



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología

Área de Fisiología Vegetal

Efecto de fitofortificantes comerciales sobre el crecimiento del maíz

Commercial phytostrengtheners effect on the growth of corn

Efecto de fitofortificantes comerciais sobre o crecemento do millo

Manuel Sánchez Cao

Trabajo de fin de grado

Fecha de defensa 29 de Junio de 2015

Dirigido por Federico Pomar Barbeito y Cristina Silvar Pereiro

ÍNDICE

RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
Transpiración	3
Acuaporinas	4
Sequía.....	5
Especies reactivas de oxígeno (ROS), peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y sequía	5
Sílice (Si).....	6
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	8
Material vegetal.....	8
Aplicación de Manvert Silikon®.....	8
Seguimiento de los síntomas externos	8
Peso seco, peso fresco (PS y PF) y % de humedad	8
Medida de transpiración	9
Evaluación de los mecanismos de tolerancia a la sequía desencadenados por Manvert Silikon®	9
Cuantificación de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) mediante naranja de xilenol.....	9
Determinación de proteínas.....	10
Actividad peroxidasa	11
Medida de la expresión génica	11
Análisis estadístico	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
Evaluación de síntomas externos.....	13
Determinación del Peso fresco (PF), Peso seco (PS) y contenido hídrico	15
Determinación de los niveles de transpiración.....	17
Evaluación de los mecanismos de tolerancia a la sequía desencadenados por Manvert Silikon®.....	17
Cuantificación de la producción de Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	17
Actividad Peroxidasa (POD)	18
Determinación de Proteínas	19
Expresión génica.....	20
5. CONCLUSIONES	22
6. BIBLIOGRAFÍA	23

RESUMEN

El agua es el principal constituyente de los tejidos vegetales, por lo que su ausencia o escasa disponibilidad son un factor limitante muy importante a tener en cuenta. La sequía es uno de los factores abióticos más importante que afecta al desarrollo normal de la planta, así como a numerosos procesos como la transpiración y cambios metabólicos. Estas alteraciones pueden verse aliviadas mediante la aplicación de sílice (Si), un elemento muy abundante en el suelo. El objetivo de este trabajo fue la evaluación del producto Manvert Silikon® en el mecanismo de respuesta de la planta frente a la sequía.

El tratamiento de las plantas con Manvert Silikon® mejoró la resistencia de las plantas a la sequía, hecho que se puso de manifiesto atendiendo a síntomas externos y al contenido hídrico de las mismas. Asimismo el tratamiento promovió diferentes mecanismos de tolerancia de la planta ante la exposición a la sequía. Esta se puso de manifiesto por un incremento del peróxido de hidrógeno, de la actividad peroxidasa (POD), de proteínas y en los niveles de expresión del gen *ZmPIP2*.

ABSTRACT

Water is the main constituent of plant tissues, so its absence or limited availability are very important limiting factors. Drought is one of the most important abiotic stresses that affect the normal development of the plant, and many other processes such as transpiration and metabolic changes. These alterations can be mitigated by applying silica (Si), an abundant element in soil. The objective of this work was to evaluate the role of the product Manvert Silikon® in the mechanism of plant response to drought.

The treatment of corn plants with Manvert Silikon® improved the plant resistance to drought, a fact that was revealed attending to external symptoms and the water content. Treatment also triggered different mechanisms of plant tolerance when exposed to drought. This was expressed as an increase in hydrogen peroxide, peroxidase activity (POD), and the expression levels of the *ZmPIP2* gene.

1. INTRODUCCIÓN

El agua constituye la mayor parte de la masa de las células vegetales, llegando a abarcar desde un 80 a un 95% de la masa de los tejidos vegetales en crecimiento. Presenta unas características esenciales que le permiten actuar como un buen disolvente y ser transportado fácilmente a través del cuerpo de la planta, que derivan principalmente de su estructura polar. Esta polaridad deriva de la separación de cargas parciales junto a la disposición de moléculas, que provoca además que las moléculas de agua tiendan a atraerse entre sí. El agua está continuamente siendo absorbida y perdida por parte de la planta. El proceso por el cual la planta pierde agua se denomina transpiración, y es un proceso que juega un papel muy importante en el movimiento del agua en la planta (Taiz y Zeiger, 2010).

Transpiración

La transpiración es la pérdida de agua en forma de vapor por parte de la planta. Es considerado el proceso más importante, en relación a los procesos hídricos de la planta, ya que en ella está involucrada una gran cantidad de agua. La transpiración es un proceso que implica dos pasos, por un lado la evaporación del agua de las superficies celulares en los espacios intercelulares, y por otro su difusión hacia el exterior que tiene lugar principalmente a través de los estomas y la cutícula y en menor medida mediante las lenticelas que pueden presentar las plantas leñosas en la corteza del tallo. El proceso de transpiración puede verse alterado por varios factores, como las características de las hojas, los estomas o si la planta sufre algún estrés o enfermedad (Kramer y Boyer, 1995).

Los estomas son estructuras epidérmicas constituidas por células con una conformación especial. Las células que los forman pueden estar turgentes, estado en el que se separa una de la otra debido a la acción de la presión sobre la pared dejando así un orificio por el que difunde el vapor de agua hacia el exterior, o bien pueden estar flácidas, estado en el que se cierra el orificio (Fig.1). En este proceso de cierre estomático resulta muy importante la actividad del ácido abscísico (ABA), ya que interfiere en el bombeo de protones, necesario para que el agua fluya hacia el interior de las células estomáticas, abriéndose así los estomas (Rojas, 2003). Además, de

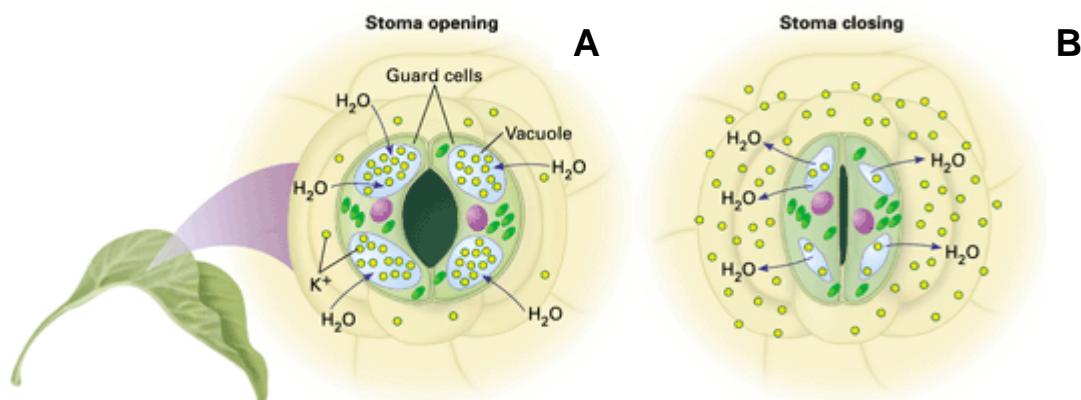


Figura 1. Mecanismo de apertura y cierre estomático. **A)** Entrada de agua e iones en las células oclusivas del estoma, provocando su apertura. **B)** Salida de agua, produciéndose el cierre estomático.

Imagen obtenida de <http://mtchs.org/BIO/biologyexploringlife/text/chapter21/concept21.2.html>

acuerdo con la teoría de la tensión-cohesión, este proceso de evaporación en las hojas provoca la generación de tensiones en las zonas próximas a donde ocurre. La elevada cohesión que existe entre las moléculas de agua permite la transmisión de estas tensiones a lo largo de la columna de agua xilemática, haciendo posible su transporte (Martínez-Vilalta y Piñol, 2003).

