



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grao

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

Efecto do *Manvert Silion* na protección do tomate fronte ao aluminio.

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

Tania Rodríguez Hayas

Julio, 2018

*Tutores académicos: Cristina Silvar Pereiro,
Alba García Ulloa*

ÍNDICE

Resumen/Resumo/Abstract.....	1
1. Introducción.....	3
1.1. La planta del tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	3
1.2. El aluminio.....	3
1.3. Fitofortificantes: Manvert Silikon.....	4
2. Objetivos.....	6
3. Material y métodos.....	7
3.1. Material vegetal.....	7
3.2. Tratamientos.....	7
3.3. Determinación del crecimiento vegetativo.....	8
3.4. Cuantificación de proteínas.....	8
3.5. Análisis de la expresión del gen LHA.....	9
3.6. Análisis de la composición de la pared celular por FTIR.....	9
3.7 Análisis estadístico de los datos.....	10
4. Resultados y discusión.....	11
4.1. Determinación del crecimiento vegetativo.....	11
4.2. Cuantificación de proteínas.....	13
4.3. Análisis de la expresión del gen LHA.....	14
4.4. Análisis de la composición de la pared celular por FTIR.....	14
5. Conclusiones/Conclusións/Conclusions.....	18
6. Bibliografía.....	20

RESUMEN

El aluminio es el factor más limitante para el crecimiento de las plantas en los suelos ácidos pero sus mecanismos de toxicidad están poco estudiados.

En este trabajo se evaluó la eficiencia del *Manvert Silikon*, de la empresa Biovert S.L., ante el estrés por aluminio empleando el tomate (*Solanum Lycopersicum* L.).

Uno de los principales efectos del aluminio es la inhibición del crecimiento radicular, asociada a la despolarización de la membrana plasmática de las raíces, así como la inhibición de la actividad H⁺-ATPasa. Además, el aluminio induce la secreción de ácidos orgánicos y compuestos fenólicos a través de la raíz, así como la modificación de la expresión génica y actividad enzimática. Para comprobar estos efectos del aluminio y saber si el Silikon protege a la planta y con qué mecanismos lo hace, se llevó a cabo la medida del crecimiento vegetativo de las plantas (raíces, tallo y hojas), la cuantificación de proteínas, y el análisis de la expresión del gen LHA que codifica para la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de las raíces. Finalmente, se analizaron los cambios en la composición de las paredes celulares de la raíz.

Con los resultados obtenidos podemos afirmar que *Manvert Silikon* favorece el crecimiento de la planta, provoca cambios en la composición de la pared de las células de la raíz, así como un aumento de la cantidad de proteínas, aunque no induce a la expresión del gen LHA.

RESUMO

O aluminio é o factor máis limitante para o crecemento das plantas nos solos ácidos pero os seus mecanismos de toxicidade están pouco estudados.

Neste traballo avalíouse a eficiencia do *Manvert Silikon*, da empresa Biovert S.L., ante o estrés por aluminio empregando o tomate (*Solanum Lycopersicum* L.).

Un dos principais efectos do aluminio é a inhibición do crecemento radicular, asociada á despolarización da membrana plasmática das células das raíces, así coma á inhibición da actividade H⁺-ATPasa. Ademais, o aluminio induce a secreción de ácidos orgánicos e compostos fenólicos a traveso da raíz, así coma a modificación da expresión xénica e actividade enzimática. Para comprobar estes efectos do aluminio e saber se o Silikon protexe a planta e con que mecanismos o fai, levouse a cabo a medida do crecemento vexetativo das plantas (raíces, tallos e follas), a cuantificación de proteínas das raíces e o análise da expresión xénica do xene LHA que codifica para a actividade H⁺-ATPasa da membrana plasmática das raíces. Finalmente, analizáronse os cambios na composición das paredes celulares da raíz.

Cos resultados obtidos podemos afirmar que *Manvert Silikon* favorece o crecemento da planta, provoca cambios na composición da parede das células da raíz, así coma o aumento da cantidade de proteínas, aínda que non induce á expresión do xene LHA.

ABSTRACT

Aluminium is the most limiting factor of plant growth in acid soils but its toxicity mechanisms are poorly studied.

In this work we evaluate the efficiency of Manvert Silikon, from the company Biovert S.L., in aluminium stressed tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.).

One of the main effects of aluminium is the inhibition of root growth, associated to the plasma membrane depolarization, and the inhibition of the H-ATPase activity. In addition, aluminium induces the efflux of organic acids and phenolic compounds through the root, and the modification of gene expression and enzyme activity. To prove these aluminium effects and know if Silikon protects the plant and how does it, we measured the growth of plants (roots, stems, leaves), we quantified the proteins content and we analysed the expression of the LHA gene, which encodes for a plasma membrane protein with H-ATPase activity. Finally, we analyzed the changes on the cell wall composition of root cells.

Our results show that Manvert Silikon enhances the plant growth, induces changes on the root cell walls composition and increases the protein quantity, but it does not induce the expression of the LHA gene.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La planta del tomate (*Solanum lycopersicum* L. 1793):

El tomate es un cultivo hortícola perteneciente a la diversa familia de las Solanáceas, que incluye más de 3000 especies (Knapp *et al.* 2016). Las Solanáceas contienen algunas especies de uso alimenticio, farmacéutico u ornamental. El tomate tiene su origen en los Andes y es una contribución de México para el mundo, siendo el primer producto de agricultura en ser exportado. Los colonizadores españoles le enseñaron el tomate al resto del mundo diversificando sus usos (Medina *et al.* 2017). *S. lycopersicum* era previamente conocida como *Lycopersicon esculentum* Mill, pero datos de ambas morfologías y las secuencias moleculares apoyaron su inclusión en el género *Solanum* L. (Knapp *et al.* 2016.).

El tomate es uno de los cultivos hortícolas más importantes del mundo, siendo el segundo en importancia dentro del género, debido a su papel fundamental en los hábitos alimenticios de una amplia parte de la población mundial (Florio *et al.* 2008). El tomate cultivado ocupa una amplia variedad de hábitats (Knapp *et al.* 2016). En los países tropicales, su cultivo se limita a la estación seca de invierno, debido a los bajos rendimientos y a la baja calidad de los frutos en las siembras de fuera de este período, efecto que se agrava si estas elevaciones de temperatura coinciden con períodos lluviosos, incrementándose la incidencia de enfermedades y plagas, fundamentalmente, cuando la explotación del cultivo se realiza a cielo abierto (Florio *et al.* 2008).

Esta planta es un cultivo de verano, aunque con las nuevas tecnologías se ha conseguido cultivarlo todo el año. Su ciclo de vida es anual. Es una herbácea de múltiples tallos verde oscuro con pelos finos y cortos, que posee hojas compuestas alternas con bordes ligeramente serrados densamente pelosas de entre 10 y 25 centímetros de longitud, con glándulas que le proporcionan un olor característico. Su floración producida en ramilletes de 8-10 flores amarillas de 5 pétalos y relativamente pequeñas, da lugar a los frutos (tomates), bayas gruesas y carnosas de color rojo que en su interior tienen celdas con pequeñas semillas de color claro. La temperatura óptima de desarrollo oscila entre los 18 y 30°C durante el día y entre 15 y 20°C por la noche; la maduración del fruto está influida por la temperatura en lo referente tanto a la coloración como a la precocidad. La humedad relativa tiene gran interés, sobre todo durante la dehiscencia polínica y la propia polinización, estando la más adecuada entre un 55 y un 75% (Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad 1992).

