



UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA  
"FRUCTUOSO RODRÍGUEZ PÉREZ"

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal

**Respuesta de plantas jóvenes de arroz  
(*Oryza sativa* L.) tratadas con  
brasinoesteroides y sus análogos y  
sometidas a estrés por NaCl**

Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en  
Ciencias Agrícolas

MSc. YANELIS REYES GUERRERO

Mayabeque  
2018



UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA  
"FRUCTUOSO RODRÍGUEZ PÉREZ"

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal

**Respuesta de plantas jóvenes de arroz  
(*Oryza sativa* L.) tratadas con  
brasinoesteroides y sus análogos y  
sometidas a estrés por NaCl**

Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en  
Ciencias Agrícolas

Autor: MSc. YANELIS REYES GUERRERO

Tutor: Inv. Tit. Lic. Miriam Núñez Vázquez, Dr. C.

Mayabeque  
2018

## ***Agradecimientos***

*A mi madre porque gracias a ella estoy aquí, por enseñarme con su ejemplo personal que las cosas solo se consiguen con sacrificio, por apoyarme en todo momento, y sobre todas las cosas por ser la SUPER ABU de mis hijos.*

*A mis dos pequeños soles, Diana y Darío, que dan mucho trabajo, pero también muchas alegrías. Para ellos es esta tesis, para que el día de mañana se sientan muy orgullosos.*

*A Eduardo por su amor y comprensión, por la compañía y el café en las madrugadas. Por ser ese padrazo increíble y un esposo genial. Pero sobre todas las cosas por enseñarme a ver la ciencia y la vida de una forma diferente.*

*A mi abuelo, porque sé que estaría muy orgulloso.*

*Al resto de mi familia, mi tía, mi papá y Tata por estar siempre pendientes y darme su apoyo en todo momento.*

*A TODO el personal del departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del INCA por ser como una familia.*

*A mi tutora, Miriam por la confianza que depositó en mí, por su guía certera y su dedicación al trabajo, a pesar de los años y los achaques. Por ser mi ejemplo de la mujer científica cubana.*

*A Elisa y Yoyi, no sólo porque sus manos soportan todo el trabajo técnico de esta tesis, sino por apoyarme y cuidarme, por sus consejos, por su hombro para llorar y su compañía para reír. En fin por ser mis padres en el INCA.*

*A las muchachitas Yanett, Yenisel, Milaydis, Yeni, Lily, Clairen, Magaly por los maratones en los muestreos, aún en días de fiesta, con ciclón y sin corriente eléctrica. Por su preocupación y aliento en los peores momentos.*

*A Yusnier y Alexander por cargar tantas bandejas.*

*A Lisbel y Lissy por su increíble ayuda en los experimentos aún cuando yo no estaba, por su responsabilidad y comprensión.*

*A los doctores José Dell'amico y Eduardo Jeréz por su invaluable ayuda con las relaciones hídricas y la excelente revisión del documento.*

*A la Dra Aymara García y al Dr. Donald Morales por sus excelentes oponencias en la predefensa en la Comisión Científica, las cuales contribuyeron a mejorar el trabajo.*

*Al Dr Walfredo Torres por su magnífica oponencia en la predefensa en el Consejo Científico y por sus valiosos consejos y sugerencias.*

*Al Dr Rubén Alfonso por la visión productiva en su valiosa oponencia, que nos ayudó a entender el alcance que pudieran tener nuestros resultados.*

*Al Dr. Alejandro Falcón por la revisión del documento y por su amistad y apoyo.*

*A Cartaya, Ana María y Yanitza por su ayuda con las determinaciones de los cationes*

*A Yenisei por el tiempo dedicado a ayudarme con los análisis multivariados.*

*Al Dr. Pedro Rodríguez por la confianza, por sus consejos y por ser uno de los mejores jefes que he tenido.*

*Al Dr. Mario Varela por las valiosas sugerencias en los análisis estadísticos.*

*A los doctores Adriano Cabrera, Noraida León, Michel Ruiz y Lázaro Maqueira por sus aportes al documento de tesis.*

*A la Dra. María Margarita Hernández que accedió a revisarnos el documento y aportó excelentes ideas.*

*A Aidita en Micorriza por prestarme algunos reactivos para las técnicas bioquímicas.*

*A todo el personal del INCA, por ser como son, desde los investigadores hasta la gente de servicios y estar siempre dispuestos a ayudar a cualquiera que lo necesite.*

*Al Dr Michael Deyholos, de la Universidad de Alberta por acogerme en su laboratorio y apoyarme en todo con mucha eficiencia y rapidez. A Leonardo Galindo, por su ayuda con el super equipamiento del laboratorio de Biología Molecular y por hacerme más llevadera mi estancia en Canadá.*

*En fin a todos aquellos que de una u otra forma han puesto su granito de arena para lograr esta tesis y me han apoyado y ayudado a lo largo de estos años.*

*A todos Muchas Gracias*

*At mis dos soles, Diana y Darío*

*At mi madre, ejemplo y guía*

## SÍNTESIS

La salinidad es uno de los estreses más preocupantes en la actualidad, por este motivo, es de gran importancia encontrar productos naturales que puedan inducir tolerancia al mismo. En este trabajo se evaluó el efecto de la aspersión foliar con Biobras-16 (BB-16), una formulación que tiene como ingrediente activo un análogo espirostánico de brasinoesteroide, o con 24-epibrasinólida, EBL (un brasinoesteroide natural), sobre indicadores fisiológicos y bioquímicos en plantas jóvenes de arroz (*Oryza sativa* L.) sometidas a estrés salino por siete días. Los resultados demostraron que la aspersión foliar con BB-16 ( $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) o EBL ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) protegió a las plantas de arroz, siendo más eficaz el análogo, con una respuesta más sostenida en el tiempo. Esta protección estuvo asociada a una disminución del daño oxidativo inducido por la salinidad, ya que se produjo una reducción de la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas, así como un incremento en la actividad de algunas enzimas antioxidantes. Ambos brasinoesteroides fueron capaces de aumentar los niveles de clorofilas, mejorar las relaciones hídricas y provocar una mayor tendencia al ajuste osmótico en las plantas estresadas. Igualmente, disminuyó la concentración de sodio en las plantas y aumentaron las de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Se encontraron pequeñas diferencias en los mecanismos de acción de ambos brasinoesteroides en estas condiciones, atribuibles a las diferencias estructurales entre ellos. Se demostró que la toxicidad iónica provocada por el estrés salino, no permitió revertir los efectos adversos que el mismo provocó en las plantas de arroz después de 14 días de recuperación, lo que se evidenció al crecer las plantas en un sustrato inerte (vermiculita). Se propone un modelo biológico que integra los mecanismos de acción de los brasinoesteroides para la inducción de tolerancia a estrés salino por NaCl en plantas de arroz.

## ÍNDICE

<i>I. INTRODUCCIÓN.</i>	1
<i>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.</i>	4
2.1 <i>Fases fenológicas de las plantas de arroz.</i>	4
2.2 <i>Salinidad.</i>	6
2.2.1 <i>Aspectos generales.</i>	6
2.3 <i>Efectos de la salinidad en las plantas</i>	7
2.3.1 <i>Efectos fisiológicos inducidos por el estrés salino en las plantas.</i>	7
2.3.2 <i>Efecto de la salinidad en la generación de estrés oxidativo en las plantas</i>	9
2.4 <i>Mecanismos de tolerancia a la salinidad</i>	11
2.4.1 <i>Ajuste osmótico.</i>	12
2.4.1.1 <i>Prolina</i>	12
2.4.1.2 <i>Glicina betaína.</i>	13
2.4.2 <i>Exclusión de iones.</i>	14
2.4.3 <i>La protección antioxidante en las respuestas de las plantas al estrés.</i>	15
2.4.3.1 <i>Defensas antioxidantes no enzimáticas</i>	15
2.4.3.2 <i>Defensas antioxidantes enzimáticas</i>	16
2.5 <i>Los brasinoesteroides como hormonas de las plantas</i>	23
2.5.1 <i>Aspectos generales.</i>	23
2.5.2 <i>Genes regulados por los brasinoesteroides.</i>	23
2.5.3 <i>Brasinoesteroides en la protección de las plantas sometidas a estrés salino</i>	25
2.5.4 <i>Análogos espirostánicos de brasinoesteroides.</i>	27
<i>III. MATERIALES Y MÉTODOS.</i>	30
3.1 <i>Influencia de la aspersion foliar con diferentes concentraciones de 24-epibrasinólida (EBL) o Biobras-16 sobre el crecimiento de plantas de arroz sometidas a estrés salino.</i>	30
3.2 <i>Influencia de la aspersion foliar con Biobras-16 (BB-16) o 24-epibrasinólida (EBL) sobre indicadores fisiológicos y bioquímicos de plantas de arroz sometidas a estrés salino.</i>	33
3.2.1 <i>Indicadores de las relaciones hídricas</i>	34
3.2.2 <i>Determinación de solutos orgánicos osmóticamente activos.</i>	35
3.2.3 <i>Contenido de cationes inorgánicos</i>	36

---

3.2.4. Contenido de clorofilas y carotenoides .....	37
3.2.5 Metabolismo oxidativo.....	37
3.2.5.1 Preparación de los extractos.....	37
3.2.5.2 Peroxidación lipídica.....	37
3.2.5.3 Análisis de la oxidación de proteínas.....	38
3.2.5.4 Análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes.....	38
3.2.5.5 Determinación de las proteínas solubles totales.....	40
3.3 Efecto de la aspersión foliar con 24-epibrasinólida (EBL) sobre variables fisiológicas y del metabolismo oxidativo de plantas de dos cultivares de arroz crecidas en sustrato inerte y sometidas a estrés salino .....	41
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	43
4.1 Influencia de la aspersión foliar con diferentes concentraciones de 24-epibrasinólida (EBL) o Biobras-16 (BB-16) sobre el crecimiento de plántulas de arroz sometidas a estrés salino.....	43
4.2 Influencia de la aspersión foliar con Biobras-16 (BB-16) o 24-epibrasinólida (EBL) sobre indicadores fisiológicos y bioquímicos de plantas de arroz sometidas a estrés salino.....	47
4.2.1 Indicadores de las relaciones hídricas.....	57
4.2.2. Contenido de solutos orgánicos osmóticamente activos .....	62
4.2.3 Contenido de cationes inorgánicos .....	68
4.2.4 Contenido de clorofilas y carotenoides .....	71
4.2.5 Indicadores del metabolismo oxidativo.....	74
4.3 Efecto de la aspersión foliar con 24-epibrasinólida (EBL) sobre variables fisiológicas y del metabolismo oxidativo de plantas de dos cultivares de arroz crecidas en sustrato inerte y sometidas a estrés salino .....	83
4.4 Análisis integral de la respuesta de plantas de arroz a la aplicación exógena de EBL ante el estrés salino .....	94
V. CONCLUSIONES. ....	99
VI. RECOMENDACIONES. ....	100
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
VIII. ANEXOS	

# ***Introducción***

## **I. INTRODUCCIÓN**

La salinidad es uno de los estrés más preocupantes en la actualidad, provocado por la inadecuada irrigación de los suelos y el cambio climático, factores que le proporcionan a este fenómeno alcance global, con un área total afectada de alrededor de 800 millones de hectáreas (FAO, 2017). En Cuba, la superficie agrícola está afectada en un 14% y otro 15% presenta peligros potenciales de salinización (ONEI, 2016b).

Las principales afectaciones en las plantas asociadas a la salinidad son el déficit hídrico impuesto por la mayor osmolaridad del suelo, el daño celular infligido por la excesiva acumulación de iones en los tejidos vegetales y el desbalance nutricional por la modificación de la absorción de nutrientes esenciales (Reddy *et al.*, 2017). La salinidad influye en el metabolismo del nitrógeno y de los azúcares, disminuye la fotosíntesis y aumenta el estrés oxidativo. Todos estos trastornos implican una afectación en el crecimiento y desarrollo de las plantas y por tanto una disminución del rendimiento (González, 2001).

El arroz (*Oryza sativa* L.) es la fuente principal de alimento de más de un tercio de la población mundial y su crecimiento y desarrollo es seriamente afectado por la salinidad, siendo las etapas más sensibles, las de plántula y ahijamiento, dentro de la fase vegetativa y la de floración dentro de la fase reproductiva (Flowers y Yeo, 1981).

En nuestro país, este cultivo, constituye parte importante de la dieta diaria y su consumo alcanza alrededor de 70 kg per cápita por año. Sin embargo, en el 2016 se obtuvieron 514 045 toneladas de arroz cáscara húmedo (ONEI, 2016a); lo que indica que la producción nacional todavía no satisface la demanda.

Por otra parte, las mayores áreas afectadas por la salinidad se encuentran en las provincias de Guantánamo, Granma, Holguín, Camagüey, Sancti Spíritus y Pinar del Río (Álvarez *et al.*, 2008). Precisamente, en la mayoría de estas provincias se encuentran las mayores áreas de producción de arroz, por lo que este fenómeno pudiera ser una limitante para lograr un incremento de la producción arrocera en el país.

Una de las estrategias que pudiera utilizarse para incrementar los rendimientos en estas condiciones, además de la utilización de cultivares tolerantes, es la aplicación de diferentes productos ecológicamente inocuos como pueden ser los bioestimulantes y los reguladores del crecimiento.

Los brasinoesteroides (BR) son potentes reguladores del crecimiento vegetal de naturaleza esteroideal. Estas hormonas tienen efectos pleiotrópicos como son: estimulación del alargamiento celular y de la desdiferenciación de protoplastos, la regeneración de la pared celular, la regulación de la diferenciación de elementos traquearios y el incremento de la biomasa y del rendimiento (Khatoon *et al.*, 2017).

En los últimos años, varios autores han estudiado la protección que los BR le confieren a las plantas ante determinados tipos de estrés tanto bióticos como abióticos (Sharma *et al.*, 2017). Entre estos se encuentran altas y bajas temperaturas (Cui *et al.*, 2015; Eremina *et al.*, 2017), sequía (Hu *et al.*, 2013; Behnamnia, 2015), salinidad (Das *et al.*, 2014; Upadhyaya *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2017 ) y exceso de metales pesados (Cao *et al.*, 2013). También incrementan la resistencia a herbicidas y agentes patógenos (Sharma *et al.*, 2013a; Fariduddin *et al.*, 2014; Canales *et al.*, 2016).

En cuanto a la protección al estrés salino, desde 1983 se demostró que la brasinólida (BL) era capaz de mejorar la tolerancia de plantas de arroz (Meudt *et al.*, 1983). Es de destacar, cómo la forma de aplicación y el órgano al cual se aplica influyen en el efecto de estas hormonas. El suministro de 24-epibrasinólida (EBL) a las raíces de plántulas crecidas en condiciones salinas aumentó el daño, mientras que los efectos fueron positivos cuando se realizó la aspersión repetida a los tallos (Sasse, 1999).

En los últimos años, se ha ampliado el estudio del efecto de los BR ante estrés salino aplicados tanto por tratamiento a las semillas (Harpreet *et al.*, 2015; Nafie *et al.*, 2015) como por aspersión foliar (Upadhyaya *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2017 ) en diferentes especies vegetales. Aunque, específicamente en arroz, no son abundantes los estudios sobre la protección de los BR ante el estrés salino y la mayor parte de la información está relacionada, fundamentalmente, con el tratamiento a las semillas.

Por ejemplo, Anuradha y Rao (2001), plantearon que la imbibición de las semillas con EBL (3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) y NaCl (150  $\text{mmol L}^{-1}$ ) provocó una recuperación en el crecimiento y un incremento de los niveles de proteínas solubles y de RNA en las plántulas, con respecto al control con NaCl. Posteriormente, se informó que el tratamiento a las semillas de arroz con EBL logró disminuir la peroxidación lipídica y la acumulación de prolina causada por el estrés salino (Özdemir *et al.*, 2004) y estimuló la actividad de algunas enzimas antioxidantes (Sharma *et al.*, 2013b).

La adición de BL, al medio salino, estimuló la germinación, el crecimiento e incrementó los niveles de potasio en plántulas de arroz, mientras que disminuyó el contenido de sodio (Das *et al.*, 2014).

Por otra parte, en Cuba se han sintetizado análogos espiroestánicos de BR, cuyas formulaciones han demostrado poseer actividad promotora del crecimiento y estimuladora del rendimiento (Núñez, 2003). En los últimos años, se han estudiado las potencialidades de algunas de ellas (Biobras-6 (BB-6), Biobras-16 (BB-16), Biobras-25) para disminuir los efectos adversos del estrés salino.

El tratamiento a las semillas con BB-6 y BB-16 estimuló el crecimiento de las plántulas de los cultivares de arroz J-104 e INCA LP-7 en medio salino, siendo el BB-16 más efectivo (Núñez *et al.*, 2007). Al evaluar la efectividad de la EBL y el BB-16, en la protección de las plántulas de dos cultivares de arroz (J-104 y Ginés) en medio salino; los resultados demostraron que los tratamientos fueron más efectivos en el cultivar tolerante Ginés (Núñez *et al.*, 2013).

La mayor parte de la información que aparece en la literatura refiere la utilización del tratamiento a las semillas con los análogos para evaluar la respuesta de plantas jóvenes de arroz ante el estrés salino; por lo que resultaría de gran importancia, determinar dicha respuesta cuando se utilice la aspersión foliar con BB-16, que es el modo de aplicación que se recomienda para incrementar los rendimientos del cultivo en nuestro país.

Además, el conocimiento de las respuestas fisiológicas y bioquímicas asociadas a la protección inducida por el BB-16 en plantas jóvenes de arroz sometidas a estrés salino, permitiría no solo compararlas con las inducidas por un brasinoesteroide natural como la EBL, sino también, una futura aplicación más racional y efectiva de esta formulación, lo cual contribuirá a la sustitución de importaciones y a la mitigación de los efectos adversos asociados al cambio climático.

Por todo lo anterior, el presente trabajo propone la siguiente hipótesis: “La aspersión foliar con brasinoesteroides o sus análogos espiroestánicos inducen respuestas fisiológicas y bioquímicas asociadas a la protección de plantas jóvenes de arroz sometidas a estrés salino por NaCl”.

Para aceptar o rechazar la hipótesis se proponen los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

Determinar las respuestas fisiológicas y bioquímicas asociadas a la protección inducida por la aspersión foliar de un brasinoesteroide natural (24-epibrasinólida) o un análogo espirostánico (Biobras-16) en plantas jóvenes de arroz sometidas a un período corto de estrés salino.

### **Objetivos específicos**

1. Establecer la concentración de 24-epibrasinólida y Biobras-16 que estimule, mediante la aspersión foliar, el crecimiento de plantas jóvenes de arroz cv. J-104 sometidas a estrés por NaCl.
2. Determinar indicadores fisiológicos y bioquímicos asociados a la protección inducida por la aspersión foliar con 24-epibrasinólida o Biobras-16 en plantas jóvenes de arroz cv. J-104 sometidas a estrés por NaCl.
3. Determinar la respuesta al estrés salino de plantas jóvenes de dos cultivares de arroz (J-104 y Ginés), con diferente sensibilidad a dicho estrés, crecidas en un sustrato inerte, ante la aspersión foliar con 24-epibrasinólida.

### **Novedad científica**

Se realizan aportes científicos al conocimiento sobre las respuestas fisiológicas y bioquímicas inducidas por el análogo de brasinoesteroide Biobras-16 en plantas jóvenes de arroz sometidas a estrés salino. Se establecen, por primera vez, las diferencias en el modo de acción entre el brasinoesteroide natural 24-epibrasinólida y el análogo Biobras-16. Se propone, además, un modelo de acción de la 24-epibrasinólida, donde se realiza un análisis integral de la respuesta de las plantas de arroz al estrés salino.

### **Aporte práctico**

El conocimiento de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos inducidos por la aspersión foliar con Biobras-16, en plantas de arroz sometidas a estrés salino, pudiera contribuir, a realizar, en un futuro, una aplicación más racional y efectiva de esta formulación en la producción arrocería nacional, fundamentalmente, en áreas afectadas por la salinidad de los suelos. Esto favorecería la sustitución de importaciones y la mitigación de los efectos adversos asociados al cambio climático.

*Revisión  
bibliográfica*

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Fases fenológicas de las plantas de arroz**

El arroz es una monocotiledónea perteneciente a la familia *Poaceae*. En las plantas de arroz se distinguen tres fases de desarrollo, las cuales tienen períodos de crecimiento definidos en cuanto a la diferenciación de la planta y los días de duración. Las fases son: vegetativa, reproductiva y la maduración (CIAT, 2005).

#### **Fase de crecimiento vegetativa**

La fase vegetativa comprende desde la germinación, estadio de plántula, ahijamiento, hasta la diferenciación del primordio floral. El estadio de plántula se extiende hasta la cuarta hoja, momento en que las plantas crecen básicamente de los productos derivados de la fotosíntesis (IIArroz, 2004).

El ahijamiento, comienza a partir de la emisión de la quinta hoja y da inicio a la aparición del primer hijo. Luego y en orden alterno, desde los siguientes subnudos continúa la emisión de los hijos primarios, secundarios y terciarios. El número total de hijos depende, principalmente de la densidad de población, características de la variedad, época de siembra, fertilidad y contenido de humedad en el suelo. El ahijamiento consta de tres fases (IIArroz, 2004):

1. Fase de crecimiento lento, denominada inicio de ahijamiento y se caracteriza por una emisión baja de hijos por unidad de tiempo.
2. Fase de ahijamiento activo, caracterizada por una emisión alta de hijos por unidad de tiempo.
3. Fase de crecimiento y desarrollo de los hijos, es lenta y puede ocurrir la muerte de algunos de ellos.

En la fase vegetativa, se define el número de panículas por planta o por unidad de área, que constituye uno de los componentes del rendimiento (IIArroz, 2004). Este proceso es influido por la radiación solar, la temperatura y las prácticas culturales, tales como la densidad de plantación, suplemento de agua y nutrientes (Yoshida, 1981; Jaffuel y Dauzat, 2005), entre otras.

La capacidad de obtener un mayor ahijamiento en los cultivares, hace posible que las plantas puedan usar al máximo el espacio disponible, lo cual resulta útil bajo condiciones no favorables.

### **Fase Reproductiva**

Comienza a partir del inicio de la diferenciación de la panícula, que aún está dentro de las vainas que cubren el tallo, y finaliza cuando la planta está en plena floración (CIAT, 2005). Se caracteriza por una disminución en el crecimiento de las hojas y comienza la elongación de los entrenudos del tallo (IIArroz, 2004). Esta fase tiene como tiempo de duración entre 35 y 40 días, aunque depende de diferentes factores como la humedad en el suelo. En la fase reproductiva, se define el número de granos por panícula, otro de los componentes del rendimiento (Katayama, 1995).

### **Fase de Maduración**

Esta abarca desde la emisión de la panícula, el crecimiento de los granos y termina con la maduración de estos. En esta etapa ocurren cambios en la masa del grano, en su tamaño y textura, así como en las sustancias de reserva y en la respiración (IIArroz, 2004).

Un aspecto importante en esta fase, es la acumulación de sustancias en el grano como resultado del transporte y la síntesis de productos de reserva, donde los granos son la fuente principal de destino. Esta última etapa tiene una duración entre 30 y 40 días, aunque varía muy poco de una variedad a otra. En esta fase se define la masa de mil granos, otro de los componentes del rendimiento (Tanaka *et al.*, 1995).

## **2.2 Salinidad**

### **2.2.1 Aspectos generales**

La salinidad de los suelos se ha convertido en un grave problema que afecta el rendimiento de los cultivos y la sostenibilidad de la agricultura. El origen de los distintos tipos de sales en el suelo puede ser natural o antrópico.

Los suelos con problemas naturales de salinidad están localizados en áreas con balance negativo de lluvia/evaporación. Además de las adversas condiciones climáticas, se deben considerar otros factores, como las aguas salinas subterráneas, las tierras bajas cercanas a las costas, los pantanos y lagunas litorales, así como en las áreas cercanas a minas y bóvedas salinas.