Acuaporinas

El agua que es incorporada de la tierra a los tejidos vasculares de la planta, debe atravesar una serie de capas concéntricas hasta llegar a los vasos. Una vez alcanza los haces, el agua se mueve por toda la planta por medio de diferentes vías caracterizadas por su baja resistencia al movimiento del agua. Se diferencian tres vías: 1) vía apoplástica, circulando alrededor de los protoplastos; 2) simplástica, de célula a célula mediante plasmodesmos; y 3) transcelular (Hachez *et al.*, 2006).

Las plantas tienen la capacidad de alterar su conductividad hidráulica, regulada por la presencia de diferentes factores externos. Estas modificaciones se deben a alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular debido a la expresión específica de acuaporinas (AQPs) (Otto y Kaldenhoff 2000). Estas acuaporinas son unas pequeñas proteínas de membrana (Kruse *et al.*, 2006), vistas como “fontaneros celulares” que regulan el movimiento de agua a través de la membrana (Fig. 2) (Hachez *et al.*, 2006), y que tienen un papel clave en el transporte de agua en las raíces y en las hojas bajo los gradientes hidroestáticos y osmóticos (Parent *et al.*, 2009).

Las acuaporinas están conformadas por seis dominios transmembrana que se mantienen unidos por las asas A, B, C, D, E y F. Son mayormente tetraméricas, y presentan segmentos intracelulares amino y carboxilo terminal. Las acuaporinas presentan una elevada permeabilidad al agua, siendo esta del orden de 3×10^9 moléculas por segundo (Rodríguez-Pérez, 2006).

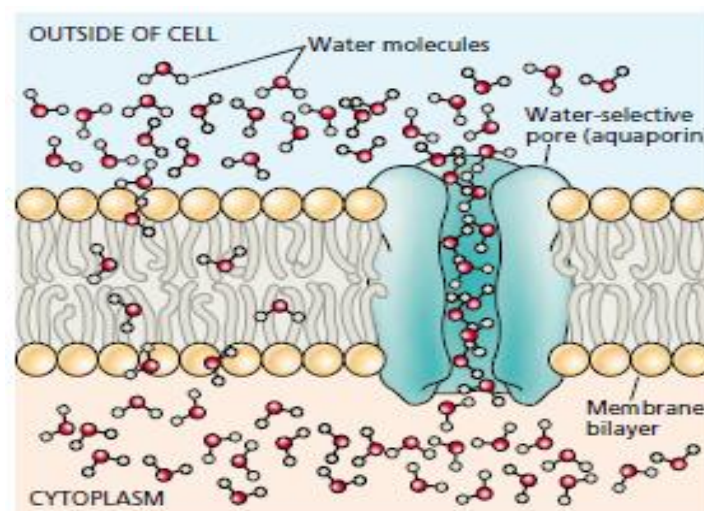


Figura 2. Mecanismo de transporte de agua al interior celular a través de la membrana. Se puede apreciar cómo puede ser realizado un transporte mediante proteínas de membrana, acuaporinas, o por difusión. Imagen obtenida del Taiz y Zeiger 2010.

En el maíz se ha identificado un grupo de genes, los *ZmPIP*, que codifican para acuaporinas y que se clasifican en dos grupos, *ZmPIP1* y *ZmPIP2*. Trabajos realizados previamente demuestran que los *ZmPIP2* presentan un mayor nivel de expresión que los *ZmPIP1* en condiciones de déficit hídrico (Fetter *et al.*, 2004; Parent *et al.* 2009)

Sequía

Se dice que una planta se enfrenta a un estrés cuando está expuesta a factores ambientales que ejercen una influencia negativa sobre el óptimo desarrollo de esta. Estos factores, que pueden ser bióticos (animales, insectos, otras plantas, etc.) o abióticos (sequía, calor, frío, etc.) van a ser las responsables del desencadenamiento de una gran variedad de respuestas en las plantas, pudiendo ir desde cambios en la expresión génica a cambios metabólicos (Ramachandra *et al.*, 2004).

Concretamente, la sequía es uno de los factores ambientales de estrés abiótico más importante y frecuente, afectando prácticamente a todos los aspectos del desarrollo y crecimiento de la planta (Zarabi *et al.*, 2010, Khayatnezhad y Gholamin, 2012). La sequía, o más bien la escasa disponibilidad de agua, supone el principal factor limitante en la producción de cultivos, siendo un problema constante para los países en desarrollo en lo referente a la producción agrícola, y para los países desarrollados un contratiempo ocasional que provoca pérdidas en las producciones agrícolas (Golbashy *et al.*, 2010).

Hay tres factores principales a tener en cuenta durante un episodio de baja disponibilidad de agua: 1) el momento del año en la que tiene lugar; 2) la intensidad de la sequía; 3) la duración del estrés. Las condiciones de escasa disponibilidad de agua conllevan un conjunto de respuestas que afectan tanto a la morfología de la planta, como a su fisiología y metabolismo. Así, podemos observar modificaciones, como cambios en la inclinación de las hojas, reducción de la síntesis de proteínas o el aumento de las especies reactivas de oxígeno entre otros. En conjunto, todos estos cambios van a provocar una reducción en su velocidad de crecimiento, en su tasa de transpiración y en su eficiencia fotosintética; teniendo como principal objetivo la producción de semillas para acabar su ciclo reproductivo lo antes posible (Covarrubias 2007).

Especies reactivas de oxígeno (ROS), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y sequía

A pesar del potencial que las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen para provocar daño oxidativo, recientemente se ha demostrado que juegan un papel muy importante en las plantas como moléculas de transducción de la señal implicada en la mediación de las respuestas ante la presencia de cualquier factor de estrés, así como en procesos de muerte celular programada y diferentes estímulos de desarrollo (Mittler *et al.*, 2004).

En ausencia de estrés hay una producción basal de especies reactivas de oxígeno (ROS) en diferentes orgánulos como cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. Esta producción se ve modificada en presencia de estrés, cuyos niveles se ven incrementados dramáticamente (Miller *et al.*, 2010). Este aumento de la producción de ROS tiene lugar como consecuencia del desacoplamiento en la cadena de transporte de electrones en los diferentes orgánulos citados anteriormente (Mittler *et al.*, 2006). Este desacoplamiento provoca que haya abundantes electrones en estado de alta

energía libres, que van a se van a transferir al oxígeno molecular para formar ROS, como pueden ser H_2O_2 , O_2^- y HO^- , moléculas altamente tóxicas con capacidad de causar daños a nivel de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Apel y Hirt 2004). Una vez aumentan los niveles de ROS, también aumenta la expresión de genes para la formación de sistemas antioxidantes.

Estos sistemas antioxidantes se pueden clasificar en enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, ascorbato peroxidasa, peroxidasa, glutatión reductasa y reductasa monodehydroascorbato) y no enzimáticos (flavanonas, antiocianinas, carotenoides y ácido ascórbico). Así, por ejemplo, sería la secuencia de acontecimientos sometidos a estrés por sequía: 1) aumento en los niveles de producción de ROS y de moléculas diana, 2) al mismo tiempo aumentan la expresión de genes para los sistemas antioxidantes, 3) aumento de antioxidantes, y 4) aumenta la tolerancia al estrés gracias al aumento de la capacidad de detoxificación (Ramachandra *et al.*, 2004).