Puede aparecer espontáneamente en medio de otros cultivos. Algunas variedades se encuentran silvestres en vegetación secundaria tropical, en áreas perturbadas y como ruderal, pero su distribución habitual es en climas tropicales. La forma silvestre de esta planta se recolecta y la forma domesticada se cultiva por sus frutos (Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad 1992).

1.2. El Aluminio:

El aluminio (Al) es el factor limitante del crecimiento más importante en la mayoría de los suelos ácidos en el mundo, afectando hasta un 70% de la tierra cultivable del mundo que es

potencialmente utilizada para la producción de comida y biomasa. La acidificación del suelo es un proceso continuo bajo unas condiciones climáticas en las que la lluvia excede la evapotranspiración. Asimismo, el uso continuo de fertilizantes que contienen amonio y amidas o de la fijación de nitrógeno por las legumbres, contribuyen a la acidificación del suelo, agravando la toxicidad del aluminio y contribuyendo a incrementar el área afectada. Además, la lluvia ácida incrementa la acidez del suelo y la solubilidad del aluminio (Rengel 1992).

Los efectos fisiológicos de la toxicidad por aluminio y los mecanismos de tolerancia no están muy bien comprendidos. Si bien se ha propuesto que uno de los efectos más destacados de este elemento es la reducción del crecimiento radicular (Rengel 1992).

A pesar de que la toxicidad del aluminio ha sido extensamente estudiada en las plantas de cultivo monocotiledóneas, el mecanismo del impacto del aluminio en plantas dicotiledóneas importantes económicamente está pobremente entendido. Existe un patrón espacial en la inhibición del crecimiento de las raíces inducida por este elemento, la cual está estrechamente asociada con una inhibición de la actividad H-ATPasa y con una reducción de la superficie cargada negativamente de la membrana plasmática en los segmentos apicales de las raíces de calabaza (Ahn *et al.* 2004). Este trabajo proporciona la primera prueba circunstancial de una despolarización en una zona específica de la superficie de la membrana plasmática potencialmente asociada con la inhibición de la actividad H-ATPasa. Estos efectos pueden indicar una interacción directa con la H-ATPasa de la membrana plasmática.

Está demostrado que la secreción de oxalato inducida por aluminio y la actividad H-ATPasa de la membrana plasmática radicular del tomate están poco relacionadas (Yang *et al.* 2011). El aluminio regula independientemente la secreción de oxalato y la actividad H-ATPasa de las raíces del tomate. El análisis de los niveles de expresión de los genes de la H-ATPasa de la membrana plasmática y de las proteínas reveló que la regulación de la H-ATPasa de la membrana plasmática en respuesta al aluminio está sujeta a control transcripcional y postranscripcional, por lo tanto, la modificación postranscripcional de la H-ATPasa de la membrana plasmática bajo el estrés por aluminio posiblemente contribuye a los cambios en la actividad de ésta (Yang *et al.* 2011).

1.3. Fitofortificantes: Manvert Silikon.

Según AEFISA (Asociación Española de Fitosanitarios y Sanidad Ambiental, 2012) los fitofortificantes son sustancias o microorganismos cuyo propósito es proteger a las plantas contra organismos nocivos mediante la activación de defensas de las plantas a través de (i) la estimulación de las resistencias o los mecanismos de defensa en la planta, o (ii) la competencia con los organismos nocivos por el espacio o las sustancias nutrientes en la fitosfera o en la rizosfera. Los fitofortificantes tienen diversos mecanismos de acción:

- Puede competir con los patógenos por el espacio radicular para el enlace en las raíces y por los alimentos.
- Pueden actuar creando la resistencia inducida en la planta. Activan sus defensas naturales, actuando como elicitores, fortaleciendo su sistema inmunitario frente al ataque de patógenos o en condiciones abiótica adversas (estrés), lo que desemboca en plantas más resistentes bajo condiciones desfavorables.

- Puede actuar como barreras físicas para evitar la penetración de plagas o enfermedades en las plantas.
- En otros casos, pueden activar más de un mecanismo a la vez.

Dentro de los fitofortificantes encontramos productos orgánicos e inorgánicos, algunos microorganismos y ceras.

El Manvert Silikon de la empresa española Biovert S.A., es un bioestimulante (o fitofortificante) líquido a base de silicio (30% SiO₂) cuya efectividad es potenciada en condiciones de estrés hídrico y elevadas temperaturas mejorando la gestión del agua disponible por parte del cultivo y reduciendo la transpiración. Aumenta la rigidez en los tejidos de la planta y fruto mejorando la resistencia de la pulpa en frutales y hortalizas mejorando así vida postcosecha (Manvert®).

Una planta solo puede absorber silicio (Si) eficientemente en la forma de ácido silícico y en la mayoría de los suelos, a pesar de las elevadas concentraciones de silicio, es deficiente en la forma disponible para las plantas. En la actualidad, la modificación del suelo con fertilizantes ricos en silicio disponible para las plantas, es visto como una opción asequible para proteger las plantas de estrés bióticos y abióticos y lograr mayor gestión sostenible de los cultivos en el mundo (Deshmukh *et al.* 2017).

El silicio está bien documentado en la protección contra la toxicidad del aluminio en plantas vasculares. La exposición al aluminio provoca un aumento significativo en la concentración de este elemento en el interior de la planta, principalmente en las raíces, con una consecuente reducción en el crecimiento radicular. Para hacer frente a los efectos deletéreos del aluminio, algunas especies de plantas han desarrollado diversos mecanismos, los cuales están generalmente relacionados con la exclusión del aluminio y/o con mecanismos de tolerancia interna. Los mecanismos de exclusión incluyen la secreción radicular de aniones ácidos orgánicos y/o componentes fenólicos, que se unen al Al³⁺ y limitan su captación en el citosol. Hay pruebas moleculares han revelado que la resistencia al aluminio en distintas especies de plantas está regulada por genes que codifican proteínas transportadoras de membrana implicadas en el eflujo de aniones ácidos orgánicos (Pontigo *et al.* 2017).

El silicio aplicado al medio de cultivo disminuye de forma continua la concentración del aluminio, lo que va acompañado por una mejora en la producción de materia seca radicular. También se observa una concentración reducida de silicio en los tejidos de la planta cuando es simultáneamente tratada con silicio y aluminio. Curiosamente, los genes de los transportadores (Lsi1 y Lsi2) son regulados negativamente en las raíces después de la aplicación de silicio o aluminio. Sin embargo, ambos Lsi1 y Lsi2 son regulados positivamente como consecuencia de la aplicación de silicio en plantas tratadas con aluminio, denotando que hay un incremento en el requerimiento de silicio para poder hacer frente al estrés por aluminio. Mientras que la adición de aluminio desencadena la peroxidación de lípidos, el silicio contribuye a la atenuación del estrés oxidativo inducido por el aluminio incrementando la concentración de fenoles y modulando las actividades de distintas enzimas. Los cambios diferenciales en la expresión génica de las isoformas de SOD (dismutasa superoxidasa) y el perfil de la generación de peroxidasa están inducidas también por el silicio en plantas con estrés por aluminio (Pontigo *et al.* 2017).

