofila *b* por mg de hojas utilizado por cada tratamiento analizados mediante HPLC. Subgrupo estadístico al que pertenece cada tratamiento según la prueba estadística Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas, con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

Se pudieron apreciar resultados bastante similares de concentración de clorofila *b* analizados, tanto por el método espectrofotométrico como por HPLC, entre los tratamientos. Existieron, sin embargo, algunas diferencias al analizar los patrones de concentración entre tratamientos. En los tratamientos que contenían los XGO (tanto a 24 horas como a 72 horas posteriores a la inducción) se pudo observar que la concentración de clorofila *b* fue estadísticamente mayor al resto de los tratamientos (al mismo tiempo luego de la inducción), diferencia que no se pudo observar mediante el método espectrofotométrico. Así mismo, el tratamiento que contenía NaCl 100 mM a las 72 horas presentó una concentración de clorofila *b* estadísticamente menor al resto de tratamientos, igualmente no detectable por el método espectrofotométrico.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una modalidad de cromatografía que trabaja a altas presiones, lo cual le confiere alta precisión en comparación con otras modalidades de cromatografía. A más de esto, la cromatografía en fase reversa, técnica empleada en el presente trabajo, se basa en la diferencia de hidrofobicidad de las moléculas para su separación, por ende se pueden distinguir moléculas similares con pequeñas diferencias en sus arreglos atómicos (Lough y Wainer, 1995, pp. 215–272). Debido a esta precisión de separación e identificación de moléculas, el uso de esta técnica analítica para la determinación de clorofilas resulta útil en estudios de las rutas de degradación de estos pigmentos, de daños enzimáticos en la ruta de biosíntesis de clorofila o simplemente es un análisis más preciso de niveles de estos pigmentos en organismos fotosintéticos (Harpaz-Saad et al., 2007, pp. 1007–1022; Hu, Tanaka, y Tanaka, 2013b, pp. 9–19; Strelkov, Lamari, y Ballance, 1998, pp. 408–413).

Al analizar la diferencia entre los valores de clorofila *b* obtenidos mediante HPLC y el método espectrofotométrico en el presente trabajo, es indudable que existen moléculas similares a este pigmento que dificultan su análisis sin un proceso de separación anterior a su detección. Es probable que esta diferencia se deba a un proceso de degradación no enzimática de la clorofila *b* debido a daños ocasionados por la presencia de radicales libres. En la membrana del tilacoide se generan constantemente ROS que pueden llegar a dañar moléculas importantes dentro del cloroplasto. Sin embargo, la tasa de generación de estas ROS se ve estabilizada por algunos mecanismos propios de las plantas (actividad de las enzimas superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa o compuestos antioxidantes β caroteno y tocoferol). No obstante, cuando las plantas se encuentran bajo condiciones de estrés salino se generan radicales libres en exceso (entre ellos ROS) que no pueden ser controlados eficientemente. Mediante este daño oxidativo se podría explicar la reducción marcada de la concentración de clorofila *b* en el tratamiento que contenía NaCl 100 mM a las 72 horas; sin embargo, el tratamiento que contenía sal y bioestimulante no presentó la misma condición, indicando un posible sistema de

protección a este daño oxidativo (Harpaz-Saad et al., 2007, pp. 1007–10022; Sato et al., 2015, pp. 249–259; Sudhir y Murthy, 2004, pp. 481–486).

Adicionalmente, se pudo evidenciar que en el tratamiento que únicamente contenía los oligosacáridos de xiloglucanos, existió un efecto de aminorar la degradación de clorofila *b*, por ende la concentración medida por HPLC fue estadísticamente mayor que el resto de tratamientos, resultado similar al obtenido por espectrofotometría. Estos resultados indican un posible mecanismo de protección de los XGO a los pigmentos fotosintéticos a ser degradados, tanto en condiciones con o sin estrés salino. Tomando en cuenta que en el tilacoide se producen constantemente ROS y que el estrés salino contribuye a una mayor tasa de acumulación de estos compuestos, es altamente probable que la presencia de los XGO contribuya a la síntesis de compuestos antioxidantes, tales como β caroteno y tocoferol o a la sobreexpresión de genes, como la *superóxido dismutasa*, *ascorbato peroxidasa*, entre otros involucrados en el proceso de estabilizar radicales libres en las células. Estos efectos tienen concordancia con los resultados obtenidos en otras investigaciones, en donde se ha evidenciado que la aplicación de los XGO en plantas de *Nicotiana tabacum* tuvo un efecto de inhibición e inducción de ciertas enzimas peroxidadas y que en plantas de *A. thaliana* estimuló la acumulación de antocianina, un compuesto antioxidante (Acosta, González, Valdés, González, y Sánchez, 2007, pp. 47–54; González-Pérez et al., 2012, pp. 211–221).