Sílice (Si)

El silicio (Si) es el segundo elemento más abundante en el suelo. En él aparece principalmente como solución ácido silícico (H_4SiO_4) en concentraciones variables y que es fácilmente absorbido por la planta (Epstein, 1994). Después de la absorción el Si se acumula en la epidermis de diversos tejidos de la planta. El Si, por lo tanto, podría decirse que es un elemento esencial para las plantas, más aún al saberse que diversas anomalías en la planta son provocadas por deficiencia de Si (Ma, 2004), aunque esta cuestión tiene sido discutida por nutricionistas vegetales de todo el mundo (Korndörfer y Datnoff., 1995).

La deficiencia de agua conduce al cierre estomático con la consiguiente reducción de la tasa fotosintética. El Si puede aliviar el estrés provocado por la sequía al reducir la tasa de transpiración, ya que se acumula debajo de la cutícula y en los estomas, formando una doble capa de Si-cutícula (Deren, 2001). Este hecho de protección se le atribuye principalmente a la deposición de Si amorfa ($SiO_2 \cdot nH_2O$) en las paredes celulares (Teodoro *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

En este trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

- Evaluación del producto comercial Manvert Silikon® como agente de defensa frente al estrés abiótico de sequía en plantas de maíz

- Caracterización de los mecanismos de respuesta a la sequía desencadenados en la planta tras la aplicación de Manvert Silikon®

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Para este trabajo se empleó una única variedad comercial de semillas de maíz adquiridas en un establecimiento local. Las semillas se lavaron con abundante agua destilada para eliminar el antifúngico que tenían aplicado. Posteriormente se sembraron en bandejas empleando una mezcla de *Vermiculita Projar n°2* (SiO_2 39,5%, Al_2O_3 12%, Fe_2O_3 y FeO 7%, TiO_2 1%, MgO 23%, CaO 1,5%, K_2O 2%, agua libre o combinada 12%) y *tierra Compo Universal* (turba, perlita, Agrosil y elementos nutrientes pH (CaCl_2): 5,0 - 6,5. Contenido en sal (KCl) g/l: < 3,0 Contenido en abono: 200 - 450 mg/l Nitrógeno (N) 200 - 500 mg/l Fosfato (P_2O_5) 300 - 550 mg/l Óxido de potasio (K_2O)), en proporción 1:2. La germinación de las plántulas y su crecimiento tuvo lugar en una cámara de cultivo, con condiciones de temperatura de 25-18°C, un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad y una intensidad lumínica que variaba entre los 8700 y 9700 Lux (lx).

Aplicación de Manvert Silikon®

Manvert Silikon®, de la empresa Biovert S.A, es el producto comercial cuya actividad frente a la sequía se va a evaluar en este trabajo. Se trata de una solución líquida de silicio, cuya composición química es mayoritariamente óxido de silicio (SiO_2). Manvert Silikon favorece el desarrollo del sistema de autodefensa natural de planta frente a factores de estrés tanto bióticos como abióticos.

Las plantas se dividieron en diferentes grupos según su tratamiento. Por un lado las plantas control, sólo tratadas con agua, y por otro lado las plantas tratadas con Manvert Silikon®. Tras la aplicación del tratamiento, las plantas se mantenían en condiciones estrictas de sequía.

La aplicación del tratamiento tuvo lugar sobre las plántulas, preparando una solución líquida de 100 ml de agua con 400µl de Manvert Silikon® y pulverizándose sobre ellas. Del mismo modo se procedió con las control, que solo se pulverizaron con 100 ml de agua.

Para la realización de los distintos análisis llevados a cabo en este estudio, las muestras fueron tomadas a distintos intervalos de tiempo tras la aplicación con Manvert Silikon®.

Seguimiento de los síntomas externos

Se realizó un seguimiento continuo de las plántulas en las distintas condiciones, realizando fotografías a los 7 y a los 15 días tras la aplicación de Manvert Silikon®. Además también se realizó un proceso de recuperación, por el que se restablecían condiciones de riego a algunas de las plantas tratadas con Manvert Silikon®, tras 15 días de sequía estricta.

Peso seco, peso fresco (PS y PF) y % de humedad

Las medidas de peso fresco y peso seco de las distintas muestras se realizaron a los 7 días y a los 15 días después de la aplicación de Manvert Silikon®, con el fin de obtener los porcentajes de humedad de cada una de las muestras de plántulas. Se usaban un mínimo de 5 plántulas por tratamiento.

Después de medir los pesos frescos, las plántulas se dejan a secar en la estufa a una temperatura aproximada de 60°C durante dos días, después de los cuales se llevará a cabo la medida de peso seco. Una vez obtenidos ambos datos, el cálculo del porcentaje de humedad se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ humedad} = \frac{PS * 100}{PF}$$

Medida de transpiración

La transpiración es la pérdida de agua por parte de la planta en forma de vapor de agua a través de la superficie foliar. Para medir la tasa de transpiración medimos la pérdida de peso de una planta en macetas individuales en periodos de tiempo controlados a las 24 horas de haber aplicado el tratamiento. Los resultados obtenidos se expresan como pérdida de mg/min*cm².

Para ello se sellaba cada maceta por medio de papel film transparente y con ayuda de Parafilm“M”®, para evitar la evaporación de agua directamente desde el sustrato y asegurarnos de que toda pérdida de peso que tenga lugar en la maceta sea producida exclusivamente a través de la transpiración en las hojas.

Las plántulas selladas se colocaron bajo la influencia de dos lámparas de 100W a una distancia de unos 40cm que proporcionan una intensidad lumínica de 18000lx aproximadamente, para promover la transpiración. Se hizo un seguimiento a lo largo de una hora, realizándose 4 medidas de peso en intervalos de 15 minutos, y posteriormente se calculó la tasa de transpiración en función del peso perdido por cada maceta.

De cada plántula dibujamos el contorno de cada una de las hojas, involucradas en el proceso de transpiración, y calculamos la superficie foliar utilizando un programa de procesamiento de imágenes para PC, el imageJ.

Evaluación de los mecanismos de tolerancia a la sequía desencadenados por Manvert Silikon®

Con el fin de evaluar los efectos que la aplicación de Manvert Silikon® tenía sobre los diferentes mecanismos de tolerancia de las plantas, se realizaron aplicaciones del producto sobre plántulas de maíz, del mismo modo que se explicó anteriormente y se midieron los siguientes parámetros a las 24 horas después de la aplicación: peróxido de hidrógeno, actividad peroxidasa, proteínas totales y expresión del gen ZmPIP2;5..

Cuantificación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) mediante naranja de xilenol

Para la cuantificación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se recogieron plántulas control y tratadas a las 24 horas de haber aplicado Manvert Silikon®, realizándose tres réplicas de cada situación. La cuantificación de peróxido de hidrógeno es un proceso que se tiene que llevar a cabo en condiciones de frío.

Tras haber pesado las muestras, éstas eran homogeneizadas en un mortero con tampón (Tris-HCl) 50mM a pH 7.5, hasta tener una muestra homogénea. Posteriormente se centrifugaban durante 30 minutos a una velocidad de 2000g,

quedándonos con el sobrenadante para la cuantificación de (H₂O₂) y enrasando a un volumen exacto. Por otro lado se prepara el reactivo de naranja de xilenol, que contiene sulfato ferroso amónico ((NH₄)₂ Fe (SO₄)₂*6H₂O) 500µM, ácido sulfúrico H₂SO₄ 50mM, naranja de xilenol 200µM; y sorbitol 200µM.