2. OBJETIVOS

- Estudiar el efecto de Manvert Silikon en el crecimiento vegetativo de la planta del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en presencia y ausencia de aluminio.
- Determinar si existe expresión del gen LHA en plantas tratadas con Manvert Silikon.
- Cuantificar el contenido en proteínas en la planta ante el tratamiento con Manvert Silikon.
- Analizar la composición de las paredes celulares radiculares tratadas con Manvert Silikon en ausencia y presencia de Aluminio.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Para los experimentos se utilizaron plantas del tomate de la variedad San Pedro. Se sembraron semillas de tomate en vermiculita y se mantuvieron en cámara de cultivo a una temperatura de 25°C durante la fase de día (16 horas) y 18°C durante la noche (8horas), regando regularmente con una solución nutritiva (Tabla 1). Tras cuatro semanas, las plantas se retiraron de la vermiculita procurando romper las raíces lo menos posible.

Tabla 1. Composición de la solución nutritiva.

Componentes	Concentración (g/ml)
KNO ₃	0,0202
Ca(NO ₃) ₄	0,0472
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,02296
MgSO ₄	0,0492
KCl	7,44·10 ⁻⁴
H ₃ BO ₃	3,04·10 ⁻⁴
MnSO ₄ ·7H ₂ O	6,4·10 ⁻⁵
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,12·10 ⁻⁴
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,4·10 ⁻⁵
H ₂ MoO ₄ (85%)	1,6·10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA	1,48·10 ⁻³
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	1,56·10 ⁻³

3.2. Tratamientos

Se realizaron dos experimentos diferentes para ensayar el efecto del producto fitofortificante Silikon en la protección del tomate frente al aluminio. Para ello, se emplearon dos modos de aplicación: pulverizado y en solución.

3.2.1. Tratamiento con solución:

Se separaron las plantas en grupos de tres de forma que mostrasen tamaños homogéneos y se colocaron cada uno en un tubo con 50 ml de distintas soluciones (Tabla 2).

Tabla 2: Composición de las soluciones de los tubos del tratamiento en solución.

Tratamientos	H ₂ O	SILIKON (3ml/l)	AlCl ₃ (500µM)
H ₂ O	+	-	-
H ₂ O + SILIKON	+	+	-
H ₂ O + AlCl ₃	+	-	+
SILIKON + AlCl ₃	+	+	+

3.2.2. Tratamiento pulverizado:

En este caso las plantas se dividieron en dos grupos iguales y se introdujeron en agua. Uno de los grupos se pulverizó con agua y el otro con Silikon (3ml/l). Se esperó 5-6 horas para que las hojas absorbieran el producto y a continuación se separaron en grupos de tres plantas y se colocaron en tubos con 50 ml de dos soluciones distintas: agua y AlCl_3 (Tabla 3):

Tabla 3: Composición de los distintos tubos del tratamiento pulverizado.

Tratamientos	H_2O	AlCl_3 (3ml/l)
H_2O	+	-
$\text{H}_2\text{O} + \text{SILIKON}$	+	-
$\text{H}_2\text{O} + \text{AlCl}_3$	+	+
$\text{SILIKON} + \text{AlCl}_3$	+	+

Tanto en el tratamiento en solución como en el tratamiento pulverizado, las soluciones se renovaron aproximadamente cada dos días para evitar variaciones en la concentración de los distintos componentes del medio.

3.3. Determinación del crecimiento vegetativo

Transcurridos 15 días, las plantas se sacaron de los distintos tratamientos, se separaron el tallo, las hojas y las raíces y se colocaron en placas Petri, con el objetivo de analizar el peso fresco. A continuación, se colocaron en una estufa, a 70°C durante 96 horas, para eliminar toda el agua presente y determinar el peso seco.

3.4. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó solo en plantas tratadas con Silikon (en solución y pulverizado), pero no expuestas a Aluminio. Para ello se tomaron muestras de raíces a las dos semanas tras el tratamiento.

Para la extracción de proteínas se machacaron las muestras con tampón Tris HCl 50 mM pH 7,5 en una proporción 1:4 (p:v), manteniendo las muestras en hielo. A continuación, se centrifugaron a 4°C y 12857 g durante 30 min, se recogió el sobrenadante y se midió el volumen. A 50 µl de muestra se le añadieron 500 µl de reactivo de Bradford y 450 µl de agua destilada; se incubaron 30 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 595 nm, frente a un blanco con tampón de extracción en lugar de la muestra.

Una vez extraídas, se realizó una recta patrón con BSA (Tabla 4), siguiendo el mismo procedimiento que con las muestras.

Tabla 4. Concentraciones de BSA empleadas en la recta patrón para la cuantificación de proteínas.

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

3.5. Análisis de la expresión del gen LHA

El análisis de la expresión del gen se realizó solo en plantas tratadas con Silikon (en solución y pulverizado), pero no expuestas a aluminio. Tras 24 horas después de aplicar el tratamiento se recogieron muestras de las raíces para la extracción de ARN, congelándolas en nitrógeno líquido. A continuación, se extrajo el ARN con el kit de extracción de BioRad Aurum™ Total RNA Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Para determinar la concentración de las muestras se mezclaron 4 μ l de ARN y 996 μ l de agua miliQ autoclavada. Se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm para determinar el ratio entre dos valores de absorbancia como indicador de la calidad del ARN. Se emplearon muestras con un ratio (260/280) en torno a 2. A continuación, para la síntesis de ADNc se empleó el Kit RevertAid First Strand ADNc Synthesis de ThermoFisher.

Posteriormente se llevaron las muestras a la Unidad de Biología Molecular de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la UDC para realizar la PCR en tiempo real. En estos ensayos se determinó la expresión del gen LHA (gen de interés) y la del gen TUB (gen de referencia). Para ello se emplearon los cebadores LHAF (GGATTGCTTTCACCCG); LHAR (TTCGCTCCCATCACGACACC); TubF (GTGTTACTTGCTGTTTGAGA); TubR (TTTGTGCTCATCTTACCC) (Yang *et al.*, 2011).

La reacción de la PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l constituido por 0.3 μ l de cada cebador (20 μ M), 2.5 μ l de ADNc y 1xIQ SYBR Green Supermix (BioRad). Las condiciones de PCR empleadas consistieron en una desnaturalización inicial (95°C, 2 min), en 40 ciclos de amplificación (95°C, 30 s; 58°C, 30s y 72°C, 50s) y, una extensión final (72°C, 5 min).

Se determinaron los datos de C_T en la fase exponencial de la amplificación. Para calcular el cambio de expresión del gen de interés (LHA) entre las muestras se empleó la ecuación $2^{-\Delta\Delta CT}$ en la que $\Delta\Delta CT = [(C_T \text{ del gen de interés} - C_T \text{ del control interno}) \text{ muestra A} - (C_T \text{ del gen de interés} - C_T \text{ del control interno}) \text{ muestra B}]$. La muestra A es la muestra tratada y la muestra B es la muestra control.

3.6. Análisis de la composición de la pared celular por FTIR (espectroscopía de infrarrojos).

La siembra y tratamiento de las plantas se realizó del modo explicado anteriormente, pero en este caso se utilizaron sólo los tratamientos en solución.