Los factores, anteriormente mencionados, implican que el proceso natural de salinidad está ampliamente distribuido por el mundo y su magnitud aumenta en dependencia de los cambios climáticos y la erosión del suelo (García *et al.*, 2007; Ritzema *et al.*, 2008; IPCC, 2016).

El proceso de salinidad es, también, una consecuencia del desarrollo de la sociedad humana, debido a incorrectas prácticas agrícolas en el suelo y mal manejo de las aguas para el riego y de la fertilización, lo cual es conocido como proceso de salinidad atrófica o secundaria (Álvarez *et al.*, 2008).

Existen informes que demuestran que el área de nuestro planeta afectada por la salinización es de alrededor de 800 millones de hectáreas y su extensión crece anualmente a razón de 3 ha  $\text{min}^{-1}$  (FAO, 2017).

En nuestro país, la superficie agrícola afectada por salinidad es de 14% (ONEI, 2016b) y las mayores áreas se encuentran al norte y al sur de las provincias de Guantánamo, Granma, Holguín, Camagüey y Sancti Spíritus. En el Occidente la provincia más afectada es Pinar del Río (Álvarez *et al.*, 2008). Las mayores áreas de producción de arroz del país se ubican, precisamente, en algunas de estas provincias como Granma, Sancti Spíritus y Pinar del Río. No obstante, otras áreas arroceras también están afectadas por este fenómeno en el norte de las provincias de Villa Clara, Ciego de Ávila y Matanzas.

El arroz es más susceptible al estrés salino en la fase vegetativa, especialmente en la etapa de plántula, y en la fase reproductiva, provocando esterilidad y aborto floral (Flowers y Yeo, 1981).

La conductividad eléctrica ha sido el indicador más extendido y el más ampliamente utilizado en la estimación de la salinidad. Se basa en la velocidad con que la corriente eléctrica atraviesa una solución salina, la cual es proporcional a la concentración de sales en solución. Esta se expresa en  $\text{dS m}^{-1}$  ( $\text{dS}$ = deciSiemens). Se ha establecido que suelos con conductividad eléctrica  $< 1 \text{ dS m}^{-1}$  son considerados no salinos, mientras que cuando la conductividad es  $> 8 \text{ dS m}^{-1}$ , los suelos se consideran como muy fuertemente salinos (Norma Cubana de Salinidad, 2010).

Aunque la salinidad de los suelos puede ser debida a diferentes sales, la más común y también la más estudiada es la producida por NaCl (Negrao *et al.*, 2011; Negrao *et al.*, 2017).

### **2.3 Efectos de la salinidad en las plantas**

#### **2.3.1 Efectos fisiológicos inducidos por el estrés salino en las plantas**

La presencia de sales solubles en el suelo afecta negativamente al desarrollo de las plantas de tres formas:

1. **Efecto osmótico:** Este efecto está relacionado con la disminución del potencial osmótico del agua en el suelo, originado por la presencia de las sales disueltas, lo que produce una disminución de la capacidad de las raíces de las plantas para absorber agua del medio.

Este déficit hídrico provoca reducción de la expansión foliar y pérdida de turgencia (Bray *et al.*, 2000). En hojas de cebada, por ejemplo, este efecto se observó a los pocos minutos de iniciar la salinización (Sharma y Bhardwaj, 2007).

También la alteración del balance hídrico genera señales químicas en las raíces como aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular y síntesis de ácido abscísico (ABA). Este último, es capaz de producir cambios fisiológicos locales (conductividad hidráulica) y a distancia (cierre estomático), por lo que se considera una de las señales tempranas de estrés (Hartung *et al.*, 2002). El cierre estomático provoca una disminución del intercambio gaseoso y la transpiración, con la consiguiente disminución de la concentración interna de  $\text{CO}_2$  y por tanto de la tasa fotosintética (Ashraf y Harris, 2013).

2. **Toxicidad iónica específica:** La presencia de iones salinos en los tejidos de las plantas, en concentraciones superiores a las toleradas origina lesiones características en ellas, dependiendo de la naturaleza y concentración de los iones. Los iones que más problemas causan son el cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y el sodio ( $\text{Na}^+$ ), aunque otros como el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) también son tóxicos. La respuesta dada por las plantas ante la presencia de los iones puede resultar beneficiosa en el caso de las halófitas, siempre que se mantengan en unos niveles determinados de concentración (Yeo *et al.*, 1991).

Resulta difícil precisar los límites máximos de concentración tolerables para un determinado anión o catión potencialmente tóxico, ya que varían entre rangos muy amplios según especies y variedades (González, 2001).

Los síntomas fisiológicos asociados a la toxicidad de los iones a partir de determinados niveles críticos son: disminución de la actividad enzimática (Reddy *et al.*, 2017) e inhibición de la fotosíntesis por afectaciones de la membrana tilacoidal y disminución de los pigmentos fotosintéticos (Ashraf y Harris, 2013). También, puede ocasionar alteraciones en la funcionalidad de la membrana con la consecuente repercusión en los mecanismos de transporte y selectividad (Gupta y Huang, 2014).

3. **Desbalance nutricional:** La presencia de iones salinos en la solución del suelo, a partir de un determinado nivel crítico de concentración, origina un desplazamiento del equilibrio

nutricional mineral de las plantas. Esto tiene un efecto directo sobre la absorción y translocación de nutrientes. Por ejemplo, la salinidad induce una absorción y acumulación de fósforo en ciertas especies (Lin y Kao, 2001).

El mecanismo más común, por el que la salinidad altera la nutrición mineral es por la interacción directa de los iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  sobre la absorción y translocación de nutrientes dentro de la planta (Negrao *et al.*, 2011).

Uno de los primeros resultados que revelaron desequilibrios nutricionales en las plantas, como consecuencia de la presencia de los iones salinos, se obtuvieron en judías (*Phaseolus vulgaris* L.), donde se comprobó que la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  depende de la relación  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Nomura *et al.*, 2007). A su vez, numerosos estudios muestran que la concentración de  $\text{K}^+$  en la planta, disminuye al aumentar la salinidad o la relación  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en el medio (Chinnusamy y Zhu, 2003).

Existe una reducción en la absorción y translocación de  $\text{K}^+$  en las plantas cultivadas en sustratos donde predomina el  $\text{Na}^+$ , aunque hay pocos datos que demuestren que la adición de  $\text{K}^+$  en dichas condiciones mejore el desarrollo de las plantas. Sin embargo, la disminución de la relación  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  por adición de  $\text{Ca}^{2+}$  a la solución nutritiva si recupera eficazmente los niveles de  $\text{K}^+$  intracelular, aumentando la tolerancia de la planta a la salinidad (Munns, 2002). Además, de este clásico desequilibrio iónico, una disminución de la concentración de  $\text{NO}_3^-$ , en la planta en condiciones salinas, ha sido ampliamente documentada en distintas condiciones experimentales y con diferentes especies de plantas. Sin embargo, a pesar de la drástica reducción de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en la hoja como respuesta a la salinidad, aumentan o al menos no disminuyen diversas fracciones nitrogenadas, como el contenido en prolina, betaínas y aminoácidos o proteínas solubles totales (Gupta y Huang, 2014). Estos resultados, contradicen que la deficiencia de nitrógeno *per se* sea un efecto tóxico de la salinidad.

La combinación de los efectos anteriores puede dar lugar a otros secundarios como el daño oxidativo (Kibria *et al.*, 2017).

### **2.3.2 Efecto de la salinidad en la generación de estrés oxidativo en las plantas**

El cierre estomático, causado por el efecto osmótico antes mencionado, reduce la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  en las hojas, inhibiendo la asimilación de éste, lo cual resulta en una sobrerreducción de la cadena de transporte electrónico fotosintética en los cloroplastos. Además, el estrés salino daña severamente el aparato fotosintético (Senguttuvel *et al.*, 2014).

La consecuencia fundamental de esta situación es la producción en exceso de las especies activas de oxígeno (EAO), tales como el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ). Las EAO pueden causar la reducción de la fotosíntesis y la transpiración, acelerar la senescencia, aumentar la respiración y provocar el eflujo de los electrolitos y las mutaciones genéticas en las plantas (Arora *et al.*, 2002).

El radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) y el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) son extremadamente tóxicos y sus acciones conducen a la oxidación no selectiva de las moléculas (las proteínas, los lípidos y el ADN) en la vecindad inmediata de su sitio de producción (Möller *et al.*, 2007).

El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno son menos dañinos que el  $^1\text{O}_2$  y el  $\text{OH}\cdot$  debido a que son comparativamente más estables (tiempo de vida media mayor que 1ms). Estas dos especies causan la oxidación inespecífica de los lípidos y las proteínas, pero es la conversión al  $\text{OH}\cdot$ , catalizada por los metales de transición Fe ó Cu (la reacción de Haber-Weiss) la que conlleva a la toxicidad mayor (Arosio y Levi, 2002). El  $\text{O}_2^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se toleran en las células vegetales hasta concentraciones de aproximadamente 1 nM y 500 nM, respectivamente (Möller *et al.*, 2007).

La detección de la acumulación de los productos relativamente estables de la degradación oxidativa de los lípidos (malondialdehído), así como la formación de proteínas carboniladas que se generan debido al ataque de los radicales libres, han sido empleadas para indicar el daño oxidativo (Khan y Panda, 2002; Dalle-Donne *et al.*, 2003).

En cuanto a los sitios de producción, fuentes importantes de especies activas de oxígeno son los procesos del transporte electrónico en los cloroplastos y el estrés foto-oxidativo en los peroxisomas (Mattos y Moretti, 2015). Sin embargo, estas especies pueden producirse en otros organelos celulares. La generación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede ocurrir a partir de la NADPH oxidasa que se localiza en la membrana citoplasmática, las peroxidasas de la pared celular y las amino-oxidadas. En las mitocondrias, también, se encuentran posibles sitios de generación de las especies activas del oxígeno (Petrov y Van Breusegem, 2012).

A nivel genético, se ha detectado que la mayoría de los genes inducidos en respuesta al estrés oxidativo tienen una relación obvia con varios procesos de desarrollo y con otros estreses bióticos y abióticos. Por ejemplo, la mayor parte de los genes de respuesta al  $\text{H}_2\text{O}_2$  se

relacionan con las defensas de las células, la transcripción y transducción de señales, así como con el metabolismo celular (Choudhury *et al.*, 2017).

A pesar de todos estos efectos adversos, las plantas ante determinadas condiciones pueden desarrollar tolerancia al estrés salino.

#### **2.4 Mecanismos de tolerancia a la salinidad**

La tolerancia es una propiedad desarrollada por las plantas durante el proceso evolutivo, para poder perpetuar la especie en condiciones donde se producen estreses climáticos o edáficos constantes, o que se repiten periódicamente.

La tolerancia a los diferentes agentes estresantes, se encuentra conferida por caracteres expresados en los cuatro niveles de organización: desarrollo, estructural, fisiológico y metabólico. De este modo, mientras que algunas plantas presentan gran plasticidad fenotípica, en otras la tolerancia muestra una base genética, que parece depender de varios genes con caracteres aditivo y dominante (Iglesias, 1994).

Para definir el concepto de tolerancia a la salinidad, es necesario establecer dos aspectos fundamentales: uno biológico y otro agronómico. Desde el punto de vista biológico la tolerancia en una especie o variedad, es aquel nivel de salinidad, hasta el cual las plantas son capaces de completar su ciclo de desarrollo y producir semillas viables (Udovenko, 1977). Desde el punto de vista agronómico, la tolerancia se define como la habilidad de las plantas de sobrevivir y producir rendimientos económicos en condiciones de estrés. Esta se expresa como la relación entre el rendimiento de una variedad en condiciones salinas con respecto a su rendimiento en condiciones normales (González, 2000).

La tolerancia a la salinidad, desde el punto de vista biológico, es un fenómeno complejo que envuelve cambios morfológicos y de desarrollo, en estrecha relación con los principales procesos fisiológicos y bioquímicos que se desarrollan en las plantas (Bahmani *et al.*, 2015).

Entre los mecanismos que explican la capacidad de las especies vegetales para tolerar el estrés por sales se encuentran: el ajuste osmótico, la exclusión de iones a nivel radical y la retención de iones en las vacuolas, la eliminación del exceso de sales a través de glándulas o estructuras especializadas y la pérdida de sales a través de la caída de las hojas y pérdida de los frutos. A continuación se abordarán, algunos de estos aspectos de forma más detallada.

### **2.4.1 Ajuste osmótico**

Las plantas, al crecer en condiciones de salinidad, pueden disminuir su potencial osmótico interno para compensar el potencial osmótico externo. De esta manera, mantienen la actividad enzimática y el transporte en el floema y evitan la deshidratación y la muerte (Gomez-Cadena, 2001). El ajuste osmótico está generalmente ligado a la síntesis de solutos orgánicos, como la betaína, colina, glicina-betaína, prolina y sacarosa y/o a la acumulación de iones inorgánicos. Estos llamados solutos compatibles tienen la función de estabilizar la estructura cuaternaria de las proteínas y algunos sirven de aceptores de radicales libres. Entre estos metabolitos ha tenido especial atención la prolina durante la respuesta a estrés salino en arroz (Demiral y Turkan, 2005; Kong-ngern *et al.*, 2012; Nounjan y Theerakulpisut, 2012).

#### **2.4.1.1 Prolina**

Las plantas superiores pueden acumular L-prolina (Pro) en respuesta a diversos estrés medioambientales como sequía y salinidad (Moharramnejad *et al.*, 2015; Gharsallah *et al.*, 2016), bajas temperaturas (Perveen *et al.*, 2013) o radiación ultravioleta (Salama *et al.*, 2011). La acumulación de prolina estabiliza las membranas y los componentes subcelulares (Delauney y Verma, 1993), incluyendo el complejo II de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Hamilton y Heckathorn, 2001). Existen estudios que proponen a la prolina como aceptor final de los radicales libres (Saradhi *et al.*, 1995; Siripornadulsil *et al.*, 2002) y estabilizador del potencial redox por reaprovisionamiento de la provisión de NADP<sup>+</sup> (Delauney y Verma, 1993; Hare y Cress, 1997). Además, este aminoácido induce la expresión de genes que tienen elementos de respuesta a prolina (*PRE*, *ACTCAT*) en sus promotores (Satoh *et al.*, 2002; Oono *et al.*, 2003).

En plantas, la prolina es sintetizada del glutamato o la ornitina. La primera es considerada la vía predominante ante estrés salino, ya que, en estas condiciones disminuyen las actividades de la alanina y aspartato aminotransferasas acumulándose glutamato (Delauney y Verma, 1993). En esta vía, la biosíntesis de la prolina comienza con la fosforilación y reducción del glutamato a glutamil-5-semialdehído (G5SA) por la enzima bifuncional  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS). G5SA es convertido a prolina a partir del pirrolina-5-carboxilato por la  $\Delta^1$ -pirrolina-carboxilato reductasa (Delauney y Verma, 1993). La actividad  $\gamma$ -glutamil quinasa de P5CS representa el paso limitante de la velocidad de reacción de esta vía y es sensible a retroinhibición por Pro (Kishor *et al.*, 1995).

El catabolismo de la prolina envuelve su oxidación a glutamato por una reacción en dos etapas que incluye dos enzimas mitocondriales: prolina deshidrogenasa y P5C-deshidrogenasa (Kiyosue *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996).

Aunque la acumulación de prolina ha sido observada en arroz expuesto a estrés salino, su rol exacto es muy controversial (Lutts *et al.*, 1996; García *et al.*, 1997). Se ha considerado más un síntoma de daño que un indicador de tolerancia al estrés (Lutts *et al.*, 1999). La acumulación de prolina ha sido correlacionada con el grado de deterioro inducido por el estrés (Zhu, 2002).

Por otro lado, la expresión de P5CS fue fuertemente inducida por el estrés salino. Esto sugiere que P5CS en la biosíntesis de la prolina juega un papel protector bajo las condiciones de estrés, quizás controlando el potencial redox y estimulando la vía de las pentosas fosfato para la regeneración del NADP<sup>+</sup> (Hare y Cress, 1997). Algunos autores sugieren que la acumulación de prolina inducida por el estrés salino puede ser causada por la expresión de P5CS (Igarashi *et al.*, 1997). Por otra parte, arroz transgénico que sobreexpresa P5CS produce más biomasa bajo condiciones de estrés salino que el arroz no transformado, por lo que se ha discutido, que el rol principal de P5CS es más en la respuesta al estrés que en el metabolismo de la prolina (Su y Wu, 2004).

#### **2.4.1.2 Glicina betaína.**

La glicina betaína, N,N,N trimetil glicina, (GB) es un compuesto cuaternario de amonio que se encuentra presente en bacterias, cianobacterias, algas, animales y plantas. Es conocido que su acumulación en las células influye en la protección contra el estrés abiótico (Chen y Murata, 2011).

Existen dos vías para la biosíntesis de la GB. En la mayoría de los sistemas biológicos, incluyendo muchos animales, plantas y microorganismos, la GB es sintetizada a partir de la colina por una reacción de oxidación de dos pasos: la colina es oxidada a betaína aldehído, la cual es oxidada a GB. La primera oxidación es catalizada por la colina monooxigenasa en plantas y la segunda oxidación es catalizada por una enzima dependiente de NAD<sup>+</sup>, la betaína aldehído deshidrogenasa (Giri, 2011). Estas enzimas se encuentran, principalmente, en el estroma de los cloroplastos y ante estrés salino se ha informado un incremento de su actividad (Gao *et al.*, 2004). Recientemente, se ha observado que plantas transgénicas con genes que codifican para estas enzimas de la biosíntesis de GB, muestran un mejor comportamiento ante estrés abiótico que las salvajes (Hisyam *et al.*, 2017).

La glicina betaína tiene varias funciones en el metabolismo de las plantas sometidas a estrés, como son: contribuir a la preservación del balance osmótico por su papel como soluto citocompatible, estabilizar la estructura de proteínas como la Rubisco y Rubisco activasa y proteger el aparato fotosintético, especialmente, los centros de reacción. Además, puede actuar como atrapador de radicales libres (Fariduddin *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se han correlacionado los niveles de GB con el aumento de la capacidad fotosintética en condiciones de estrés salino y de sequía (Cha-um *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010).

#### **2.4.2 Exclusión de iones.**

La exclusión de iones a nivel radical y la retención de iones en las vacuolas de las raíces en crecimiento y en los diferentes órganos permiten que las plantas toleren concentraciones extracelulares muy elevadas de sales. Muchas plantas responden al estrés salino mediante la exclusión del Na<sup>+</sup> y/o Cl<sup>-</sup> de las hojas.

El antitransportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> SOS1 (del inglés *salt overly sensitive*) es la única proteína, caracterizada hasta el momento, involucrada en el eflujo de Na<sup>+</sup> de la membrana plasmática de células vegetales. Los mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes de SOS1 son extremadamente sensibles a la sal y tienen defectos combinados en la exclusión de Na<sup>+</sup> y su transporte a larga distancia desde la raíz a los brotes (Qiu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002).

La actividad del intercambiador SOS1 es regulada por la fosforilación por el complejo con actividad quinasa SOS2/SOS3 (Qiu *et al.*, 2002). SOS2 es una Serina-Treonina quinasa y SOS3 es un sensor de Ca<sup>2+</sup> miristoilado (Gong *et al.*, 2004; Kolukisaoglu *et al.*, 2004).

Cuando se une el Ca<sup>2+</sup>, SOS3 se dimeriza y promueve la actividad quinasa de SOS2 (Sánchez-Barrena *et al.*, 2005). Además de activar SOS2, se ha observado que SOS3 participa en el reclutamiento de SOS2 a la membrana plasmática para lograr una interacción más eficiente con SOS1 (Qiu *et al.*, 2002). Las plantas mutantes de ambos genes *sos2* y *sos3* tienen un fenotipo más sensible a la salinidad que las *sos1*.

Se han encontrado los homólogos de estos genes en arroz (*OsSOS1*, *SOS2:OsCIPK24* y *SOS3:OsCBL4*), lo cual demuestra que la vía SOS para la tolerancia a la salinidad funciona en cereales. Además, demostraron que las vías de activación son similares entre especies y tienen un alto grado de conservación estructural entre mono y dicotiledóneas (Martínez-Atienza *et al.*, 2007).

Otras plantas, a través de la succulencia han desarrollado habilidades para incrementar los compartimentos celulares de las hojas y retener altas concentraciones de sales en las vacuolas. El secuestro vacuolar del  $\text{Na}^+$  es una importante y costosa estrategia para disminuir las concentraciones de sodio en el citosol. Este secuestro depende de antitransportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y de fosfatasa como  $\text{H}^+$ -ATPasa tipo V y  $\text{H}^+$ -PPasa (pirofosfatasa) que generan el gradiente de protones necesario para la actividad de los antitransportadores.

La sobreexpresión de *AVPI*, una  $\text{H}^+$ -pirofosfatasa vacuolar aumenta el secuestro de  $\text{Na}^+$  en las vacuolas y mantiene alto el contenido relativo de agua en las hojas. Estas plantas son más tolerantes a la sequía y a la salinidad que el fenotipo salvaje (Gaxiola *et al.*, 2001). Aunque la potenciación de la compartimentación de iones en las vacuolas pudiera incrementar la tolerancia del arroz a la salinidad (Ohta *et al.*, 2003) las especies que son glicófitas típicas se basan primeramente en la exclusión de sodio para el crecimiento en ambientes salinos (Gollack *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003).

### **2.4.3 La protección antioxidante en las respuestas de las plantas al estrés.**

Para minimizar los efectos tóxicos de las EAO, las plantas han desarrollado mecanismos bien regulados de protección enzimáticos y no enzimáticos. Estos mecanismos atrapan e inactivan eficientemente los radicales libres de oxígeno, lográndose el balance entre la producción y la destrucción de los mismos (Choudhury *et al.*, 2017). La habilidad de las plantas de sobreponerse al estrés oxidativo depende de sus capacidades de desencadenar tales mecanismos de respuesta de manera eficaz, en los diferentes organelos celulares.

Los niveles de los antioxidantes se incrementan después de la exposición de las plantas al estrés ambiental biótico o abiótico, incluyendo la salinidad (Kibria *et al.*, 2017).

#### **2.4.3.1 Defensas antioxidantes no enzimáticas**

Los antioxidantes no enzimáticos pueden ser metabolitos lipofílicos entre los que se destacan los tocoferoles, los carotenoides, los polifenoles y los alcaloides. También, pueden ser hidrofílicos como el glutatión, el ascorbato, las poliaminas y la cisteína, que pueden secuestrar directamente las EAO o servir como sustratos para los sistemas de protección enzimáticos (Kibria *et al.*, 2017).

Los carotenoides son un grupo de antioxidantes lipofílicos que están asociados a las membranas (Liu *et al.*, 2015); absorben luz entre 400 y 550 nm, por lo que actúan como pigmentos accesorios colectores de luz (Durchan *et al.*, 2012). También han sido implicados

en la protección contra el daño foto-oxidativo, debido fundamentalmente a que desactivan el  $^1\text{O}_2$  y la  $^1\text{Chl}$  (clorofila) por transferencia del exceso de energía (García-Plazaola *et al.*, 2012). También protegen las células contra el radical superóxido e hidroxilo, participan en la terminación de las reacciones de peroxidación lipídica y en la regeneración del antioxidante tocoferol (Edreva, 2005).

Por otra parte, los tocoferoles, a diferencia de los carotenoides que forman complejos con las proteínas, se encuentran libres en la matriz lipídica de las membranas y aparentemente juegan un papel en el control de la fluidez y la estabilidad de las membranas (Marquardt *et al.*, 2013).

El ascorbato es uno de los antioxidantes más potentes y estudiados en el reino vegetal. Ha sido encontrado en los principales tipos de células vegetales, organelos y en el apoplasto (Mattos y Moretti, 2015). El ascorbato puede atrapar directamente radicales superóxido e hidroxilo, así como oxígeno singlete y también disminuir los niveles de peróxido a través de la ascorbato peroxidasa (Sen *et al.*, 2014). En cloroplastos el ascorbato actúa como cofactor de la violaxantina desepoxidasa, involucrada en la disipación del exceso de energía. También participa en la regeneración del tocoferol a partir del radical tocoferilo por lo que contribuye a la protección de las membranas (Sharma *et al.*, 2012).

