



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Efecto del *Manvert Silikon* en la protección de tomate frente al aluminio.

Efecto de *Manvert Silikon* na protección do tomate fronte ao aluminio.

***Manvert Silikon's* effect on the protection of the tomato against aluminium.**

Lara Vilanova Cancela

Junio, 2017

*Tutor(es) Académico: Cristina Silvar Pereiro
Alba García Ulloa*

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. Introducción	3
1.1. <i>Solanum lycopersicum</i> L	3
1.2. El aluminio	3
1.3. <i>Manvert Silikon</i> de Biovert S.L y los fitofortificantes.....	4
2. Objetivos	6
3. Material y Métodos	7
3.1. Siembra del material vegetal	7
3.2. Tratamiento realizado	7
3.3. Determinación del crecimiento vegetativo mediante el peso fresco y seco	8
3.4. Composición de la pared radicular por FTIR (Espectroscopía de infrarrojos).....	8
3.4.1. Obtención de muestras.....	8
3.4.2. Extracción de la pared celular	8
3.4.3. Obtención de espectros.....	9
3.5. Cuantificación de proteínas totales.....	9
3.6. Expresión del gen LHA	9
3.7. Análisis estadístico de los datos	10
4. Resultados y Discusión	12
4.1. Biometría: determinación del crecimiento vegetativo.....	12
4.1.1. Tratamiento en solución de <i>Manvert Silikon</i>	13
4.1.2. Tratamiento pulverizado de <i>Manvert Silikon</i>	14
4.2. Composición de la pared radicular por método FTIR	15
4.3. Cuantificación de proteínas totales.....	19
4.4. Expresión del gen LHA	20
5. Conclusiones	22
6. Bibliografía.....	23

RESUMEN

El aluminio (Al) es un metal muy tóxico para la mayoría de las plantas a muy bajas concentraciones. Tiene la capacidad de inhibir o reducir considerablemente el crecimiento vegetativo de las plantas y con ello disminuir la producción de los cultivos hortícolas.

En este trabajo se evaluó el efecto de protección que el producto comercial *Manvert Silikon*, de la empresa Biovert S.L., tiene sobre el desarrollo de la planta frente al aluminio que pueda haber en el medio. En concreto se trabajó con tomate (*Solanum lycopersicum* L.), centrándonos en su crecimiento vegetativo y distintos aspectos del metabolismo como la composición de la pared radicular, la expresión del gen LHA y el contenido en proteínas.

Se observaron cambios en la proporción de los componentes de pared celular a nivel de la raíz, detectándose un mayor contenido de compuestos fenólicos en las plantas afectadas por aluminio mientras que las plantas tratadas por *Manvert Silikon* presentaban mayor contenido en polisacáridos y mayor expresión del gen LHA en solución, aunque de manera no significativa. No se observaron diferencias para el contenido en proteínas entre los tratamientos. Con todo esto, se puede afirmar que el aluminio afecta a la fisiología de la planta activando mecanismos de protección y resistencia en ella.

Palabras clave: Aluminio, fitofortificante, tomate, paredes celulares, FTIR, gen LHA, H⁺-ATPasa.

RESUMO

O aluminio (Al) é un metal moi tóxico para a maioría das plantas e a moi baixas concentracións. Ten a capacidade de inhibir ou reducir considerablemente o crecemento vexetativo das plantas e con elo baixar a produción dos cultivos hortícolas.

Neste traballo avalíouse o efecto da protección que o produto comercial *Manvert Silikon*, da empresa Biovert S.L., ten sobre o desenvolvemento da planta fronte ao aluminio que poida haber no medio. En concreto traballouse con tomate (*Solanum lycopersicum* L.), centrándonos no seu crecemento vexetativo e distintos aspectos do metabolismo coma na composición da parede radicular, a expresión do xene LHA e o contido en proteínas.

Observáronse cambios na proporción dos compoñentes de parede celular a nivel da raíz, detectándose un maior contido de compostos fenólicos nas plantas afectadas por aluminio mentres que as plantas tratadas por *Manvert Silikon* presentaban maior contido en polisacáridos e maior expresión do xene LHA en solución, aínda que de xeito non significativo. Non se observaron diferenzas para o contido en proteínas entre os tratamentos. Con todo isto, pódese afirmar que o aluminio afecta á fisioloxía da planta activando mecanismos de protección e resistencia nela.

Palabras clave: Aluminio, fitofortificante, tomate, paredes celulares, FTIR, xene LHA, H⁺-ATPasa.

ABSTRACT

Aluminum (Al) is a very toxic metal for the majority of plants at very low concentrations. It has the capacity to inhibit or reduce considerably the vegetative growth of plants, diminishing the production of the horticultural crops.

In this work, the protective effect of the commercial product *Manvert Silikon*, from the company Biovert S.L., was assessed on the development of plants against the aluminum that can be in the medium. In particular, we worked with tomato (*Solanum lycopersicum* L.), focusing on its vegetative growth and different aspects of metabolism such as the root cell wall composition, the expression of the LHA gene and the protein content.

Changes in the proportion of cell wall components at the root level were observed, with a higher content of phenolic compounds in the plants affected by aluminum, while the plants treated with *Manvert Silikon* showed higher polysaccharide content and higher expression of the LHA gene in solution, although not significantly. No differences were observed for the protein content between treatments. Therefore, we can suggest that aluminum affects the physiology of the plant by activating different mechanisms of protection and resistance.

Key words: Aluminum, phytofortifier, tomato, cell walls, FTIR, LHA gene, H⁺-ATPase.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Solanum lycopersicum* L.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L. o *Lycopersicon esculentum* P. Mill) es una planta herbácea que pertenece a la familia de las Solanáceas y que es nativo de Sudamérica (Jardín Botánico de Castilla La Mancha, 2012). Es un fruto muy consumido y cultivado en todo el mundo desde su llegada a Europa gracias al conquistador español Hernán Cortés, que en 1521 lo trajo de la ciudad azteca de Tenochtitlán, hoy Ciudad de México. En el siglo XVI ya formaba parte de la alimentación de los aztecas, mayas y pueblos de la región, y hoy en día es una de las frutas más vendidas y exportadas en todo el mundo (FEPEX, 2016).

Se considera una planta anual. Por norma general presentan entre 1-3 m de alto y las hojas son alternas de hasta 25 cm de largo. En cuanto a las flores, estas son amarillas y forman racimos de 3 a 12 flores. El fruto es el tomate, una baya rojiza al madurar debido al alto contenido en pigmentos carotenoides como el licopeno y carotenos. Es un alimento con muy pocas calorías y su composición nutritiva se basa en agua y carbohidratos simples con algunos ácidos orgánicos que le dan el sabor ácido característico. En cuanto a la composición mineral, es rico en Potasio (K), Magnesio (Mg), Fósforo (P), ácido ascórbico (vitamina C) y en el complejo vitamínico B: B₁, B₂ y B₅. El licopeno junto con la Vitamina C le confieren al fruto poder antioxidante y protector del organismo siendo anticancerígeno (Jardín Botánico de Castilla La Mancha, 2012).

Cabe decir que es una planta heliófila que necesita de temperaturas de entre 21-24°C durante el día y 15-20°C por la noche. El ambiente debe presentar una humedad relativa de entre 60-80% dado que por encima o por debajo de este, se incrementa la incidencia de enfermedades o se dificulta la polinización, respectivamente (Peregüez-Cardona, 2011). En cuanto al suelo no es muy exigente pero no soporta las inundaciones, por lo que prefiere los suelos bien drenados tanto ligeramente ácidos como básicos. Sin embargo, se sabe que las concentraciones altas de aluminio (Al) afectan al desarrollo de las raíces, y por ende al crecimiento, dado que no se extienden por el suelo lo suficiente como para captar los nutrientes necesarios (Casierra y Aguilar-Avendaño, 2007), pudiendo también causar clorosis aunque ésta no es tan evidente.