3.6.1. Extracción de paredes: se machacaron las muestras con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo muy fino. Se hicieron lavados (añadir reactivo de lavado, agitar, centrifugar 10 min a

13000 rpm a temperatura ambiente y descartar sobrenadante) con agua destilada, dos con Tritón X-100 1%. Por último, se secaron las muestras a 37°C durante 3 semanas.

3.6.2. Adquisición y procesado de datos de FTIR (modo ATR):

Las muestras se llevaron a la Unidad de Espectroscopía Molecular del SAI para realizar el análisis con el espectrofotómetro FTIR Bruker Vector 2.2 controlado con el software OPUS. En el modo de adquisición de datos ATR el poder penetración del haz de infrarrojos es bajo, por lo que es necesario compactar todo lo posible la muestra contra el cristal. Antes de la obtención del espectro de cada muestra se realizó un blanco registrando el espectro sin muestra. El espectro de cada muestra resultó de promediar 64 registros.

Para el procesado de los datos se empleó el software OPUS. En primer lugar, se realizó la corrección de la línea base con el objetivo de eliminar el ruido de fondo. A continuación, se normalizaron los espectros para tener en cuenta las intensidades relativas de los picos y se exportaron por separado.

3.7. Análisis estadístico de los datos

Tras haber determinado el peso fresco y el peso seco de las plantas y el contenido de las proteínas, se compararon los resultados con Microsoft Office Excel, representando en diagramas de barras los valores de las medias y de las desviaciones típicas. Para analizar estadísticamente los datos del crecimiento vegetativo obtenidos se realizó un test ANOVA con el programa SPSS. En el caso de la cuantificación de proteínas, los datos se analizaron con un test t-Student comparando si había variación en la cantidad de proteínas en las plantas tratadas con Manvert Silikon frente a las plantas sin tratamiento, en ambos tratamientos, solución y pulverizado, por separado. Por otra parte, los datos obtenidos de los espectros de FTIR se analizaron con el programa OPUS para realizar la corrección de la línea base y la normalización de los datos; posteriormente se hicieron las medias de las longitudes de onda en el programa Microsoft Office Excel obteniendo un único espectro por cada tratamiento representándolos en un diagrama de dispersión. A continuación, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para reducir las 175 variables, cada una de las longitudes de onda, y obtener los factores que representen el mayor porcentaje de la varianza.

4. RESULTADOS

4.1. Determinación del crecimiento vegetativo

Tras los distintos tratamientos, se obtuvieron datos de peso fresco y peso seco de las raíces, el tallo y las hojas para cada uno de los grupos de plantas (Fig. 1-4).

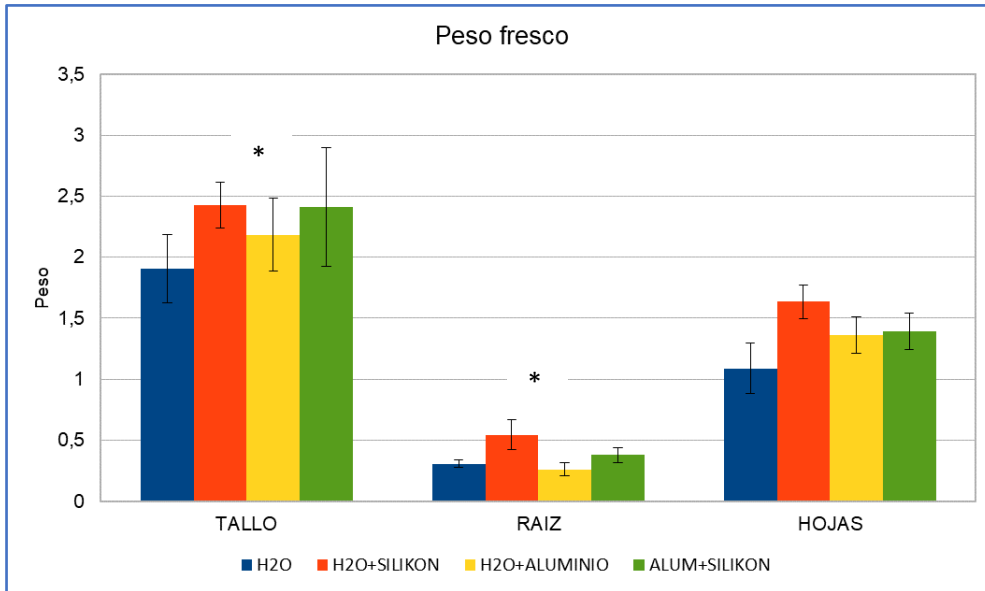


Figura 1. Pesos frescos de los tratamientos en solución de los distintos órganos de la planta. Las desviaciones típicas indican el grado de dispersión que presentan los datos con respecto a la media. El asterisco indica diferencias significativas a $p < 0,05$.

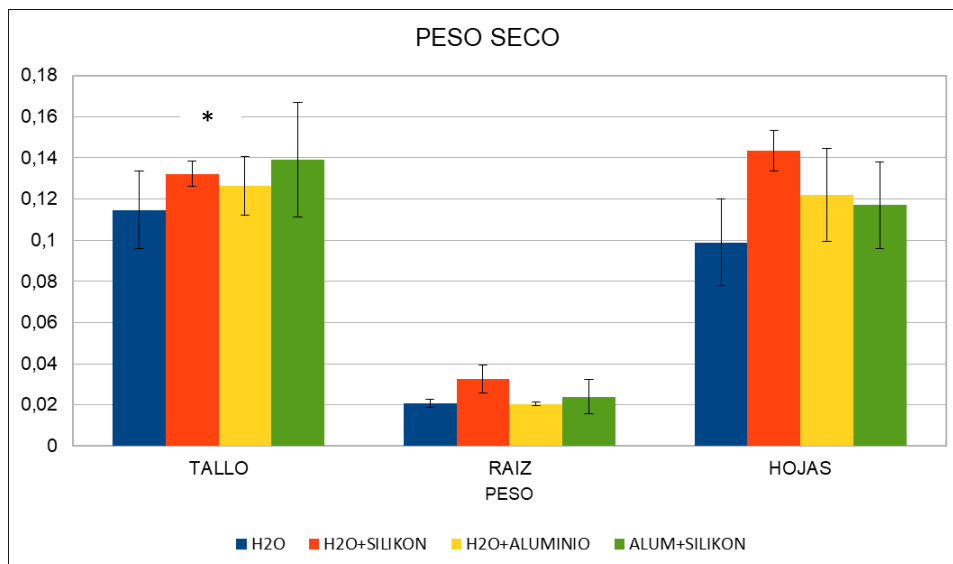


Figura 2. Pesos secos de los tratamientos en solución. Las desviaciones típicas indican el grado de dispersión que presentan los datos con respecto a la media. El asterisco indica diferencias significativas a $p < 0,05$.