Hasta la fecha no se encuentran publicadas investigaciones donde se analice el efecto de la aplicación de los XGO sobre los niveles de clorofila *a* y *b*, ni de su tasa de síntesis o degradación. Existen estudios donde se demuestra que la aplicación de ciertos oligosacáridos (de alginatos y quitosano) mejora la tasa fotosintética de las plantas y conducen a una mayor concentración de pigmentos fotosintéticos. Sin embargo, el mecanismo de cada bioestimulante es distinto para cada formulación y por esta razón, se debe validar el efecto individual de cada bioestimulante sobre las plantas para su aplicación en la agricultura

(González, Castro, Vera, y Moenne, 2012, pp. 443–448; Katapodis et al., 2002, pp. 1413–1416).

En el presente trabajo se demostró que la presencia de los XGO a la concentración de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ en el medio de cultivo reguló negativamente la expresión del gen *CV* y mantuvo elevados los valores de concentraciones de clorofila *a* y *b*. De igual forma, se evidenció que es probable que exista una relación directa entre la regulación negativa del gen *CV* con respecto a la concentración de clorofilas en las plantas, indicando que el mecanismo de vesiculación de cloroplastos es una de las principales vías de daños en los sistemas fotosintéticos de las plantas bajo condiciones de estrés salino. Los resultados de este trabajo sugieren que la aplicación de los XGO confieren cierto nivel de tolerancia en plantas de *A. thaliana* a condiciones de estrés salino, mediante mecanismos de protección del sistema fotosintético de las mismas.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

La presencia de oligosacáridos de xiloglucanos a la concentración $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ provocó la regulación negativa del gen *CV* de plantas de *Arabidopsis thaliana*, lo que sugiere que evita la degradación de cloroplastos por la ruta de vesiculación en presencia o no de estrés salino.

El tratamiento con oligosacáridos de xiloglucanos a la concentración $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ mantuvo los niveles de clorofila *a* y *b* elevados con y sin estrés salino, frente a sus controles respectivos en plantas de *Arabidopsis thaliana*, lo que apunta a una mayor tasa fotosintética.

Se estandarizó un método cromatográfico que permitió la identificación de clorofila *b* con un tiempo de retención de 29,8 minutos.

Se determinó un método cromatográfico que permitió la separación e identificación de clorofila *b* en un extracto de pigmentos fotosintéticos de hojas de *Arabidopsis thaliana*.

El método de HPLC estandarizado permitió determinar la concentración de clorofila *b* en los diferentes tratamientos y diferenciarlo de compuestos análogos de este pigmento fotosintético, no detectables por espectrofotometría.

La tasa de degradación de clorofila *b* en condiciones salinas se vio reducida con la presencia de oligosacáridos de xiloglucanos a la concentración de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ en plantas de *Arabidopsis thaliana*, lo que sugiere que le confieren a las plantas mayor tolerancia a este tipo de estrés.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto apuntan a que la presencia de oligosacáridos de xiloglucanos a la concentración de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ confieren tolerancia a las plantas de *Arabidopsis thaliana* frente a estrés salino, al reducir

la tasa de vesiculación de cloroplastos e inducir un aumento en la concentración de clorofilas *a* y *b* en sus tejidos foliares.

6.2. Recomendaciones

Realizar un análisis de niveles de expresión de genes involucrados en la síntesis y degradación de pigmentos fotosintéticos, tales como las clorofilas *a* y *b* cuando han sido tratadas con XGO bajo condiciones salinas.

Realizar un estudio comparativo sobre distintos mecanismos de degradación de cloroplastos (entre ellos vesiculación de cloroplastos, autofagia de cloroplastos y vacuolas asociadas a la senescencia) en plantas tras su tratamiento con XGO en condiciones de estrés salino.

Medir la capacidad antioxidante y producción de compuestos fitoquímicos antioxidantes específicos en las plantas al añadir XGO, que puedan proteger la maquinaria fotosintética, cómo β caroteno y tocoferol.