1.2. *El aluminio*

El aluminio (Al) es un metal de número atómico 13 y el más abundante de la corteza terrestre (Kopittke *et al.*, 2015). A pH neutro se encuentra en forma de óxidos relativamente insolubles pero a pH ácidos (< 5) se encuentra en forma de ión Al⁺³ por lo que se solubiliza reemplazando otros minerales como el Mg y el Ca inhibiendo así el crecimiento de la raíz de los cultivos, y por tanto disminuye la producción (Casierra y Aguilar-Avendaño, 2007).

El estrés por aluminio afecta principalmente al ápice de las raíces de forma que la mayor parte de los mecanismos de tolerancia conocidos hasta ahora son llevados a cabo

por este órgano. Esta inhibición de crecimiento se puede deber a que este metal afecta a la síntesis del ADN así como a las rutas de señalización por Ca^{+2} (Achary *et al.*, 2013). Sin embargo, también afecta a los genes que llevan a cabo la síntesis *de novo* de lípidos de membrana y puede provocar daños estructurales y funcionales en esta. La tolerancia de una planta estará determinada en gran medida a solventar dichos problemas con los lípidos de membrana, como por ejemplo, mantener su composición estable (Huynh *et al.*, 2012).

Las plantas tolerantes son aquellas capaces de sobrevivir en suelos que son tóxicos para otras plantas y por ello, adoptan dos mecanismos generales de protección en plantas tolerantes al aluminio: uno con el que intentan evitar su entrada al interior y en el que intervienen las barreras físicas o los exudados de la raíz, y otro con el que intentan detoxificar el interior de las células una vez que el aluminio ha entrado en ellas (Carreño y Chaparro-Giraldo, 2013)

Los mecanismos relacionados con la exudación de sustancias pueden ser: la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática de la raíz frente al aluminio, la formación de una barrera de pH en la rizosfera y la inmovilización de aluminio gracias a la producción de calosa (Jones *et al.*, 2006); siendo las sustancias exudadas más comunes, y que se oponen a la entrada del aluminio, los compuestos fenólicos y sustancias quelantes (Kochian, 1995). También es muy común la secreción de ácidos orgánicos como malato, citrato u oxalato a través de las raíces al exterior para formar una especie de cubierta protectora para el ápice de la raíz y que esta se mantenga en todo momento en un medio ácido (Ma *et al.*, 2001).

Existen dos patrones identificados de secreción de los ácidos orgánicos: uno en el que la secreción ocurre antes de la hora de exposición a cualquier forma de aluminio y otro donde la secreción ocurre horas después de la exposición. En el primer caso, se sugiere la activación de transportadores de membrana mientras que en el segundo patrón se sugiere la inducción de nuevas proteínas, lo que explicaría el retraso.

En cuanto a los mecanismos relacionados con la detoxificación, el metal es quelado por aniones de carboxilatos que son secuestrados en vacuolas (Kochian, 1995).

Según Delhaize *et al.* (1993) y Ma *et al.* (2001), los genes más importantes en la tolerancia a aluminio son los que codifican para proteínas transportadoras de aniones orgánicos u otros compuestos y enzimas detoxificadoras de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Uno de los genes implicados en la tolerancia al aluminio es el gen LHA, expresado en la raíz del tomate *S. lycopersicum*, y que codifica para una H^+ -ATPasa que se localiza en la membrana plasmática radicular (Yang *et al.*, 2011) cuya función es regular la salida de ácidos orgánicos (Ma *et al.*, 2001).

1.3. *Manvert Silikon de Biovert S.L y los fitofortificantes*

Para solventar los problemas de estrés por aluminio, se han desarrollado los denominados fitofortificantes, los cuales según AEFISA (2012), consisten en sustancias o microorganismos cuya función es proteger a las plantas frente a condiciones bióticas

o abióticas adversas activando rutas o mecanismos de defensa; pero siempre y cuando se empleen antes de que la planta se encuentre afectada.

Estos compuestos presentan diversos mecanismos de acción: (1) actuar como barreras físicas para evitar la entrada de patógenos; (2) fortalecer el sistema inmunitario de la planta creando la resistencia inducida, (3) actuar como competidores sobre los lugares de unión del patógeno en la rizosfera o bien por los alimentos y (4) activar simultáneamente varios mecanismos (AEFISA, 2012). En cualquier caso, nunca actuarán directamente sobre los patógenos, que es lo que los diferencia de los fitosanitarios.

Los fitofortificantes pueden ser de varios tipos: (1) orgánicos, (2) microorganismos, (3) inorgánicos y (4) ceras.

En este trabajo empleamos el fitofortificante *Manvert Silikon* de la empresa española Biovert S.A., el cual es un bioestimulante inorgánico de la autodefensa en plantas que está compuesto por óxido de silicio (SiO_2) 30%p/p y 36%p/v.

Es un producto destinado a la agricultura que se suele emplear para aumentar la rigidez de los tejidos de las plantas y frutos al favorecer la absorción de Fósforo (P) y Hierro (Fe) presentes en el suelo, además de reducir la transpiración en suelos con déficit hídrico mejorando la gestión del agua (Manvert).

El silicio es capaz de interactuar con los metales pesados y engrosar las células epidérmicas radiculares generando una barrera física. Esto evita la penetración de estos en las células y también interviene en el metabolismo de la propia planta. Es decir, el papel del silicio es similar al de la lignina y promueve la resistencia de la planta al ataque por hongos dado que activa genes que producen metabolitos secundarios como los polifenoles y enzimas que traen consigo la síntesis de toxinas que actúan como inhibidores de patógenos (Diatom, 2010).

2. OBJETIVOS

- Determinar el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratadas con *Manvert Silikon* en presencia y ausencia de aluminio.
- Analizar la composición de las paredes celulares de la raíz en presencia y ausencia de aluminio y de *Manvert Silikon*.
- Cuantificar las proteínas totales en presencia y ausencia de aluminio y de *Manvert Silikon*.
- Evaluar si *Manvert Silikon* induce la expresión del gen LHA en plantas no sometidas a la influencia del aluminio.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Siembra del material vegetal

Para los ensayos se emplearon plantas de tomate de la variedad San Pedro. Las semillas fueron sembradas en pocillos con vermiculita a razón de cinco semillas por pocillo y se dejaron embeber en agua de grifo. Se colocaron en una cámara de crecimiento con ciclos de luz de 16 horas a 22°C y de oscuridad de 8 horas a 20°C durante tres semanas. Después de la siembra, cada dos días se regaban las semillas con agua del grifo, y una vez salieron las plántulas de los tomates se procedió a regar, cada dos días, con una solución nutritiva (Tabla 1).

Tabla 1: Componentes, con sus respectivas concentraciones, de la solución nutritiva.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
KNO ₃	5,99 mM
Ca(NO ₃) ₂	4,00 mM
NH ₄ H ₂ PO ₄	2,00 mM
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,00 mM
KCl	49,89 µM
H ₃ BO ₃	24,58 µM
MnSO ₄ · 7H ₂ O	1,16µM
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,95 µM
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,48 µM
H ₂ MoO ₄ (85%)	0,56 µM
Na ₂ EDTA	19,88 µM
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	19,89 µM

3.2. Tratamiento realizado

Pasadas tres semanas las plantas estaban listas para realizar los distintos ensayos, de forma que se transfirieron a tubos de 50 ml con los distintos tratamientos: agua destilada, *Manvert Silikon* (3 ml/l), aluminio (AlCl₃) (500 µM) y *Manvert Silikon* (3ml/l) con AlCl₃ (500 µM); cambiando el tratamiento cada dos días para que no variase de forma significativa la concentración del medio (Tabla 2).