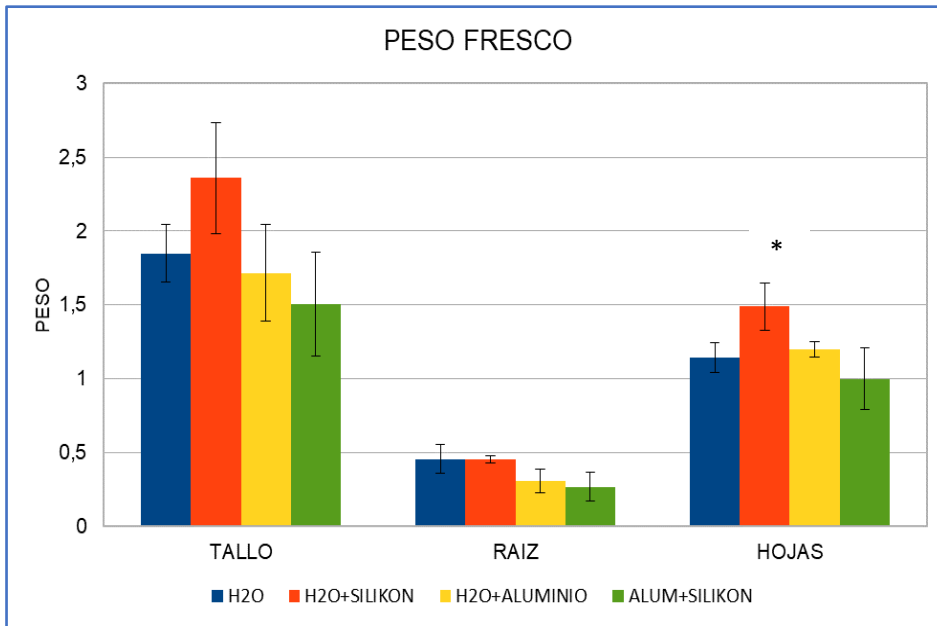


Figura 3. Pesos frescos de los tratamientos en pulverizado. Las desviaciones típicas indican el grado de dispersión que presentan los datos con respecto a la media. El asterisco indica diferencias significativas a $p < 0,05$.

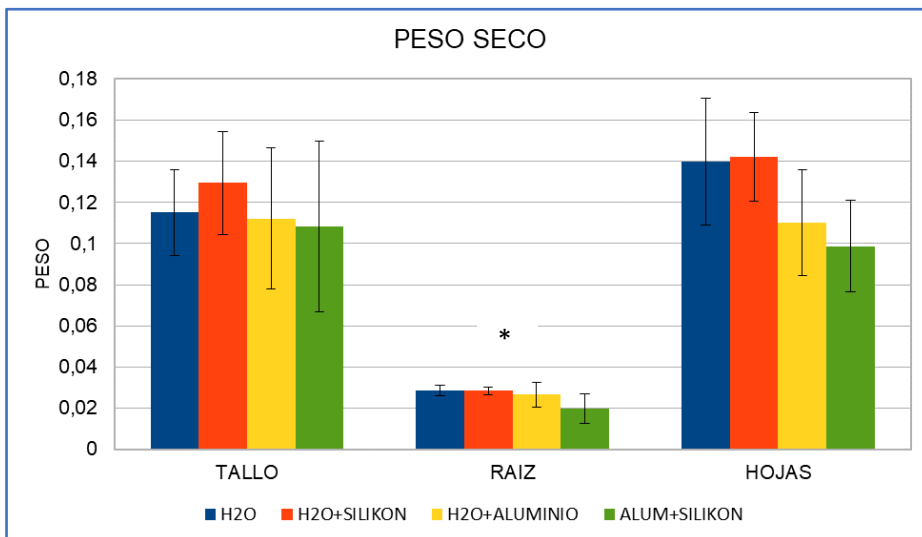


Figura 4. Pesos secos de los tratamientos en pulverizado. Las desviaciones típicas indican el grado de dispersión que presentan los datos con respecto a la media. El asterisco indica diferencias significativas a $p < 0,05$.

Los datos de peso fresco mostraron diferencias significativas en el tallo y la raíz en solución (Fig. 1), y las hojas en el tratamiento pulverizado (Figura 3). Estos resultados parecen indicar un efecto positivo del Silikon sobre el crecimiento de las plantas, ya que las plantas tratadas con agua y Silikon mostraron un crecimiento ligeramente mayor a las plantas no tratadas. Se ha demostrado que la adición de fertilizantes ricos en silicio (el componente principal del Silikon) resulta beneficiosos para las plantas vasculares (Deshmunkh *et al.* 2017; Manivannan *et al.* 2017), lo que concuerda con el incremento del peso fresco que se observó en las Figuras 1 y 3.

También se observó que el Aluminio afecta negativamente a la planta (Fig. 1-4), siendo su efecto paliado por la presencia del fitofortificante (Fig. 1 y 2). Esto se corresponde con el hecho de que

el aluminio es el factor limitante del crecimiento de las plantas más importante de los suelos ácidos (Rengel 1992).

Otro aspecto relevante que se puede observar en las gráficas es que el efecto beneficioso del Silikon es más pronunciado en los tratamientos en solución, siendo el tallo y las hojas los órganos más favorecidos en su crecimiento vegetativo. Sin embargo, la raíz es el órgano en el que se observa una mayor efectividad del Silikon como agente protector frente al aluminio (Fig. 1, 2).

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un test ANOVA. Atendiendo a los valores del nivel de significación ($p < 0,05$), el Silikon en solución es más efectivo, concretamente en las raíces, que son los órganos en los que hemos encontrado diferencias significativas, concordando con lo que muestran las gráficas (Fig. 1 y 2).

4.2. Cuantificación de proteínas

Los resultados de la cuantificación de proteínas en las raíces nos muestran que el tratamiento con Silikon en solución no provocó un aumento en la producción de proteínas. Sin embargo, el contenido en proteínas aumentó claramente tras el tratamiento con Silikon pulverizado (Fig. 5).

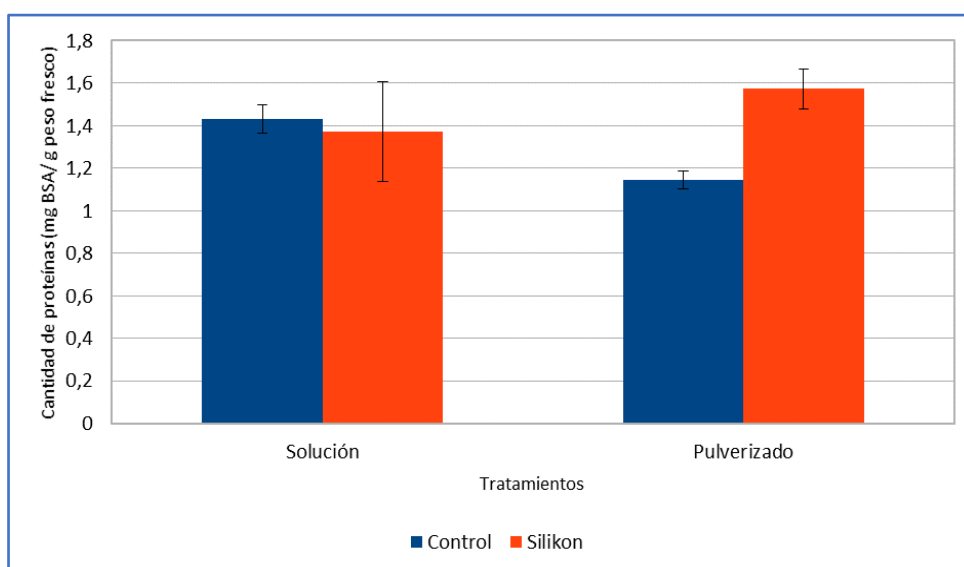


Figura 5. Contenido en proteínas en la raíz tras el tratamiento con Silikon en solución o pulverizado.