El glutatión (GSH) es otro de los antioxidantes hidrofílicos. Este puede actuar como aceptor o donador de electrones en muchas reacciones biológicas (Kao, 2015). Además, está involucrado en numerosos procesos celulares como la desintoxicación de xenobióticos, el secuestro de metales pesados y la defensa contra EAO ya que inactiva el  $^1\text{O}_2$  y el  $\text{OH}\cdot$  (Noctor *et al.*, 2012). El glutatión protege los grupos tiol de las enzimas del estroma de los cloroplastos. Se asocia a la regeneración del  $\alpha$ -tocoferol y del ascorbato a través del ciclo glutatión-ascorbato y es el sustrato de las enzimas glutatión-S-transferasa y la glutatión peroxidasa (Szarka *et al.*, 2012).

#### **2.4.3.2 Defensas antioxidantes enzimáticas**

Entre los principales antioxidantes enzimáticos se encuentran las enzimas que remueven oxidantes tóxicos como las superóxido dismutasas, las peroxidasas, las catalasas y otras enzimas que mantienen los niveles de antioxidantes en sus estados reducidos como son la deshidroascorbato reductasa, la monodeshidroascorbato reductasa, y la glutatión reductasa (Kibria *et al.*, 2017).

Actualmente, son poco comprendidos los mecanismos específicos que modulan la expresión de los genes antioxidantes, especialmente de los que codifican las diferentes isoenzimas de una misma proteína. Los resultados han mostrado que las múltiples formas de las enzimas antioxidantes tienen un patrón de expresión diferencial, su regulación es compleja y se localizan en varios tejidos y organelos (Foyer y Noctor, 2009).

Las superóxido dismutasas (SOD) (EC 1.15.1.1) son metaloenzimas que eliminan los radicales  $O_2^-$ , producen el oxígeno molecular y el peróxido de hidrógeno. Se han detectado varias isoformas de esta metaloenzima, que se distinguen por su cofactor metálico. En general, las plantas contienen la MnSOD mitocondrial, así como las Cu/Zn SOD citosólicas y cloroplásticas. Se conoce que en los cloroplastos de algunas especies se ha encontrado, además, la FeSOD (Alscher *et al.*, 2002). La existencia de múltiples formas de la SOD, su localización dentro de los tejidos, las células, y los organelos, implica funciones múltiples para estas enzimas en las plantas.

La actividad de la SOD responde a diferentes condiciones de estrés (Alscher *et al.*, 2002), y ante el estrés salino se han observado resultados diferentes. Algunos autores mostraron que la actividad total de la SOD disminuyó en callos de papa (*Solanum tuberosum* L.) crecidos en presencia de NaCl (Rahnama y Ebrahimzadeh, 2006). Sin embargo, Benavides *et al.* (2000) habían informado que la actividad de la SOD se incrementó en cultivares de papa sensibles a la sal y no se produjeron cambios en los tolerantes. Otros estudios plantean incrementos de la actividad SOD en cultivares tolerantes a la sal y una reducción en los sensibles (Hernández *et al.*, 1993)

La catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) fue la primera enzima antioxidante descubierta y caracterizada. La reacción típica de la catalasa es la dismutación de dos moléculas de  $H_2O_2$  en agua y  $O_2$ . Aunque algunas catalasas de bacterias utilizan manganeso como cofactor redox, todas las formas eucarióticas conocidas utilizan el grupo hemo (Fe-porfirina) (Zamocky *et al.*, 2008). El tipo mejor caracterizado de catalasa es la “típica” o monofuncional, la cual se encuentra en diversos organismos como procariotas, hongos, animales y plantas (Chelikani *et al.*, 2004). Estas enzimas consisten en polipéptidos de 50 a 70 kDa y están organizadas en tetrámeros con cada monómero enlazado al grupo hemo (Zamocky *et al.*, 2008).

Las catalasas se distinguen de otras enzimas en que no requieren de un reductor para la catálisis de la reacción de dismutación. Junto a la APX, se diferencian de otras enzimas del

metabolismo del peróxido por su alta especificidad por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las catalasas tienen una alta tasa de recambio, con una afinidad mucho menor por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que la APX y la peroxirredoxina las cuales tienen valores de  $K_m$  por debajo de los  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  (König *et al.*, 2002). Sin embargo, esto mismo dificulta determinar las características cinéticas precisas de la enzima y lo más que se ha estimado es la  $K_m$  aparente para  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el rango de  $40\text{-}600 \text{ mmol L}^{-1}$  (Chelikani *et al.*, 2004). Esto indica que las funciones de la catalasa *in vivo* están por debajo de su capacidad máxima, pero su actividad se acelera, incluso si las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumentan a valores relativamente altos.

Por otra parte, Scandalios (1990) plantea que las catalasas y las superóxido dismutasas son las enzimas antioxidantes más eficientes. Su acción combinada no sólo convierte el  $\text{O}_2^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y oxígeno, sino que también evita la formación del  $\text{OH}^\cdot$ , el oxidante más tóxico.

Las catalasas son proteínas sensibles a la luz, con una alta tasa de recambio y los estrés como bajas temperaturas, sal e irradiación alta, pueden causar decrementos en la cantidad de enzima acelerando la inactivación o disminuyendo la capacidad de recambio de la proteína (Mhamdi *et al.*, 2010). No obstante, se ha informado que la introducción de un gen de la catalasa en arroz incrementó la resistencia al estrés salino (Moriwaki *et al.*, 2007); mientras, Özdemir *et al.* (2004) demostraron que la salinidad disminuyó significativamente la actividad enzimática de la CAT en plantas de arroz.

Las hemo-peroxidasas son glicoproteínas que contienen el grupo hemo en su centro catalítico. De acuerdo a las diferencias en la estructura primaria de las mismas y a sus propiedades catalíticas, existen tres clases diferentes de enzimas peroxidadas (POXs). Así, se describen las peroxidadas de la clase I intracelulares (EC 1.11.1.15/.6/.11), las de la clase II liberadas por los hongos (EC 1.11.1.13/.14), y las peroxidadas de la clase III secretadas por las plantas (EC 1.11.1.7). Esta última clase se encuentra presente en todas las plantas terrestres (Hiraga *et al.*, 2001).

La acción de las peroxidadas se sustenta en dos posibles ciclos catalíticos, el peroxidativo y el hidroxílico. En su ciclo catalítico regular, las peroxidadas de la clase III catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno mediante la toma de electrones de varias moléculas donantes tales como compuestos fenólicos, precursores de lignina, auxinas ó metabolitos secundarios (Hiraga *et al.*, 2001).

Por otra parte, en su ciclo hidroxílico, la acción de la POX forma varios radicales libres de oxígeno. Así, las POXs tienen la capacidad de generar peróxido de hidrógeno y subsiguientemente radicales hidroxilo en el ciclo hidroxílico, y debido a esa habilidad, las POXs pueden implicarse en la producción de radicales que provocarán, por ejemplo, la ruptura no-enzimática de pectinas y xiloglucanos que ocurre durante la elongación celular (Fry, 2004). También estas enzimas pueden relacionarse con la generación de radicales libres que requeriría la transducción de las señales del estrés (Liszkay *et al.*, 2003; Passardi *et al.*, 2004). De las dos familias de POX más importantes de las plantas, se encuentran unas que oxidan preferiblemente los sustratos fenólicos como el compuesto artificial guayacol y otras que tienen especificidad por el sustrato ascorbato (Asada, 1992).

Las “fenol” peroxidasas se encuentran con elevada actividad específica en las paredes celulares. Sus productos de oxidación, los radicales fenoxi-monolignol, se incorporan espontáneamente a la lignina y promueven la rigidez de las paredes (Ros-Barceló *et al.*, 2007). También las POXs están involucradas en la formación de la lignina a través de un proceso similar (Ralph *et al.*, 2004).

De esta manera, las POXs están implicadas en el proceso de entrecruzamiento de los compuestos de la pared celular, con el fin de crear una barrera física durante el crecimiento normal de la planta y en respuesta a estímulos tales como: heridas, patógenos y variaciones climáticas. La implicación de las POXs en el entrecruzamiento está asociado con la capacidad oxidativa del ciclo peroxidativo (Passardi *et al.*, 2004).

Varias de las isoenzimas de las peroxidasas del guayacol están presentes en los diferentes organelos como las vacuolas, el citosol y la pared celular (Morales y Ros-Barceló, 1997).

La exposición de las plantas a diferentes tipos de estrés induce la actividad de la peroxidasa. La expresión de esta enzima conduce a la defensa a través de dos mecanismos: pasivamente, por la creación de paredes más potentes; o activamente, por la producción masiva de radicales libres (Passardi *et al.*, 2005).

El estrés salino aumenta la actividad de la enzima peroxidasa en plantas de arroz (Panda y Khan, 2003; Özdemir *et al.*, 2004; Khan y Panda, 2008). La actividad de las peroxidasas de callos de papa se incrementó bajo estrés salino, pero a altas concentraciones de NaCl (150 mmol L<sup>-1</sup>) esta actividad se redujo (Rahnama y Ebrahimzadeh, 2006).

Sin embargo, en trigo, la salinidad disminuyó las enzimas POX y APX, además de aumentar

los niveles de MDA y la producción del radical superóxido (Zheng *et al.*, 2009).

En algodón (*Gossypium hirsutum* L.), ha sido informado que las POX se incrementan en los cultivares tolerantes a la sal y se reducen o permanecen constantes en los sensibles (Gossett *et al.*, 1994; Rajguru *et al.*, 1999; Meloni *et al.*, 2003).

Se consideran a las ascorbato peroxidasas (APX) (EC 1.11.1.11) como las atraparoras de peróxido de hidrógeno más importantes que operan tanto en el citosol como en los cloroplastos (Asada, 1992). En arroz, Pandey *et al.* (2017) encontraron ocho isoenzimas de las APX distribuidas en diferentes compartimentos celulares como son la membrana de los tilacoides (OsAPx8), el estroma (OsAPx5, OsAPx6, OsAPx7), los peroxisomas (OsAPx3 y OsAPx4) y el citosol (OsAPx1 y OsAPx2). Todas las isoformas difieren en sus propiedades como masa molar, pH óptimo, estabilidad, velocidad catalítica y afinidad por el sustrato, lo cual contribuye a la regulación diferencial de la expresión de cada isoenzima (Caverzan *et al.*, 2012).

Las APX han manifestado una alta afinidad por el ascorbato y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones saturantes de 0,2-0,4 mmol L<sup>-1</sup> y 0,02-0,035 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Esta alta afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hace a esta enzima una buena candidata para la regulación precisa de las concentraciones de este oxidante (Choudhury *et al.*, 2017).

Estas enzimas, especialmente las isoformas presentes en los cloroplastos, son lábiles en ausencia del ascorbato. Se distinguen de las peroxidasas de guayacol por la inhibición con el p-cloromercuribenzoato (Asada, 1992). Todas las isoenzimas de la APX muestran inducción por el tratamiento con ABA, siendo las isoformas citosólicas las más inducibles (Zhang *et al.*, 2014; Pandey *et al.*, 2017).

Existen evidencias de que las APX son reguladas por el estrés ambiental. Se ha informado que la APX fue más importante que la CAT en la desintoxicación del peróxido de hidrógeno en plantas de papa expuestas a estrés salino (Benavides *et al.*, 2000). También, plantas transgénicas de *Arabidopsis*, portadoras de un gen de cebada que codifica para una APX de peroxisomas fueron más tolerantes al estrés salino que las plantas salvajes (Xu *et al.*, 2008). Sin embargo, Zheng *et al.* (2009) observaron una disminución de la APX en plantas de trigo (*Triticum aestivum*) ante el estrés salino impuesto por NaCl (195 mmol L<sup>-1</sup>).

La monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR) (EC 1.6.5.4) cataliza la regeneración del ácido ascórbico a partir del radical monodeshidroascorbato utilizando NAD(P)H como

donador de electrones. Por tanto, esta enzima es la encargada de mantener el “pool” de ascorbato en su forma reducida.

Las MDHAR de plantas exhiben una alta similitud de secuencia con las flavoenzimas procarióticas. Se ha informado la presencia de actividad MDHAR en algas (Haghjou *et al.*, 2009), briófitas (Lunde *et al.*, 2006) y en plantas superiores (Yoon *et al.*, 2004; Leterrier *et al.*, 2005). Las isoformas de MDHAR están presentes en cloroplastos, citosol, peroxisomas y mitocondrias (Jimenez *et al.*, 1997; Mittova *et al.*, 2004; Kavitha *et al.*, 2010).

La estructura general de la MDHAR es similar a otras proteínas azufre-hierro con función reductasa y su actividad favorece al NADH sobre el NADPH como donante de electrones (Park *et al.*, 2016).

Algunos autores han encontrado que tanto la actividad como la expresión génica de esta enzima se ven afectadas por varias condiciones de estrés (Pandey *et al.*, 2015). Estudios con plantas transgénicas han confirmado el papel de esta enzima en la inducción de tolerancia. Por ejemplo, la sobreexpresión de una MDHAR de *A.thaliana* en *Nicotiana tabacum* incrementó la tolerancia de las plantas transgénicas a estrés por ozono, sal y deshidratación (Eltayeb *et al.*, 2007). La sobreexpresión de genes de MDHAR citoplasmática de *Acanthus ebracteatus* en *Oryza sativa* aumentó la respuesta al estrés salino. Igualmente sucedió cuando se sobreexpresaron genes de MDHAR cloroplástica de *Malpighia glabra* en *Nicotiana tabacum* (Eltelib *et al.*, 2012; Sultana *et al.*, 2012).

La deshidroascorbato reductasa (DHAR; EC 1.8.5.1) es otra enzima encargada de la regeneración del ascorbato oxidado, regulando de esta forma el estado redox de las células vegetales. Concretamente, esta enzima cataliza la reducción del DHA (forma oxidada del ascorbato) a ASC mediante la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG). La DHAR se ha identificado como otra de las enzimas integrantes del ciclo ascorbato-glutatión. La actividad DHAR ha sido encontrada en mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas de hojas y raíces de diferentes especies vegetales (Pandey *et al.*, 2015).

La DHAR también tiene un papel importante en la tolerancia a estrés abiótico, ya que plantas que sobreexpresan este gen son más tolerantes a diferentes estreses. Por ejemplo, la sobreexpresión de DHAR incrementó el ácido ascórbico y la tolerancia a estrés oxidativo y salino en plantas de tomate (LeMartret *et al.*, 2011). También, la expresión simultánea de una DHAR cloroplástica de arroz y una GR de *E. coli* en plantas de tabaco aumentó la tolerancia a

estrés salino y frío. Adicionalmente, esta enzima juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo. La pérdida de la actividad de DHAR ocasionó en arroz una disminución rápida del contenido de ascorbato, con un decremento de la expansión foliar lo que afectó el crecimiento de las plantas (Chen y Gallie, 2006).

Esta enzima es importante en la protección frente a diferentes estreses producidos por herbicidas, contaminantes atmosféricos, bajas temperaturas, estrés fotooxidativo, estrés hídrico y estrés por metales pesados (Gill y Tuteja, 2010).

La glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2) convierte el glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) utilizando NADPH. Esta enzima mantiene el estado redox de la célula permitiendo el balance entre el GSH y el “pool” de ascorbato (Noctor *et al.*, 2012). La GR es una flavoproteína oxidoreductasa (Achary *et al.*, 2014) que posee múltiples isoformas (Pang y Wang, 2010). Se encuentra localizada en los cloroplastos, la mitocondria y el citosol, aunque también se ha encontrado en peroxisomas (Jimenez *et al.*, 1997). Generalmente, en los cloroplastos muestra su mayor actividad, aproximadamente el 80% de la actividad total en los tejidos vegetales proviene de las isoformas cloroplásticas (Foyer y Noctor, 2011).

La actividad GR es regulada por los efectos combinados del pH, NADPH y GSSG. Bajas concentraciones de NADPH disminuyen su actividad, al igual que pH por debajo de 5,5 y por encima de 7, mientras que en este rango no se observan variaciones significativas (Lascano *et al.*, 1999). Existen evidencias que la actividad de la GR es determinante en la tolerancia de diferentes especies vegetales a estreses medioambientales como sal, sequía, alta irradiación, temperaturas extremas y ozono (Shamsi *et al.*, 2010). Sin embargo, muchos estudios muestran que la actividad GR aumenta, mientras otros observan que disminuye ante condiciones de estrés. Estos cambios en la actividad pueden ser debido a síntesis de nuevas enzimas o por cambios en sus propiedades cinéticas.

Ante estrés salino se han informado incrementos en la actividad GR en *Casuarina*, guisante, cítricos, soya, arroz, garbanzo, tomate, trigo y algodón (Pang y Wang, 2010). Esta respuesta es dependiente de la tolerancia de los cultivares, ya que, por ejemplo, la actividad GR incrementó en la parte aérea de un cultivar tolerante de papa, mientras que disminuyó en el sensible (Aghaei *et al.*, 2009). Además, en raíces de maíz, se observó un decremento en la actividad en los cultivares sensibles; mientras que en los tolerantes no varió (Azevedo-Neto *et al.*, 2006). Como se puede observar todas estas defensas enzimáticas son muy importantes en la

eliminación del estrés oxidativo provocado por la salinidad en las plantas. Por esta razón, el estudio de la actividad y la expresión de estas enzimas, es clave para conocer si la aplicación de bioestimulantes es capaz de mitigar los efectos adversos del estrés salino en las plantas de arroz.

## **2.5 Los brasinoesteroides como hormonas de las plantas**

### **2.5.1 Aspectos generales**

Los brasinoesteroides (BR) son considerados la sexta clase de hormonas vegetales y hasta el presente han sido aislados y caracterizados, en forma libre o conjugada, más de 50 compuestos en todas las especies vegetales (Khatoon *et al.*, 2017).

Estas hormonas están distribuidas por casi toda la planta pero su mayor concentración se encuentra en el polen y las semillas (Haubrick y Assmanns, 2006). La primera de estas sustancias, aislada de polen de nabo (*Brassica napus L.*) fue la brasinólida, BL (Grove *et al.*, 1979).

Entre las respuestas a los BR se incluyen, además del efecto clásico de elongación de los tallos, efectos sobre las raíces, la foto-morfogénesis, la elongación floral, la senescencia, la división celular, el desarrollo vascular y reproductivo, la polarización de la membrana y el bombeo de protones, la regulación de las relaciones fuente/sitio de consumo y la modulación del estrés (Fridman y Savaldi-Goldstein, 2013; Khatoon *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2017).

### **2.5.2 Genes regulados por los brasinoesteroides**

La identificación de genes directamente regulados por BR se inicia con los estudios relacionados con sus efectos en la inducción de genes *XET* (xiloglucano-endotransglicosilasa), asociados al alargamiento celular (Zurek y Clouse, 1994; Xu *et al.*, 1995). También, en diferentes especies vegetales se ha observado el aumento de la expresión de los genes *BRU1*, *TCH4*, *LeBR1*, *OsXTR1* y *OsXTR3*, los cuales codifican para xiloglucano endotransglicosilasas/ hidrolasas (XET o XTH) de soya, Arabidopsis, tomate y arroz, respectivamente (Zurek y Clouse, 1994; Xu *et al.*, 1996; Koka *et al.*, 2000; Uozu *et al.*, 2000). Las XET o XTH son enzimas involucradas en la biosíntesis y modificación de la pared celular.

Análisis de microarreglos han demostrado que el tratamiento con BL sobreexpresa numerosos genes adicionales relacionados con la expansión celular y la organización de la pared celular, incluyendo posibles expansinas, extensinas, proteínas arabinogalactanos y enzimas modificadoras de pectina (Goda *et al.*, 2002; Divi *et al.*, 2016).

Se ha encontrado que la señalización por BR es indispensable para el incremento de la abundancia de las pectinmetilesterasas (PME), permitiendo la modulación de la expresión de *AtPME41*, que está asociada con los mecanismos de resistencia al estrés (Qu *et al.*, 2011; Wolf *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que la expresión de dos genes XET (*tch4* y *meri5*) se reduce apreciablemente en los mutantes de Arabidopsis deficientes de brasinoesteroides, y se incrementa con la aplicación de la EBL (Kauschmann *et al.*, 1996). Un gen homólogo a *bru1* en tomate (*Solanum lycopersicum*), el LeBR1, tiene una expresión reducida en plantas del mutante deficiente *dpy* y se induce rápidamente (a partir de 2 horas) después del tratamiento con BR (Koka *et al.*, 2000).

Los BR también inducen la expresión de varios genes relacionados con el ciclo celular (*CYCA*, *CYCB*, *CYCD3;1*, *CYCD3;2*) que codifican para quinasas dependientes de ciclinas (CDKs siglas en inglés) y ciclofilinas que juegan un papel crítico en la regulación del ciclo celular, la proliferación y la diferenciación (Fu *et al.*, 2008)

Sin embargo, se han obtenido evidencias de expresión génica relacionadas con otros efectos de los BR como la síntesis del etileno, la interacción con otras fitohormonas, el desarrollo vascular, la foto-morfogénesis, la modulación de las respuestas al estrés, la iniciación de la traducción de proteínas, entre otros (Divi *et al.*, 2016). Así, en el frijol mungo (*Vigna radiata*), se encontró que los BR inducen genes de la 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa, enzima responsable de la síntesis del etileno (Yi *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha demostrado que la expresión del gen XET (*bru1*) es más intensa en células del parénquima paratraqueario (Oh *et al.*, 1998), lo que sugiere el papel de los BR en la formación del xilema. En Arabidopsis, se detectó la expresión del gen *opr3*, relacionado con la síntesis de ácido jasmónico (Müssig *et al.*, 2000). Además, la BL induce la expresión de los genes *ga20ox1*, relacionado con el metabolismo de las giberelinas (Bouquin *et al.*, 2001).

Otra característica de la regulación de la expresión génica por los BR es que estas hormonas regulan directamente algunos genes que codifican para su propia biosíntesis (Goda *et al.*, 2002). Se ha visto que en condiciones de desarrollo normal, la producción de los BR es controlada por retroalimentación de los genes de la biosíntesis, debido a que la expresión es parcialmente reprimida a concentraciones fisiológicas de estas hormonas (Choe *et al.*, 2001).

Sin embargo, un nivel alto de hormona activa resulta en la represión de los genes de la

biosíntesis y en la inducción de *bas1*, gen relacionado con el catabolismo de los BR (Choe *et al.*, 2001). Varios estudios han probado que los genes *dwf4* y *cpd* se reprimen significativamente por la aplicación de BL (Goda *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002).

### **2.5.3 Brasinoesteroides en la protección de las plantas sometidas a estrés salino**

En los últimos años, se ha informado ampliamente el efecto protector de los brasinoesteroides ante distintos tipos de estrés como altas y bajas temperaturas (Cui *et al.*, 2015; Eremina *et al.*, 2017), sequía (Hu *et al.*, 2013; Behnamnia, 2015) y salinidad (Das *et al.*, 2014; Upadhyaya *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2017 ). Además, estas hormonas disminuyen los efectos del estrés causado por la falta de nutrientes, por exceso de metales pesados y también incrementan la resistencia a herbicidas y agentes patógenos (Cao *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013a; Fariduddin *et al.*, 2014; Canales *et al.*, 2016).

En cuanto a la protección al estrés salino, se demostró que en *Eucalyptus camaldulensis*, la EBL estimuló la germinación de las semillas en condiciones salinas (Sasse *et al.*, 1995)

Por otra parte, en plántulas de maní sometidas a salinidad, diferentes BR naturales revirtieron los efectos inhibitorios del crecimiento (Vardhini y Rao, 1997).

El tratamiento a las semillas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) con homobrasinólida (HBL), antes o después de la inmersión en NaCl, revirtió los efectos dañinos que el tratamiento salino ejerce en el crecimiento y rendimiento de estas plantas (Ali *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que el tratamiento pre-siembra con HBL, estimuló las actividades de las enzimas antioxidantes, además de disminuir la peroxidación lipídica e incrementar la concentración de proteínas en plantas de maíz sometidas a estrés salino (Arora *et al.*, 2008).