REFERENCIAS

- Abd Elrahman, S. H., Mostafa, M. A. M., Taha, T. A., Elsharawy, M. A. O., y Eid, M. A. (2012). Effect of different amendments on soil chemical characteristics, grain yield and elemental content of wheat plants grown on salt-affected soil irrigated with low quality water. *Annals of Agricultural Sciences*, 57(2), 175-182. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2012.09.001>
- Abdul Qados, A. M. S. (2011). Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10(1). Recuperado el 5 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2010.06.002>
- Acosta, A., González, L., Valdés, M., González, C., y Sánchez, L. (2007). EFECTO DE DOS OLIGOSACARINAS SOBRE LA EXPRESIÓN ISOENZIMÁTICA AL SER APLICADAS SOBRE DOS VARIEDADES DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.). Recuperado el 8 de diciembre de 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215844008>
- Adani, F., Genevini, P., Zaccheo, P., y Zocchi, G. (1998). The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 21(3). Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1080/01904169809365424>
- Aducci, P. (2012). *Signal Transduction in Plants*. Birkhäuser.
- Albert, N. W., Lewis, D. H., Zhang, H., Irving, L. J., Jameson, P. E., y Davies, K. M. (2009). Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*. *Journal of Experimental Botany*, 60(7). Recuperado el 11 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1093/jxb/erp097>
- Arnon, D. I. (1949). COPPER ENZYMES IN ISOLATED CHLOROPLASTS. POLYPHENOLOXIDASE IN *BETA VULGARIS*. *Plant Physiology*, 24(1). Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>

- Axelos, M., Curie, C., Mazzolini, L., Bardet, C., y Lescure, B. (1992). A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 30(1).
- Aydin, A., Canan, K., y Menit, T. (2012). Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. *Journal of Agricultural Research*, 7(7). Recuperado el 25 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.5897/AJAR10.274>
- Ayers, A. R., Valent, B., Ebel, J., y Albersheim, P. (1976). Host-Pathogen Interactions. *Plant Physiology*, 57(5).
- Biswal, B., Krupinska, K., y Biswal, U. C. (2013). *Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence*. Springer Science y Business Media.
- Blumwald, E., y Wang, S. (2015). Improving plant tolerance to stress through the control of chloroplast stability. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de <http://www.google.com/patents/WO2015066180A1>
- Bocanegra, M. P., Lobartini, J. C., y Orioli, G. A. (2006). Plant Uptake of Iron Chelated by Humic Acids of Different Molecular Weights. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 37(1–2). Recuperado el 1 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1080/00103620500408779>
- Boonsong, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., y Matta, F. B. (2011). Detection of Pigments and Natural Colorants from Thai Herbal Plants for Possible Use as Coloring Dyes. *HortScience*, 46(2).
- Brown, G. D., y Gordon, S. (2003). Fungal β -Glucans and Mammalian Immunity. *Immunity*, 19(3). Recuperado el 2 de diciembre de 2016 de [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00233-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00233-4)
- Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, A., Vernieri, P., y Ferrante, A. (2015). Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture y Horticulture*, 31(1). Recuperado el 5 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1080/01448765.2014.964649>

- Calvo, P., Nelson, L., y Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383(1–2). Recuperado el 7 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Cao, J., Lv, X. Y., Chen, L., Xing, J. J., y Lan, H. Y. (2015). Effects of salinity on the growth, physiology and relevant gene expression of an annual halophyte grown from heteromorphic seeds. *AoB Plants*. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv112>
- Chen, S., Zhang, Z., Wang, Z., Guo, X., Liu, M., Hamoud, Y. A., ... Qiu, R. (2016). Effects of uneven vertical distribution of soil salinity under a buried straw layer on the growth, fruit yield, and fruit quality of tomato plants. *Scientia Horticulturae*, 203. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.024>
- Cho, Y. S., Hong, M. W., Kim, S.-Y., Lee, S.-J., Lee, J. H., Kim, Y. Y., y Cho, Y.-S. (2014). Fabrication of dual-pore scaffolds using SLUP (salt leaching using powder) and WNM (wire-network molding) techniques. *Materials Science and Engineering: C*, 45. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.10.009>
- Christ, B., y Hörtensteiner, S. (2014). Mechanism and Significance of Chlorophyll Breakdown. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(1). Recuperado el 7 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9392-y>
- Colla, G., Cardarelli, M., Svecová, E., Roupael, Y., Reynaud, H., Canaguier, R., y Planques, B. (2012). Effectiveness of a plant-derived protein hydrolysate to improve crop performances under different growing conditions. *Acta Horticulturae*. Recuperado el 7 de diciembre de 2016 de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201400150171>
- De Lucia, B., y Vecchietti, L. (2012). Type of Bio-Stimulant and Application Method Effects on Stem Quality and Root System Growth in L.A. Lily. *European Journal of Horticultural Science*, 77(1).
- Descamps, V., Colin, S., Lahaye, M., Jam, M., Richard, C., Potin, P., ... Kloareg,