El análisis t-Student reveló diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras control y las muestras tratadas cuando éstas eran sometidas a Silikon pulverizado, pero no cuando las plantas eran sometidas a Silikon en solución (Fig. 5).

Las enzimas antioxidantes son activadas por silicio en las raíces de las plantas con estrés por aluminio. Por lo tanto, hay una correlación directa entre la concentración de silicio y la actividad de estas enzimas en las raíces de las plantas tratadas con aluminio y silicio. La activación de estas enzimas va acompañada por un notable descenso en la peroxidación de los lípidos, con la consecuente reducción del daño oxidativo provocado por el aluminio. En cualquier caso, no hay mucha información sobre el papel del silicio en la acción de estas enzimas bajo condiciones sin estrés (Pontigo *et al.* 2017)

4.3. Análisis de la expresión del gen LHA

La Figura 6 muestra los resultados del análisis de PCR en tiempo real para el gen LHA en raíces de tomate sometidas a un tratamiento con Silikon tanto en solución como pulverizado. El valor de C_T del gen de interés se ha normalizado con el gen de referencia, y la expresión del gen LHA en las muestras problema se ha referenciado frente al control con agua.

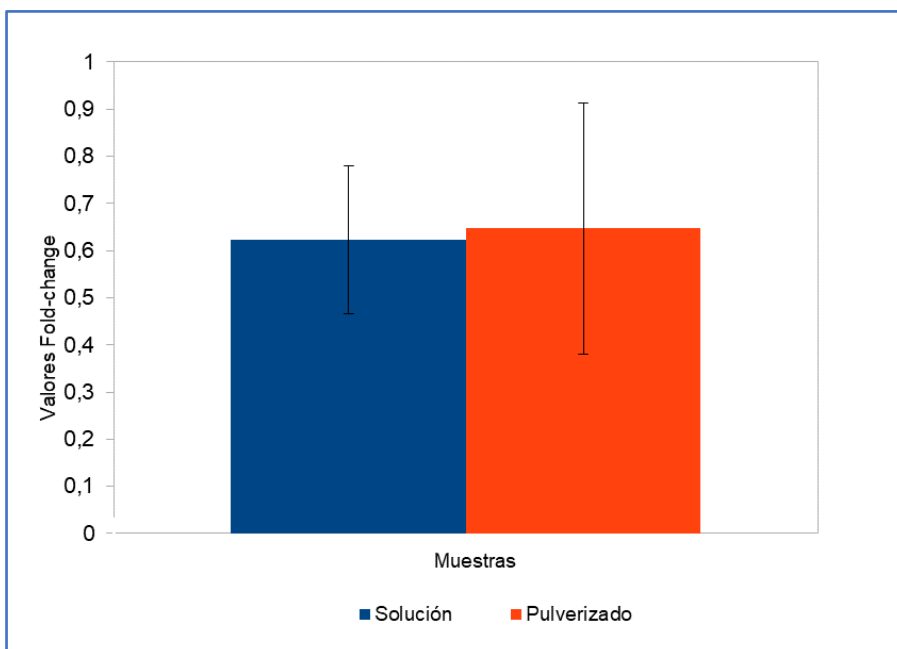


Figura 6. Gráfica comparativa de los resultados de la PCR en tiempo real del gen LHA en ambos tratamientos.

Un valor de expresión relativa menor que 1 indica que la expresión del gen disminuye, en este caso es de 0,6, lo que significa que el Silikon inhibe la expresión del gen LHA (Fig. 6). El gen LHA codifica para la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de las raíces (Yang *et al.* 2011). Cuando el Silikon es añadido al medio, provoca la inhibición de la expresión de los genes transportadores de silicio (Ls1 y Ls2) en la planta, mientras que si se aplica un tratamiento combinado con silicio y aluminio se produce un aumento de la expresión (Pontigo *et al.* 2017). Lo mismo puede ocurrir con el gen LHA, al aplicar sólo Silikon solo puede causar un efecto inhibitorio, en cambio, cuando se aplica en plantas con estrés por aluminio puede inducir la expresión del gen LHA.

Para verificar si las diferencias entre ambos tratamientos son significativas, se aplicó un análisis t-Student, que mostró que no existen diferencias significativas en la expresión del gen LHA entre ambos tratamientos.

4.4. Análisis de la composición de la pared celular por FTIR.

El análisis FTIR aporta información sobre la composición de las paredes celulares en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre $800 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ (Fernández-Pérez *et al.* 2014). Por ello se realizó un estudio de la composición de las paredes celulares por FTIR en este intervalo de longitudes de onda (Fig. 7).

En la Figura 7 se representan los espectros obtenidos tras restar los valores del control a los valores de los diferentes tratamientos. Las mayores diferencias se dan entre los 900 y los 1200 cm^{-1} , que son las regiones correspondientes a los hidratos de carbono, como celulosa, pectina,

ramnogalacturonano y xiloglucano que tienen picos solapados (Fernández-Pérez *et al.* 2014) por lo que no podemos asignar las diferencias a compuestos concretos, siendo la más grande la del tratamiento con Aluminio+Silikon. Esto se puede deber al efecto protector del Silikon que produce un engrosamiento en las paredes de las células de las raíces para formar una barrera contra el aluminio.

En cambio, la región correspondiente a las ligninas (1400-1700 cm^{-1}) parece disminuir en todos los tratamientos. Las ligninas son compuestos fenólicos en cuya formación están implicadas las peroxidasas, aunque no están directamente relacionadas (Fernández-Pérez *et al.* 2014). Este efecto en la formación de ligninas puede indicar que la exposición al tratamiento no fue suficiente para inducir un aumento en la cantidad de ligninas.