Para llevar a cabo la cuantificación del peróxido de hidrógeno se mezclaban 500µl del reactivo con 500µl de cada una de las muestras incubando durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo medimos las absorbancias del complejo formado de naranja de xilenol-hierro a 560nm en un espectrofotómetro Thermo Helyos. Con las absorbancias obtenidas podemos calcular la concentración de H₂O₂ presente en cada una de nuestras muestras mediante la elaboración de una recta patrón de H₂O₂.

Preparamos ahora las distintas concentraciones con las que vamos a realizar la recta patrón: 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 7.5 µM y 10 µM de peróxido de hidrógeno, que nos da como resultado la siguiente ecuación y a partir de la cual calcularemos las concentraciones de nuestras muestras:

$$x = \frac{y - 0.1035}{0.055}$$

siendo “x” la concentración que calculamos de nuestras muestras e “y” la absorbancia que presentam.

Los volúmenes de muestras no utilizadas se conservan en el congelador a -80°C para su posterior uso en otras pruebas.

Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas empleamos el homogenizado obtenido para la determinación de H₂O₂, a las 24 horas de haber aplicado el tratamiento, teniendo por lo tanto tres réplicas de nuevo para para las plántulas tratadas con el producto y para las control. La determinación de proteínas es un proceso que tiene que ser llevado a cabo en frío.

La determinación de proteínas se llevó a cabo en un medio de reacción que contenía reactivo de Bradford, 500µl, junto con 450µl de agua y 50µl de las muestras, dejándose incubar en oscuridad durante 30 minutos. El blanco empleado se prepara con 500µl de Bradford y 500µl de agua.

Se mide la absorbancia, después de la incubación, para cada muestra a 590nm a temperatura ambiente. Una vez obtenidas todas las absorbancias, calculamos la concentración de proteínas (µg proteína/ml de muestra) a partir de la ecuación de la recta de Bradford:

$$x = \frac{y - 0.0632}{0.051}$$

siendo “x” la concentración que calculamos de nuestras muestras e “y” la absorbancia que presentan.

Actividad peroxidasa

Para la estudio de la actividad peroxidasa se utilizó el homogeneizado preparado anteriormente con las muestras preparadas a las 24 horas de aplicación del tratamiento.

La actividad peroxidasa se determinó empleando un medio de reacción que contenía tampón Tris-HCl 50mM a pH 7.5, H₂O₂ y actuando como donador de electrones el 4-metoxi-naftol 100mM.

La actividad peroxidasa de las distintas muestras se determinó a temperatura ambiente mediante un espectrofotómetro en el que se siguió el curso de reacción a lo largo de un minuto, a una absorbancia de 593nm.

Medida de la expresión génica

Para el estudio de la expresión génica se tomaron muestras a las 24 horas de la aplicación de Manvert Silikon®. Se recogieron las hojas de plántulas control y tratadas que se cortaron en pequeños trozos, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C.

Las muestras almacenadas a -80°C fueron transferidas a un mortero estéril donde se homogeneizaron con nitrógeno líquido. Una vez obtenido el homogeneizado, se utilizó como material de partida para la extracción de RNA siguiendo el protocolo establecido en el Kit BioRad Aurum™ Total RNA Mini Kit. La cantidad de RNA se determinó mediante medidas espectrofotométricas a 260 nm. Una vez conocida la concentración de RNA, 500 ng de este se utilizaron para la retro-transcripción inversa con el iScript cDNA synthesis kit de BioRad. Los oligos que amplifican el gen *ZmPIP2;5* se obtuvieron de Parent *et al.* (2009). El gen de la tubulina β de tomate se utilizó como “housekeeping” o control endógeno que se expresa constitutivamente y los oligos se obtuvieron de (González-Pérez, 2012).

La expresión génica relativa se realizó en los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidade da Coruña con el sistema de PCR en tiempo real iCycler iQ (BioRad). La mezcla de reacción (50 µl) se preparó incluyendo 0,3 µl de cada cebador, 2,5 µl de cDNA y 1xIQ SYBR Green Supermix (BioRad). El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de amplificación: 95°C 30 segundos, 58°C 30 segundos y 72°C 50 segundos. Finalmente se añadió un paso de elongación a 72 °C durante 5 minutos. El análisis de los resultados se realizó con el software del fabricante, Optical System Software 3.0 (BioRad). Después de cada reacción de PCR se comprobaba la existencia de un único pico en las curvas de “melting”. Se aplicó el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008) para cuantificar la expresión relativa de nuestro gen de interés, donde:

$$\Delta\Delta Ct = [Ct_{GI} (\text{muestra desconocida}) - Ct_{TUB} (\text{muestra desconocida})] - [Ct_{GI} (\text{muestra control}) - Ct_{TUB} (\text{muestra control})].$$

El Ct se define como aquel ciclo en el que la emisión de fluorescencia por el producto de la PCR puede distinguirse del fondo. GI es el gen de interés y TUB es el control interno o calibrador (el gen de la tubulina). La muestra control es la muestra que representa el valor 1x de expresión para el gen de interés. Cada medida de expresión se realizó por duplicado.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el GraphPadPrism versión 5.01, consistiendo en la realización de un T-test. La representación de los resultados se proporciona como una media de las réplicas empleadas y una desviación estándar (SD).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de síntomas externos

Desde la aplicación del tratamiento con Mavert Silikon® a las plántulas de maíz se les realizó un seguimiento a lo largo de los 15 días que se mantuvieron en condiciones de sequía, tanto a las controles como a las tratadas. Se tomaron fotografías a los 7 y 15 días para observar la evolución de los daños externos.

A los 7 días ya se apreciaban notables diferencias entre ambas. Las plántulas tratadas presentaban mayor rigidez, un menor nivel de marchitez y de deshidratación, notable únicamente en los ápices foliares. Por otro lado, en las plántulas que no fueron tratadas se podía apreciar mayor deterioro. En este caso, los síntomas de deshidratación y marchitez no se limitaban únicamente a los ápices foliares, sino que ya cubrían una superficie mayor. También se apreciaba en este caso un mayor decaimiento foliar, como consecuencia de una mayor pérdida de la turgencia celular (Fig. 3).

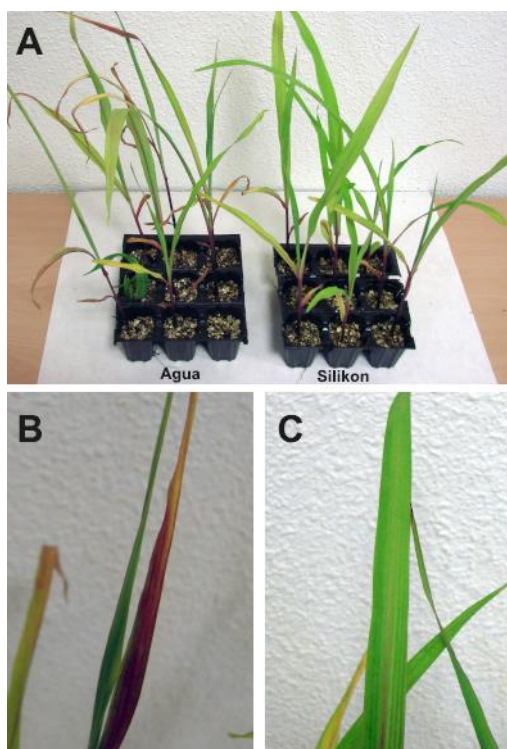


Figura 3. Fotografías de los síntomas de las plantas tomadas a los 7 días tras la aplicación del tratamiento. **A)** Plano general de las plántulas control y tratadas. Plano cercano de **B)** las plántulas control y **C)** tratadas.