El tratamiento se llevó a cabo en dos métodos de aplicación, el *Manvert Silikon* en solución y pulverizado en hojas. En el caso de la pulverización foliar del *Manvert Silikon* se esperó entre 4-6 horas para dejar absorber bien y luego se introdujeron en su tratamiento correspondiente teniendo en cuenta que las plantas pulverizadas no deben presentar *Manvert Silikon* en solución, sino que este será únicamente agua destilada o aluminio (Tabla 2).

Tabla 2: Contenido de los tubos según el tratamiento.

Tratamientos	Solución (50 ml)	Pulverización foliar (50 ml)
1	H ₂ O	H ₂ O
2	<i>Manvert Silikon</i> (3ml/l)	H ₂ O
3	AlCl ₃ (500 μM)	AlCl ₃ (500 μM)
4	AlCl ₃ (500 μM)+ <i>Manvert Silikon</i> (3ml/l)	AlCl ₃ (500 μM)

3.3. Determinación del crecimiento vegetativo mediante el peso fresco y seco

A los 11 días de tratamiento, se recogieron las muestras separando raíz, tallo y hojas de cada réplica. Se pesaron los distintos órganos en una balanza, obteniendo así el peso fresco, y se recogieron en placas Petri etiquetadas con la información necesaria para su correcta identificación.

Las placas Petri se llevaron a una estufa a 70°C durante 96 horas. Luego se volvió a pesar el contenido de cada una de las placas obteniendo el peso seco de los distintos órganos y tratamientos.

3.4. Composición de la pared radicular por FTIR (Espectroscopía de infrarrojos)

3.4.1. Obtención de muestras

Para este ensayo se realizaron 3 réplicas biológicas por cada tratamiento y la siembra se realizó de la manera anteriormente explicada. En este caso, el *Manvert Silikon* solo fue aplicado en solución

3.4.2. Extracción de la pared celular

A los 11 días se recogieron las raíces para llevar a cabo la extracción de paredes celulares. Para ello, las muestras fueron homogeneizadas con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo muy fino, que fue recuperado en tubos de centrifuga. Cada uno de las muestras fue sometida a una serie de lavados de 10 minutos cada uno a 1790 g y a temperatura ambiente; y entre lavados, y con una pipeta Pasteur, se retiró con cuidado el sobrenadante para no resuspender las paredes.

Los lavados a los que fueron sometidas cada una de las muestras, y en este orden, fueron las siguientes: un lavado con agua destilada, dos con Tritón X-100 al 1%, otros dos de agua destilada, dos lavados de Etanol 70° y otros dos de Etanol 96° (Fernández-Pérez *et al.*, 2015).

Luego se procedió a la filtración de las muestras con ayuda de una bomba de vacío y filtros de celulosa. Finalmente, estos se introdujeron en placas de Petri para ser

llevados a la estufa a 37°C donde estuvieron durante 3 semanas hasta que se secaron totalmente las paredes.

3.4.3. Obtención de espectros

Las muestras fueron llevadas al SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) donde fueron analizadas con ayuda de un espectrómetro Bruker Vector 2.2 FTIR en modo ATR para obtener el espectro de cada muestra, haciendo un blanco antes de cada muestra.

Este espectrómetro presenta un brazo con un tornillo que permite la compresión de la muestra sobre un cristal permitiendo un contacto perfecto con el haz de infrarrojos. Luego un sensor recoge la información recibida de los rayos infrarrojos. Se obtuvieron tres espectros de infrarrojo por cada muestra.

3.5. Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas se realizó en dos tratamientos distintos, agua y *Manvert Silikon*, usando tres réplicas biológicas por tratamiento, cada una con dos réplicas técnicas.

A las 24 horas tras la aplicación del tratamiento, se pesaron las raíces y se trituraron en frío con un mortero empleando el tampón Tris HCl 50 mM pH 7,5 a una relación 1:4 (p:v). Luego se centrifugaron a 4°C durante 30 min a 18.000 g y una vez obtenido el sobrenadante se determinó su volumen. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método Bradford. Para ello se prepararon tubos eppendorf de 1 ml con 50 µl de muestra, 450 µl de agua destilada y 500 µl de reactivo de Bradford. Los tubos fueron incubados 30 min en oscuridad y luego se procedió a medir las absorbancias a 590 nm frente a un blanco en el que se sustituyó la muestra por tampón Tris-HCl 50 mM pH7,5.

Las absorbancias obtenidas se compararon con una recta patrón (Tabla 3) que se realizó empleando seroalbúmina bovina (BSA) y el proceder fue el mismo que con las muestras.

Tabla 3: Concentraciones de BSA empleadas en la recta patrón por el método Bradford.

TUBOS	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BSA (mg/50µl)	0	0.0025	0.0050	0.0075	0.0100	0.0125	0.0150	0.0175	0.0200	0.0225

3.6. Expresión del gen LHA

Este ensayo se realizó en dos tratamientos (agua y *Manvert Silikon*) con el objetivo de evaluar si el fortificante induce la expresión del gen LHA (que se encuentra en las raíces) en plantas que no han estado en contacto con el AlCl₃. Cada tratamiento constó de dos réplicas

A las 24 horas del tratamiento de las muestras, éstas se trituraron con nitrógeno líquido en morteros previamente autoclavados. A continuación, se extrajo el ARN con el kit Aurum™ Total RNA de la empresa Bio-Rad siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cuantificación de la concentración del ARN que había en cada réplica se realizó con el Nanodrop ND-1000 de Thermo Scientific, también se determinó el ratio de absorbancia 260/280 para conocer la calidad de la extracción. A continuación, se obtuvieron alícuotas de ARN a una concentración de 200 ng/μl. A partir de aquí se empleó el kit RevertAid First Strand ADNc Synthesys de la empresa Thermo Fisher Scientific para sintetizar ADNc.

Posteriormente, las réplicas se llevaron al SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) para la realización de una PCR a tiempo real y así comparar la expresión del gen LHA con otro gen constitutivo (LeTUB) en el genoma de las plantas.

La PCR en tiempo real permitió cuantificar la expresión génica empleando los ciclos Ct (ciclo umbral). Consiste en la acumulación de una señal de fondo fluorescente donde el Ct o ciclo umbral sería el número de ciclos requeridos para que la señal exceda el ruido de fondo, por lo que cuanto más cantidad de ácidos nucleicos haya en la muestra, menor es el Ct (Schmittgen y Livak, 2008).

La mezcla de reacción de PCR consistió en un volumen total de 50 μl constituido por 0.3μl de cada cebador (20 uM), 2.5μl de ADNc y 1xIQ SYBR Green Supermix (BioRad). El protocolo de ampliación consistió de una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación: 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58°C y 50 segundos a 72°C. Por último, la extensión final fue de 5 min a 72°C.

Los cebadores empleados fueron los siguientes: LHAF GGATTGCTTTCACCCG; LHAR TTCGCTCCCATCACGACACC; TubF GTGTTACTTGCTGTTTGAGA; TubR TTTGTGCTCATCTTACCC (Yang *et al.*, 2011).

A partir de los resultados de la PCR en tiempo real, se comprobó la existencia de un único pico en las curvas de "melting" y que nos demuestra la amplificación de una sola secuencia del gen que queremos amplificar. La expresión del gen LHA fue calculada mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008) ya que supone que la eficiencia de la PCR del gen constitutivo es cercana a 1 al igual que la PCR del gen LHA.