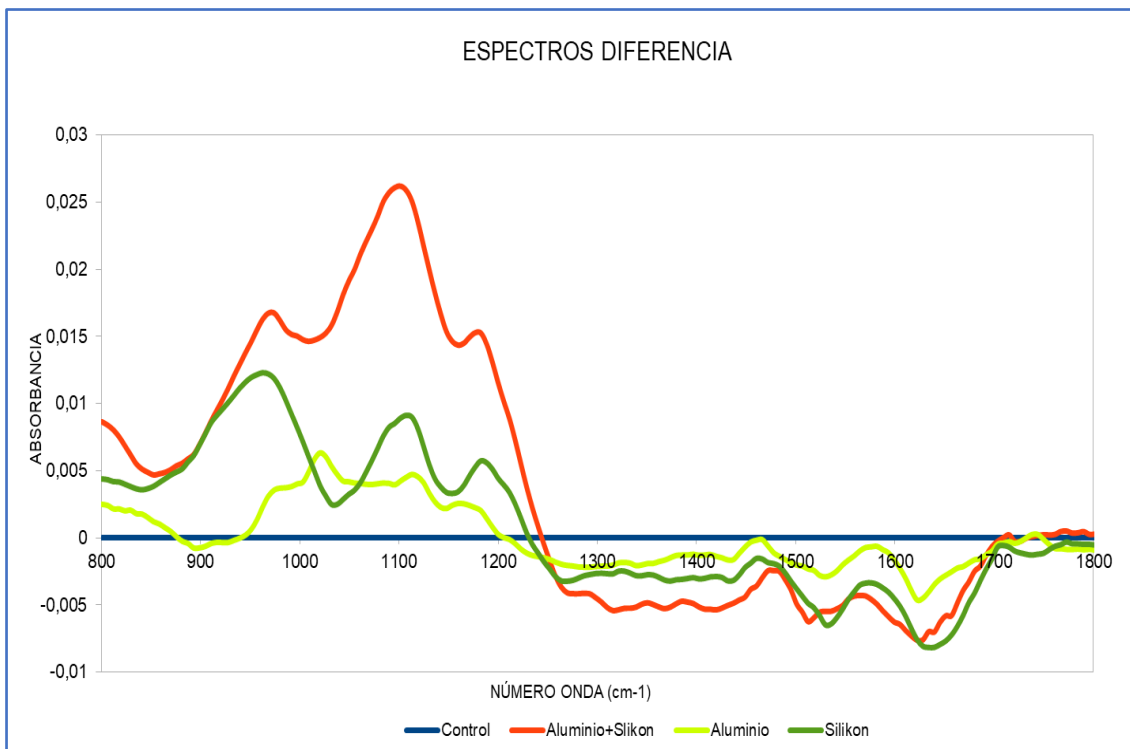


Figura 7. Espectros de diferencia medidos mediante FTIR de cada una de las muestras para cada tratamiento.

Para reducir el número de variables, los datos obtenidos se sometieron a un análisis de componentes principales (ACP) (Figuras 8-10). Se obtuvieron tres factores que explican un 94,89% de la varianza, aportando el factor 1 un 42,43%, el factor 2 un 26,94% y el factor 3 un 14,44%.

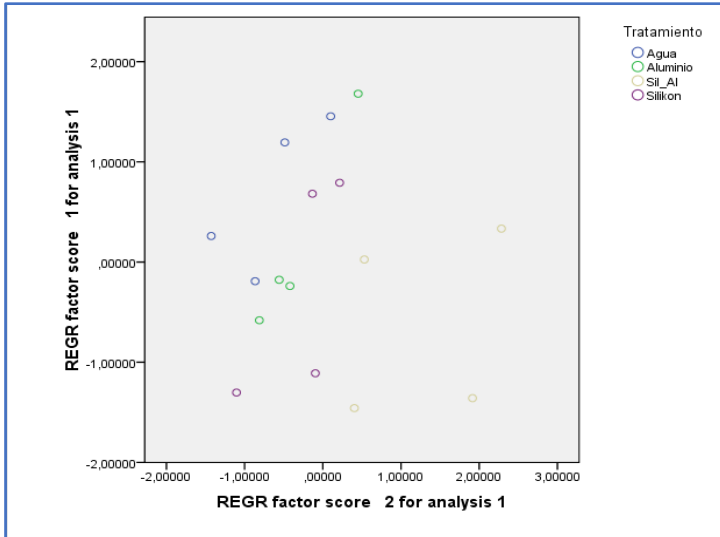


Figura 8. Análisis de componentes principales, F1 frente a F2.

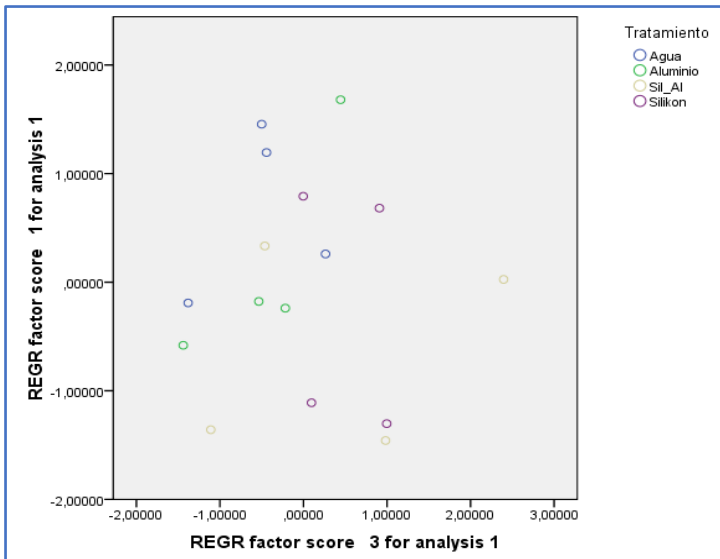


Figura 9. ACP, F1 frente a F3.

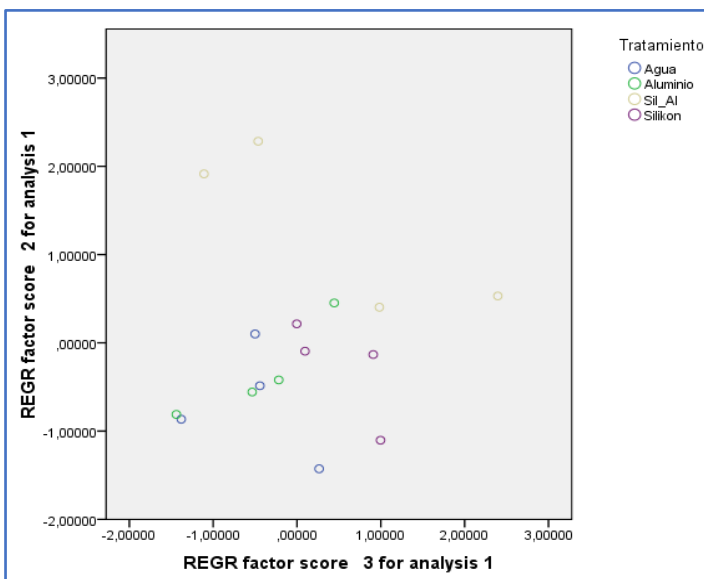


Figura 10. ACP, F2 frente a F3.

En las Figuras 8 y 10, se puede apreciar que el tratamiento Aluminio+Silikon muestra una separación del resto de tratamientos en función del factor 2, lo que indica que puede haber diferencia en la composición de la pared celular.

Para ver la relación del factor dos con las variables se representó frente a la absorbancia para ver en qué parte del espectro se representa y qué componentes de la pared varían (Fig. 11).