En las fotografías tomadas a los 15 días se aprecia un agravamiento de los síntomas, siendo más notorio en las plantas que no habían sido tratadas. Las hojas se apreciaban totalmente secas, deshidratadas, perdiendo todo el volumen y rigidez que poseía la plántula. A diferencia de las plántulas control, las tratadas presentaban un menor grado en la evolución de los síntomas (Fig. 4).

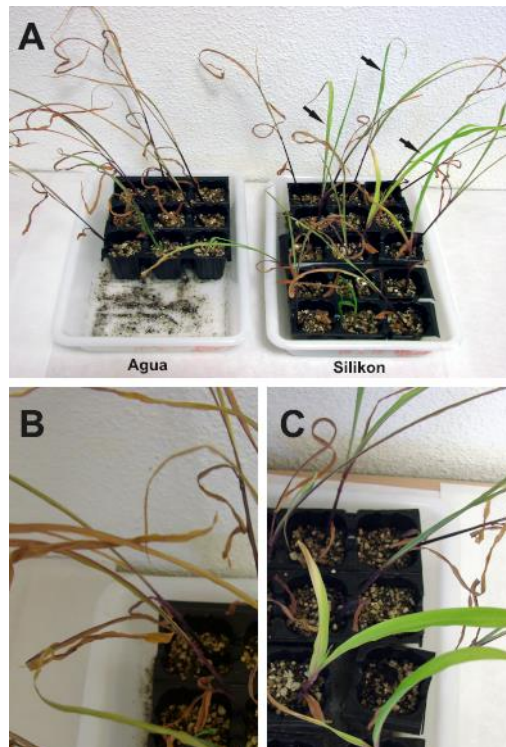


Figura 4. Fotografías de los síntomas a los 15 días de la aplicación del tratamiento. **A)** Plano general de las plántulas control y tratadas. Las flechas indican las plántulas que posteriormente se recuperaron de las tratadas. **B)** Detalle de las plántulas control, y **C)** de las tratadas, en donde se aprecia perfectamente diferencias entre ambas.

Después de los 15 días de seguimiento, ninguna de las plantas sin tratar pudieron ser recuperadas, aun volviendo a un régimen de riego adecuado, sin embargo, algunas plantas de las tratadas con Manvert Silikon® sí que se recuperaron y después de 21 días se les tomó fotografías de nuevo. Transcurrido este período de tiempo las plantas apenas presentaban síntomas, a excepción de uno pocos ápices foliares, pero habían recuperado su rigidez y volumen (Fig. 5).



Figura 5. Fotografía de las plántulas tratadas que se mantuvieron bajo condiciones de sequía estricta después del proceso de recuperación.

Determinación del Peso fresco (PF), Peso seco (PS) y contenido hídrico

Los valores que obtenemos a los 7 días en la determinación de PF no se aprecian diferencias significativas entre las muestras que tomamos. Por otro lado, a los 15 días de la aplicación del producto, se aprecian diferencias significativas entre los valores obtenidos ($p < 0.05$). En este caso, las plantas tratadas mantienen un mayor PF que las control estando ambas en condiciones de sequía (Fig. 6).

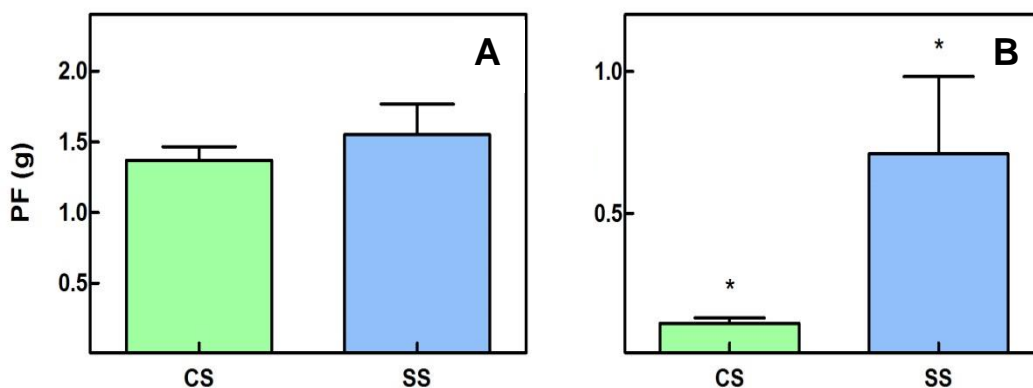


Figura 6. Representación de las medias obtenidas en los PF, **A)** a los 7 días de la aplicación del tratamiento y **B)** a los 15 días, en las plántulas control y tratadas en condiciones de sequía (CS y SS respectivamente). A los 15 días apreciamos diferencias significativas entre ambas muestras ($p < 0.05$).

En lo relativo a los datos de PS determinados, a los 7 días obtenemos unos valores muy similares entre las muestras mantenidas en las diferentes condiciones, sin apreciarse diferencias significativas. A los 15 días obtenemos los mismos resultados, valores muy similares sin apreciarse diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las control y tratadas mantenidas en condiciones de sequía (Fig. 7).

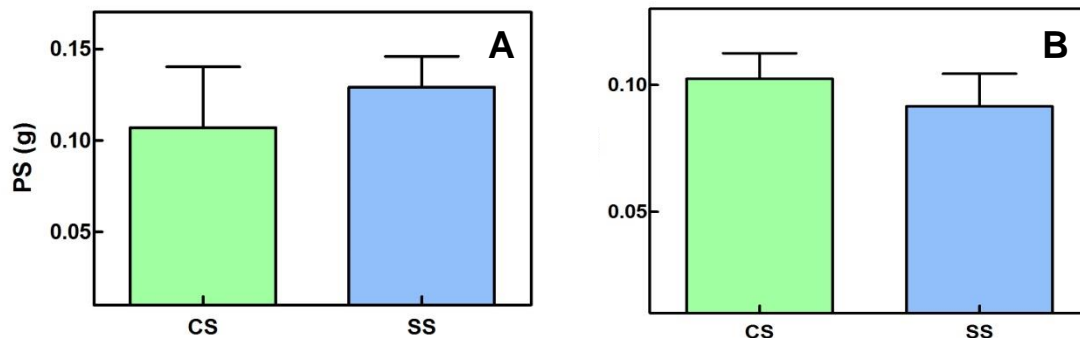


Figura 7. Representación de las medias obtenidas en los PS, **A)** a los 7 días de la aplicación del tratamiento y **B)** a los 15 días en las plántulas control y tratadas en condiciones de sequía (CS y SS respectivamente).

Los valores obtenidos para el porcentaje de humedad mostraron una reducción en aquellas plántulas que se mantuvieron bajo condiciones de estrés. Comparando los datos obtenidos para las plántulas en sequía, obtenidos a los 15 días (Fig. 8), las plántulas previamente tratadas presentaban de media un 19.5% más de humedad en comparación con las control en las mismas condiciones, mostrando así una mayor eficiencia hídrica aquellas previamente tratadas. Así, con estos valores obtenidos, podemos apreciar diferencias significativas a los 15 días tras la aplicación del tratamiento ($p < 0.05$).

A los 7 días, a diferencia de lo que se veía en el apartado anterior mediante las fotografías, no se apreciaron diferencias significativas. Este hecho puede ser debido a que, a diferencia de lo que sucedió con las plántulas con las que trabajamos en el anterior apartado que estuvieran situadas justo bajo los focos de luz, en este caso, y por falta de espacio, no fue posible, dando como resultado un posible retraso en el proceso de sequía.