3.7. Análisis estadístico de los datos

Los datos del crecimiento vegetativo de las plantas y contenido en proteínas, fueron analizados con Microsoft Office Excel 2007 donde se calcularon y representaron, mediante diagrama de barras, los valores de media y desviaciones típicas. A continuación, se empleó el programa IBM SPSS Statistics 23 para realizar un análisis de ANOVA. Los datos obtenidos de los espectros de FTIR se analizaron con el programa OPUS para realizar la corrección de la línea base y su normalización. Con Microsoft Office Excel 2007 se filtraron las longitudes de onda de interés (800-1800) y se realizó

el promedio de los datos (de los 3 espectros) para obtener un único espectro por tratamiento. Los espectros se representaron mediante un diagrama de dispersión. Además, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) mediante IBM SPSS Statistics 23.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Biometría: determinación del crecimiento vegetativo

Por cada tratamiento se hicieron 6 réplicas y cada una de ellas con 3 plantas (compensando su tamaño entre las repeticiones) haciendo un total de 18 plantas por tratamiento y 72 por método de aplicación. En total se emplearon 144 plantas.

Tras 11 días de incubación con distintos tratamientos, se observó que las plantas sometidas a $AlCl_3$, tanto en solución (Figura 1) como en pulverizado (Figura 2), presentaban unas raíces muy reducidas y dañadas. Por ello se puede deducir que el pequeño tamaño de las plantas, en comparación con las demás, sea debido al efecto de dicho elemento sobre las raíces. A su vez, cabe destacar la presencia de clorosis general en las hojas que puede ser a causa de la falta de nutrientes.



Figura 1: Plantas de tomate a los 11 días de estar sometidas a los distintos tratamientos en solución.



Figura 2: Plantas de tomate a los 11 días de estar sometidas a los distintos tratamientos en pulverizado.

4.1.1. Tratamientos con *Manvert Silikon* en solución

A pesar de que en la Figura 1 se ven efectos claros de aluminio sobre las plantas de tomate, y que la Figura 3 muestra pesos fresco y seco bajos (respectivamente) en los tratamientos con $AlCl_3$ o con *Manvert Silikon* y $AlCl_3$; al trabajar con un nivel de significación del 95%, los ANOVAs realizados revelaron p-valores > 0.05 en todos los casos, y por ello, el efecto del aluminio no es significativo y la aplicación del *Manvert Silikon* no acaba de resultar efectiva ya que no hay diferencias significativas.

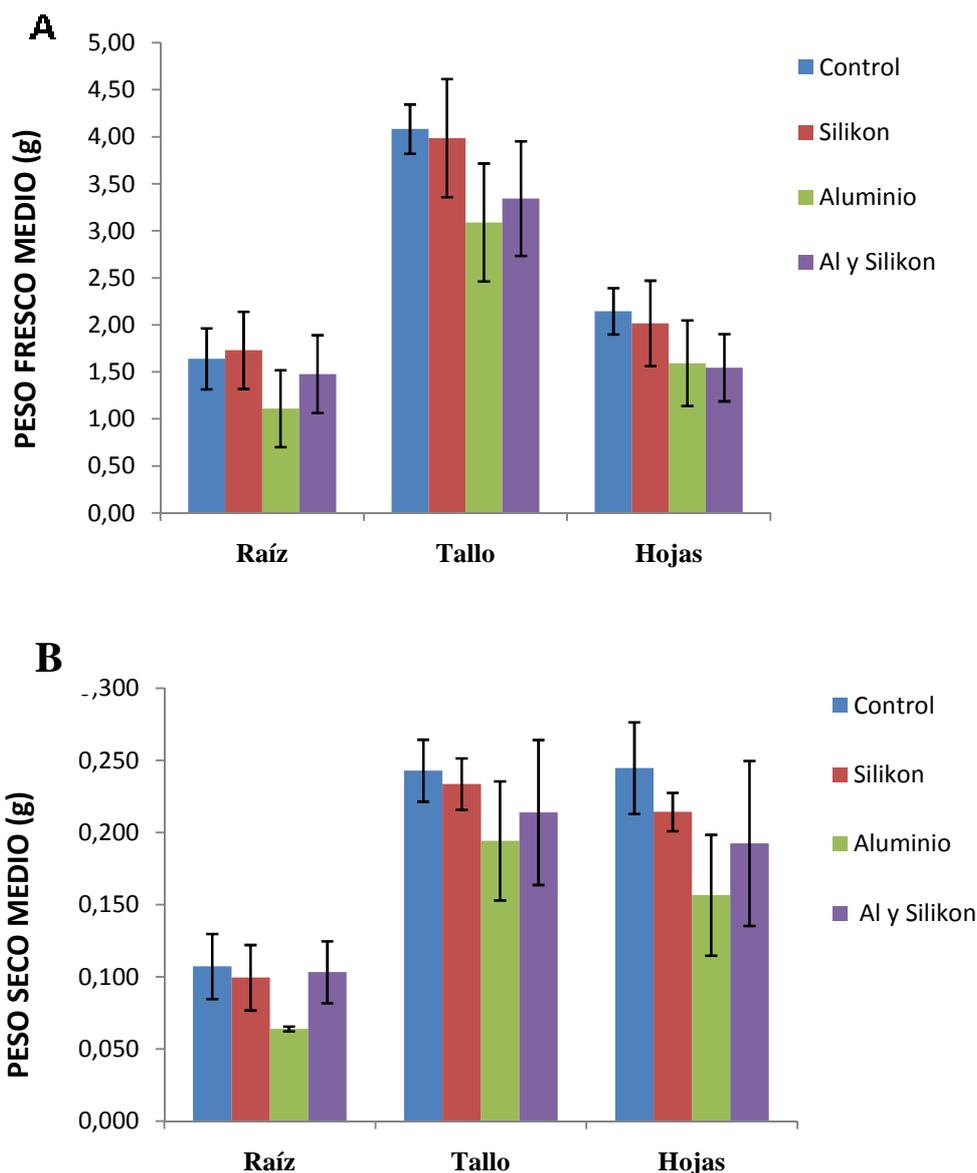


Figura 3: Representación del peso fresco (A) y seco (B) medio de los distintos órganos del tomate con *Manvert Silikon* en solución. Las desviaciones típicas indican el grado de dispersión que presentan los datos con respecto a la media.

Esto puede deberse al crecimiento heterogéneo de las réplicas y que no se llevase a cabo una buena compensación de estas; o bien, a que el efecto del *Manvert Silikon* no fue lo suficientemente grande como para ser detectado con nuestro tamaño muestral.

Una posible solución sería aumentar el tamaño muestral y así reducir las desviaciones típicas (para que no se solapen y reducir la influencia del azar) y posiblemente conseguir detectar efectos más pequeños del *Manvert Silikon*.

Aunque en nuestro caso no hemos detectado diferencias significativas en la masa de las mismas, autores como Nogueirol *et al.* (2015) han demostrado que en suelos tropicales ácidos y con gran concentración de aluminio, existen cambios en el tamaño y longitud de raíces y tallos en las plantas de tomate.

4.1.2. Tratamientos con *Manvert Silikon* pulverizado

Si nos fijamos en la Figura 4, las plantas tratadas solo con $AlCl_3$ o con *Manvert Silikon* y $AlCl_3$ se ven afectadas dado que los pesos fresco (Figura 4A) y seco (Figura 4B) de los distintos órganos son inferiores al del resto de tratamientos.

Aun así, las plantas que estuvieron tratadas con *Manvert Silikon* y $AlCl_3$ presentan pesos superiores a las que estuvieron solo con $AlCl_3$.