- B. (2006). Isolation and Culture of a Marine Bacterium Degrading the Sulfated Fucans from Marine Brown Algae. *Marine Biotechnology (New York, N.y.)*, 8. Recuperado el 1 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1007/s10126-005-5107-0>
- Du Fall, L. A., y Solomon, P. S. (2011). Role of Cereal Secondary Metabolites Involved in Mediating the Outcome of Plant-Pathogen Interactions. *Metabolites*, 1(1). Recuperado el 5 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.3390/metabo1010064>
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196. Recuperado el 11 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- EBIC. (2013). European Biostimulants Industry Council | Promoting the biostimulant industry and the role of plant biostimulants in making agriculture more sustainable. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de <http://www.biostimulants.eu/>
- Eichholz, I., Huyskens-Keil, S., Kroh, L. W., y Rohn, S. (2012). Phenolic compounds, pectin and antioxidant activity in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) influenced by boron and mulch cover. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 84(1), 26.
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., y Daayf, F. (2010). Chitosan in Plant Protection. *Marine Drugs*, 8(4). Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.3390/md8040968>
- European Biostimulants Industry Council. (2013). Promoting the biostimulant industry and the role of plant biostimulants in making agriculture more sustainable. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <http://www.biostimulants.eu/>
- European Biostimulants Industry Council. (2016). Future of biostimulants industry brighter thanks to proposed regulation on fertilizing products. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <http://www.biostimulants.eu/2016/03/future->

of-biostimulants-industry-brighter-thanks-to-fertilizer-regulation-proposal/

- Fan, H.-F., Du, C.-X., y Guo, S.-R. (2012). Effect of Nitric Oxide on Proline Metabolism in Cucumber Seedlings under Salinity Stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 137(3), 127–133.
- FAO, y ITPS. (2015). *Status of the World's Soil Resources (SWSR) - Main Report*. Italia. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <http://www.fao.org/3/a-i5199e.pdf>
- FAO, y ITPS. (2015). Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Main Report. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <http://www.fao.org/documents/card/en/c/c6814873-efc3-41db-b7d3-2081a10ede50/>
- Filippou, P., Antoniou, C., Obata, T., Van Der Kelen, K., Harokopos, V., Kanetis, L., ... Fotopoulos, V. (2016). Kresoxim-methyl primes *Medicago truncatula* plants against abiotic stress factors via altered reactive oxygen and nitrogen species signalling leading to downstream transcriptional and metabolic readjustment. *Journal of Experimental Botany*, 67(5). Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1093/jxb/erv516>
- Fingerman, I. M., Zhang, X., Ratzat, W., Husain, N., Cohen, R. F., y Schuler, G. D. (2013). NCBI Epigenomics: What's new for 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue). Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1093/nar/gks1171>
- Fry, S. C. (1989). The Structure and Functions of Xyloglucan. *Journal of Experimental Botany*, 40(1). Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1093/jxb/40.1.1>
- Fry, S. C., Aldington, S., Hetherington, P. R., y Aitken, J. (1993). Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiology*, 103(1).

- Fry, S. C., York, W. S., Albersheim, P., Darvill, A., Hayashi, T., Joseleau, J.-P., ... White, A. R. (1993). An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiologia Plantarum*, 89(1). Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01778.x>
- Giller, K. E., Andersson, J. A., Corbeels, M., Kirkegaard, J., Mortensen, D., Erenstein, O., y Vanlauwe, B. (2015). Beyond conservation agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 6. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00870>
- Glick, D., Barth, S., y Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3–12. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1002/path.2697>
- González-Pérez, L., Perrotta, L., Acosta, A., Orellana, E., Spadafora, N., Bruno, L., ... Rogers, H. J. (2014). In tobacco BY-2 cells xyloglucan oligosaccharides alter the expression of genes involved in cell wall metabolism, signalling, stress responses, cell division and transcriptional control. *Molecular Biology Reports*, 41(10), 6803–6816. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3566-y>
- González-Pérez, L., Vázquez-Glaría, A., Perrotta, L., Acosta, A., Scriven, S. A., Herbert, R., ... Rogers, H. J. (2012). Oligosaccharins and Pectimorf® stimulate root elongation and shorten the cell cycle in higher plants. *Plant Growth Regulation*, 68(2). Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9709-z>
- González, A., Castro, J., Vera, J., y Moenne, A. (2012). Seaweed Oligosaccharides Stimulate Plant Growth by Enhancing Carbon and Nitrogen Assimilation, Basal Metabolism, and Cell Division. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(2). Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9309-1>
- González, A., Moenne, F., Gómez, M., Sáez, C. A., Contreras, R. A., y Moenne,