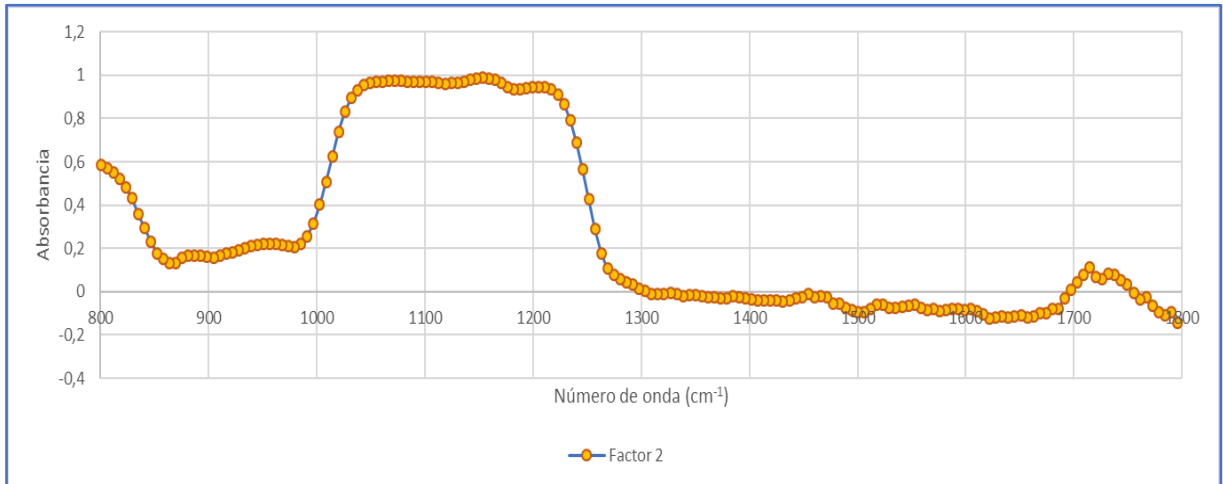


Figura 11. Representación del espectro del FTIR en función del factor 2.

La gráfica de la Figura 11 nos muestra que el factor 2 explica la zona del espectro relacionada con los hidratos de carbono. En esta región del espectro, el tratamiento que más diferencias aporta es el de Silikon+aluminio (Fig. 7).

En un estudio en plantas de césped, la producción de materia seca se reduce en cuando se aplica aluminio. El silicio aplicado en ausencia de aluminio no afecta al crecimiento de las plantas, en cambio, cuando se aplica silicio en presencia de aluminio, esto favorece el rendimiento de las raíces (Pontigo *et al.* 2017). Por lo tanto, podemos deducir que el aumento de los carbohidratos en el tratamiento Silikon+aluminio de las raíces se debe al engrosamiento de la pared que induce el Silikon para proteger a la planta del aluminio; tal y como nos muestran las figuras 1 y 4, en las que las diferencias en los pesos de las raíces eran significativas.

5. CONCLUSIONES

- El producto Manvert Silikon favorece el crecimiento vegetativo de las plantas de tomate, al mismo tiempo que contrarresta en parte el efecto negativo que tiene el aluminio sobre dicho crecimiento, siendo más efectiva su aplicación en forma de solución.
- El contenido en proteínas de las raíces aumentó significativamente en las plantas tratadas con Silikon con respecto a las plantas control, pero sólo cuando éste se aplica en forma pulverizada.
- La expresión del gen LHA se reduce tras el tratamiento con Manvert Silikon, no habiendo diferencias en función del método de aplicación.
- En cuanto a la composición de las paredes celulares radiculares, los espectros diferenciales muestran que el contenido en hidratos de carbono aumenta en presencia de Manvert Silikon, y en menor medida en presencia de aluminio. Además, las plantas con estrés por aluminio presentan una reducción en el contenido de ligninas. El análisis de componentes principales confirmó que la composición de las paredes varía en mayor medida en el tratamiento con Manvert Silikon y aluminio.

CONCLUSIÓNS

- O produto Manvert Silikon favorece o crecemento vexetativo das plantas do tomate, ao mesmo tempo que contrarresta en parte o efecto negativo que ten o aluminio sobre dito crecemento, sendo máis efectiva a súa aplicación en forma de solución.
- O contido en proteínas aumentou significativamente nas plantas tratadas con Silikon con respecto ás plantas control, pero só cando este se aplica en forma pulverizada.
- A expresión do xene LHA redúcese tras o tratamento con Manvert Silikon, non habendo diferenzas en función do método de aplicación.
- En canto á composición das paredes celulares radiculares. Os espectros diferenciais mostran que o contido en hidratos de carbono aumenta en presenza de Manvert Silikon, e en menor medida en presenza de aluminio. Ademais, as plantas con estrés por aluminio presentan unha redución no contido de ligninas. O análise de compoñentes principais confirmou que a composición das paredes varía en maior medida no tratamento con Manvert Silikon e aluminio.

CONCLUSIONS

- The product MANvert Silikon enhances the growth of tomato plants, and counteract in part the aluminium's negative effect, being more effective as a solution.
- Protein content was significantly higher on plants treated with Silikon compare to control plants, but only when it was pulverized.
- The expression of the LHA gene was reduced after the treatment with MANvert Silikon, showing no differences among treatment strategies.
- Regarding the root cell wall composition, the differential spectrums show that the carbohydrates content increases in the presence of Manvert Silikon, and to a lesser extent in the presence of aluminium. Additionally, plants stressed with aluminium show a reduction in the

lignin content. The principal component analysis confirms that the composition of cell walls varied to a greater extent in the treatment with Manvert Silikon and aluminium.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, S. J., Sivaguru, M., Osawa, H., Chung, G. C. y Matsumoto, H. (2001). Aluminium inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane Surface potentials in squash roots. *Plant Physiology*, 126: 1381-1390.
- CONABIO (Comisión Nacional para el conocimiento y el uso de la Biodiversidad) (1992). <https://www.gob.mx/conabio> (última consulta: 13/07/2018).
- Deshmukh, R. K., Ma, J. F., Bélanger, R. R., eds. (2017). Role of Silicon in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1858.
- Fernández-Pérez, F., Vivar, T., Pomar, F., Pedreño, M. A. y Novo-Uzal, E. (2014). Peroxidase 4 is involved in syringyl lignin formation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 175: 86-94.
- Florido, M., Alvarez, M., Lara, R. M., Plana, D., Caballero, A., Florido, R., Shagarodsky, T. y Moya, C. (2008). Análisis de la variedad morfoagronómica en la colección de tomate (*Solanum* L. sección *Lycopersicon* subsección *Lycopersico*) conservada *ex situ* en Cuba. *Cultivos tropicales*, 29 (2): 43-48.
- Knapp, S., y Peralta, I. E., (2016) The tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and its botanical relatives. En: Causse M., Giovannoni J., Bouzayen M., Zoune M. (eds.) *The Tomato Genome. Compendium of Plant Genomes*. Springer, Berlin, Heidleberg (Alemania).
- Manivannan, A., y Ahn, Y.-K. (2017). Silicon Regulates Potential Genes Involved in Major Physiological Processes in Plants to Combat Stress. *Frontiers in Plant Science*, 8:1346.
- Manvert: Bioestimulantes y nutrientes avanzados. *Bioestimulantes: manvert silikon*. <http://www.manvert.com/product/manvert-silikon/> (última fecha de consulta: 11/07/2018)
- Medina, T., Arroyo, G., y Dzul, J. G. (2017). Origin and evolution of tomato production *Lycopersicon esculentum* in México. *Ciencia Rural*, Santa Maria, 47(03): e20160526.
- Pontigo, S., Godoy, K., Jiménez, H., Gutiérrez-Moraga, A., Mora, M. L. y Cartes, P. (2017). Silicon-Mediated Alleviation of Aluminum Toxicity by Modulation of Al/Si Uptake y Antioxidant Performance in Ryegrass Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8:642.
- Rengel, Z. (1992). Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytology*, 121: 499-513.
- Yang, J. Y., 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*, 20119 (234):281-291.