El tratamiento con EBL a las raíces de plantas de dos cultivares de trigo, una tolerante y otra moderadamente sensible a la salinidad, mejoró el crecimiento de las plantas e incrementó el rendimiento en condiciones salinas (Ali *et al.*, 2008b). En otro estudio, con estos mismos cultivares, se demostró que la aspersion foliar con EBL fue capaz de mejorar el crecimiento de las plantas de ambos cultivares en condiciones normales; sin embargo, en condiciones salinas, solamente se estimuló el crecimiento del cultivar tolerante; aunque se observó una estimulación de la actividad fotosintética y de la eficiencia del fotosistema II en ambos cultivares (Shahbaz *et al.*, 2008).

Otros autores informaron, que el tratamiento a las semillas con EBL disminuyó significativamente el índice mitótico de plantas de cebada crecidas en medio que contenía

NaCl; sin embargo, esta hormona fue capaz de disminuir las anomalías cromosómicas que se presentan en los ápices de las raíces en estas condiciones (Tabur y Demir, 2009).

En otra especie, *Brassica napus*, se ha informado que la presencia de EBL en el medio estimuló significativamente la germinación y el crecimiento inicial de las plántulas ante condiciones salinas (Kagale *et al.*, 2007). Igualmente, la adición de EBL al medio de crecimiento aumentó los niveles de pigmentos fotosintéticos, carbohidratos y enzimas antioxidantes en plántulas de frijol sometidas a salinidad (Nafie *et al.*, 2015).

Además, se ha informado que la imbibición de las semillas con HBL estimuló el crecimiento y algunas enzimas antioxidantes en plántulas de mostaza (*Brassica juncea*) sometidas a estrés salino (Harpreet *et al.*, 2015).

En cuanto a la aspersión foliar, se ha constatado que, la EBL 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  incrementó significativamente el crecimiento, la concentración de clorofilas y la actividad fotosintética en plántulas de mostaza sometidas a estrés salino. También disminuyó el eflujo de electrolitos y la peroxidación lipídica, lo que favoreció el índice de estabilidad de las membranas (Ali *et al.*, 2008a).

La aspersión foliar con EBL en plantas de fresa (*Fragaria*×*ananassa*) expuestas a estrés salino, disminuyó los efectos inhibitorios que la sal causa en el crecimiento y en el contenido de nutrientes de las plantas (Karlidag *et al.*, 2011). En plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) sometidas a estrés salino, la aspersión foliar con EBL (5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) ejerció un efecto positivo en el crecimiento, el rendimiento y el sistema antioxidante (Rady, 2011). En plantas de papa sometidas a estrés salino, la aspersión foliar con EBL estimuló el crecimiento, los niveles de prolina y algunas enzimas antioxidantes (Upadhyaya *et al.*, 2015). Por otra parte, la aspersión foliar con EBL 0,01  $\mu\text{mol L}^{-1}$  aceleró el crecimiento de plantas de trigo de 14 días de edad sometidas a NaCl (Dong *et al.*, 2017).

En el cultivo del arroz, existe relativamente poca información sobre la protección de los brasinoesteroides a las plantas sometidas a estrés salino. Así, Anuradha y Rao (2001) encontraron una recuperación en el crecimiento y un incremento de la concentración de proteínas solubles totales y de RNA en plántulas de arroz cuyas semillas fueron tratadas con EBL (3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) y NaCl (150  $\text{mmol L}^{-1}$ ) durante 24 horas.

En trabajos posteriores, se demostró que la imbibición de las semillas de arroz con BL, EBL y HBL (3  $\mu\text{M}$ ) restauró considerablemente el crecimiento, los niveles de clorofilas y la actividad

de la nitrato reductasa ante estrés salino (Anuradha y Rao, 2003); así como, el tratamiento con EBL, a esa concentración, logró disminuir la peroxidación lipídica y la acumulación de prolina causada por el estrés salino ( $120 \text{ mmol L}^{-1}$ ), incrementando también, la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (Özdemir *et al.*, 2004).

Igualmente, el tratamiento a las semillas con diferentes concentraciones de EBL durante ocho horas estimuló el crecimiento, los niveles de proteína, prolina y la actividad de las enzimas antioxidantes en plantas de arroz sometidas a estrés salino. Además, el tratamiento con EBL y NaCl disminuyó los niveles de MDA y *SaltT*, un gen de respuesta a estrés, mientras que sobreexpresó el gen *OsBR11* (Sharma *et al.*, 2013b).

Los autores mencionados anteriormente, refieren la utilización del tratamiento a las semillas y la adición al medio como modos de aplicación de los BR para evaluar la respuesta de las plantas sometidas a estrés salino. Sin embargo, a pesar de que la aspersión foliar es el modo de aplicación más utilizado, para la estimulación del rendimiento de los cultivos, la información que aparece en la literatura internacional acerca de la posible protección inducida a las plantas por la aspersión foliar de BR es limitada. Por otra parte, se conocen muy poco los mecanismos por los cuales estas hormonas vegetales ejercen su efecto protector en plantas sometidas a estrés salino y, en particular, en el cultivo del arroz.

#### **2.5.4 Análogos espiroestánicos de brasinoesteroides**

Los BR, desde muy temprano, generaron interés práctico en la agricultura, con la aplicación de compuestos naturales como promotores de los rendimientos de los cultivos (Ikekawa y Zhao, 1991). Sin embargo, debido a problemas de las aplicaciones de estos compuestos naturales en condiciones de campo, así como el alto costo de la síntesis química de estos, se hizo necesario la introducción de análogos de BR, cuyos efectos tenían una duración más prolongada en el tiempo y a la vez, su obtención era mucho más económica (Khripach *et al.*, 1999).

De manera general, los análogos de BR pueden ser divididos en tres grandes grupos: los análogos de la cadena lateral, análogos del núcleo esteroidal y análogos con modificaciones tanto en el núcleo esteroidal como en la cadena lateral. Por ejemplo, los análogos espiroestánicos de brasinoesteroides presentan el anillo espirocetálico en lugar de la cadena lateral típica de los brasinoesteroides naturales y se ha demostrado que algunos presentan actividad promotora del crecimiento (Coll *et al.*, 1995; Khripach *et al.*, 1999; Núñez, 2003).

Dentro de esta clase de análogos resulta atractivo el estudio de los que poseen el núcleo esterooidal similar a la castasterona.

A pesar de sus características estructurales similares a los BR naturales, no se conoce si los análogos de BR poseen actividad brasinoesteroide *per se* ó si ellos actúan como precursores de los mismos. También pudieran interactuar con los BR endógenos para ejercer su acción (Núñez, 2003).

En Cuba, se han realizado numerosos estudios de las respuestas fisiológicas de las plantas a los análogos espirostánicos de castasterona en múltiples especies (González *et al.*, 1998; Núñez, 2003; Ortega *et al.*, 2003). Se ha constatado su influencia en la germinación, el enraizamiento y el crecimiento vegetativo de las plantas, así como en el rendimiento y la calidad de las cosechas (Nuñez, 2013).

En cuanto al efecto de estos compuestos ante estrés abiótico, existen resultados que demuestran el efecto del análogo conocido como MH5 en la estimulación de la tolerancia de las plántulas de arroz crecidas *in vitro*, ante estrés por déficit hídrico durante 24 horas (García *et al.*, 2005). También, se ha encontrado un efecto positivo de este compuesto en la tolerancia de vitroplantas de banano (*Musa L.*) ante un estrés por temperatura baja (González *et al.*, 2005).

En el estrés por temperatura alta, se ha informado que la incubación de tejido foliar de tomate con BB-6 0,01 mg L<sup>-1</sup>, propicia la granulación en el núcleo, nucleolo y citoplasma, así como más desarrollo del retículo endoplasmático, cuando este se somete a una temperatura de 40°C por 1,5 horas (Sam *et al.*, 2001). Igualmente, en plántulas de tomate cv. Amalia sometidas a estrés de altas temperaturas la inclusión en el medio del análogo MH-5 (1 µmol L<sup>-1</sup>) o BB-6 (1 µmol L<sup>-1</sup>) indujo termotolerancia (Mazorra, 2009).

En cuanto al estrés salino, la exposición durante 16 días al BB-16 0,01 mg L<sup>-1</sup> incrementó, significativamente, la actividad de las enzimas CAT, SOD, GR y ligeramente la actividad de la APX en plántulas de arroz crecidas *in vitro* en presencia de NaCl 75 mmol L<sup>-1</sup> (Núñez *et al.*, 2003-2004)

El tratamiento a las semillas de los genotipos de arroz J-104 e INCA LP-7 con diferentes concentraciones de dos análogos de BR (BB-6 y BB-16) estimuló el crecimiento de plántulas crecidas en NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup>. El tratamiento con BB-16 0,005 mg L<sup>-1</sup> fue el más efectivo en revertir los efectos adversos que la salinidad provocó en el crecimiento de las plantas de

ambas variedades, mientras que la respuesta al BB-6 dependió del cultivar (Núñez *et al.*, 2007).

Adicionalmente, se evaluó la influencia del tratamiento a las semillas con varias concentraciones de EBL y BB-16 (0; 0,01; 0,1 y 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) en el crecimiento de las plántulas de dos cultivares de arroz (J-104 y Ginés) en medio salino. Tanto la EBL como el BB-16 fueron capaces de revertir parcialmente la inhibición que en el crecimiento de las plántulas de ambos genotipos de arroz provocó la presencia de NaCl; siendo más efectivos los tratamientos en el cultivar tolerante Ginés (Núñez *et al.*, 2013).

Recientemente, se ha informado que el tratamiento a las semillas de arroz cv. INCA LP-7 con varias concentraciones de dos análogos de brasinoesteroides, BB-16 y BB-25, estimularon la longitud y la masa seca de las raíces en el caso del primero, así como la longitud y la masa seca de ambos órganos en el segundo. Las concentraciones más efectivas fueron 0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para el caso del BB-16 y 0,01  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para el BB-25 (Núñez *et al.*, 2016).

Con los análogos sucede algo similar a la EBL, la información que aparece en la literatura refiere la utilización del tratamiento a las semillas para estudiar los efectos que los mismos provocan en las plantas crecidas en condiciones de estrés abiótico, aun cuando la aplicación para incrementar los rendimientos se ha realizado en su mayoría por aspersión foliar.

Además, en el caso del BB-16, apenas se conocen los mecanismos por los cuales este ejerce su efecto protector en las plantas sometidas a estrés salino, y sobre todo, si estos mecanismos pudieran ser los mismos que los de los brasinoesteroides naturales.

Por otra parte, conocer las respuestas fisiológicas y bioquímicas de las plantas asperjadas con BB-16 y sometidas a estrés salino, permitiría la utilización más racional y efectiva de este producto en áreas arroceras afectadas por salinidad, contribuyendo de esta forma a la sustitución de importaciones y a la mitigación de los efectos adversos asociados al cambio climático

# ***Materiales y métodos***

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### **3.1 Influencia de la aspersión foliar con diferentes concentraciones de 24-epibrasinólida (EBL) o Biobras-16 (BB-16) sobre el crecimiento de plantas de arroz sometidas a estrés salino**

Con el objetivo de seleccionar la concentración más efectiva de cada producto a aplicar para estimular el crecimiento de plantas de arroz sometidas a estrés salino se ejecutaron dos experimentos en instalaciones del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). En ambos se utilizó la metodología que se describe a continuación.

Se utilizaron semillas de arroz del cultivar Jucarito-104 (J-104), el cual es sensible al estrés salino (Alfonso, 1998); posee un alto potencial de rendimiento y una gran plasticidad fenotípica, por lo que se utiliza en los programas de mejoramiento del cultivo.

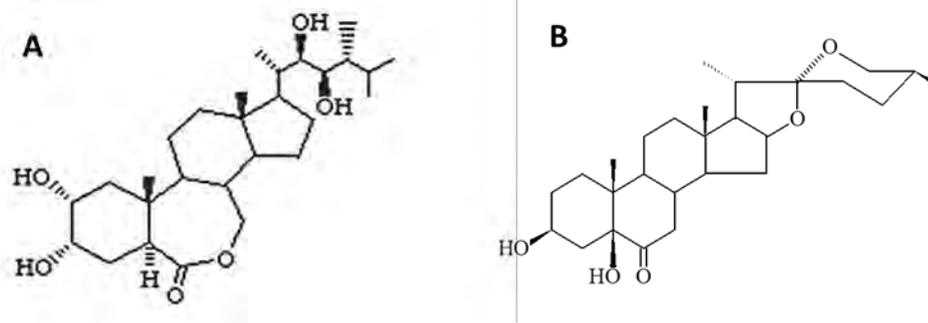
Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial (5%) durante cinco minutos; posteriormente, se lavaron seis veces con agua destilada estéril y luego se embebieron en agua durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, se colocaron en placas de Petri, a temperatura ambiente en la oscuridad, para propiciar la germinación. A las 48 horas, las semillas germinadas se transfirieron a recipientes plásticos de 240 cm<sup>3</sup> que contenían suelo Gleysol Nodular Ferruginoso Petroférrico (Hernández *et al.*, 2015) proveniente del municipio de Los Palacios, provincia de Pinar del Río. Las características químicas de este suelo se encontraban en el rango que permitían el crecimiento de las plantas de arroz (Anexo1).

Se dejaron crecer tres plantas por recipiente y se colocaron 20 recipientes en cada una de las bandejas plásticas que contenían agua corriente. Las ocho bandejas, con 480 plantas, se colocaron dentro de un umbráculo para evitar el efecto de las precipitaciones.

En el momento de emergencia de la tercera hoja verdadera, se realizó la aspersión foliar con la 24-epibrasinólida (EBL) (Sigma.Co), un brasinoesteroide natural, ó con el Biobras-16 (BB-16). Este último, es una formulación que tiene, como ingrediente activo, el análogo espirostánico de castasterona, 25(R)-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , dihidroxi-espirostan-6-ona, suministrada por el Centro de Estudios de Productos Naturales de la Facultad de Química de La Universidad de la Habana (Figura 1). Las concentraciones utilizadas fueron 0,5, 1 y 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para el

experimento donde se evaluó la EBL y 0,01, 0,1 y 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para el Biobras-16 (Núñez *et al.*, 2006; Núñez *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Estructura química de los brasinoesteroides utilizados en los experimentos **A.** 24-epibrasinólida (**EBL**) (brasinoesteroide natural) **B.** 25(R)-3β, 5α, dihidroxi-espirostan-6-ona (**BB-16**) (análogo espirostánico de la castasterona).

En ambos casos se tomaron 12 mL de cada una de las soluciones y se le adicionó la cantidad de agua destilada necesaria para humedecer completamente el follaje de las plantas. La entrega de solución de brasinoesteroide fue como promedio de 0,1 mL por planta. En cada uno de los casos, con esta preparación, se asperjaron 120 plantas por tratamiento y se dejaron 120 como tratamiento control, las cuales se asperjaron con agua destilada. A todas las soluciones se le adicionó Tween 20 al 0,01% como adherente.

De inmediato, las plantas se dividieron en dos grupos de 60 plantas, uno se colocó en bandejas a las cuales se les adicionó solución nutritiva Hoagland diluida 1:1 (v/v) y el otro se colocó en bandejas que contenían solución nutritiva Hoagland diluida suplementada con NaCl 100 mmol  $\text{L}^{-1}$ , concentración que fue seleccionada de experimentos anteriores (Reyes, 2012). Esta solución tuvo una conductividad eléctrica (CE) de 10,09  $\text{dSm}^{-1}$ , valor que corresponde a un suelo fuertemente salino (Norma Cubana de Salinidad, 2010).

En la tabla I se resumen los tratamientos utilizados para cada experimento.

Las plantas estuvieron sometidas a tratamiento con NaCl por siete días, momento a partir del cual, se colocaron en solución nutritiva Hoagland diluida, durante 14 días, para su recuperación (Reyes, 2012).

**Tabla I.** Tratamientos utilizados en los experimentos de aspersión foliar con EBL ó BB-16 en plantas de arroz sometidas a estrés salino.

Tratamientos	Descripción
SN	Solución nutritiva Hoagland 1:1
SN+ NaCl	Solución nutritiva Hoagland 1:1 suplementada con NaCl 100 mmol L <sup>-1</sup>
SN+ C <sub>1</sub> (EBL o BB-16)	Aspersión foliar con C <sub>1</sub> + Solución nutritiva Hoagland 1:1
SN+ NaCl+ C <sub>1</sub> (EBL o BB-16)	Aspersión foliar con C <sub>1</sub> + Solución nutritiva Hoagland 1:1 suplementada con NaCl 100 mmol L <sup>-1</sup>
SN+ C <sub>2</sub> (EBL o BB-16)	Aspersión foliar con C <sub>2</sub> + Solución nutritiva Hoagland 1:1
SN+ NaCl+ C <sub>2</sub> (EBL o BB-16)	Aspersión foliar con C <sub>2</sub> + Solución nutritiva Hoagland 1:1 suplementada con NaCl 100 mmol L <sup>-1</sup>
SN+ C <sub>3</sub> (EBL o BB-16)	Aspersión foliar con C <sub>3</sub> + Solución nutritiva Hoagland 1:1
SN+ NaCl+ C <sub>3</sub> (EBL o BB-16)	Aspersión foliar con C <sub>3</sub> + Solución nutritiva Hoagland 1:1 suplementada con NaCl 100 mmol L <sup>-1</sup>

C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> son las concentraciones de EBL (0,5, 1 y 2 μmol L<sup>-1</sup>) y BB-16 (0,01, 0,1 y 1 μmol L<sup>-1</sup>) respectivamente.

Al iniciar y finalizar el tratamiento salino y a los siete y 14 días de recuperación se evaluaron los siguientes indicadores de crecimiento a 12 plantas por tratamiento.

- Longitud de la parte aérea (cm): La altura de las plántulas se midió desde la base del tallo hasta la hoja más larga proyectada en la misma dirección del tallo (IRRI, 2002) con una regla milimetrada Logarex con un margen de error de 0,1 cm.
- Longitud del sistema radical (cm): la longitud de las raíces se midió desde la base de la raíz hasta la raíz más larga con una regla milimetrada Logarex con un margen de error de 0,1 cm.
- Masa seca (g planta<sup>-1</sup>): La masa seca de la parte aérea y el sistema radical se determinó a cuatro muestras (compuestas por tres plantas cada una) por tratamiento después de 72 h a 80° C en una estufa de convección forzada (BINDER). La determinación se realizó en una balanza *Sartorius* CPA324S con un margen de error de 0,1 mg.

Se ejecutaron dos repeticiones de cada experimento; en el caso de la EBL, una se efectuó en el período septiembre-octubre y la otra, octubre-noviembre del 2009. En el Biobras-16, la primera se realizó en el período diciembre 2009-enero 2010 y la segunda en mayo-junio del 2010.

En cada experimento se registraron las temperaturas mínimas, medias y máximas diarias, y las humedades relativas medias durante la etapa de crecimiento inicial de las plántulas (desde la siembra hasta la imposición del tratamiento con NaCl) (20 días), durante el período de tratamiento con NaCl (siete días) y durante la fase de recuperación (14 días) en las dos repeticiones de cada uno (Anexos 4 y 5).

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 60 plantas por tratamiento. Luego de comprobar que los datos obtenidos cumplieron con los supuestos teóricos de normalidad y homogeneidad de varianza, se les realizó un ANOVA de clasificación simple. En los casos en que hubo diferencias significativas entre tratamientos se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Rangos Múltiples de Tukey con  $p \leq 0,05$ , utilizando el programa estadístico SPSS v 15.

### **3.2 Influencia de la aspersión foliar con Biobras-16 (BB-16) o 24-epibrasinólida (EBL) sobre indicadores fisiológicos y bioquímicos de plantas de arroz sometidas a estrés salino**

Con el objetivo de corroborar los resultados que se obtuvieron en el acápite anterior se decidió realizar dos experimentos con las mejores concentraciones de EBL y BB-16.

En estos experimentos se utilizó la misma metodología de establecimiento que en los anteriores. Los tratamientos quedaron conformados de la forma siguiente:

- 1- SN
- 2- SN + EBL ó SN + BB-16
- 3- SN + NaCl
- 4- SN + EBL + NaCl ó SN + BB-16 + NaCl

En todas las variantes, se asperjaron 240 plantas por tratamiento. Se dejó igual cantidad como tratamiento control. El número de muestras por tratamiento y las evaluaciones de los indicadores de crecimiento: longitud y masa seca de la parte aérea y de las raíces, se realizaron de manera similar a lo descrito en el acápite 3.1. Además, se le determinó al mismo número de plantas el área foliar ( $\text{cm}^2$ ) con un medidor de área foliar AM 300. Las evaluaciones, en estos experimentos, se realizaron al iniciar y finalizar el tratamiento salino y a los 14 días de recuperación.

Los experimentos se ejecutaron en los períodos agosto-septiembre y octubre-noviembre de 2013, para EBL y BB-16, respectivamente. En cada uno se midieron las variables meteorológicas informadas en los experimentos anteriores (Anexos 6 y 7).

Posteriormente, para comparar los resultados de la aspersión foliar con ambos brasinoesteroides en plantas jóvenes de arroz sometidas a estrés salino y determinar las respuestas fisiológicas y bioquímicas de las mismas, se decidió ejecutar otro experimento, durante mayo-junio de 2014, en el cual se incluyeron ambos productos. Se siguió, exactamente, la misma metodología que en los dos experimentos anteriores y se evaluaron las mismas variables de crecimiento.

Al finalizar el período de estrés y a los 14 días de recuperación, se tomaron muestras foliares (hojas 3, 4 y 5) y de raíces de cinco plantas por tratamiento, para evaluar indicadores de las relaciones hídricas (Morales *et al.*, 2004) y realizar determinaciones de indicadores bioquímicos que pueden estar asociados a estos efectos, los que se detallan a continuación.

### **3.2.1 Indicadores de las relaciones hídricas**

Se determinó el potencial hídrico foliar ( $\Psi_h$ ) en una cámara de presión tipo Scholander. Con este mismo instrumento se midió el potencial hídrico en la raíz más larga de cinco plantas por tratamiento ( $\Psi_{h\text{ raíz}}$ ). Para ello, las raíces fueron desprendidas y cuidadosamente extraídas del suelo minimizando los daños y luego colocadas en la cámara de presión (Zegbe y Behboudian, 2010). Todas las mediciones de potencial hídrico fueron tomadas entre las 9:00 y 10:30 h en cada fecha de muestreo.

Para la estimación del potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) se tomaron las mismas hojas utilizadas para el potencial hídrico y se congelaron en nitrógeno líquido. Posteriormente, se descongelaron, se les extrajo la savia mediante centrifugación en una centrífuga refrigerada (*Eppendorf* 5804 R). Esta savia se utilizó para la determinación en un osmómetro de presión de vapor Wescor 5520. Para la estimación del potencial osmótico saturado ( $\Psi_{os}$ ), las hojas se colocaron por separado en viales con agua destilada durante 24 h y se realizó el mismo procedimiento que para la medición del potencial osmótico. El potencial de presión o potencial de turgencia ( $\Psi_p$ ) de las hojas, se calculó por la diferencia entre el potencial hídrico y osmótico.

Para la estimación del posible ajuste osmótico realizado por las plantas se calculó la diferencia entre el potencial osmótico saturado de los diferentes tratamientos y el control, según la metodología descrita por Babu *et al.* (1999).

### **3.2.2. Determinación de solutos orgánicos osmóticamente activos.**

De manera general, en cada tratamiento se tomaron tres muestras de una mezcla de las hojas tres, cuatro y cinco de 15 plantas (Yoshida, 1981). Para las determinaciones en las raíces se tomaron tres muestras de una mezcla de las raíces enteras de las 15 plantas anteriores. A cada muestra se le realizaron tres repeticiones de laboratorio para  $n=9$

Para la obtención de los diferentes extractos se utilizó una centrífuga refrigerada (*Eppendorf* 5804 R). Todas las determinaciones colorimétricas se realizaron en un espectrofotómetro UV/Visible (Genesys 6, Thermo Electron Corporation)

El contenido de prolina se determinó por la reacción con la ninhidrina (Bates *et al.*, 1973). Tres muestras de 0,25 g de tejido vegetal (hoja y raíz) se congelaron en nitrógeno líquido y fueron homogenizadas con 10 mL de agua destilada a 100 °C. Posteriormente, las muestras se filtraron, 2 mL del extracto se hicieron reaccionar con 2 mL de ácido acético glacial y 2 mL de ninhidrina a 100 °C por una hora. La reacción fue detenida en baño con hielo. El cromóforo conteniendo la prolina fue extraído con 4 mL de tolueno. La prolina fue cuantificada a 520 nm, usando L-prolina (SIGMA) para la curva de calibración.