- A. (2014). Oligo-carrageenan kappa increases NADPH, ascorbate and glutathione syntheses and TRR/TRX activities enhancing photosynthesis, basal metabolism, and growth in Eucalyptus trees. *Frontiers in Plant Science*, 5. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00512>
- Gorji, T., Tanik, A., y Sertel, E. (2015). Soil Salinity Prediction, Monitoring and Mapping Using Modern Technologies. *Procedia Earth and Planetary Science*, 15, 507-512. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.proeps.2015.08.062>
- Govindjee, Beatty, J. T., y Gest, H. (2003). Celebrating the millennium – historical highlights of photosynthesis research, Part 2. *Photosynthesis Research*, 76(1–3), 1–11. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1023/A:1024937502216>
- Guan, Q., Yue, X., Zeng, H., y Zhu, J. (2014). The Protein Phosphatase RCF2 and Its Interacting Partner NAC019 Are Critical for Heat Stress–Responsive Gene Regulation and Thermotolerance in Arabidopsis[W]. *The Plant Cell*, 26(1), 438–453. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1105/tpc.113.118927>
- Guo, J., Shi, G., Guo, X., Zhang, L., Xu, W., Wang, Y., ... Hua, J. (2015). Transcriptome analysis reveals that distinct metabolic pathways operate in salt-tolerant and salt-sensitive upland cotton varieties subjected to salinity stress. *Plant Science*, 238, 33–45. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.013>
- Hachicha, M., Kahlaoui, B., Khamassi, N., Misle, E., y Jouzdan, O. (s. f.). Effect of electromagnetic treatment of saline water on soil and crops. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.03.003>
- Harpaz-Saad, S., Azoulay, T., Arazi, T., Ben-Yaakov, E., Mett, A., Shibolet, Y. M., ... Eyal, Y. (2007). Chlorophyllase Is a Rate-Limiting Enzyme in

- Chlorophyll Catabolism and Is Posttranslationally Regulated. *The Plant Cell*, 19(3), 1007–1022. Recuperado el 9 de diciembre de 2016 de <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050633>
- Hayashi, T., y Kaida, R. (2011). Functions of Xyloglucan in Plant Cells. *Molecular Plant*, 4(1), 17-24. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1093/mp/ssq063>
- Hichri, I., Muhovski, Y., Žižková, E., Dobrev, P. I., Franco-Zorrilla, J. M., Solano, R., ... Lutts, S. (2014). The Solanum lycopersicum Zinc Finger2 Cysteine-2/Histidine-2 Repressor-Like Transcription Factor Regulates Development and Tolerance to Salinity in Tomato and Arabidopsis1[W]. *Plant Physiology*, 164(4), 1967-1990. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1104/pp.113.225920>
- Hisabori, T., Sunamura, E.-I., Kim, Y., y Konno, H. (2013). The Chloroplast ATP Synthase Features the Characteristic Redox Regulation Machinery. *Antioxidants y Redox Signaling*, 19(15), 1846–1854. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5044>
- Hu, X., Tanaka, A., y Tanaka, R. (2013). Simple extraction methods that prevent the artifactual conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples. *Plant Methods*, 9, 19. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-19>
- Integrated DNA Technologies. (2016). Oligo Analyzer 3.1. Recuperado 23 de noviembre de 2016, a partir de Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>
- Ishida, H., Izumi, M., Wada, S., y Makino, A. (2014). Roles of autophagy in chloroplast recycling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(4), 512–521. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.11.009>
- Jiang, X., Qi, W., Xu, X., Li, Y., Liao, Y., y Wang, B. (2014). Higher soil salinity causes more physiological stress in female of Populus cathayana cuttings.

Acta Ecologica Sinica, 34(4), 225–231. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2014.05.002>

Kahlaoui, B., Hachicha, M., Misle, E., Fidalgo, F., y Teixeira, J. (s. f.). Physiological and biochemical responses to the exogenous application of proline of tomato plants irrigated with saline water. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.12.002>

Katapodis, P., Kavarnou, A., Kintzios, S., Pistola, E., Kekos, D., Macris, B. J., y Christakopoulos, P. (2002). Production of acidic xylo-oligosaccharides by a family 10 endoxylanase from *Thermoascus aurantiacus* and use as plant growth regulators. *Biotechnology Letters*, 24(17), 1413–1416. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1023/A:1019898414801>

Khan, M. I. R., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N. A., y Khan, N. A. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00462>

Khan, N. A. (2003). NaCl-Inhibited Chlorophyll Synthesis and Associated Changes in Ethylene Evolution and Antioxidative Enzyme Activities in Wheat. *Biologia Plantarum*, 47(3), 437–440. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000023890.01126.43>

Khan, W. M., Prithviraj, B., y Smith, D. L. (2002). Effect of Foliar Application of Chitin and Chitosan Oligosaccharides on Photosynthesis of Maize and Soybean. *Photosynthetica*, 40(4), 621–624. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1023/A:1024320606812>

Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J.-M., Yvin, J.-C., Kopp, M., Kloareg, B., y Fritig, B. (2000). Linear β -1,3 Glucans Are Elicitors of Defense Responses in Tobacco. *Plant Physiology*, 124(3), 1027–1038.

- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman.
- Li, X., Zhai, C., y Li, X. (2015). Expression of nhaA gene confers salt-sensitivity in transgenic rice cultures and plants. *New Negatives in Plant Science*, 1–2, 16–22. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.neps.2015.07.001>
- Liebman, y Davis. (2000). Integration of soil, crop and weed management in low-external-input farming systems. *Weed Research*, 40(1), 27–47. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1046/j.1365-3180.2000.00164.x>
- Lienart, Y. (2008, enero 2). Use of xyloglucan polymers and oligomers, and derivative compounds, as phytosanitary products and biofertilizers. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <http://www.google.com.ec/patents/EP1359802B1>
- Lin, Q., Ishikawa, T., Akoh, R., Yang, F., y Zhang, S. (2016). Soil salinity reduction by river water irrigation in a reed field: A case study in Shuangtai Estuary Wetland, Northeast China. *Ecological Engineering*, 89, 32-39. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.003>
- Lough, W. J., y Wainer, I. W. (1995). *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice*. CRC Press.
- Malerba, M., y Cerana, R. (2016). Chitosan Effects on Plant Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7). Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.3390/ijms17070996>
- Malusá, E., y Vassilev, N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6599–6607. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>

- Marcus, S. E., Verherbruggen, Y., Hervé, C., Ordaz-Ortiz, J. J., Farkas, V., Pedersen, H. L., ... Knox, J. P. (2008). Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biology*, 8, 60. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-60>
- Marschall, M., y Proctor, M. C. F. (2004). Are Bryophytes Shade Plants? Photosynthetic Light Responses and Proportions of Chlorophyll a, Chlorophyll b and Total Carotenoids. *Annals of Botany*, 94(4), 593-603. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1093/aob/mch178>
- Martínez, D. E., Costa, M. L., Gomez, F. M., Otegui, M. S., y Guiamet, J. J. (2008). "Senescence-associated vacuoles" are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves. *The Plant Journal*, 56(2), 196–206. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03585.x>
- Menard, R. (2004). -1,3 Glucan Sulfate, but Not -1,3 Glucan, Induces the Salicylic Acid Signaling Pathway in Tobacco and Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, 16(11), 3020-3032. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024968>
- Mordor Intelligence. (2016). Global Plant BioStimulant Market Share. Recuperado 30 de septiembre de 2016, a partir de Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <http://live.amcharts.com/RmMTk/>
- Moschen, S., Bengoa Luoni, S., Paniego, N. B., Hopp, H. E., Dosio, G. A. A., Fernandez, P., y Heinz, R. A. (2014). Identification of Candidate Genes Associated with Leaf Senescence in Cultivated Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *PLoS ONE*, 9(8). Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104379>
- Muchate, N. S., Nikalje, G. C., Rajurkar, N. S., Suprasanna, P., y Nikam, T. D. (2016). Physiological responses of the halophyte *Sesuvium*

- portulacastrum to salt stress and their relevance for saline soil bio-reclamation. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 224, 96–105. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.07.009>
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell y Environment*, 25(2), 239–250. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nardi, S., Carletti, P., Pizzeghello, D., y Muscolo, A. (2009). Biological Activities of Humic Substances. En N. S. H. visitingessor scientist F. recipient P. C. C. A. Editor, B. X. P. D. essor technical editor editorial board member S. A. Fullessor, y P. M. H. P. D. Emeritus M.Sc essor (Eds.), *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems* (pp. 305–339). John Wiley y Sons, Inc. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470494950.ch8/summary>
- Narsai, R., Castleden, I., y Whelan, J. (2010). Common and distinct organ and stress responsive transcriptomic patterns in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 10, 262. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-262>
- Nia, S. H., Zarea, M. J., Rejali, F., y Varma, A. (2012). Yield and yield components of wheat as affected by salinity and inoculation with *Azospirillum* strains

- from saline or non-saline soil. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11(2), 113–121. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2012.02.001>
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S. I., y Murata, N. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(7), 742–749. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.05.013>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Pingali, P. L. (2012). Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12302–12308. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1073/pnas.0912953109>
- Pitman, M. G., y Läuchli, A. (2002). Global Impact of Salinity and Agricultural Ecosystems. En A. Läuchli y U. Lüttge (Eds.), *Salinity: Environment - Plants - Molecules* (pp. 3-20). Springer Netherlands. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-48155-3_1
- Poapst, P. A., y Schnitzer, M. (1971). Fulvic acid and adventitious root formation. *Soil Biology and Biochemistry*, 3(3), 215–219. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(71\)90017-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(71)90017-4)
- Pocock, T., Król, M., y Huner, N. P. A. (2004). The determination and quantification of photosynthetic pigments by reverse phase high-performance liquid chromatography, thin-layer chromatography, and spectrophotometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 274, 137-148. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1385/1-59259-799-8:137>
- Poincelot, R. (1993). The Use of a Commercial Organic Biostimulant for Bedding