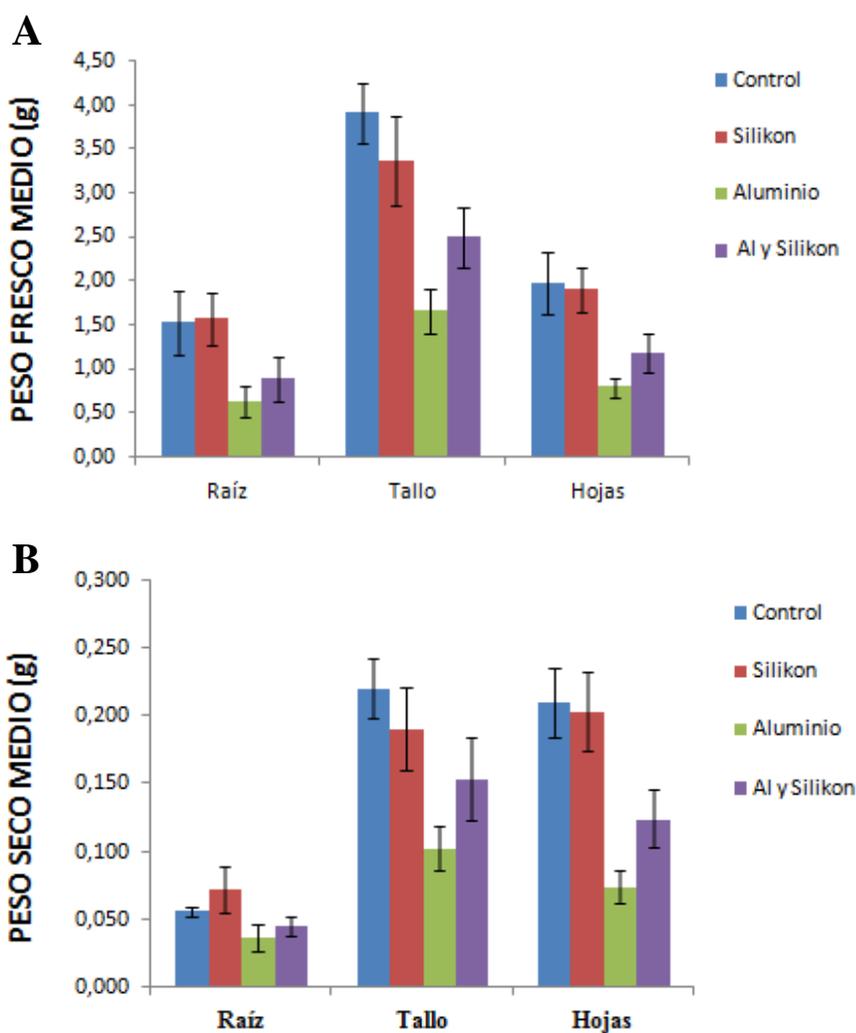


Figura 4: Representación del peso fresco (A) y seco (B) medio de los distintos órganos del tomate mediante pulverizado de *Manvert Silikon*. Las desviaciones típicas indican el grado de dispersión que presentan los datos con respecto a la media.

El análisis de ANOVA realizado reveló p-valores < 0.05 para todos los casos, y por ello, al trabajar con un nivel de significación del 95%, se puede rechazar la hipótesis que afirma que no hay diferencias significativas en los pesos fresco y seco entre tratamientos pulverizados; es decir, el test ha sido significativo.

Dado que en este caso (pulverizado) hay diferencias significativas, se puede decir que este es el modo de aplicación más eficiente del *Manvert Silikon*.

4.2. Composición de la pared radicular por método FTIR

De las absorbancias obtenidas, de cada una de las muestras, a partir del número de onda se realizó una representación de espectros diferencia (Figura 5) (siendo estos la resta del espectro obtenido menos los valores correspondientes en el control) para cada tratamiento quedando reflejada la composición cualitativa de las paredes radicales.

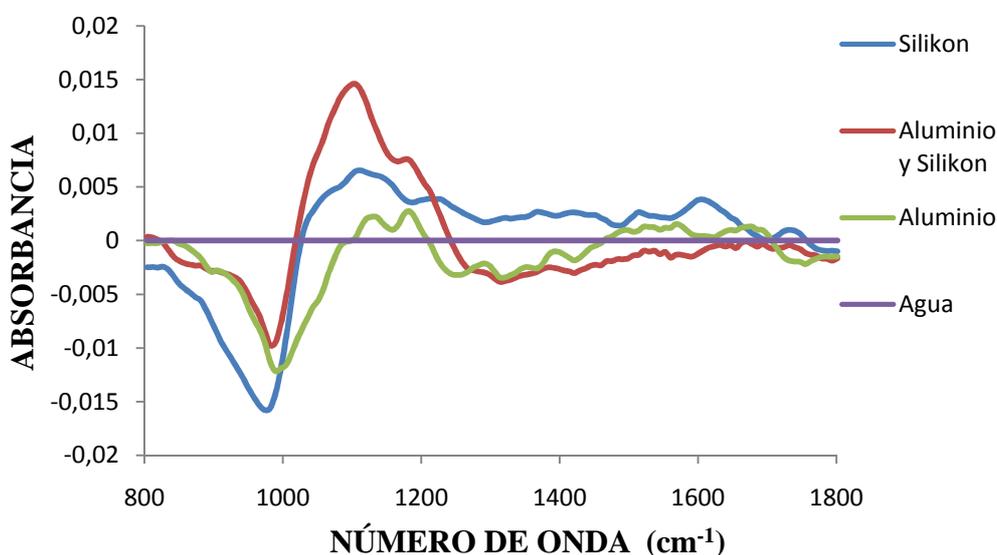


Figura 5: Representación de los espectros diferencia de FTIR de cada una de las muestras para cada tratamiento. Obtenidos a partir de la diferencia de los espectros de las plantas tratadas con *Manvert Silikon*, $AlCl_3$ + *Manvert Silikon*, y $AlCl_3$ con el espectro de las tratadas con agua (control).

En este gráfico (Figura 5), las muestras tratadas con agua se corresponden al valor 0 para todos los números de onda dado que a partir de su espectro se obtuvieron los espectros diferencia de los demás tratamientos; y además, al no estar sometidas al estrés por $AlCl_3$ muestran la composición de referencia de las paredes celulares de las raíces de una planta de *S. lycopersicum*. Los espectros diferencia de las demás muestras reflejan modificaciones en la composición de su pared debido al estrés al que se vieron sometidas.

Los principales picos de absorbancia de cada espectro se encuentran en torno a los 1100cm^{-1} , siendo unos más altos que otros dependiendo del tratamiento aplicado. Esta región del espectro ($800\text{-}1200\text{cm}^{-1}$) se corresponde con polisacáridos de pared como

celulosas, pectinas, ramnagalacturonanos y xiloglucanos (Fernández-Pérez *et al.*, 2015). De esta forma se puede observar que las paredes tratadas con AlCl_3 y *Manvert Silikon*, *Manvert Silikon* o solo AlCl_3 están enriquecidas en estos componentes frente a las plantas control, siendo las que más se diferencian del control los dos primeros casos.

Entre los $1200\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ las muestras tratadas con *Manvert Silikon* presentan valores más altos en todo el rango, destacando un pequeño pico de absorbancia en torno a los 1600 cm^{-1} , que está relacionado con compuestos con anillos aromáticos como la formación de ligninas ($1400\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$) (Fernández-Pérez *et al.*, 2015). Esto puede deberse a la capacidad protectora del fitofortificante que promueve el engrosamiento de las paredes; mientras que en casos en los que está presente el aluminio la concentración de dicho compuesto en la pared no es tan alta.

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para reducir el número de variables en el que se recoge la varianza de los datos obtenidos mediante FTIR. Para ello se agruparon los números de onda en componentes principales (CP) de las que se escogieron los tres primeros que agrupan un 91% de la varianza de los datos.