La determinación de glicina betaína se llevó a cabo por el método propuesto por Grieve y Grattan (1983), basado en la reacción de la glicina-betaína con el KI-I<sub>2</sub>. Para ello, se tomaron 0,25 g de tejido vegetal (hoja y raíz), previamente secado por 72 h, se extrajeron en 10 mL de agua desionizada, con agitación por 48 h y se filtraron. Posteriormente, se tomó una alícuota de 0,5 mL y se diluyó en proporción 1:1 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N se agitó suavemente en vórtex y se dejó reposar en hielo por 1 h. Se agregó 0,1 mL de KI-I<sub>2</sub> previamente frío, se taparon las muestras y se dejaron en refrigeración a 0-4 °C por 16 h. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 16 000 g por 15 minutos a 0 °C, se separó el sobrenadante, y se agregaron 4,5 mL de 1,2-dicloroetano y se dejaron a temperatura ambiente por 2 h y 30 minutos. Se retiró con pipeta 1 mL del sobrenadante, y se leyó la absorbancia a 365 nm. Los valores obtenidos se interpolaron en la curva de calibración hecha con un patrón de betaína (SIGMA).

Para la preparación de los extractos que se utilizaron para la estimación de los azúcares solubles totales y reductores, se tomaron tres muestras de 0,25 g de hojas y raíces de cada tratamiento y se redujeron a polvo con N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, se les añadió 3 mL de etanol 80% (v/v) y se calentaron en baño de agua a 85 °C durante 30 minutos. Al término de este tiempo se centrifugaron a 16 000 g durante 10 minutos y se colectó el sobrenadante. Este

procedimiento se repitió tres veces. Los sobrenadantes obtenidos se evaporaron en baño de arena hasta alcanzar los 3 mL, luego se completó con agua destilada hasta los 10 mL.

La determinación de los azúcares solubles totales se realizó como se describe a continuación: se tomaron 0,5 mL de muestra diluida (1:50) y se colocaron en un baño de hielo. Se le agregó lentamente la antrona 2% diluida en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se calentó en baño de agua a 100 °C durante 7,5 minutos. Pasado este tiempo, se enfriaron en baño de hielo y se pusieron 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia a 630 nm (Yemm y Willis, 1954). Los valores obtenidos se interpolaron en la curva de calibración realizada con diferentes concentraciones de glucosa (SIGMA).

La estimación de los azúcares reductores se detalla a continuación: se tomaron 0,5 mL de muestra y se le añadió 1 mL de mezcla cúprico alcalina, se calentaron en baño de agua a 100 °C durante 20 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente. Se le añadió 1 ml de Reactivo C (molibdato de amonio, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y arseniato de sodio) y se agitó con un vórtex. Posteriormente, se le añadió 4 ml de agua destilada y se leyó la absorbancia a 520 nm (Somogy, 1952). Los valores obtenidos se interpolaron en la curva de calibración realizada con patrón de glucosa (SIGMA).

### **3.2.3. Contenido de cationes**

El contenido de sodio (Na<sup>+</sup>), potasio (K<sup>+</sup>), calcio (Ca<sup>2+</sup>) y magnesio (Mg<sup>2+</sup>) se determinó en las hojas y las raíces. El material vegetal se secó en una estufa de convección forzada (BINDER) a 70°C durante 72 h y se pesó en una balanza analítica hasta obtener peso constante. Se tomaron 0,5 g de muestra seca y molinada con un tamaño de partículas de 60 Mesh y se adicionaron 4 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. La digestión se realizó en un horno de microondas (tiempo de 20 minutos y temperatura máxima de 190 °C). Posteriormente, se trasvasaron a recipientes de vidrio y se diluyeron con 20 mL de agua destilada, se filtraron y se procedió a determinar la concentración de cationes metálicos en el sobrenadante mediante absorción atómica con llama NovAA 350 con límite de detección (mg kg<sup>-1</sup>) de 0,01 para Ca<sup>2+</sup> y 0,03 para Mg<sup>2+</sup>, de acuerdo a la norma ISO-11466, 1995. El Na<sup>+</sup> y el K<sup>+</sup> se midieron por emisión. Los resultados se expresaron en mg g<sup>-1</sup> masa seca.

### 3.2.4. Contenido de clorofilas y carotenoides

La concentración de los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y totales y carotenoides totales), se determinó por el método espectrofotométrico descrito por Arnon (1949).

Se pesaron 0,04 g de tejido foliar, se sumergieron en 10 mL de acetona (80% v/v) y se mantuvieron en la oscuridad por 24 h. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 440, 665 y 649 nm. La concentración de cada uno de los pigmentos se expresó en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de masa seca, según las ecuaciones siguientes:

$$C_a = (11,63 A_{665} - 2,39 A_{649}) / \text{MS}$$

$$C_b = (20,11 A_{649} - 5,18 A_{665}) / \text{MS}$$

$$C_{a+b} = (6,45 A_{665} + 17,72 A_{649}) / \text{MS}$$

$$C_{c+x} = \frac{1000 \times A_{440} - 3,27 C_a - 104 C_b}{229 \times \text{MS}}$$

Donde  $A_{440}$ ,  $A_{649}$ ,  $A_{665}$  – absorbancia a 440, 649 y 665 nm.

MS gramos de masa seca de tejido.

$C_{c+x}$ : carotenoides totales (carotenos + xantofilas)

### 3.2.5. Metabolismo oxidativo

#### 3.2.5.1 Preparación de los extractos

Tres muestras de 0,25 g de tejido foliar de cada tratamiento se extrajeron con 2,5 mL de una solución de tampón fosfato de potasio 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7,8; EDTA 0,1 mmol  $\text{L}^{-1}$ ; Tritón X-100 0,1% (v/v), PVPP 1,5% (p/v) y 2,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de los inhibidores de proteasas aprotinina y leupeptina. El homogenado se centrifugó a 16 000 g por 20 minutos a 4 °C, colectándose el sobrenadante para los análisis respectivos.

#### 3.2.5.2 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se estimó mediante la determinación del contenido de malondialdehído (MDA) (Hodges *et al.*, 1999). Para el análisis, 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante obtenido del extracto se mezclaron con 500  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,5% (p/v) disuelto en ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v). Las mezclas se calentaron a 95 °C durante 25 minutos en tubos Eppendorf de 1,5 mL con orificios en la tapa para permitir la salida de los vapores, se enfriaron en hielo durante 15 minutos y luego se centrifugaron a 16 000 g por 10 minutos a 4 °C. Se midió la absorbancia a 532 y 600 nm. La absorbancia a 600 nm se sustrajo

de la lectura a 532 nm para descontar la absorbancia no específica. Se estimó la cantidad de MDA utilizándose el coeficiente de extinción de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , expresándose como cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) por gramo de masa fresca de tejido.

### **3.2.5.3. Análisis de la oxidación de proteínas**

Las proteínas modificadas oxidativamente se estimaron como contenido total en grupos carbonilos oxidados (GCO) por derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina, para formar las correspondientes dinitrofenilhidrazonas (Reznick y Packer, 1994). Para el análisis, el sobrenadante, obtenido de los extractos, se trató con sulfato de estreptomina 1% (p/v) durante 15 minutos para eliminar los ácidos nucleicos que pudieran interferir con el ensayo y se centrifugó a 16 000 g por 10 minutos a 4 °C.

Los sobrenadantes obtenidos se mezclaron con 500  $\mu\text{L}$  de 2,4-dinitrofenilhidrazina (10 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) en HCl 2 mol  $\text{L}^{-1}$ , a 25 °C durante una hora con agitación cada 10 minutos. La reacción se detuvo con 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v), las muestras se incubaron durante 10 minutos a 4 °C y se centrifugaron a 16 000 g por 3 minutos. Los precipitados obtenidos se lavaron tres veces con 1 mL de etanol: acetato de etilo (1:1) (v/v), para eliminar la 2,4-dinitrofenilhidrazina libre, se resuspendieron en guanidina 6 mol  $\text{L}^{-1}$  y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. La absorbancia de las hidrazonas (grupos carbonilos derivatizados) se midió a 370 nm. Se estimó la cantidad de grupos carbonilos derivatizados utilizándose el coeficiente de extinción de  $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , y se expresó como concentración de grupos carbonilos oxidados por mg de proteínas presentes en el extracto.

### **3.2.5.4. Análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes**

Para el ensayo de la actividad enzimática de las peroxidasas solubles, POX (EC 1.11.1.7) se utilizaron 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante colectado en una mezcla de reacción que contuvo 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  del tampón fosfato, pH 7; guayacol 1% (v/v) y peróxido de hidrógeno 0,25% (v/v) en un volumen total de 1 mL. Estas concentraciones de los sustratos guayacol y  $\text{H}_2\text{O}_2$  se estandarizaron antes de realizar los ensayos. La formación de guayacol oxidado se midió a través del monitoreo del incremento de la absorbancia del tetraguayacol a 470 nm cada 5 segundos en un intervalo de 30 segundos (Chance y Maehly, 1955). La actividad POX se calculó utilizando el coeficiente de extinción del guayacol ( $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y se expresó en  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

Para el análisis de las peroxidasas asociadas iónicamente a la pared celular, POX<sub>wc</sub>, el precipitado obtenido de los extractos, después de lavado tres veces con tampón fosfato, se trató con NaCl 1 mol L<sup>-1</sup> por 1 hora (Lin y Kao, 2001). Después, se centrifugó a 16 000 g por 15 minutos y con el sobrenadante obtenido se realizó el ensayo de la actividad enzimática peroxidasa como se describió previamente.

Para determinar la actividad de la enzima catalasa, CAT (EC 1.11.1.6) se utilizaron 50 µL del sobrenadante en la mezcla de reacción que contenía tampón fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), y peróxido de hidrógeno 10 mmol L<sup>-1</sup> en un volumen de 1 mL. La descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se evaluó cada 10 segundos durante 1 minuto y la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se estimó por la absorbancia a 240 nm. La actividad CAT se calculó utilizando el coeficiente de extinción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,0436 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) y se expresó en µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína (Aebi, 1984).

La actividad de la enzima superóxido dismutasa, SOD (EC 1.15.1.1) se analizó mediante la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT, siglas en inglés) (Beyer y Fridovich, 1987). En el ensayo se emplearon 50 µL del sobrenadante en una mezcla de reacción que contenía tampón bicarbonato 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 10,2), metionina 13 mmol L<sup>-1</sup>, EDTA 0,1 mmol L<sup>-1</sup> y NBT 63 µmol L<sup>-1</sup>. La reacción se realizó en tubos de vidrio en un volumen final de 4 mL y la misma se inició con la riboflavina 1,3 µmol L<sup>-1</sup> y la exposición bajo luz blanca (15 watt, lámpara fluorescente) durante 2 minutos. La reacción se detuvo en la oscuridad. Para cada muestra se utilizaron blancos sin iluminar. La cantidad de NBT se estimó por la absorbancia a 560 nm. Una unidad de actividad SOD se definió como la cantidad de enzima que provoca una inhibición del 50% en la fotorreducción del NBT.

Para el análisis de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa, APX (EC 1.11.1.11) se partió de un extracto que se preparó con ácido ascórbico 1 mmol L<sup>-1</sup>. Se utilizaron 50 µL del sobrenadante en la mezcla de reacción que contenía tampón fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), ácido ascórbico 50 mmol L<sup>-1</sup>, EDTA 0,1 mmol L<sup>-1</sup> y peróxido de hidrógeno 0,1 mmol L<sup>-1</sup> en un volumen final de 1 mL (Nakano y Asada, 1981). El monitoreo de la oxidación del ascorbato dependiente del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se evaluó 10 veces en un intervalo de 100 segundos por la disminución de su absorbancia a 290 nm. La actividad APX se calculó utilizando el coeficiente de extinción del ascorbato (2,8 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) y se expresó en µmol Asc min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

Para el ensayo de la enzima monodeshidroascorbato reductasa, MDHAR (EC 1.6.5.4 ) se determinó la oxidación del NADPH a NADP<sup>+</sup> a 340 nm, acoplada a la reacción de reducción del monodeshidroascorbato a ascorbato (Hossain *et al.*, 1984). Se utilizaron 100 µL del sobrenadante en la mezcla de reacción que estaba formada por: 500 µL de tampón Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,5; 50 µL de NADH 4 mmol L<sup>-1</sup>; 50 µL de ácido ascórbico 20 mmol L<sup>-1</sup> y 300 µL de ascorbato oxidasa comercial (CALBIOCHEM: 2650 U/mg proteína; 1U en la mezcla de reacción). La reacción se siguió cada 20 segundos durante 2 minutos a 340 nm. La actividad enzimática se expresó en nmol de NADH oxidado por mg<sup>-1</sup> de proteína utilizando el coeficiente de extinción molar para el NADH (6,2 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

La actividad deshidroascorbato reductasa, DHAR (EC 1.8.5.1) se determinó siguiendo el incremento de absorbancia a 265 nm debido a la formación del ascorbato por medio de la DHAR cada 20 segundos durante 2 minutos. La mezcla de reacción se llevó a cabo en 1 mL y a 25 °C con tampón fosfato de sodio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,5; GSH 50 mmol L<sup>-1</sup>; deshidroascorbato (DHA) 4 mmol L<sup>-1</sup> (diluido en hidróxido de amonio 25% (p/v)) y 50 µL de sobrenadante (Dalton *et al.*, 1986). La actividad enzimática se expresó en nmol de DHA reducido a ascorbato mg<sup>-1</sup> de proteína, aplicando el coeficiente de extinción molar para el DHA (14 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

La actividad glutatión reductasa, GR (EC 1.6.4.2) cataliza la formación de glutatión reducido a partir de glutatión oxidado. La mezcla de reacción contenía, en un volumen total de 1 mL, tampón Tris- HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mmol L<sup>-1</sup>; NADPH 0,2 mmol L<sup>-1</sup>; glutatión oxidado (GSSG) 0,5 mmol L<sup>-1</sup> y 50 µL del sobrenadante, que inicia la reacción. La absorbancia se midió cada 20 segundos durante 3 minutos a 340 nm (Carlberg y Mannervik, 1985). La actividad GR se calculó utilizando el coeficiente de extinción del NADPH (6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) y se expresó en µmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de proteína.

#### **3.2.5.5. Determinación de las proteínas solubles totales**

La concentración de proteínas solubles totales de cada uno de los sobrenadantes se determinó por el método de MicroLowry. Para ello se tomaron 20 µL del sobrenadante, se mezclaron con 180 µL de H<sub>2</sub>O y 1 mL de reactivo de Lowry, se agitó en un vórtex durante 10 segundos y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitó, se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente y la

lectura espectrofotométrica se realizó a 750 nm (Sun, 1994). Se utilizó la albúmina de suero bovino (BSA) (1 g L<sup>-1</sup>) (SIGMA) para realizar la curva patrón.

En todos los experimentos de este acápite, se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 120 plantas por tratamiento. Luego de comprobar que los datos obtenidos cumplieron con los supuestos teóricos de normalidad y homogeneidad de varianza, se les realizó un ANOVA de clasificación simple. En los casos en que hubo diferencias significativas entre tratamientos se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Rangos Múltiples de Tukey con  $p \leq 0,05$ , utilizando el programa estadístico SPSS v 15.

Se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables del estado hídrico y los solutos citocompatibles ó los cationes inorgánicos. También se determinaron estos coeficientes entre las variables del daño oxidativo y las enzimas antioxidantes. Estos coeficientes se determinaron en ambos brasinoesteroides (BB-16 y EBL) por separado para analizar si había diferencia entre ellos.

### **3.3 Efecto de la aspersion foliar con 24-epibrasinólida (EBL) sobre variables fisiológicas y del metabolismo oxidativo de plantas de dos cultivares de arroz crecidas en sustrato inerte y sometidas a estrés salino.**

Este experimento se ejecutó en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Alberta en Edmonton, Canadá. Se utilizaron semillas de arroz de los cultivares Jucarito-104 (J-104), susceptible al estrés salino (Alfonso, 1998) y Ginés, tolerante (González *et al.*, 2009). Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial (5%) durante cinco minutos; posteriormente, se lavaron seis veces con agua destilada estéril y luego se sumergieron en agua durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, se colocaron en placas de Petri, a temperatura ambiente en la oscuridad, para propiciar la germinación. Luego de 48 horas, las semillas germinadas se transfirieron a macetas plásticas de 250 cm<sup>3</sup> que contenían vermiculita.

Se utilizaron 120 macetas en total para cada cultivar (cada una con cuatro plantas en crecimiento) y se colocaron en bandejas plásticas que contenían solución nutritiva de Hoagland diluida 1:1 v/v. Las bandejas se ubicaron dentro de una cámara de crecimiento con condiciones controladas de temperatura (28 °C), humedad (70 %) y fotoperíodo (12 horas luz/12horas de oscuridad).

En el momento de emergencia de la tercera hoja verdadera, se realizó la aspersión foliar con 24-epibrasinólida a la concentración de  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Se asperjó un volumen total de 24 mL para 240 plantas de cada cultivar. A todas las soluciones se le adicionó Tween 20 al 0,01% como adherente. Las plantas se dividieron en dos grupos, uno se colocó en bandejas a las cuales se les adicionó solución nutritiva Hoagland diluida 1:1 v/v (SN) y el otro se colocó en bandejas que contenían solución nutritiva Hoagland diluida suplementada con NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  (SN+NaCl).

A los siete días, las plantas que se sometieron a tratamiento salino, se colocaron en solución nutritiva Hoagland diluida 1:1 v/v, durante 14 días, para su recuperación.

Las evaluaciones de crecimiento (longitud de la parte aérea, longitud de las raíces, masa seca de la parte aérea y de las raíces) se realizaron a 24 plantas por tratamiento, a los tres y siete días del tratamiento salino y a los siete y 14 días de recuperación. Se utilizó la misma metodología que en los experimentos anteriores.

En estos momentos, se evaluaron también, variables fisiológicas y bioquímicas. Las evaluaciones de la conductancia estomática ( $g_s$ ,  $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), la transpiración ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), la concentración interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) y la tasa fotosintética ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) se realizaron, a 16 plantas por tratamiento, utilizando un equipo portátil de medición de fotosíntesis (LI-6400; LI-COR, Lincoln, NE, USA). Las mediciones se realizaron en la cámara de crecimiento entre 1 y 4 h después del inicio del fotoperíodo ( $\text{PAR} > 800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Para la determinación de las clorofilas *a*, *b*, totales y los carotenoides se siguió la metodología descrita anteriormente. El contenido de prolina en hojas y raíces y las actividades de las enzimas peroxidasas, catalasas, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, monohidroascorbato reductasa, deshidroascorbato reductasa y glutatión reductasa se determinaron según las metodologías informadas en el acápite 3.2.5.4, ajustando los volúmenes finales a 0,3 mL. Se leyeron en placas de ELISA en un espectrofotómetro Beckman modelo UV-1700 Shimadzu.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 120 plantas por tratamiento. El procesamiento estadístico de los datos obtenidos consistió en el cálculo de las medias, las desviaciones estándar y los intervalos de confianza a  $p \leq 0,05$ .

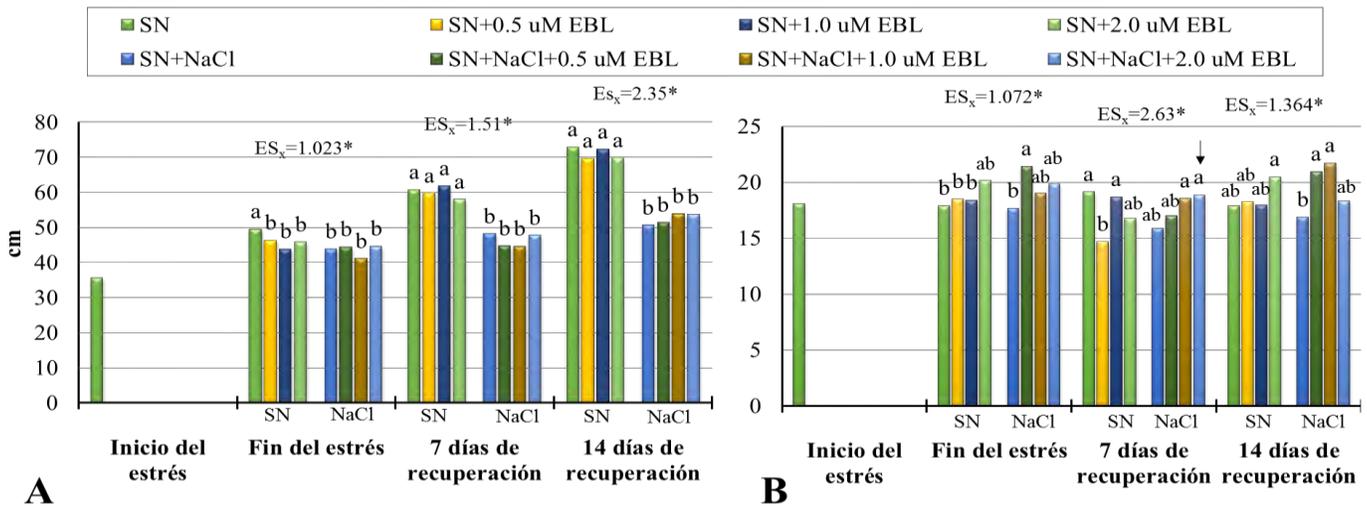
# *Resultados y Discusión*

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Influencia de la aspersión foliar con diferentes concentraciones de 24-epibrasinólida (EBL) o Biobras-16 (BB-16) sobre el crecimiento de plantas de arroz sometidas a estrés salino.

A continuación se analizarán y discutirán los resultados de una de las dos repeticiones de los experimentos realizados, teniendo en cuenta que en el caso de la EBL, los resultados fueron similares en ambas repeticiones. En el caso del BB-16 se tomó la segunda repetición efectuada en mayo, debido a que las condiciones meteorológicas imperantes en el experimento, que se inició en diciembre, afectaron el crecimiento de las plantas.

El comportamiento de la longitud de la parte aérea y las raíces de las plantas de arroz cv. J-104 asperjadas con EBL se muestra en la figura 2. Como se puede apreciar, el tratamiento con NaCl afectó la longitud de la parte aérea (Figura 2A); además se observa, que en la recuperación en solución nutritiva sin NaCl las afectaciones en la longitud de la parte aérea de las plantas tratadas, no pudieron ser revertidas por las concentraciones de EBL ensayadas.

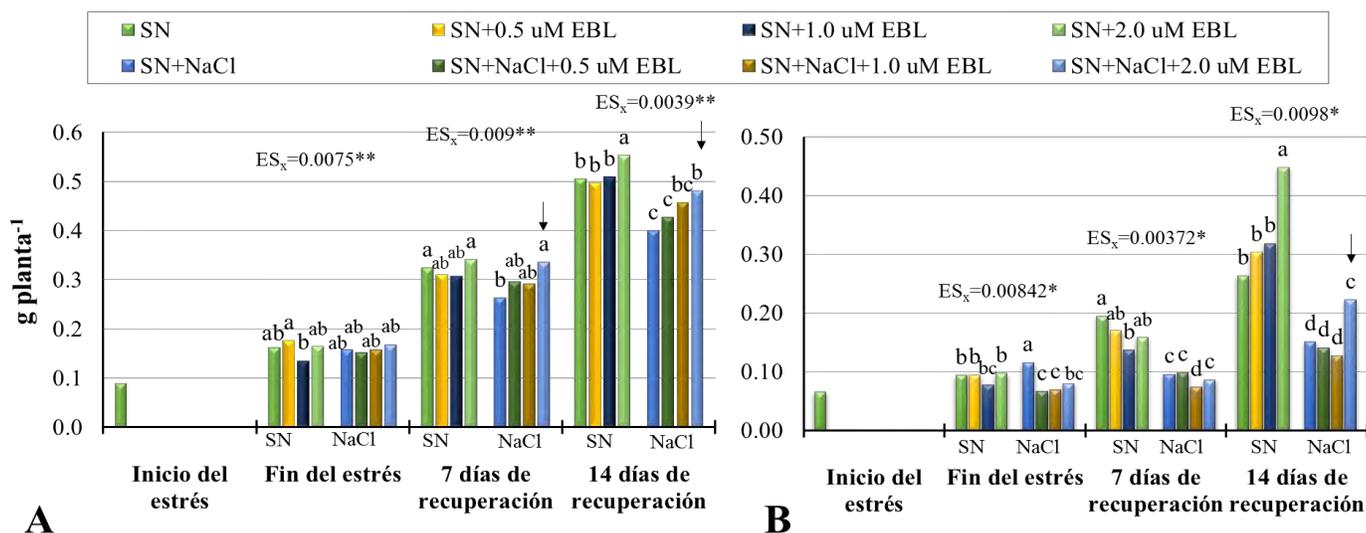


**Figura 2.** Efecto de la aspersión foliar con diferentes concentraciones de EBL en la longitud de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup> por siete días. **A.** Parte aérea. **B.** Raíces. Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey (p≤0,05) n=12.