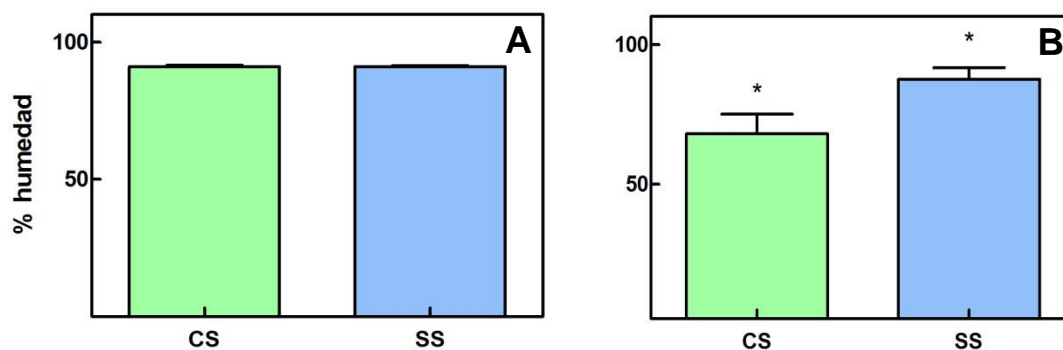


Figura 8. Representación de las medias obtenidas para los % de humedad **A)** a los 7 días y **B)** a los 15 días, entre las plántulas control y tratadas en condiciones de sequía (CS y SR respectivamente). Podemos apreciar diferencias significativas a los 15 días de la aplicación del tratamiento.

Se puede observar que aquellas plantas que fueron tratadas con sílice (Si) presentan unos valores medios de peso seco mayores que las plantas control, a las que no se les aplicó Si, concordando con los resultados obtenidos por Teodoro et al. (2015)

Estos datos concordaban con los obtenidos en otros trabajos, en los que se constató, mediante la aplicación foliar de Si en plantas de soja, que las plantas a las que se les aplicaba el tratamiento presentaban valores medios mayores de peso seco (Moreira et al. 2010).

Determinación de los niveles de transpiración

En nuestro trabajo, los datos obtenidos de tasa de transpiración ($\text{mg}/\text{min}\cdot\text{cm}^2$) no se aprecian diferencias significativas ($p>0.05$) a las 24 horas de la aplicación del producto, entre las plántulas tratadas y control en condiciones de sequía (Fig. 9). Lo que obtenemos es una tendencia a reducirse la tasa de transpiración en aquellas bajo estrés por sequía, comparándolas a las que mantienen unas condiciones de riego normal.

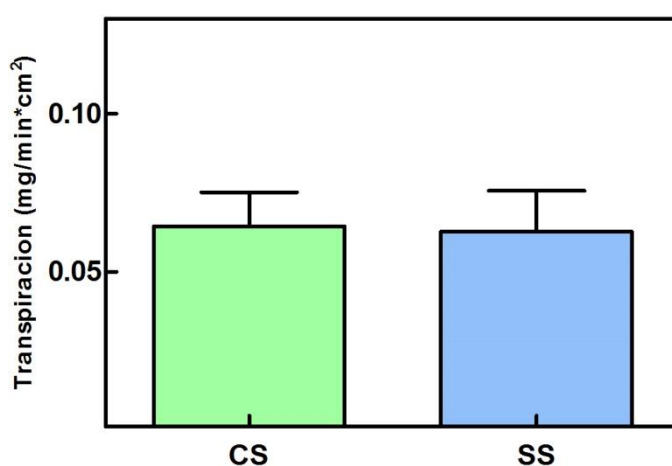


Figura 9. Representación de las medias obtenidas entre las plántulas control y tratadas en condiciones de sequía (CS SS respectivamente).

La tasa de transpiración se puede ver reducida gracias al Si. Así, la tasa de transpiración en el arroz puede verse reducida en hasta un 30%, planta cuya cutícula es delgada, pudiendo presentar un efecto aliviador ante las situaciones de estrés por estrés hídrico (Ma et al., 2001). En este trabajo de Ma et al. (2001) el efecto del Si fue mayor en las plantas bajo condiciones de estrés.

Evaluación de los mecanismos de tolerancia a la sequía desencadenados por Manvert Silikon®.

Cuantificación de la producción de Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

En las plántulas a las que se llevó a cabo la determinación de la cantidad de H_2O_2 se obtuvieron diferencias significativas de concentración ($\mu\text{mol}/\text{gPF}$) entre las plántulas control y las tratadas ($p<0.05$), siendo mayores en las plantas tratadas.

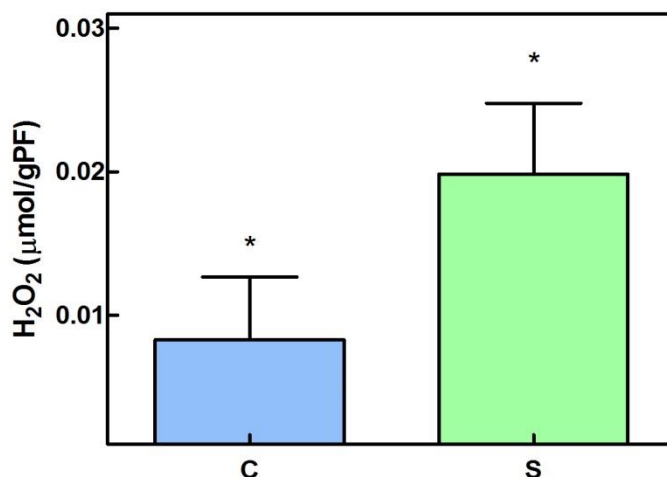


Figura 10. Medias de las concentraciones de H₂O₂ a las 24h de la aplicación de Manvert Silikon. Se observan diferencias significativas entre ambas ($p < 0.05$), cuantificándose una concentración mayor en aquellas que han sido tratadas.

En presencia de estrés hídrico, la planta presenta una tendencia a incrementar significativamente los niveles de concentración de H₂O₂. La aplicación de sílice, una vez están sometidas a estrés, provoca un descenso en los niveles de concentración de H₂O₂, en comparación a las control, en los valores obtenidos a los 15 y 20 días, pero volvían a aumentar si continuaban expuestas al estrés (Habibi, 2014). Esta tendencia del silicio a reducir los niveles de concentración de H₂O₂ también se ve reflejada en otras investigaciones, como la de Gunes *et al.* (2007).

A diferencia de la determinación de la concentración en los anteriores trabajos citados, en este trabajo se cuantifica el efecto de Manvert Silikon® en la producción de H₂O₂ a las 24 horas de haber realizado la aplicación.

Actividad Peroxidasa (POD)

En los resultados obtenidos se puede ver los efectos de la sequía en la actividad antioxidante de las plántulas, por medio de la determinación de POD. Esta actividad antioxidante es de vital importancia para la planta, ya que ROS es altamente tóxico para ella.

En el ensayo realizado se observaron diferencias significativas en la cuantificación de la concentración de POD ($p < 0.05$). Las plántulas previamente tratadas con Manvert Silikon® presentaban una actividad mayor de POD, y con ello una mejor respuesta antioxidante frente a ROS, que las plántulas control (Fig. 11).