En las siguientes gráficas (Figura 6, 7 y 8) se representan las puntuaciones de los distintos casos para esos tres componentes principales:

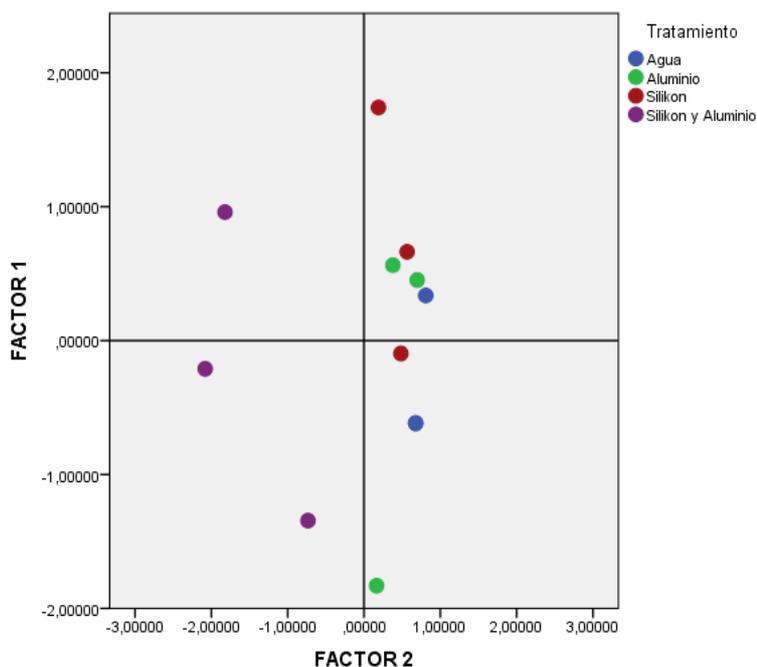


Figura 6: Representación de los casos en función de los factores 1 y 2.

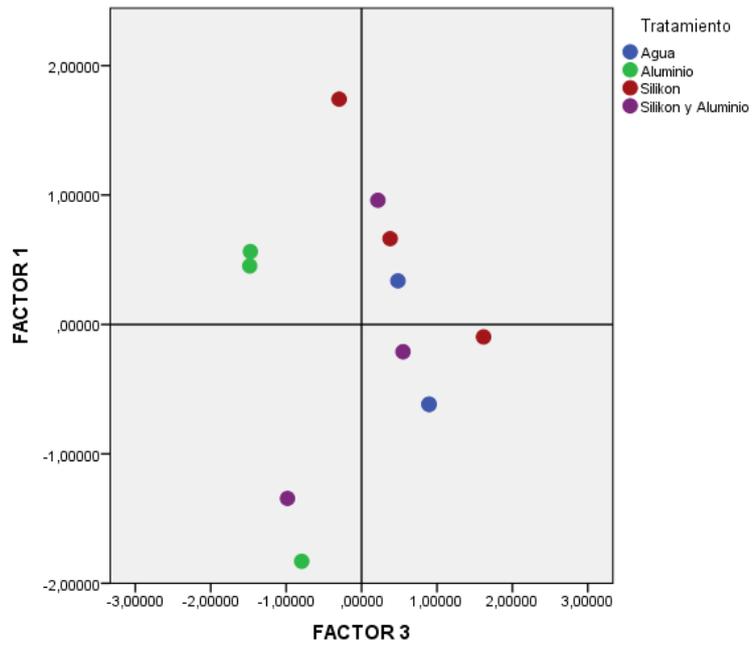


Figura 7: Representación de los casos en función de los factores 1 y 3.

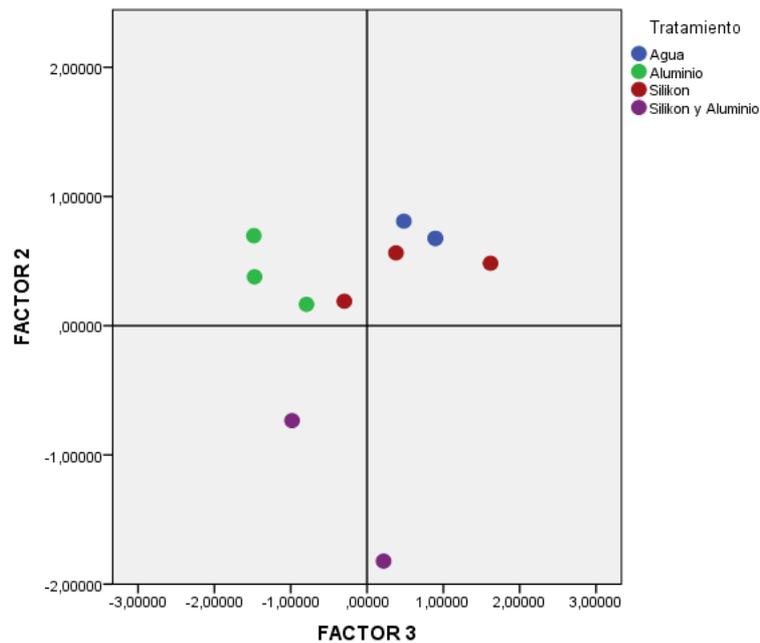


Figura 8: Representación de los casos en función de los factores 2 y 3.

En las Figuras 7 y 8 se observa una agrupación clara del tratamiento $AlCl_3$ en función del factor 3 sugiriendo que el $AlCl_3$ provoca alteraciones en las paredes radicales y en las Figuras 6 y 8 el grupo de *Manvert Silikon* y $AlCl_3$ se separa bien en función del factor 2; lo que puede estar indicando que la composición de la pared se diferencia del resto de tratamientos.

El siguiente gráfico (Figura 9) muestra qué rangos del espectro están recogidos en cada uno de los factores (CP) obtenidos en el ACP, permitiendo interpretar el significado biológico de los factores:

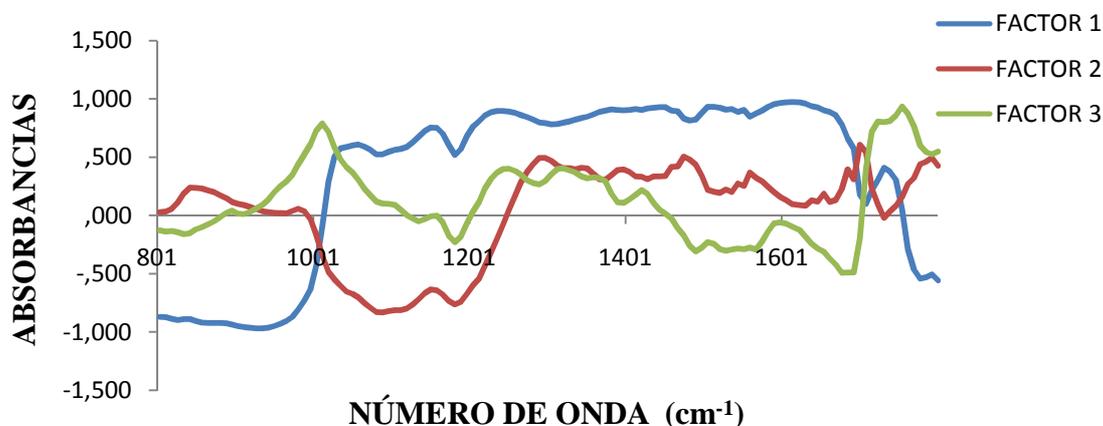


Figura 9: Representación de los espectros obtenidos por el FTIR haciendo distinción entre factores.

Este gráfico nos muestra que el factor 1 explica la zona del espectro relacionada con los compuestos fenólicos ($1400-1650\text{ cm}^{-1}$) y los polisacáridos ($800-1200\text{ cm}^{-1}$). El factor 2 explica la zona del espectro relacionada con los compuestos fenólicos ($1400-1650\text{ cm}^{-1}$) por lo que muestras con puntuaciones bajas en este factor, como en el caso de las muestras tratadas con AlCl_3 y *Manvert Silikon* (Figuras 6 y 8), tendrán reducido su contenido en ligninas con respecto a los demás tratamientos. Esto se refleja también en la Figura 6 en la que, aunque pequeña, se observa que hay diferencias en este rango entre muestra control y AlCl_3 y *Manvert Silikon*. Y por último, el factor 3 explica la zona del espectro relacionado con una zona concreta y definida de los polisacáridos (sobre los 990 cm^{-1}) y también una zona concreta de los compuestos fenólicos (sobre los 1700 cm^{-1}), por lo que muestras, con puntuaciones bajas de este factor, como el AlCl_3 (Figuras 7 y 8), tendrán reducido su contenido en dichos compuestos respecto al control (Fernández-Pérez *et al.*, 2015).