En cuanto a la longitud de la raíz, la salinidad no modificó significativamente este indicador en ninguna de las evaluaciones realizadas. No obstante, se observó un incremento significativo

con la aspersión de EBL 0,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  con respecto al control con NaCl, tanto al finalizar el período de estrés como al final de la recuperación (Figura 2B).

El tratamiento con NaCl provocó una disminución en la biomasa de la parte aérea a partir de los siete días de recuperación (Figura 3A). Este comportamiento fue revertido por la aspersión foliar con la EBL a la concentración de 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  en los dos momentos de la recuperación evaluados. También, se observó un incremento en la biomasa seca de las raíces en el tratamiento salino, a los siete días de estrés (Figura 3B). Durante la recuperación, disminuyó significativamente la biomasa seca de las raíces en las plantas tratadas con NaCl, tanto a los siete como a los 14 días, en comparación con las plantas de los tratamientos sin sal. A los 14 días de recuperación, la aspersión foliar con EBL 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  fue la única concentración que estimuló significativamente este indicador en las plantas de arroz.



**Figura 3.** Efecto de la aspersión foliar con diferentes concentraciones de EBL en la masa seca de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup> por siete días. **A.** Parte aérea. **B.** Raíces. Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=12$ .

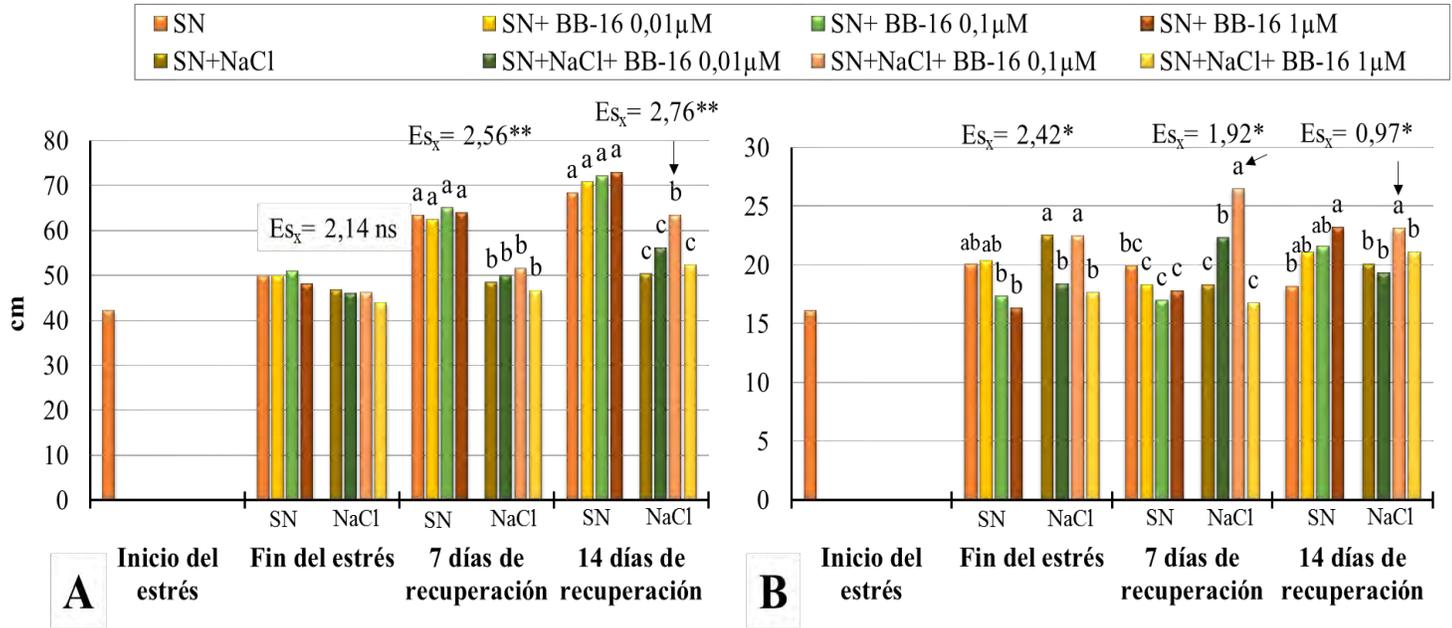
El resultado, que muestra el aumento de la biomasa de la raíz con el tratamiento salino al finalizar el período de estrés, ha sido informado anteriormente utilizando este mismo cultivar (Núñez *et al.*, 2006). Se ha encontrado un comportamiento similar en otros cultivos (Qayyum *et al.*, 2007; Moud y Maghsoudi, 2008; Negrao *et al.*, 2017). Sin embargo, en el período de recuperación, la biomasa de la raíz disminuyó en las plantas que fueron previamente estresadas sugiriendo que la salinidad causa efectos irreversibles a largo plazo.

En la figura 4 se presenta el comportamiento de la longitud de la parte aérea de las plantas asperjadas con BB-16. El período de tratamiento con NaCl disminuyó significativamente la longitud de la parte aérea en todos los tratamientos, durante la recuperación. La aspersión foliar con BB-16 0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  estimuló de forma significativa la longitud de la parte aérea a los 14 días de la recuperación.

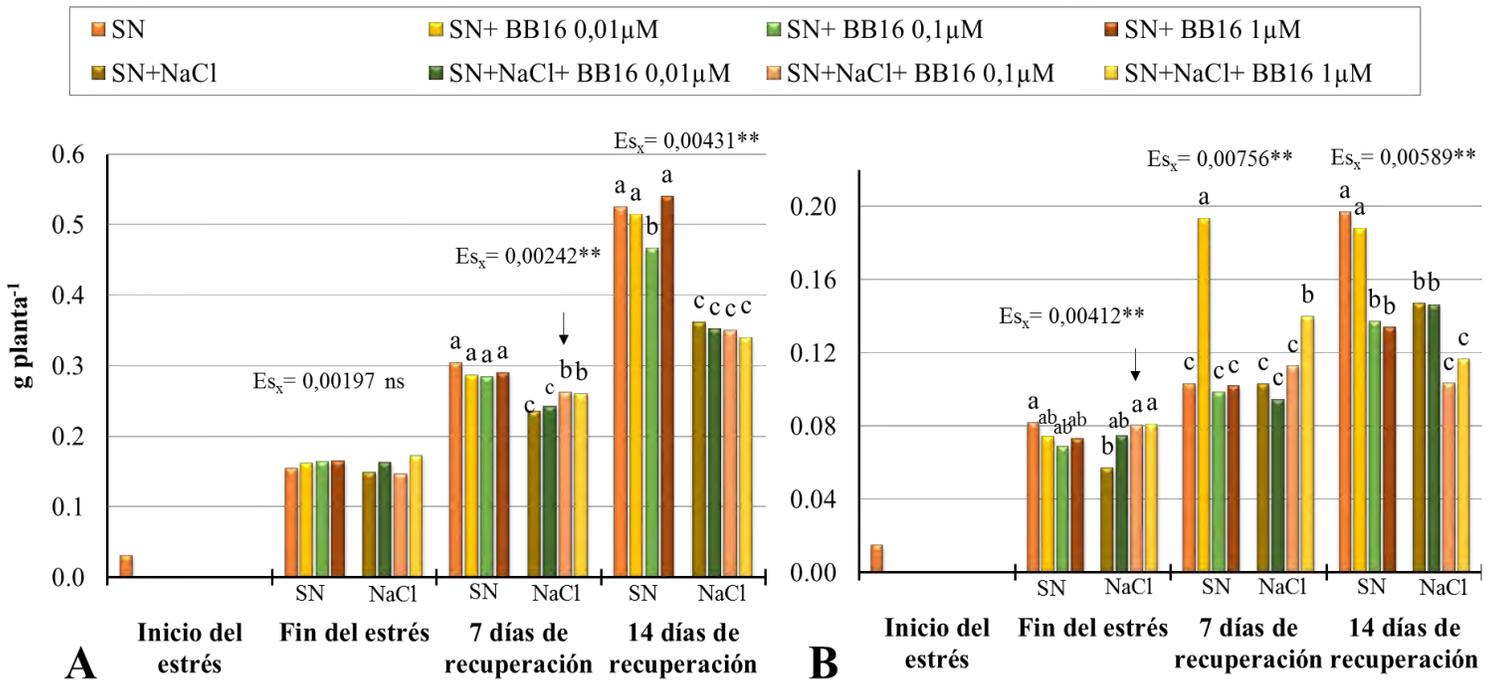
En la longitud de las raíces se observa que, de forma general, el tratamiento con NaCl no afectó este indicador en ninguno de los momentos evaluados (Figura 4B), mientras que se encontró en las plantas asperjadas con BB-16 0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  y sometidas a estrés salino, un incremento significativo a los siete días de recuperación, incluso superior al control sin sal. También, la concentración de 0,01  $\mu\text{mol L}^{-1}$  tuvo este mismo comportamiento con respecto al al control con NaCl.

En cuanto a la masa seca de la parte aérea, no se encontraron afectaciones en este indicador una vez finalizado el tratamiento con NaCl. Sin embargo, durante la recuperación se observó una reducción significativa en las plantas que estuvieron sometidas a estrés. Los tratamientos con BB-16 0,1 y 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , a los siete días de recuperación modificaron parcialmente este comportamiento.

El estrés salino sólo disminuyó significativamente la masa seca de las raíces en las plantas controles al finalizar el período de tratamiento con NaCl y a los 14 días de la recuperación. Por el contrario, las plantas asperjadas con BB-16 a las concentraciones de 0,1 y 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  aumentaron significativamente los niveles de masa seca con respecto al control con sal, una vez finalizado el estrés, aunque durante la recuperación no se mantuvo este efecto (Figura 5B). Es interesante señalar, que los indicadores del crecimiento de las plantas de los tratamientos controles no respondieron de igual manera al estrés salino en los dos experimentos. Esto pudiera deberse las diferentes condiciones meteorológicas que prevalecieron durante la ejecución de ambos experimentos, pues las temperaturas a que estuvieron sometidas las plantas fueron desiguales, con una diferencia de aproximadamente cuatro grados en la temperatura mínima (Anexos 4 y 5).



**Figura 4.** Efecto de la aspersión foliar con diferentes concentraciones de BB-16 en la longitud de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup> por siete días. **A.** Parte aérea. **B.** Raíces. Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=12$ .



**Figura 5.** Efecto de la aspersión foliar con diferentes concentraciones de BB-16 en la masa seca de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup> por siete días. **A.** Parte aérea. **B.** Raíces. Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=12$ .

Existen evidencias que plantean que la respuesta a la salinidad depende de la temperatura a que están sometidas las plantas (Núñez *et al.*, 2013). Este fenómeno pudiera deberse a la influencia de la temperatura en la conductividad hidráulica de la raíz (Rodríguez *et al.*, 1997) lo cual pudiera influir en la absorción de agua y sales por las raíces.

En cuanto a las concentraciones de brasinoesteroides, diversos resultados muestran que las más efectivas en la disminución de los efectos adversos del estrés salino, varían entre 1-5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para cultivos como trigo, fresa, frijol, guisante y mostaza (Ali *et al.*, 2008b; Shahbaz *et al.*, 2008; Karlidag *et al.*, 2011; Rady, 2011; Shahid *et al.*, 2015; Wani *et al.*, 2017).

En arroz, los pocos resultados que existen en la literatura muestran que el tratamiento por imbibición de las semillas con diferentes concentraciones de EBL y homobrasinólida (0,5, 1 y 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) disminuyó los efectos adversos que provocó la salinidad. Este efecto fue dependiente de la concentración obteniéndose los mejores resultados con las dosis de 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de homobrasinólida y EBL (Anuradha y Rao, 2001). Sin embargo, en otras investigaciones se ha demostrado que la imbibición con concentraciones de EBL (0,1 y 0,01  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) estimuló la longitud y la masa seca de la parte aérea de plántulas de dos cultivares de arroz crecidas en medio salino (Núñez *et al.*, 2013).

En este trabajo la concentración de EBL, aplicada por aspersion foliar, que estimuló el crecimiento fue la de 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Esta se encuentra en el rango de las estudiadas por otros autores y es menor que las concentraciones efectivas informadas en la literatura internacional para el caso del arroz.

Se ha informado, anteriormente, el efecto que la imbibición de las semillas con análogos de brasinoesteroides provoca en la germinación y el crecimiento de plantas de arroz y tomate sometidas a estrés por NaCl. Así, el BB-6 (0,001  $\text{mg L}^{-1}$ ) incrementó ligeramente el porcentaje de germinación de semillas de tomate cv. Campbell-28 en soluciones de NaCl 50, 100 y 150  $\text{mmol L}^{-1}$ ; sin embargo, la masa fresca y seca de las radículas se estimularon solamente en las concentraciones más bajas de la sal (Nuñez, 2000).

El tratamiento a las semillas con BB-16 0,005  $\text{mg L}^{-1}$  fue el más efectivo en reducir los efectos adversos que la salinidad provocó en el crecimiento de las plantas de los cultivares J-104 e INCA-LP 7 (Núñez *et al.*, 2007). Esta concentración es diez veces inferior a la más efectiva informada en este trabajo.

Más recientemente, se evaluó la influencia del tratamiento a las semillas con varias concentraciones de BB-16 en el crecimiento de las plántulas de dos cultivares de arroz (J-104 y Ginés) en medio salino. El análogo fue capaz de estimular el crecimiento de las plántulas de ambos genotipos de arroz en presencia de NaCl; siendo más efectivos los tratamientos en el cultivar tolerante (Núñez *et al.*, 2013).

La concentración más efectiva en el caso del BB-16 fue de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , siendo veinte veces inferior a la utilizada en el caso de la EBL ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Esta diferencia pudiera deberse a las características estructurales de cada compuesto, ya que todavía no se conoce si este análogo posee actividad brasinoesteroide *per se* o si este actúa como precursor de los mismos. Teniendo en cuenta los resultados presentados, donde las concentraciones de EBL  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  y BB-16  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  tuvieron un efecto positivo en el crecimiento, fundamentalmente, durante la recuperación; y analizando que estas concentraciones se encuentran cercanas a las informadas en la literatura, se seleccionaron las mismas para ejecutar otros experimentos, donde se evaluarán no solo los indicadores del crecimiento, sino además, las respuestas fisiológicas y bioquímicas asociadas al efecto protector que estos brasinoesteroides ejercen en las plantas de arroz sometidas a estrés salino.

Con el objetivo de reducir las evaluaciones para profundizar en las respuestas de las plantas y considerando que los principales resultados se obtuvieron a los 14 días de recuperación, se decidió realizar las evaluaciones fisiológicas y bioquímicas en dos momentos solamente, es decir, al finalizar el período de estrés y a los 14 días de recuperación.

#### **4.2 Influencia de la aspersión foliar con Biobras-16 (BB-16) o 24-epibrasinólida (EBL) sobre indicadores fisiológicos y bioquímicos de plantas de arroz sometidas a estrés salino.**

Para confirmar los resultados que se obtuvieron en los experimentos anteriores, se ejecutaron dos experimentos, en los que se asperjaron las concentraciones seleccionadas de EBL y BB-16 y se evaluaron, al iniciar y finalizar el estrés y después de 14 días de recuperación, indicadores del crecimiento.

En las tablas II y III se muestran los resultados de las plantas de arroz, asperjadas foliarmente con EBL  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  o BB-16  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  y sometidas o no a tratamiento con NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  durante siete días, en los dos experimentos ejecutados en fechas diferentes.

Se puede observar que al finalizar el tratamiento con NaCl, hubo afectaciones en el crecimiento de la parte aérea de las plantas, mientras hubo un incremento significativo en la

longitud y la masa seca de la raíces en el experimento con EBL (Tabla II); sin embargo, este efecto desapareció después de catorce días de recuperación.

La aspersión foliar con EBL, al finalizar el período de estrés, sólo logró un aumento significativo de la longitud de la parte aérea en comparación con el tratamiento con NaCl. Sin embargo, durante la recuperación la aspersión foliar con EBL protegió la longitud de las raíces y la masa seca de las plantas tratadas con NaCl (Tabla II).

**Tabla II.** Efecto de la aspersión foliar con EBL 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  en las variables de crecimiento de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl 100  $\text{mmol L}^{-1}$ .

		SN	SN+NaCl	SN+EBL	SN+EBL+NaCl	ES <sub>x</sub>
Longitud de la parte aérea (cm)	Inicio del estrés	34,1	-	-	-	-
	7 días de estrés	45,2 a	34,9 c	42,4 b	<b>39,7 b</b>	1,07*
	14 días de recuperación	55,7 a	43,7 b	56,9 a	44,1 b	1,24*
Longitud de las raíces (cm)	Inicio del estrés	17,9	-	-	-	-
	7 días de estrés	17,8 b	19,3 a	18,7 ab	20,5 a	1,03*
	14 días de recuperación	20,5 b	18,8 b	19,2 b	<b>23,4 a</b>	0,9412*
Masa seca de la parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )	Inicio del estrés	0,3657	-	-	-	-
	7 días de estrés	0,8195 b	0,7374 c	0,8713 a	0,7579 c	0,0081*
	14 días de recuperación	1,6967 b	1,2567 d	1,7643 a	<b>1,4296 c</b>	0,0061*
Masa seca de las raíces (g planta <sup>-1</sup> )	Inicio del estrés	0,0817	-	-	-	-
	7 días de estrés	0,2933 c	0,5065 a	0,4214 b	0,5158 a	0,0074*
	14 días de recuperación	1,5689 b	0,7215 d	1,8722 a	<b>1,1054 c</b>	0,0054*
Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Inicio del estrés	56,79	-	-	-	-
	7 días de estrés	95,7 b	88,4 c	99,9 a	89,2 c	1,29*
	14 días de recuperación	115,3 b	87,2 c	163,0 a	93,0 c	4,61*

Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=24$ .

En la tabla III se aprecia un efecto protector del BB-16 en todos los indicadores del crecimiento evaluados al finalizar el período de estrés. Se destacó la masa seca de la parte aérea y el área foliar, donde la aspersión foliar con el análogo logró valores superiores al control sin sal. Este efecto se mantuvo durante la recuperación.

**Tabla III.** Efecto de la aspersión foliar con BB-16 0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  en las variables de crecimiento de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl 100  $\text{mmol L}^{-1}$ .

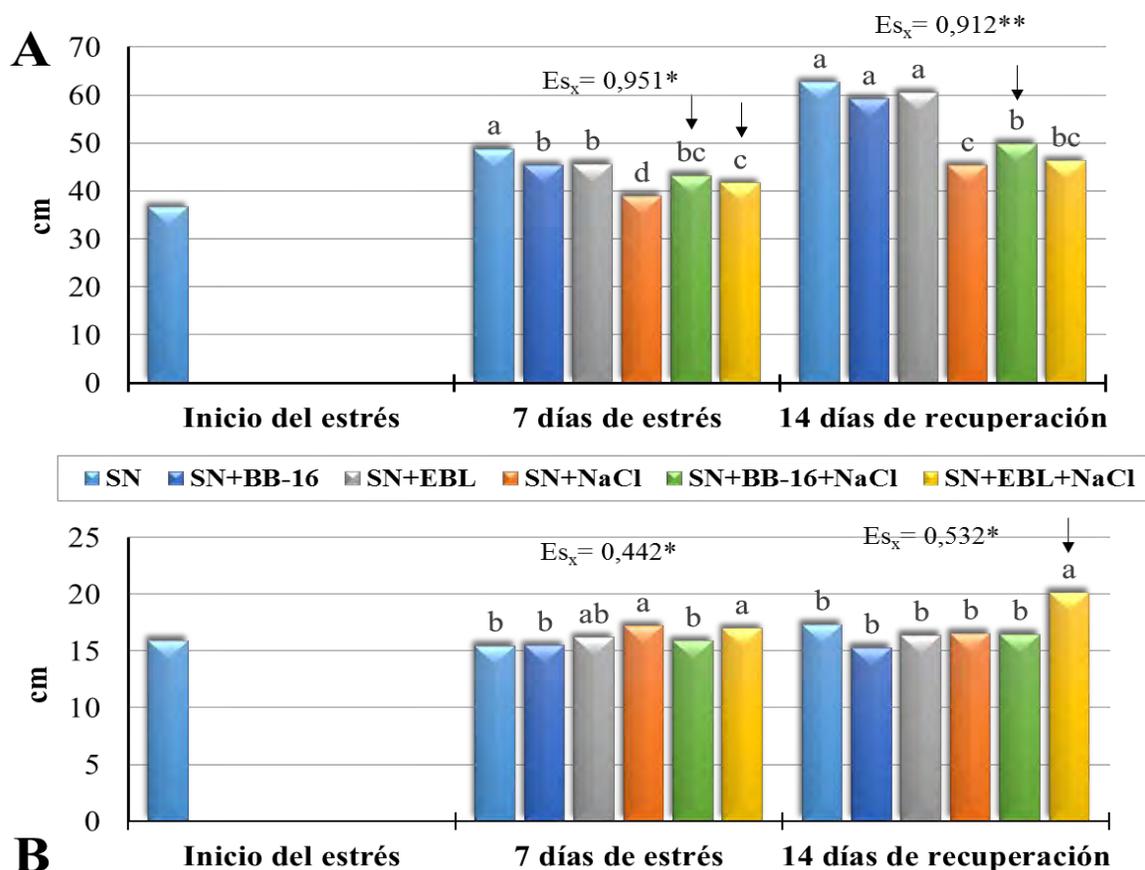
		SN	SN+NaCl	SN+BB-16	SN+BB-16+NaCl	ES <sub>x</sub>
Longitud de la parte aérea (cm)	Inicio del estrés	35,4	-	-	-	-
	7 días de estrés	40,5 a	34,1 b	39,4 a	<b>41,4 a</b>	0,82*
	14 días de recuperación	52,9 b	44,6 c	59,5 a	<b>49,4 b</b>	0,94*
Longitud de las raíces (cm)	Inicio del estrés	19,0	-	-	-	-
	7 días de estrés	22,1 a	18,9 c	20,4 b	<b>20,1 b</b>	0,15*
	14 días de recuperación	22,0	21,3	22,2	21,6	0,86 ns
Masa seca de la parte aérea (g planta <sup>-1</sup> )	Inicio del estrés	0,3387	-	-	-	-
	7 días de estrés	0,7414 b	0,5062 c	1,0141 a	<b>1,0222 a</b>	0,0523**
	14 días de recuperación	1,4708 b	1,4687 b	2,4264 a	<b>2,6702 a</b>	0,0426**
Masa seca de las raíces (g planta <sup>-1</sup> )	Inicio del estrés	0,0837	-	-	-	-
	7 días de estrés	0,1943 b	0,1039 d	0,2191 a	<b>0,1541 c</b>	0,0073*
	14 días de recuperación	0,2678 b	0,1674 d	0,3059 a	<b>0,2362 c</b>	0,0084*
Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Inicio del estrés	72,3	-	-	-	-
	7 días de estrés	89,6 b	67,7 c	102,0 ab	<b>115,9 a</b>	6,45*
	14 días de recuperación	132,4 c	127,5 c	194,8 a	<b>169,1 b</b>	6,31*

Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=24$ .