- Plant Production. *Journal of Sustainable Agriculture*, 3(2), 99-110. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de https://doi.org/10.1300/J064v03n02_09
- Porra, R. J., Thompson, W. A., y Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 975(3), 384-394. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0)
- Qados, A., y Amira, M. (2011). Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10(1), 7-15. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2010.06.002>
- Radi, A. A., Farghaly, F. A., y Hamada, A. M. (2013). Physiological and biochemical responses of salt-tolerant and salt-sensitive wheat and bean cultivars to salinity. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 3(1), B72-B88.
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Apel, K., y Lebedev, N. (1996). Evolution of Chlorophyll Biosynthesis—The Challenge to Survive Photooxidation. *Cell*, 86(5), 703–705. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80144-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80144-0)
- Ren, Y., Picout, D. R., Ellis, P. R., y Ross-Murphy, S. B. (2004). Solution properties of the xyloglucan polymer from *Azelia africana*. *Biomacromolecules*, 5(6), 2384–2391. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1021/bm049678n>
- Richardson, A., Aikens, M., Berlyn, G., y Marshall, P. (2003). Drought stress and paper birch (*Betula Papyrifera*) seedlings: Effects of an organic biostimulant on plant health and stress tolerance, and detection of stress effects with instrument-based, noninvasive methods. *Journal of*

Arboriculture, 30(1). Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de [https://www.researchgate.net/publication/238757710_Drought_stress_and_paper_birch_Betula_Papyrifera_seedlings_Effects_of_an_organic_biostimulant_on_plant_health_and_stress_tolerance_and_detection_of_stress_effects_with_instrument-based_noninvasive_met](https://www.researchgate.net/publication/238757710_Drought_stress_and_paper_birch_Betula_Papyrifera_seedlings_Effects_of_an_organic_biostimulant_on_plant_health_and_stress_tolerance_and_detection_of_stress_effects_with_instrument-based_noninvasive_methods)

Ruban, A. V., Berera, R., Ilioaia, C., van Stokkum, I. H. M., Kennis, J. T. M., Pascal, A. A., ... van Grondelle, R. (2007). Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature*, 450(7169), 575–578. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1038/nature06262>

Russo, R., y Berlyn, G. (1992). Vitamin-Humic-Algal Root Biostimulant Increases Yield of Green Bean. *HortScience*, 27(7), 847.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Sato, R., Ito, H., y Tanaka, A. (2015). Chlorophyll b degradation by chlorophyll b reductase under high-light conditions. *Photosynthesis Research*, 126(2–3), 249–259. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0145-6>

Schippers, J. H. M., Schmidt, R., Wagstaff, C., y Jing, H.-C. (2015). Living to Die and Dying to Live: The Survival Strategy behind Leaf Senescence. *Plant Physiology*, 169(2), 914–930. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1104/pp.15.00498>

Schoefs, B. (2002). Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends in Food Science y Technology*, 13(11), 361-371. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00182-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00182-6)

Schürmann, P. (2009). LIGHT and CHLOROPLAST ENZYME ACTIVITY. Photo Biology. Recuperado a partir de <http://photobiology.info/Schurmann.html>

- Shi, H., Jiang, C., Ye, T., Tan, D., Reiter, R. J., Zhang, H., ... Chan, Z. (2015). Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L). Pers.] by exogenous melatonin. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 681-694. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1093/jxb/eru373>
- Sinha, P., Singh, V. K., Suryanarayana, V., Krishnamurthy, L., Saxena, R. K., y Varshney, R. K. (2015). Evaluation and Validation of Housekeeping Genes as Reference for Gene Expression Studies in Pigeonpea (*Cajanus cajan*) Under Drought Stress Conditions. *PLoS ONE*, 10(4). Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122847>
- Stadnik, M., y Freitas, M. (2014). Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. *Tropical Plant Pathology*, 39(2). Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000200001>
- Stavridou, E., Hastings, A., Webster, R. J., y Robson, P. R. H. (2016). The impact of soil salinity on the yield, composition and physiology of the bioenergy grass *Miscanthus x giganteus*. *GCB Bioenergy*, n/a-n/a. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1111/gcbb.12351>
- Stochel, G., Stasicka, Z., Brindell, M., Macyk, W., y Szacilowski, K. (2009). *Bioinorganic Photochemistry*. John Wiley y Sons.
- Strelkov, S. E., Lamari, L., y Ballance, G. M. (1998). Induced chlorophyll degradation by a chlorosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 20(4), 428-435. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1080/07060669809500417>
- Stryer, L. (1995). *Biochemistry*. W.H. Freeman.
- Sudhir, P., y Murthy, S. D. S. (2004). Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, 42(2), 481-486. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1007/S11099-005-0001-6>