El AlCl_3 actúa causando estrés en las plantas a ciertas concentraciones por lo que sus paredes presentan más contenido en fenoles y polisacáridos y esto se traduce en raíces pequeñas y menos desarrolladas (Figura 1 y 2). Sin embargo, la aplicación del *Manvert Silikon*, en presencia de AlCl_3 , hace que el contenido en polisacáridos aumente, y tal y como sostiene Yang *et al.* (2008) con los cultivos de arroz, las paredes celulares de plantas tolerantes contienen mayor cantidad de polisacáridos (Figura 5) que las plantas susceptibles. Lo que demuestra que el fitofortificante induce la síntesis de polisacáridos de pared para engrosarla y hacerla más impermeable a la entrada del aluminio.

4.3. Cuantificación de proteínas totales

Considerando que el contenido en proteínas de las muestras que estuvieron en agua se ha tomado como la cantidad constitutiva en una planta no expuesta a estrés, el ANOVA reveló un p-valor de 0.638 (> 0.05) mostrando que no se puede rechazar la hipótesis que afirma que no hay diferencias entre tratamientos en solución (Figura 10A).

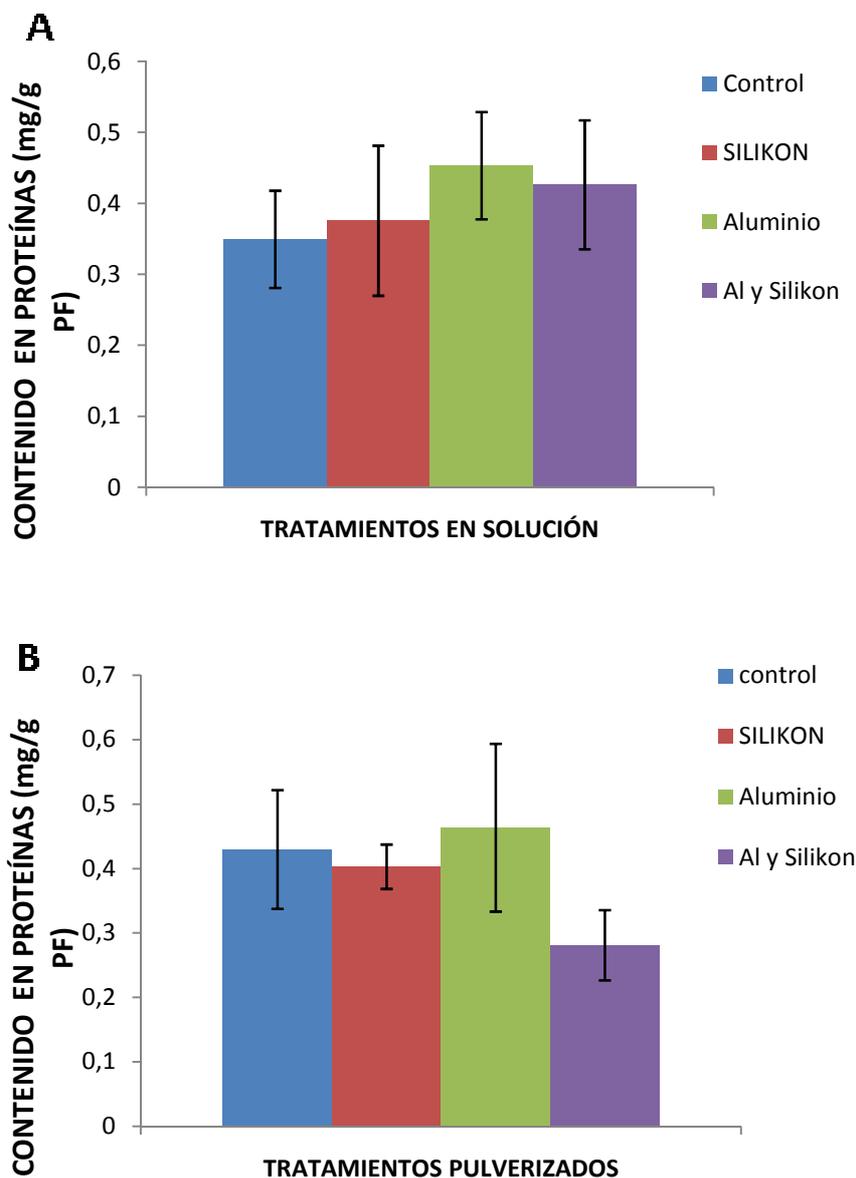


Figura 10: Representación del contenido en proteínas de cada tratamiento con *Manvert Silikon* en solución (A) *Manvert Silikon* pulverizado (B) por el método de Bradford. Las desviaciones típicas indica el grado de dispersión que presentan los datos con respecto a la media.

En cuanto a las plantas tratadas con *Manvert Silikon* mediante pulverización (Figura 10B), el ANOVA reveló un p-valor de 0.243 (> 0.05) mostrando que no se

puede rechazar la hipótesis que afirma que no hay diferencias entre tratamientos en pulverizado.

Lo que cabría esperar en este caso, es que las plantas expuestas a estrés por AlCl_3 y al fitofortificante indujesen la síntesis de proteínas, por encima del control, como método de protección. Según Ma *et al.* (2001), la exposición prolongada al AlCl_3 en cultivos de arroz hace que este compuesto active cascadas de señales que a su vez provocan la transcripción de ciertos genes que codifican para proteínas involucradas en la producción de calosa, la cual actúa de barrea física inmovilizando al aluminio en la pared celular (Jones *et al.*, 2006); o bien para proteínas transportadoras de ácidos orgánicos a través de las membranas plasmáticas como la H^+ -ATPasa expresada en las raíces del tomate.

A la vista de nuestros datos y teniendo en cuenta que la secreción de ácidos orgánicos al exterior se puede producir mediante la activación de ATPasas ya sintetizadas, podemos decir que el tiempo de exposición de las plantas en los distintos tratamientos no fue suficientemente grande como para inducir la síntesis de nuevas proteínas que secretasen los ácidos orgánicos al exterior, lo que explicaría los resultados obtenidos.

4.4. Expresión del gen LHA

En este ensayo cuantificamos la expresión del gen LHA en las plantas de tomate expuestas y no expuestas a *Manvert Silikon*, comparándola con la expresión de un gen constitutivo LeTUB usado como referencia.

La Figura 11 muestra que la expresión del gen LHA es mayor cuando se aplica *Manvert Silikon* en solución, es decir, que induce la expresión de dicho gen; sin embargo, en pulverizado esto no es tan evidente por lo que para saber si hay diferencias en la expresión media del gen LHA entre las aplicaciones (solución y pulverizado), realizamos un test t-Student donde el p-valor fue de 0.342 (>0.05), y por ello no hay evidencias para afirmar que la expresión media del gen LHA sea diferente entre métodos de aplicación.