En estos experimentos se corroboró el efecto de las concentraciones de BB-16 y EBL escogidas en el acápite 3.1, en las plantas de arroz sometidas a estrés salino. También, se confirmó el efecto de las fechas de plantación en la respuesta diferenciada de las plantas al estrés salino, ya que los experimentos se realizaron en fechas diferentes.

Por ese motivo y para comparar los resultados de la aspersión foliar con los brasinoesteroides, se ejecutó otro experimento, en similares condiciones, en el cual se incluyeron ambos productos. En este experimento se evaluaron, además de los indicadores de crecimiento, diferentes variables fisiológicas y bioquímicas asociadas a la respuesta de las plantas de arroz ante el estrés salino.

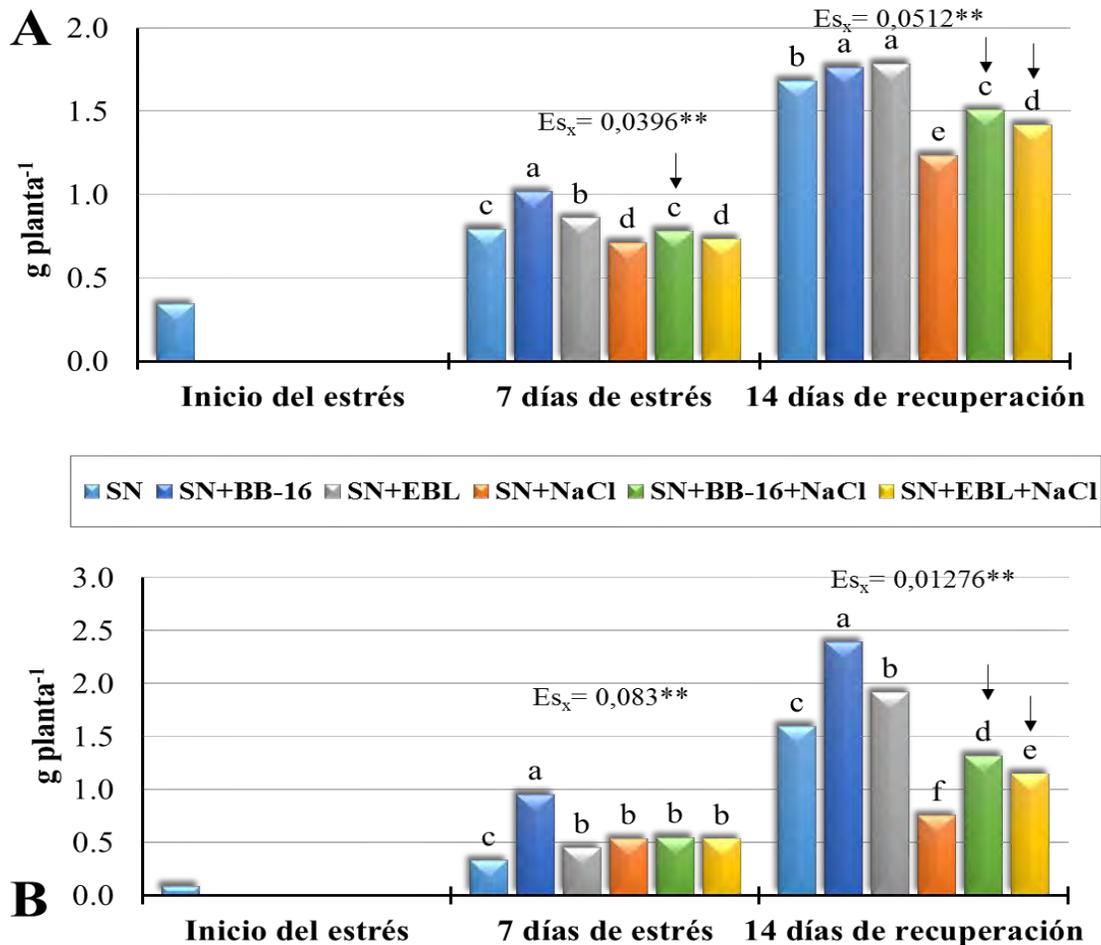
En la Figura 6 se muestran los resultados de la longitud de las plantas de arroz asperjadas con BB-16 o EBL y sometidas a estrés salino durante siete días.



**Figura 6.** Efecto de la aspersión foliar con BB-16 ( $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) o EBL ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) en la longitud de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a  $\text{NaCl } 100 \text{ mmol L}^{-1}$  por siete días. **A.** Parte aérea **B.** Raíces. Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=24$ .

El tratamiento salino disminuyó la longitud de la parte aérea y aumentó la longitud de las raíces. En la recuperación, la reducción en la parte aérea de las plantas del tratamiento control fue más marcada. En las raíces, no se observaron diferencias significativas entre las plantas sometidas a  $\text{NaCl}$  y las del control. En cuanto a la protección inducida por los brasinoesteroides, tanto el BB-16 como la EBL lograron, al finalizar el período de estrés, estimular significativamente la longitud de la parte aérea en comparación con el tratamiento control con sal. Sin embargo, en la recuperación, solo el BB-16 mantuvo este efecto, mientras que la EBL sólo lo hizo en la longitud de las raíces.

En la Figura 7 se muestran los resultados de la masa seca de las plantas de arroz asperjadas con BB-16 o EBL y sometidas a estrés salino durante siete días.

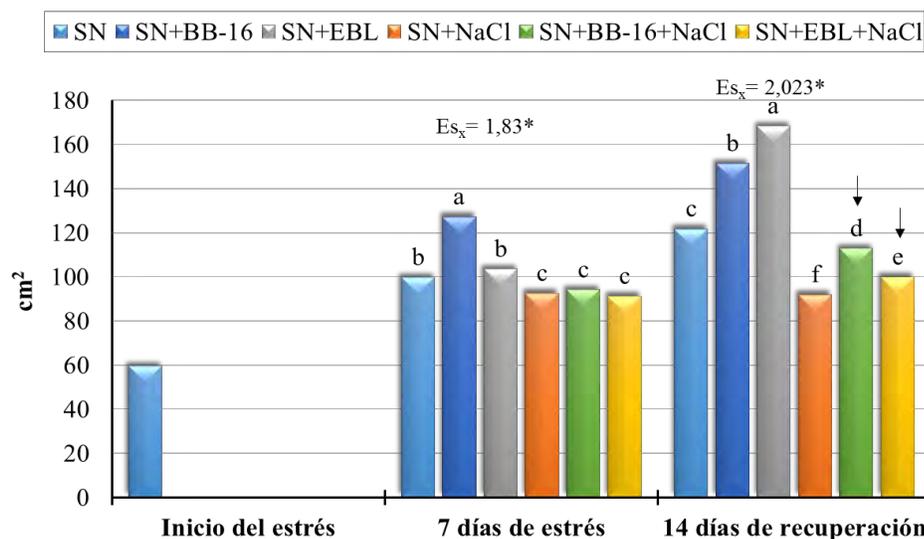


**Figura 7.** Efecto de la aspersión foliar con BB-16 ( $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) o EBL ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) en la masa seca de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  por siete días. **A.** Parte aérea. **B.** Raíces. Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=24$ .

El tratamiento salino disminuyó la masa seca de la parte aérea y este efecto se hizo más marcado durante la recuperación. En la masa seca de las raíces, se observó un aumento significativo al finalizar el período de estrés, aunque en la recuperación este indicador disminuyó significativamente. Sólo el BB-16 pudo proteger a las plantas de arroz estresadas, al finalizar el período de estrés, con un aumento significativo de la masa seca de la parte aérea a niveles similares al control sin sal. Durante la recuperación, ambos brasinoesteroides

lograron revertir parcialmente los efectos adversos de la salinidad en la masa seca de la parte aérea y las raíces siendo más efectivo el BB-16.

En la figura 8 se observa el efecto de la aspersión foliar con ambos brasinoesteroides en el área foliar. Al finalizar el período de estrés, no se observaron diferencias significativas en los tratamientos sometidos a NaCl. Sin embargo, durante la recuperación, ambos BR lograron incrementar significativamente el área foliar de las plantas, en comparación con el tratamiento control con sal, siendo más efectivo el BB-16.



**Figura 8.** Efecto de la aspersión foliar con BB-16 ( $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) o EBL ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) en el área foliar de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  por siete días. Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=24$ .

De forma general, se ha observado en este trabajo un incremento en las variables de crecimiento de las plantas de arroz asperjadas con BB-16 o EBL y sometidas a NaCl, resultado similar al experimento anterior.

Es bien conocido que la salinidad inhibe el crecimiento de las plantas y en muchos casos la longitud de la parte aérea es más afectada que las raíces (Munns, 2002). Este efecto del estrés salino pudiera estar asociado tanto al déficit hídrico como a la acumulación de iones que retrasan los procesos de división y diferenciación celular (Duan *et al.*, 2007).

Esta disminución en el crecimiento de las plantas tratadas, durante la recuperación, pudiera deberse a que los efectos tóxicos de la acumulación de sales tardan más en manifestarse pero permanecen en el tiempo, aún después de pasar al período de recuperación (Reddy *et al.*,

2017). Para corroborar esta hipótesis, se ha señalado el hecho de que una vez concluido el período de estrés y sometidas las plantas durante siete días al tratamiento control, estas no lograron recuperarse, lo que demuestra el carácter irreversible de los daños ocasionados (Morales *et al.*, 2006).

Algunos de los resultados presentados muestran que la biomasa de la raíz aumentó con el tratamiento salino (Figuras 6 y 7), lo cual se ha informado con anterioridad (Qayyum *et al.*, 2007; Moud y Maghsoudi, 2008). A pesar de que las raíces se encuentran en contacto directo con la sal, su crecimiento se ve menos afectado que el de la parte aérea, aumentando la relación raíz: parte aérea (Moud y Maghsoudi, 2008; Munns y Tester, 2008). Esto pudiera ser una adaptación de la planta para incrementar la relación entre la absorción de agua y la pérdida por transpiración. Sin embargo, en el período de recuperación, la biomasa de la raíz disminuyó en las plantas que fueron previamente estresadas, sugiriendo que los efectos a largo plazo de la salinidad afectan el crecimiento de este órgano.

En cuanto a las respuestas de las plantas sometidas a estrés salino y asperjadas foliarmente con EBL, resultados similares han sido informados por otros autores en diferentes cultivos. Por ejemplo, en trigo, se han evaluado los efectos de la aspersión foliar con EBL en plantas de dos cultivares y se encontró que la EBL solamente estimuló el crecimiento del cultivar tolerante (Shahbaz *et al.*, 2008).

Otros autores, han informado que la aspersión foliar con EBL ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) incrementó significativamente la masa seca de tallos y raíces en plantas de fresa sometidas a estrés salino (Karlidag *et al.*, 2011). La EBL ha sido capaz, también, de estimular el crecimiento en condiciones de estrés salino de plantas de las especies *Vigna radiata* (Mir *et al.*, 2015), *Lactuca sativa L.* (Ekinci *et al.*, 2012) y *Triticum aestivum L.* (Talaat y Shawky, 2013).

Particularmente en arroz, se ha observado una recuperación en el crecimiento de las plántulas de arroz cv. IR-64 cuyas semillas fueron tratadas durante 24h con NaCl  $150 \text{ mmol L}^{-1}$  y EBL  $3 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Anuradha y Rao, 2001) y de plántulas de arroz cv. IR-28, cuyas semillas fueron tratadas con EBL a igual concentración (Özdemir *et al.*, 2004).

Se ha informado, además, que el tratamiento a las semillas con EBL  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  logró aumentar la longitud y las masas fresca y seca de la parte aérea, así como de las raíces de plántulas de arroz cultivar Pusa Basmati-1 sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (Sharma *et al.*, 2013b).

Phap (2006), encontró una recuperación en el crecimiento de plantas de arroz sometidas a estrés salino, asperjadas con EBL durante la fase de inicio de paniculación.

Se ha demostrado que los brasinoesteroides no se transportan a largas distancias, sino que su efecto es local, o sea, su transporte es a corta distancia, dentro de la célula o entre células vecinas (Symons *et al.*, 2008); por lo que la forma de aplicación a las plantas es muy importante. En la protección a las plantas ante el estrés salino se han utilizado varias formas de aplicación como son: la imbibición a las semillas, la aspersion foliar y la adición al medio de crecimiento; siendo la imbibición a las semillas, la forma más utilizada en el cultivo del arroz.

En cuanto a la utilización de los análogos de brasinoesteroides existen algunos resultados informados en la literatura. Se ha observado un incremento en la masa seca de las plántulas del cultivar de arroz Perla de Cuba (sensible) sometidas a soluciones de 100 y 150 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl y tratadas con los análogos DI-43, MH-5, CR-44 y BB-6 (Nuñez, 2000).

En tomate, se encontró que el tratamiento con 0,1 µmol L<sup>-1</sup> de BB-16 fue capaz de proteger el crecimiento inicial de plántulas del cultivar INCA 9(1) ante el estrés salino provocado por 75 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl; sin embargo, no hubo respuesta en el cultivar Amalia (Reyes *et al.*, 2010).

Posteriormente, se evaluó la influencia del tratamiento a las semillas con varias concentraciones de EBL y BB-16, en el crecimiento de las plántulas de dos cultivares de arroz (J-104 y Ginés) en medio salino. Tanto la EBL como el BB-16 fueron capaces de modificar parcialmente la inhibición que en el crecimiento de las plántulas de ambos genotipos de arroz provocó la presencia de NaCl; siendo más efectivos los tratamientos en el cultivar tolerante Ginés (Núñez *et al.*, 2013). También, el tratamiento a las semillas de arroz cv. INCA LP-7 con BB-16, a la misma concentración utilizada en este trabajo, estimuló la longitud y la masa seca de las raíces de las plántulas en medio salino (Núñez *et al.*, 2016).

El crecimiento vegetal requiere de la coordinación de numerosos procesos, algunos de los cuales parecen estar influenciados por los brasinoesteroides. La plasticidad de la pared celular se incrementa cuando la salida de protones a través de las H<sup>+</sup>ATPasas acidifica el apoplasto con la consiguiente activación de las enzimas involucradas en el ablandamiento de la pared celular. Algunos estudios han informado que el tratamiento con brasinoesteroides aumenta la actividad ATPasa en epicotilos de frijol Azuki y raíces de maíz induciendo la salida de protones hacia el apoplasto (Cerana *et al.*, 1983; Cerana *et al.*, 1984).

Recientemente, se ha descubierto, en plántulas de *Arabidopsis*, que BRI 1 puede inducir rápidamente la expansión de la pared celular en respuesta a la BL. Esta expansión de la pared es acompañada por una rápida hiperpolarización del potencial de membrana, la cual depende de la activación de la H<sup>+</sup>ATPasa-tipo P. Esta activación requiere de la actividad quinasa de BRI 1 y parece estar mediada por una asociación del receptor con la bomba de protones modulada por la BL (Caesar *et al.*, 2011).

Además, se ha demostrado que los brasinoesteroides pueden regular la biosíntesis de la celulosa mediante el control de la expresión de los genes *CESA* de *Arabidopsis* (Xie *et al.*, 2011).

Los brasinoesteroides también pueden influir en el crecimiento mediante el aumento de la expresión de genes que codifican para xiloglucano endotrans-glicosilasas/ hidrolasas (Zurek y Clouse, 1994; Xu *et al.*, 1996; Koka *et al.*, 2000; Uozu *et al.*, 2000). Estas enzimas están involucradas en la biosíntesis y modificación de la pared celular.

Igualmente, el tratamiento con BL sobreexpresa numerosos genes relacionados con la expansión celular y la organización de la pared celular, como expansinas, extensinas, arabinogalactanos y enzimas modificadoras de pectina (Goda *et al.*, 2002; Divi *et al.*, 2016). Del mismo modo, la señalización por brasinoesteroides es necesaria para el aumento de las enzimas pectin metilesterasas (Qu *et al.*, 2011; Wolf *et al.*, 2012). Además, se ha descubierto un elemento primario de esta señalización hormonal llamado RECEPTOR-LIKE PROTEIN (RLP44). Esta proteína activa la señalización por brasinoesteroides por interacción directa con BAK 1, el correceptor de BRI1, permitiendo la sobrerregulación de agentes remodeladores de la pared celular con la consiguiente preservación de la integridad de la misma (Wolf *et al.*, 2014).

Los brasinoesteroides inducen la expresión de varios genes relacionados con el ciclo celular (*CYCA*, *CYCB*, *CYCD3;1*, *CYCD3;2*) que codifican para quinasas dependientes de ciclinas (CDKs siglas en inglés) y ciclofilinas que juegan un papel crítico en la regulación del ciclo celular, la proliferación y la diferenciación (Fu *et al.*, 2008)

La BL puede también afectar la forma celular y la expansión a través de la regulación de la dinámica de los microtúbulos (Catterou *et al.*, 2001a, b) y la acumulación de transcritos de las ciclinas tipo B y D (*CycD3*) (Hu *et al.*, 2000; Miyazawa *et al.*, 2003).

Se debe señalar que el efecto de la EBL en el crecimiento radical ha sido un poco controversial en la literatura internacional. En general, los niveles de brasinoesteroides en raíces son mucho más bajos que en los meristemas, y al parecer los requerimientos en este órgano también son menores (Shimada *et al.*, 2003). Los primeros informes mostraron que la EBL tenía efectos inhibitorios en la formación de las raíces en maíz, tomate, *Arabidopsis* y plántulas de soya (Sasse, 2003). Sin embargo, otros autores han informado incrementos en la longitud de la raíz en plantas de berro (*Lepidium sativum*) crecidas en la oscuridad y raíces primarias de maíz (Kim *et al.*, 2000). Müssig *et al.* (2003), demostraron que en *Arabidopsis thaliana* esta respuesta es dependiente de la concentración. Aplicaciones de bajas concentraciones de BR ( $0,1 \text{ nmol L}^{-1}$ ) estimularon el crecimiento de la raíz mientras que las altas concentraciones resultaron inhibitorias ( $10 \text{ nmol L}^{-1}$ ).

También, se ha propuesto que los brasinoesteroides influyen en la regulación del tamaño del meristemo de la raíz de *Arabidopsis* de dos maneras: por la renovación de la competencia de las células del centro quiescente y por el control de la progresión del ciclo celular (González-García *et al.*, 2011; Vilarrasa-Blasi *et al.*, 2014).

Se ha observado que estas hormonas están involucradas, junto con las auxinas, en la regulación del número de las raíces laterales (Fukaki y Tasaka, 2009; Chaiwanon y Wang, 2015) y en la formación de los pelos radicales (Kuppusamy *et al.*, 2009).

Todos estos resultados pudieran asociarse a la influencia de la aspersión foliar con EBL ( $2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) en el crecimiento de plantas de arroz cv. J-104 sometidas a NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  por siete días. Sin embargo, aunque la respuesta en el crecimiento fue similar y en ocasiones superior a la EBL, no se conoce si la acción del BB-16 ( $0,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) se produce mediante los mismos mecanismos moleculares. Lo anterior indica que sería interesante en experimentos futuros evaluar la expresión de algunos de estos genes ante el tratamiento con este análogo de brasinoesteroide.

Para tratar de conocer algunos de los mecanismos asociados a la respuesta en el crecimiento observada en los resultados anteriores, se evaluaron indicadores de las relaciones hídricas y de la nutrición de las plantas, así como varios indicadores bioquímicos asociados al estrés y al metabolismo oxidativo de la planta.

#### **4.2.1 Indicadores de las relaciones hídricas**

Uno de los efectos más inmediatos del estrés salino en las plantas es la modificación de las relaciones hídricas causada por el efecto osmótico que disminuye el potencial hídrico del medio y restringe la absorción de agua por las raíces.

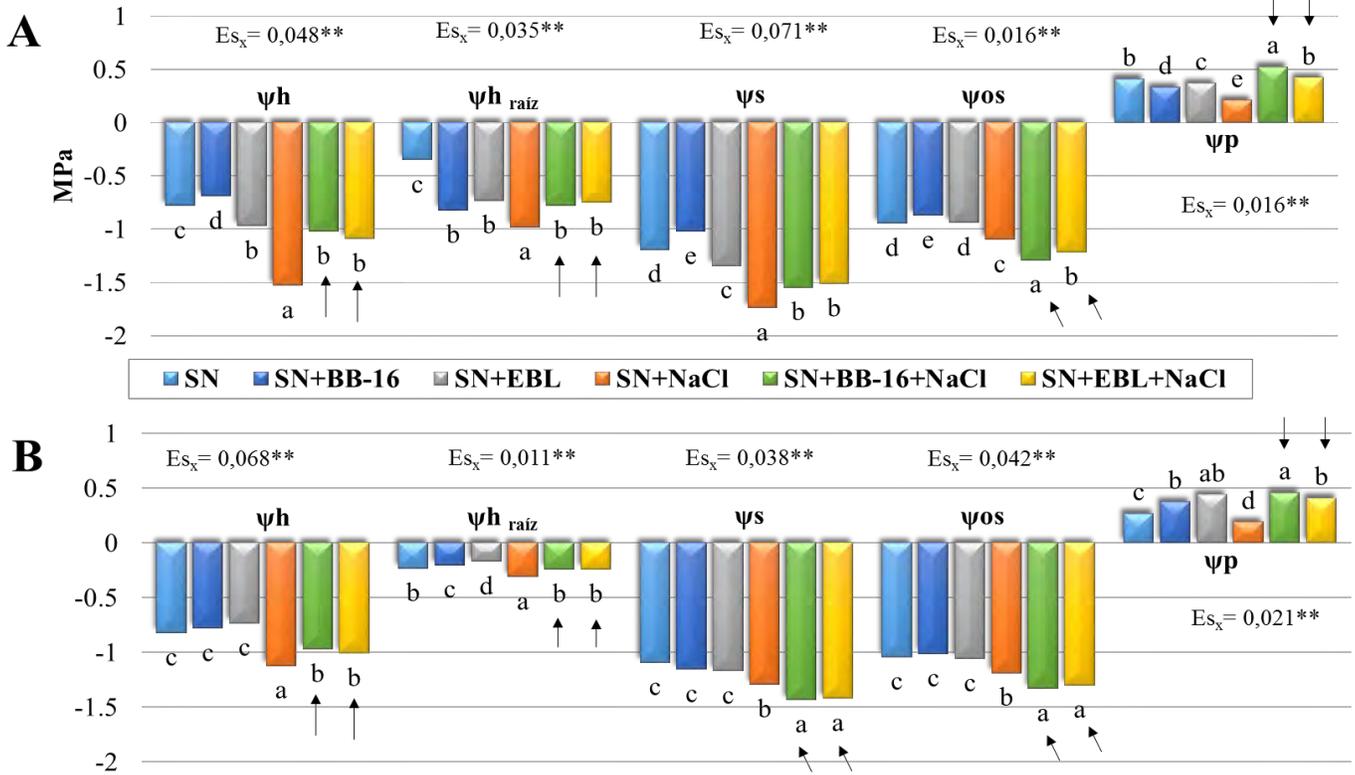
En el caso del potencial hídrico foliar ( $\Psi_h$ ), a los siete días de estrés, se evidenció una disminución significativa en los tratamientos expuestos al NaCl con respecto al control. Esta respuesta fue significativamente menor en las plantas tratadas con BB-16 o EBL con respecto al control con sal (Figura 9A). Algo similar ocurrió con el potencial hídrico de la raíz ( $\Psi_{h\text{ raíz}}$ ) donde la salinidad disminuyó significativamente este indicador, aunque el decremento fue menor en las plantas de arroz asperjadas con BB-16 o EBL en comparación con las plantas del tratamiento control con sal. Es interesante destacar como en el caso de las plantas asperjadas con EBL sin estrés también disminuyó el potencial hídrico foliar y el de la raíz, al igual que el potencial osmótico. La aspersión foliar con BB-16 en las plantas sin estrés solo tuvo este comportamiento en el potencial hídrico de la raíz.