- Surzycki, S. (2012). *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer Science y Business Media.
- Tanaka, A., y Makino, A. (2009). Photosynthetic Research in Plant Science. *Plant and Cell Physiology*, 50(4), 681–683. Recuperado el 6 de octubre de 2016 de <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp040>
- Thrane, J.-E., Kyle, M., Striebel, M., Haande, S., Grung, M., Rohrlack, T., y Andersen, T. (2015). Spectrophotometric Analysis of Pigments: A Critical Assessment of a High-Throughput Method for Analysis of Algal Pigment Mixtures by Spectral Deconvolution. *PLoS ONE*, 10(9), 2-24. Recuperado el 6 de octubre de 2016 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137645>
- Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., ... Adrian, M. (2014). Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in Plant Science*, 5. Recuperado el 6 de octubre de 2016 de <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00592>
- UNESCO, y ONU. (2005). *Creación de comités de bioética*. Francia. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de <http://unesdoc.unesco.org/images/0013/001393/139309s.pdf>
- Valifard, M., Mohsenzadeh, S., Kholdebarin, B., y Rowshan, V. (2014). Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii*. *South African Journal of Botany*, 93, 92–97. Recuperado el 6 de octubre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.04.002>
- Van Sandt, V. S. T., Suslov, D., Verbelen, J.-P., y Vissenberg, K. (2007). Xyloglucan Endotransglucosylase Activity Loosens a Plant Cell Wall. *Annals of Botany*, 100(7), 1467–1473. Recuperado el 6 de octubre de 2016 de <https://doi.org/10.1093/aob/mcm248>
- Von Wettstein, D., Gough, S., y Kannangara, C. (1995). Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7), 1039-1057.

- Wada, S., y Ishida, H. (2009). Chloroplasts autophagy during senescence of individually darkened leaves. *Plant Signaling y Behavior*, 4(6), 565–567.
- Wang, S., y Blumwald, E. (2014). Stress-Induced Chloroplast Degradation in Arabidopsis Is Regulated via a Process Independent of Autophagy and Senescence-Associated Vacuoles. *The Plant Cell Online*, tpc.114.133116. Recuperado el 6 de octubre de 2016 de <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133116>
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Whitney, S. M., Houtz, R. L., y Alonso, H. (2011). Advancing Our Understanding and Capacity to Engineer Nature's CO₂-Sequestering Enzyme, Rubisco1[W]. *Plant Physiology*, 155(1), 27–35. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1104/pp.110.164814>
- Wilson, H. T., Xu, K., y Taylor, A. G. (2015). Transcriptome Analysis of Gelatin Seed Treatment as a Biostimulant of Cucumber Plant Growth. *The Scientific World Journal*, 2015. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1155/2015/391234>
- Wohlfahrt, G., y Gu, L. (2015). The many meanings of gross photosynthesis and their implication for photosynthesis research from leaf to globe. *Plant, Cell y Environment*, 38(12), 2500–2507. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1111/pce.12569>
- Wood, L. (2015, junio 5). Latin America Biostimulants Market 2015. Recuperado 30 de septiembre de 2016 de <http://www.businesswire.com/news/home/20150605005795/en/Research-Markets-Latin-America-Biostimulants-Market-2015>
- Wu, A., Song, Y., van Oosterom, E. J., y Hammer, G. L. (2016). Connecting

- Biochemical Photosynthesis Models with Crop Models to Support Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*, 7. Recuperado el 2 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01518>
- WWF. (2016). Soil Erosion and Degradation | Threats | WWF. Recuperado 2 de noviembre de 2016, de <http://www.worldwildlife.org/threats/soil-erosion-and-degradation>
- Yang, J., Worley, E., y Udvardi, M. (2014). A NAP-AAO3 Regulatory Module Promotes Chlorophyll Degradation via ABA Biosynthesis in Arabidopsis Leaves[W][OPEN]. *The Plant Cell*, 26(12), 4862-4874. Recuperado el 11 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133769>
- Zargar, V., Asghari, M., y Dashti, A. (2015). A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 204–226. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>
- Zarzycki, P. K., Ślęczka, M. M., Zarzycka, M. B., Bartoszek, M. A., Włodarczyk, E., y Baran, M. J. (2011). Temperature-controlled micro-TLC: A versatile green chemistry and fast analytical tool for separation and preliminary screening of steroids fraction from biological and environmental samples. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(3–5), 418-427. Recuperado el 24 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.05.007>
- Zivcak, M., Brestic, M., Kalaji, H. M., y Govindjee. (2014). Photosynthetic responses of sun- and shade-grown barley leaves to high light: is the lower PSII connectivity in shade leaves associated with protection against excess of light? *Photosynthesis Research*, 119(3), 339-354. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de <https://doi.org/10.1007/s11120-014-9969-8>