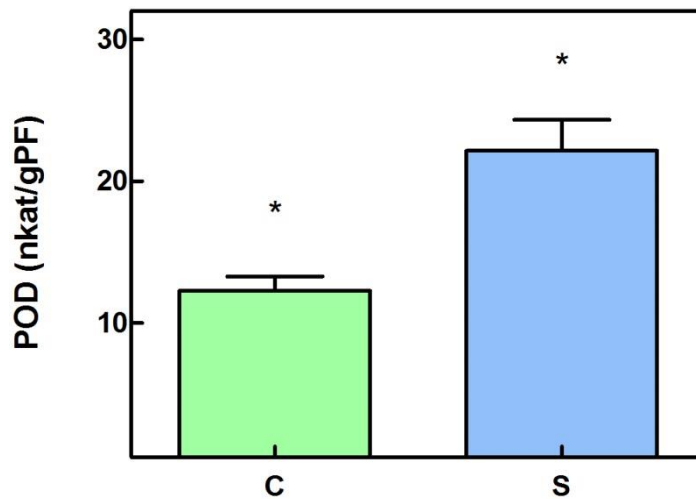


Figura 11. Valores medios de la concentración de POD a las 24 horas de haber aplicado el tratamiento, apreciándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ambos. En las plántulas control (C) se aprecia una menor concentración que en las tratadas (S).

La actividad proteica bajo condiciones de estrés aumenta, acompañada del aumento de ROS y POD, con finalidad antioxidante. Resultados obtenidos revelan un aumento significativo ($p < 0.05$) de la actividad enzimática de catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) en aquellas plantas sometidas a estrés hídrico (Abedi y Pakniyat, 2010).

La capacidad que presentan las plantas para poder superar el estrés oxidativo provocado por la exposición al estrés hídrico está basada en una gran parte en la capacidad de inducción de SOD, y posteriormente en la capacidad de regulación positiva de otras enzimas antioxidantes (Alscher *et al.* 2002).

Pruebas realizadas por Habibi (2014) muestran en este caso una reducción de la actividad CAT y SOD después de 20 y 25 días de estrés por sequía, pero la aplicación de Si causó un incremento significativo de estas enzimas.

Estudios realizados con anterioridad corroboran los datos obtenidos en este ensayo, en los que también se aprecia un incremento significativo de la actividad POD como respuesta al estrés oxidativo provocado durante el déficit de hídrico (Abedi y Pakniyat, 2010). Otros trabajos llevados a cabo obtuvieron resultados semejantes para la determinación de POD a los obtenidos en este, en los que se sometieron a estrés por sequía diversas especies de plantas (Gunes *et al.*, 2008) (Xiao *et al.*, 2008).

Determinación de Proteínas

En los resultados obtenidos en la cuantificación de proteínas se puede ver, como respuesta al estrés oxidativo provocado por el déficit hídrico, que la actividad proteica se ve incrementada.

La cuantificación de la concentración de proteínas por el método de Bradford revela un aumento significativo de esta, en las plántulas que se habían tratado previamente frente a las control, cercano al 40% (Fig. 12). Este hecho determina que la aplicación de Manvert Silikon® tiene un efecto directo en la cantidad de proteínas. Estudios posteriores podrían arrojar luz sobre la naturaleza de estas proteínas inducidas.

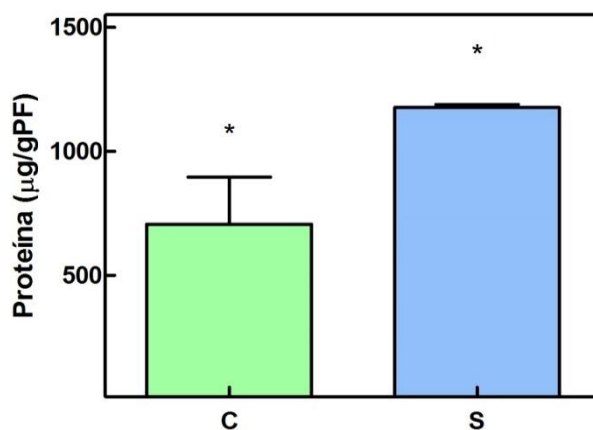


Figura 12. Representación de las medias proteicas obtenidas. Se puede apreciar un aumento significativo en la concentración de proteínas en las plántulas tratadas ($p < 0.05$).

Expresión génica

Gracias a la técnica RT-PCR en tiempo real, se pudo conocer la expresión génica relativa de nuestro gen de interés, el *ZmPIP2*. Para ello se emplearon cebadores específicos, no solo de para nuestro gen de interés, sino también los que se corresponden con los de la tubulina del maíz, que se empleará para normalizar la muestra, teniendo como valor 1x.

La determinación de la expresión génica relativa de nuestro gen de interés se determinó a las 24 de la aplicación del tratamiento con Manvert Silikon. El gen *ZmPIP2* mostró un incremento de expresión en las plántulas tratadas con respecto a las plántulas control. Este incremento fue dos veces mayor que la expresión encontrada en las plántulas control (Fig. 13).

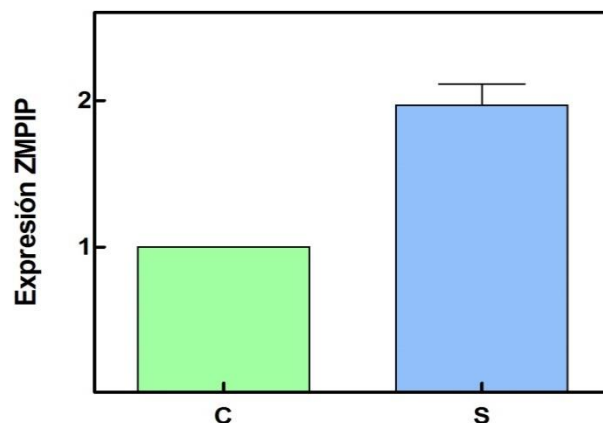


Figura 13. Expresión relativa del gen ZMPIP en plántulas de maíz, tras la aplicación de Manvert Silikon®. Los valores están referidos a la expresión en las plantas control, siendo este de valor de 1.

La expresión génica relativa de *ZmPIP* obtenida a partir de RT-PCR a tiempo real llevada a cabo en este trabajo concuerda con los datos obtenidos en otros ensayos. La cuantificación de los niveles de expresión de *ZmPIP* llevada a cabo con tratamientos de déficit hídrico por Parent et al. (2009) muestra una mayor expresión en aquellas plantas sensibles a la sequía. Además, los niveles de expresión pueden verse afectados por cambios en la biosíntesis de ABA, teniendo lugar una mayor expresión en aquellas plantas que contienen mayor concentración de ABA (Jang *et al.*, 2004). El aumento de los niveles de *ZmPIP2* posiblemente también induzca a un incremento en la permeabilidad de las células de la raíz al agua (Zelazny *et al.*, 2007).

Además, a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de Bienert et al. (2014) la expresión simultánea de dos isoformas de ZMPIP, ZMPIP1 y ZMPI, se aprecia un incremento en la afinidad por la difusión transmembrana de H₂O₂ pudiendo tener un importante actividad en mecanismos de detoxificación.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las plántulas tratadas con Manvert Silikon® muestran una mayor tolerancia a la sequía. Este hecho se pone de manifiesto a partir de los valores obtenidos en los porcentajes de humedad siendo mayores en las tratadas. Estas tienen, por lo tanto, una mayor capacidad de regular la pérdida de agua.

La actividad antioxidante reflejada por las plántulas tratadas con Manvert Silikon® también es considerablemente mayor. La actividad peroxidasa (POD) así como la concentración de proteínas obtenidas son más significativos en las tratadas previamente a la exposición a la sequía. Estos parámetros son muy importantes a la hora de hacer frente al estrés oxidativo provocado por las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Las acuaporinas son las principales responsables de la toma de agua por parte de la planta, y su actividad está determinada por diferentes genes, como los ZmPIP. La aplicación de Manvert Silikon® provocó cambios cuantitativos en la expresión del gen *ZmPIP2*, expresándose en mayor medida en las plantas tratadas. Este dato determinaría una mayor capacidad de incorporar agua, y por tanto mejor capacidad de tolerancia ante el estrés de las plantas tratadas.