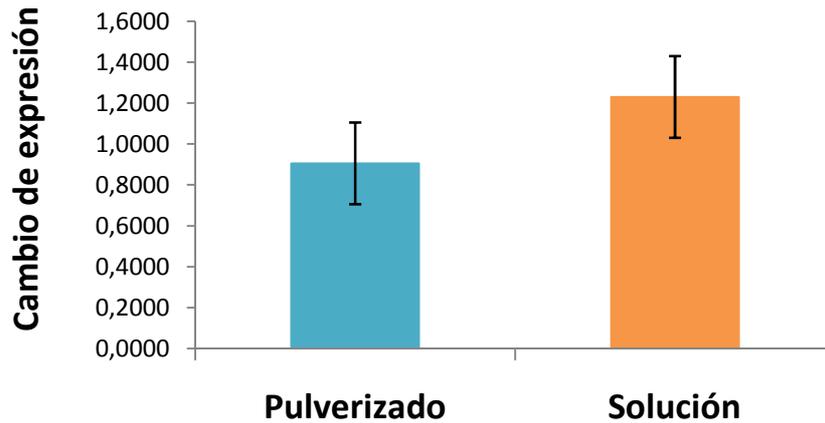


Figura 11: Representación de la expresión del gen LHA en plantas sometidas a *Manvert Silikon* en ambos tratamientos.

Cuando las raíces de las plantas de tomate están expuestas al AlCl_3 , se induce el gen LHA, que codifica para una H^+ -ATPasa que se encuentra en la membrana plasmática de las raíces (Yang *et al.*, 2011) cuya función es regular la salida de ácidos orgánicos si el AlCl_3 se encuentra en el medio, es decir, este gen actúa como defensa ante dicho estrés.

En nuestro caso, los resultados concuerdan con los de proteínas ya que, el aluminio presente induce la activación de proteínas existentes, como las ATPasas, para evitar la entrada del metal.

5. CONCLUSIONES

- La pulverización del *Manvert Silikon* favorece al crecimiento y desarrollo de las plantas al producir cambios en el peso de las mismas.
- El *Manvert Silikon* induce cambios en la composición de la pared aumentando el contenido en polisacáridos mientras que el aluminio los disminuye.
- Los tratamientos aplicados a las muestras en presencia y ausencia de *Manvert Silikon* no producen cambios en el contenido en proteínas.
- Las aplicaciones realizadas (solución y pulverizado) de *Manvert Silikon* no muestran exista mayor expresión del gen LHA que en el caso control.

CONCLUSIÓNS

- A pulverización do *Manvert Silikon* favorece ó crecemento e desenrolo das plantas ao producir cambios no peso das mesmas.
- *Manvert Silikon* induce cambios na composición da parede aumentando o contido en polisacáridos mentres que o aluminio diminúe.
- Os tratamentos aplicados ás mostrás en presenza e ausencia de *Manvert Silikon* non producen cambios no contido en proteínas.
- As aplicacións realizadas (solución e pulverizado) de *Manvert Silikon* non mostran que haxa maior expresión do xene LHA que no caso control.

CONCLUSIONS

- The spraying of *Manvert Silikon* benefits the growth and development of tomato plants by producing changes in their weight.
- *Manvert Silikon* induces changes in cell wall composition by increasing the content of polysaccharides, while aluminum decreases it.
- The treatments applied to the samples in the presence or absence of *Manvert Silikon* do not produce changes in the protein content.
- The treatments made (solution and spraying) of *Manvert Silikon* do not show more expression of the LHA gene than in the control case.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Achary, V. M. M., Parinandi, N. L. y Panda, B. B. (2013). Calcium channel blockers protect against aluminium-induced DNA damage and block adaptive response to genotoxic stress in plant cells. *Toxicology and Environmental Mutagenesis* , 751 (2):130-138.
- Asociación Española de Fitosanitarios y Sanidad Ambiental (AEFISA). (2012). Fitofortificantes. <http://www.aefisa.es/productos/otros-medios-de-defensa-vegetal> (Última consulta 30/05/2017).
- Carreño, A. y Chaparro-Giraldo, A. (2013). Tolerancia al aluminio en especies vegetales: mecanismos y genes. *Universitas Scientárvum* , 18 (3): 283-310.
- Casierra, P. F. y Aguilar-Avenidaño, O. E. (2007). Estrés por aluminio en plantas: reacciones en el suelo, síntomas en vegetales y posibilidades de corrección. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hrtícolas* , 1 (2): 246-257.
- Delhaize, E., Ryan, P. R. y Randall, P. J. (1993). Aluminium Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* , 103: 695-702.
- Diatom. (2010). *El silicio y la resistencia de las plantas al ataque de hongos*.<http://www.diatom.com.br/es-ES/noticias/item/articulo-el-silicio-y-la-resistencia-de-las-plantas-al-ataque-de-hongos-patogenos>. (Última consulta 05/06/17).
- Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas vivas (FEPEX). (2016). *Datos del sector: Exportación/importación españolas de frutas y hortalizas*. <http://www.fepe.es/datos-del-sector/exportacion-importacion-espa%C3%B1ola-frutas-hortalizas> (Última consulta 30/05/17).
- Fernández-Pérez, F., Vivar, T., Pomar, F., Pedreño, M. A. y Novo-Uzal, E. (2015). Peroxidase 4 is involved in syringyl lignin formation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* , 175: 86-94.
- Huynh, V. B., Repellin, A.,Zuily-Fodil, Y. y Pham-Thi, A. T. (2012). Aluminum stress response in rice: effects on membrane lipid composition and expression of lipid biosynthesis genes. *Physiologia Plantarum* , 146(3): 272-284.
- Jardín Botánico de Castilla La Mancha (UCLM). Albacete. (2012). *Tomate (Solanum lycopersicum L.)* <http://www.jardinbotanico-clm.com/wp-content/uploads/2012/04/TOMATE.pdf>(Última consulta30/05/17).

- Jones, D. L., Blancaflor, E. B., Kochian, L. V. y Gilroy, S. (2006). Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1309-1318.
- Kochian, L. (1995). Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. *Physiology and Plant Molecular Biology* , 46 (1): 237-260.
- Kopittke, P. M., Moore, K. L., Lombi, E., Gianoncelli, A., Ferguson, B. J., Blamey, F. P. C., Menzies, N. W., Nicholson, T. M., McKenna, B. A., Wang, P., Gresshoff, P. M., Kourousias, G., Webb, R. I., Green, K. y Tollenaere, A.(2015). Identification of the Primary Lesion of Toxic Aluminum in Plant Roots. *Plant Physiology* , 167: 1402-1411.
- Ma, J. F., Ryan, P. R. y Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role os organic acids. *Trends in Plant Science*, 6 (6): 273-278.
- Manvert: Bioestimulantes y nutrientes avanzados. *Bioestimulantes: manvert silikon*. <http://www.manvert.com/product/manvert-silikon/> (Última consulta 30/05/2017).
- Nogueirol, R. C., Monteiro, F. A., Gratão, P. L., Borgo, L. y Azevedo, R. A. (2015). Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. *Environ Monit Assess*, 187 (3): 73.
- Peregüez-Cardona, O. E. (2011). Respuesta fisiológica del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Unapal-Maravilla, a diferentes láminas de riego y su efecto en la absorción de nutrientes. *Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Facultad de Ciencias Agropecuarias*. <http://www.bdigital.unal.edu.co/6496/1/7008505.2011.pdf> (Última consulta: 13/06/17).
- Schmittgen, T. D. y Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR by the comparative Ct method. *Nature Protocols*, 3 (6): 1101-1108.
- Yang, J. L., Li, Y. Y., Zhang, Y. J., Zhang, S. S., Wu, Y. R., Wu, P. y Zheng, S. J. (2008). Cell Wall Polysaccharides Are Specifically Involved in the Exclusion of Aluminium from the Rice Root Apex. *Plant Physiology*, 146: 602-611.
- Yang, J. L., Zhu, X. F., Peng, Y. X., Zheng, C., Ming, F. y Zheng, S. J. (2011). Aluminium regulates oxalate secretion and plasma membrane H⁺-ATPase activity independently in tomato roots. *Planta* , 234: 281-291.