CONCLUSIONS

The results obtained in this work show that the seedlings treated with Manvert Silikon® have greater tolerance to drought. This fact is evident from the values obtained in humidity percentages being higher in treated plants. Therefore, these plants possess a greater ability to regulate water loss.

The antioxidant activity reflected by seedlings treated with Manvert Silikon® is also considerably higher. The peroxidase activity (POD) and the concentration of proteins are more significant in the treated plants expose to drought. These parameters are very important to cope with oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS).

Aquaporins are primarily responsible for taking water from the plant, and its activity is determined by different genes, such as ZmPIP. The application of Manvert Silikon® caused quantitative changes in the expression of the *ZmPIP2* gene, which resulted higher in treated plants. This fact leads to a greater capacity of incorporating water, and therefore to a better stress tolerance of treated plants.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abedi, T. y Pakniyat, H. (2010) Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 46: 27-34.
- Alscher, R.G., Erturk, N. y Heath, L.S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1331–1341.
- Apel, K. y Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373–399.
- Bienert, G.P., Heinen, R.B., Berny, M.C. y Chaumont, F. (2014) Maize plasma membrane aquaporin ZmPIP2;5, but not ZmPIP1;2, facilitates transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838(1): 216–222.
- Covarrubias, A.A. (2007) Sobrevivir al estrés: cómo responden las plantas a la falta de agua. *Biotechnología*, 14: 253-262.
- Deren, C., Datnoff, L.E., Snyder, G.H. y Korndörfer, G.H. (2001) Plant genotypes, silicon concentration and silicon related responses Silicon in Agriculture. *Studies in Plant Science*, 8: 149-158.
- Epstein, E. (1994) The anomaly of silicon in plant biology. *PNAS*, 91: 11-17.
- Fetter, K., Van Wilder, V., Moshelion, M. y Chaumont, F. (2004) Interactions between Plasma Membrane Aquaporins Modulate Their Water Channel Activity. *The Plant Cell*, 16(1): 215–228.
- Gunes, A., Inal, A., Bagci, E.G., y Coban, S., (2007) Silicon mediated changes on some physiological and enzymatic parameters symptomatic of oxidative stress in barley grown in sodic-B toxic soil. *Journal of Plant Physiology*, 164(6): 807–811.
- Golbashy, M., Ebrahimi, M., Khorasani, S.K. y Choukan, R. (2010) Evaluation of drought tolerance of some corn (*Zea mays* L.) hybrids in Iran. *African Journal of Agricultural Research*, 5(19): 2714-2719.
- González-Pérez, S. 2012. Análisis de peroxidasas implicadas en lignificación en la respuesta de defensa de tomate frente a *Verticillium dahliae*. Trabajo Fin de Máster.
- Gunes, A., Pilbeam, D., Inal, A. y Coban, S. (2008) Influence of silicon on sunflower cultivars under drought stress, I: Growth, antioxidant mechanisms and lipid peroxidation. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 39(13-14): 1885–1903.
- Habibi, G. (2014) Silicon Supplementation Improves Drought Tolerance in Canola Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61(6): 784–791.
- Hachez, C., Moshelion, M., Zelazny, E., Cavez, D. y Chaumont, F. (2006) Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Molecular Biology*, 62(1-2): 305–323.

- Jang, J.Y., Kim, D.G., Kim, Y.O., Kim, J.S. y Kang, H. (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 54(5): 713–725.
- Khayatnezhad, M. y Gholamin, R. (2012) The effect of drought stress on leaf chlorophyll content and stress resistance in maize cultivars (*Zea mays*). *African Journal of Microbiology Research*, 6(12): 2844-2848.
- Korndörfer, G.H. y Datnoff, L.E. (1995) Adubação com silício: uma alternativa no controle de doenças da cana-de-açúcar e do arroz. *Informações Agronômicas*, 70: 1-5.
- Kramer, P.J. y Boyer, J.S. (1995). *Water relations of plants and soils* (201-256). San Diego, California: Academic press.
- Kruse, E., Uehlein, N. y Kaldenhoff, R. (2006) The aquaporins. *Genome Biology*, 7(2): 1-6.
- Ma, J.F. (2004) Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50:1, 11-18
- Ma, J.F., Miyake, Y. y Takahashi, E. (2001) Silicon as a beneficial element for crop plants. *Studies in Plant Science*, 8:17-39
- Martínez-Vilalta, J. y Piñol, J. (2003) Limitaciones hidráulicas al aporte de agua a las hojas y resistencia a la sequía. *Ecosistemas*, 1-7.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. y Mittler, R. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 453-467.
- Mittler, R., Kim, Y., Song, L., Coutu, J., Coutu, A., Ciftci-Yilmaz, S., Lee, H., Stevenson, B. y Zhu, J.K. (2006) Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Letters*, 580(28-29): 6537–6542.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. y Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9: 490–498.
- Moreira, A.R., Fagan, E.B., Martins, K.V. y Souza, C.H.E. (2010) Resposta da cultura da soja a adubação de silício foliar. *Bioscience Journal*, 26(3): 413-423.
- Otto, B. y Kaldenhoff, R. (2000) Cell-specific expression of the mercury-insensitive plasma-membrane aquaporin NtAQP1 from *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 211(2): 167–172.
- Parent, B., Hachez, C., Redondo, E., Simonneau, T., Chaumont, F. y Tardieu, F. (2009) Drought and Abscisic Acid Effects on Aquaporin Content Translate into Changes in Hydraulic Conductivity and Leaf Growth Rate: A Trans-Scale Approach. *Plant Physiology*, 149(4): 2000–2012.
- Ramachandra A.R., Chaitanyaa K.V. y Vivekanandanb M. (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 161: 1189–1202.

Rodríguez-Pérez, L. (2006) Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas: Physiological implications of osmoregulation in plants. *Agronomía Colombiana*, 24(1): 28-37.

Rojas, G.M. (2003) La resistencia a la sequía. *Ciencia*, 6: 326-331.

Schmittgen TD y Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3:1101-1108. Taiz, L. y Zeiger, E. (2010). *Plant physiology*. Sunderland: Sinauer Associates.

Teodoro, P.E., Ribeiro, L.P., Oliveira, E.P., Corrêa, C.C.G. y Torres, F.E. (2015) Acúmulo de massa seca na soja em resposta a aplicação foliar com silício sob condições de déficit hídrico. *Bioscience. Journal*, 31(1): 161-170.

Xiao, X., Xu, X. y Yang, F. (2008) Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. *Silva Fennica*, 42: 705–719.

Ying, Y.Q., Song, L.L., Jacobs, D.F., Mei, L., Liu, P., Jin, S.H. y Wu, J.S. (2015) Physiological response to drought stress in *Camptotheca acuminata* seedlings from two provenances. *Frontiers in Plant Science*, 6(361): 1-8.

Zarabi, M., Alahdadi, I., Akbari, G.A. y Akbari, G.A. (2011) A study on the effects of different biofertilizer combinations on yield, its components and growth indices of corn (*Zea mays* L.) under drought stress condition. *African Journal of Agricultural Research*, 6(3): 681-685.

Zelazny, E., Borst, J.W., Muylaert, M., Batoko, H., Hemminga, M.A. y Chaumont, F. (2007) FRET imaging in living maize cells reveals that plasmamembrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *PNAS*, 104(30): 12359–12364.