En el caso del potencial osmótico ( $\Psi_s$ ), se observó una reducción significativa al final del estrés; mientras el decremento del  $\Psi_s$  en las plantas tratadas con ambos brasinoesteroides fue significativamente menor (Figura 9A). El potencial osmótico saturado ( $\Psi_{os}$ ) disminuyó significativamente en los tratamientos con NaCl, siendo esta disminución más significativa en las plantas asperjadas con los BR, destacándose nuevamente el BB-16.

En el caso del potencial de presión ( $\Psi_p$ ) se observó un aumento significativo en las plantas estresadas tratadas con BB-16 y EBL al finalizar el período de salinidad, siendo más efectivo el análogo (Figura 9A).

Al final de la recuperación se observó un comportamiento similar en todos los indicadores evaluados, con una influencia positiva de la aspersión foliar con BB-16 o EBL.

Varios autores han encontrado que tanto el potencial hídrico foliar como los potenciales osmóticos sufrieron una fuerte depresión con el incremento del contenido salino en el medio, mientras que el potencial de presión se incrementó (Morales *et al.*, 2004).



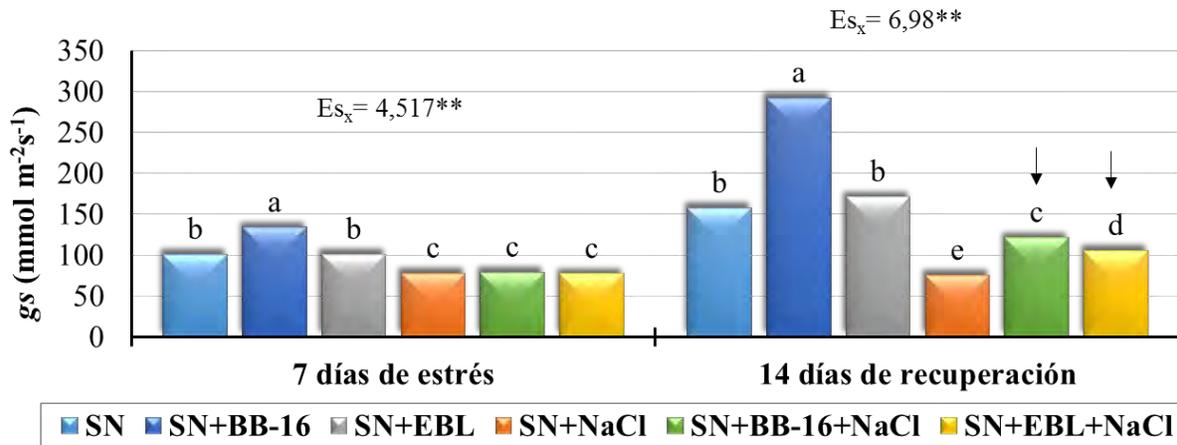
**Figura 9.** Efecto de la aspersión foliar con BB-16 ( $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) o EBL ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) en los potenciales: hídrico foliar ( $\psi_h$ ), hídrico de raíz ( $\psi_{h \text{ raíz}}$ ), osmótico ( $\psi_s$ ), osmótico saturado ( $\psi_{os}$ ) y de presión ( $\psi_p$ ) de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  durante siete días. **A.** Final del período de estrés. **B.** Final del período de recuperación. Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=5$ .

También en trigo, la salinidad causó efectos adversos en el potencial hídrico y en el osmótico, tanto en una variedad tolerante como en una susceptible. La EBL logró mejorar este efecto en el potencial hídrico en el cultivar susceptible, pero en el potencial osmótico la concentración de  $0,025 \text{ mgL}^{-1}$ , causó un decremento significativo en las plantas estresadas (Shahbaz *et al.*, 2008).

La aspersión foliar con EBL ( $0,125 \text{ mg L}^{-1}$ ) tuvo un efecto positivo en las relaciones hídricas en plantas de guisante sometidas a estrés salino (Shahid *et al.*, 2015). Por otra parte, tanto la EBL como la HBL a la concentración de  $0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$  incrementaron el potencial hídrico foliar en dos cultivares de mostaza crecidas en medio salino (Wani *et al.*, 2017)

Otro de los indicadores evaluados en el trabajo fue la conductancia estomática. La regulación de la conductancia estomática en las hojas es un fenómeno clave, tanto para la absorción de CO<sub>2</sub> como para evitar la desecación en condiciones de estrés (Ashraf y Harris, 2013).

En la figura 10, se observa una disminución de la conductancia estomática en las plantas sometidas a NaCl al final del estrés. Este comportamiento se acentuó al final de la recuperación. Resultados similares han sido demostrados, por otros autores, en cuatro cultivares de cítricos ante diferentes concentraciones de NaCl, siendo los cultivares más afectados los sensibles (Balal *et al.*, 2012). Igualmente, se ha observado la disminución de la conductancia estomática en plantas de mostaza sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (Jamil y Rha, 2013). También, en *Fraxinus ornus* disminuyó la conductancia estomática en plantas expuestas a la salinidad (Fini *et al.*, 2014).



**Figura 10.** Efecto de la aspersión foliar con BB-16 (0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) o EBL (2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) en la conductancia estomática de hojas de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl 100  $\text{mmol L}^{-1}$  durante siete días. Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=5$ .

La aspersión foliar con ambos brasinoesteroides en las plantas tratadas con NaCl no tuvo efecto en la conductancia estomática al finalizar el estrés. Sin embargo, a los 14 días de recuperación, el tratamiento con ambos brasinoesteroides provocó que la disminución de este indicador con respecto a las plantas control con sal fuera menor (Figura 10).

Otros autores han obtenido resultados similares con la utilización de la EBL, por ejemplo en lechuga el tratamiento a la semilla y la posterior aspersión foliar con tres concentraciones de EBL (1, 2 y 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), incrementó la conductancia estomática en un 75% respecto al

control; el tratamiento más efectivo fue el de 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  tanto a la concentración de NaCl de 50  $\text{mmol L}^{-1}$  como a la de 100  $\text{mmol L}^{-1}$  (Ekinci *et al.*, 2012).

En frijol mungo, la aspersión foliar con EBL ( $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ) aumentó la conductancia estomática en las plantas tratadas con NaCl a niveles similares al control (Mir *et al.*, 2015). En berenjena, las concentraciones de EBL de 50 y 100  $\text{nmol L}^{-1}$  lograron revertir la disminución provocada por NaCl 90  $\text{mmol L}^{-1}$  (Wu *et al.*, 2012).

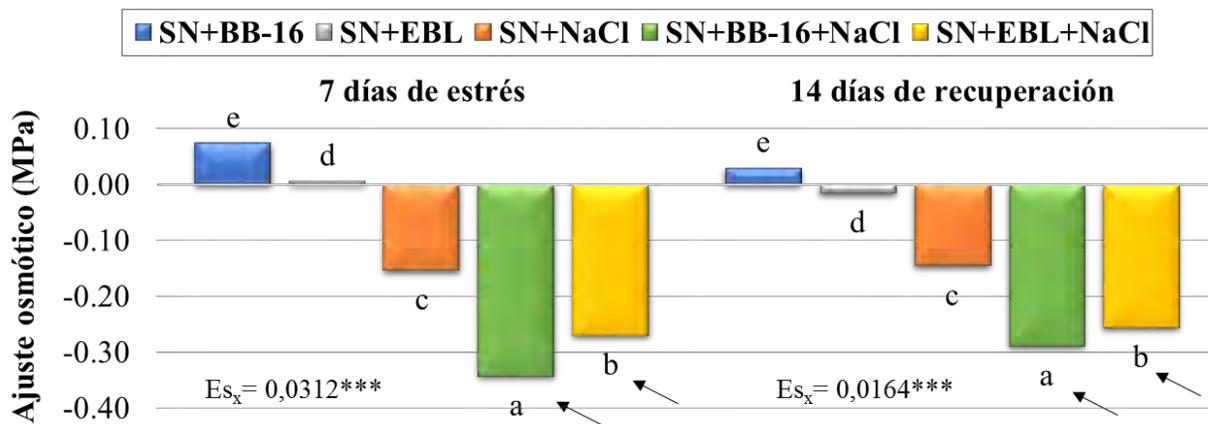
Este incremento del estado hídrico de las plantas, inducido por los BR, pudiera ser el resultado de un aumento de la conductividad hidráulica de la raíz. Existen evidencias que la BL puede incrementar la actividad de las acuaporinas (Morillon *et al.*, 2001), lo cual pudiera conllevar a una recuperación de la turgencia y la expansión celular.

La disminución del potencial hídrico de la raíz observada en este trabajo pudiera ser debida al estrés osmótico provocado por la presencia del NaCl. Esto explicaría la disminución de la absorción de agua por la raíz. A su vez, este estado hídrico puede provocar el cierre estomático dependiente de ABA, y por tanto, a una menor conductancia estomática le corresponderá un menor intercambio de vapor de agua y una menor transpiración, por consiguiente, un menor movimiento del agua en la planta. Esto conlleva a una menor hidratación de la parte aérea provocando una depresión en los potenciales hídrico y osmótico en las hojas. Lógicamente, a medida que transcurre el tiempo esta disminución en la transpiración debiera incrementar el estado hídrico de las plantas.

Está bien fundamentado que los efectos de la salinidad incluyen la reducción de la conductancia estomática y la conductividad hidráulica de la raíz, probablemente debido al estrés osmótico y al desbalance iónico causado por las altas concentraciones apoplásticas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Gupta y Huang, 2014; Senguttuvel *et al.*, 2014; Reddy *et al.*, 2017). También, se ha sugerido que la disminución de la conductividad hidráulica de la raíz por la salinidad, pudiera estar relacionada con una reducción de la actividad o la concentración de las acuaporinas en la membrana plasmática de la raíz (Sade *et al.*, 2010). La salinidad probablemente afecte la función de estos canales de agua en las raíces por dos vías: la expresión génica y cambios bioquímicos en las proteínas, por ejemplo: fosforilación, lo cual está descrito como uno de los mecanismos que permite la activación molecular de las acuaporinas (Martínez-Ballesta *et al.*, 2006)

Es interesante señalar, como con la disminución del potencial hídrico también disminuye el potencial osmótico, lo que contribuye a que el potencial de presión o turgencia se mantenga constante. Mantener la turgencia es muy importante para diferentes procesos celulares como la expansión y el transporte de sustancias (Taiz y Zeiger, 2006).

Existen diferentes vías por las cuales las plantas pueden disminuir el potencial osmótico, una de ellas es el ajuste osmótico. Este es un mecanismo fisiológico de las plantas que les permite disminuir su potencial osmótico interno para compensar el potencial osmótico externo y facilitar la entrada de agua a la célula.



**Figura 11.** Efecto de la aspersión foliar con BB-16 ( $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) o EBL ( $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) en el ajuste osmótico de hojas de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  durante siete días. Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=5$ .

Diversos métodos se han indicado para la estimación del ajuste osmótico realizado por la planta y en este experimento se tomó como estimación del ajuste osmótico, la diferencia en el potencial osmótico saturado ( $\Psi_{os}$ ) entre las plantas sometidas a los distintos tratamientos y el control sin sal (Morales *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2006; Nortes, 2008; Dell'Amico *et al.*, 2011).

Como se puede apreciar en la figura 11, las plantas asperjadas con ambos brasinoesteroides exhibieron una mayor diferencia entre sus  $\Psi_{os}$  y por ende, se puede inferir que tuvieron un mejor ajuste osmótico. En este caso, se destacó el BB-16 que difirió significativamente de las plantas asperjadas con EBL en los dos momentos evaluados.

En plantas de trigo cultivadas en condiciones de salinidad, se ha encontrado que los cultivares más tolerantes tuvieron un mejor ajuste osmótico (Argentel *et al.*, 2013). También, en plantas de tomate cv. Amalia sometidas a diferentes niveles de NaCl, se observó una disminución en el potencial osmótico saturado y por ende, un mejor ajuste osmótico, comportamiento que fue más pronunciado a medida que aumentó la concentración de sal (Morales *et al.*, 2010).

No se han encontrado referencias en la literatura internacional del efecto de los brasinoesteroides en el ajuste osmótico de plantas sometidas a estrés salino, utilizando una metodología para este fin, sino de manera general, se determinan algunos solutos osmóticamente activos y se infiere si existe o no ajuste osmótico. Esto revela la novedad de los resultados presentados en este trabajo.

El ajuste osmótico está generalmente ligado a la síntesis de solutos orgánicos, como la betaína, colina, glicina-betaína, prolina y sacarosa y/o a la acumulación de iones inorgánicos. Por esta razón, se decidió evaluar diferentes solutos orgánicos, así como el contenido de iones en plantas de arroz cv. J-104 sometidas a estrés salino durante siete días.

#### **4.2.2 Contenido de solutos orgánicos osmóticamente activos**

En la tabla IV se muestran los resultados del contenido de prolina y glicina betaína, en hojas y raíces, al finalizar el tratamiento con NaCl.

El estrés salino aumentó los niveles de prolina, tanto en las hojas como en la raíz (Tabla IV). La aplicación foliar con ambos brasinoesteroides incrementó aún más el contenido de este aminoácido en las hojas; sin embargo, en la raíz solo la EBL tuvo este efecto. Al finalizar la recuperación (Tabla IV), las plantas que estuvieron sometidas al estrés salino continuaron con un contenido de prolina mayor. Las plantas asperjadas con brasinoesteroides y sometidas a estrés disminuyeron el contenido de este osmolito, en el caso de la EBL en hojas y raíces y en el BB-16 sólo en las hojas (Tabla IV).

Resultados similares a los encontrados en este trabajo, se han informado en la literatura. La aspersión foliar con EBL aumentó la concentración de prolina tanto en las hojas como en las raíces en plantas de frijol (Rady, 2011) y trigo (Talaat y Shawky, 2013) sometidas a estrés salino.

**Tabla IV.** Efecto de la aspersión foliar con BB-16 (0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) o EBL (2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) en el contenido de prolina (**Pro**) y glicina betaina (**GB**) de hojas (H) y raíces (R) de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl 100  $\text{mmol L}^{-1}$  durante siete días.

	7 DÍAS DE ESTRÉS				14 DÍAS DE RECUPERACIÓN			
	Pro ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)		GB ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MS)		Pro ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)		GB ( $\mu\text{g g}^{-1}$ MS)	
	H	R	H	R	H	R	H	R
SN	0,0095 c	0,01 d	965,609 a	584,65 c	0,0103 c	0,012 c	1036,96 b	588,77 a
SN+BB-16	0,014 b	0,011 cd	910,21 b	605,5 b	0,0066 d	0,0076 d	829,9 e	580,4 b
SN+EBL	0,012 b	0,025 b	844,81 d	603,2 b	0,0103 c	0,013 c	947,1 d	575,5 b
SN+NaCl	0,015 b	0,026 b	890,34 c	620,85 ab	0,01525 a	0,0297 a	981,24 c	580,03 b
SN+BB-16+NaCl	<b>0,025 a</b>	0,014 c	914,35 bc	609,8 b	0,0097 c	0,0086 d	957,3 d	588,3 a
SN+EBL+NaCl	<b>0,028 a</b>	<b>0,039 a</b>	927,12 b	628,6 a	0,0137 b	0,0152 b	<b>1116,2 a</b>	586,8 ab
$E_{s_x}$	0,0016**	0,00104**	11,824**	5,11**	0,00085**	0,00073**	6,28**	2,325**

Medias con letras comunes no difieren significativamente entre si según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=9$

Algo similar ocurrió en *Lolium perenne* L., donde la aspersión foliar con dos concentraciones de EBL (10 y 100  $\text{nmol L}^{-1}$ ) acrecentó el contenido de prolina foliar en las plántulas tratadas con NaCl 250  $\text{mmol L}^{-1}$  (Wu *et al.*, 2017). Además, en frijol, la adición de EBL al medio de cultivo incrementó los niveles de prolina de las plantas crecidas en tres concentraciones (50, 100 y 150  $\text{mmol L}^{-1}$ ) de NaCl (Nafie *et al.*, 2015).

Sin embargo, también se ha encontrado en la literatura el efecto contrario, o sea, que la aplicación de EBL disminuye los niveles de prolina. Tal es el caso del tratamiento a semillas de arroz con EBL y su posterior crecimiento en medio salino (Özdemir *et al.*, 2004). También, en semillas de frijol tratadas con EBL (5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) y sometidas a estrés salino por ocho días, se observó una disminución del contenido de prolina con respecto a las plántulas estresadas (Ali y Abdel-Fattah, 2006). Estos resultados pudieran relacionarse con la forma de aplicación de los brasinoesteroides, ya que en los ejemplos presentados el tratamiento a la semilla provoca una disminución de los niveles de prolina.

En el caso del BB-16 son pocos los resultados encontrados en la literatura sobre el efecto ocasionado en la concentración de prolina ante estrés salino. En plántulas de tomate, el

tratamiento a las semillas con BB-16 y luego, el crecimiento en medio salino disminuyó la concentración de prolina en el cv. Amalia mientras no tuvo influencia en el cv. INCA 9(1) (Reyes *et al.*, 2014). En arroz, el tratamiento a las semillas con BB-16 no difirió significativamente del control con sal en el contenido de prolina foliar de plántulas del cv. INCA LP-7 crecidas en medio salino, mientras que el análogo BB-25 disminuyó significativamente este indicador (Núñez *et al.*, 2016).

Por otro lado, en los últimos años, se ha descrito el posible papel de la prolina como antioxidante. La acumulación de prolina estabiliza las membranas y los componentes sub-celulares, incluyendo el complejo II de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Szabados y Savoure, 2009). Existen estudios que proponen a la prolina como aceptor final de los radicales libres (Sharma y Dietz, 2006) y estabilizador del potencial redox por reaprovisionamiento del NADP<sup>+</sup> (Hamilton y Heckathorn, 2001). Se ha demostrado que la aplicación exógena de prolina proporciona una acción protectora contra el daño oxidativo inducido por el estrés salino (Ahmed *et al.*, 2010).

El aumento de la prolina en condiciones de estrés salino, tanto en hojas como en raíces, provocado por la aspersion foliar con EBL pudiera deberse a incrementos en la expresión de los genes de P5CS (enzima clave en la biosíntesis de la prolina). Otros autores han demostrado que la expresión de *AtP5CSI* es activada por una vía de traducción de señales dependiente de ABA y modulada por la luz y los brasinoesteroides (Savouré *et al.*, 1997; Strizhov *et al.*, 1997). También, el estrés salino indujo hipersensibilidad en los mutantes de BR *det-2* (biosintético) y *bin-2* (señalización), lo que estuvo relacionado con un decremento de la expresión de *P5CSI* y una disminución de los niveles de prolina (Zeng *et al.*, 2010).

Sin embargo, la aspersion foliar con BB-16 sólo aumentó los niveles de prolina en las hojas, disminuyéndolos en la raíz. Esta constituye una de las diferencias entre la EBL y el BB-16 obtenidas en este trabajo. Sería interesante en experimentos futuros evaluar la expresión diferencial de genes relacionados con el metabolismo de la prolina ante tratamientos con EBL y BB-16 para dilucidar estos mecanismos moleculares.

La glicina betaína es otro de los solutos osmóticamente activos que pueden sintetizar las células para realizar el ajuste osmótico. En la Tabla IV se muestran los niveles de glicina betaína en hojas y raíces de plantas de arroz después de ser sometidas a estrés salino por siete días. El estrés salino disminuyó la concentración de glicina betaína en las hojas y la aumentó

en las raíces. Las aspersiones foliares con ambos brasinoesteroides no modificaron este comportamiento (Tabla IV). Al finalizar el período de recuperación, las plantas que estuvieron sometidas a NaCl, redujeron la concentración de este osmolito en las hojas y no existieron diferencias en las raíces. Sin embargo, la aspersión foliar con BB-16 disminuyó aún más la concentración en las hojas, mientras que la EBL incrementó significativamente este indicador tanto en hojas como en raíces (Tabla IV).

En hojas de dos cultivares de trigo sometidos a diferentes niveles de salinidad, se observó un aumento de la concentración de glicina betaína, resultado similar a lo obtenido en este trabajo. La aspersión foliar con EBL 0,1 mg L<sup>-1</sup> aumentó aún más este indicador (Talaat y Shawky, 2012; 2013)

Sin embargo, no se han encontrado resultados en la literatura sobre el efecto de la aplicación de BB-16 en los niveles de glicina betaína por lo que estos constituyen los primeros resultados sobre el tema.

En plantas sometidas a estrés, la glicina betaína contribuye a la preservación del balance osmótico por su papel como soluto citocompatible, estabiliza la estructura de proteínas como la Rubisco y Rubisco activasa, protege el aparato fotosintético, especialmente, los centros de reacción y puede actuar como atrapador de radicales libres (Fariduddin *et al.*, 2013). También, se ha correlacionado la concentración de GB con el aumento de la capacidad fotosintética durante el estrés salino y de sequía (Cha-um *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010).

Recientemente, se ha observado que plantas transgénicas con genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de GB, muestran un mejor comportamiento ante estrés abióticos, que las salvajes (Hisyam *et al.*, 2017).

En la tabla V, se muestra la concentración de azúcares solubles totales (AT) y reductores (AR) en hojas y raíces de plantas de arroz después de sometidas a NaCl durante siete días. El estrés salino aumentó la concentración de azúcares solubles totales y reductores en las hojas. En las raíces sólo aumentaron los azúcares solubles totales. La aspersión foliar con BB-16 disminuyó los niveles de ambos azúcares en las hojas y no los modificó en las raíces. El tratamiento con EBL aumentó aún más los AT en hojas, mientras que los AR no variaron. En las raíces ambos azúcares disminuyeron con la aspersión foliar con EBL.

**Tabla V.** Efecto de la aspersión foliar con BB-16 (0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) o EBL (2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) en el contenido de azúcares solubles totales (AT) y reductores (AR) de hojas (H) y raíces (R) de plantas de arroz cv. J-104 sometidas a NaCl 100  $\text{mmol L}^{-1}$  durante siete días.

	7 DÍAS DE ESTRÉS				14 DÍAS DE RECUPERACIÓN			
	AT		AR		AT		AR	
	(mg Glucosa $\text{g}^{-1}$ MF)		( $\mu\text{g}$ Glucosa $\text{g}^{-1}$ MF)		(mg Glucosa $\text{g}^{-1}$ MF)		( $\mu\text{g}$ Glucosa $\text{g}^{-1}$ MF)	
	H	R	H	R	H	R	H	R
SN	9,102 c	1,063c	253,29 c	87,67 a	10,50 b	0,372 c	259,65 a	177,43 b
SN+BB-16	6,082 d	0,940 c	244,20 c	89,01 a	2,30 e	0,366 c	176,81 d	95,77 e
SN+EBL	13,84 ab	1,146 c	273,21 b	74,73 b	12,784 a	1,225 a	236,27 b	183,67 a
SN+NaCl	12,209 b	1,872 a	324,71 a	65,13b	7,58 c	0,636 b	176,54 d	151,55 c
SN+BB-16+NaCl	4,884 d	1,652 ab	272,68 b	70,81 b	5,60 d	0,220 d	<b>208,70 c</b>	82,99 f
SN+EBL+NaCl	<b>15,881 a</b>	1,537 b	319,97 a	47,93 c	8,896 c	0,177 d	156,71 e	131,82 d
$E_{s_r}$	1,09**	0,0912**	4,03**	3,84**	0,432**	0,0241**	4,31**	1,91**

Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=9$

Al finalizar la recuperación, las plantas tratadas con NaCl mostraron una disminución de los AT en hojas y un aumento en la raíz. Los azúcares reductores disminuyeron en ambos órganos. La aspersión foliar con BB-16 disminuyó los AT en hojas y raíces, mientras que aumentó los AR en las hojas y disminuyó en las raíces. En el caso de la EBL, no hubo variación en la concentración de AT en hojas, en comparación con el tratamiento control con sal; mientras hubo una disminución en las raíces. También la EBL redujo la concentración de AR en ambos órganos (Tabla V).

Similar a los resultados presentados, en frijol sometido a diferentes niveles de salinidad se ha encontrado un aumento de los azúcares solubles totales en hojas. La aspersión foliar con EBL 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  incrementó este comportamiento, pero solo en el nivel más bajo de estrés (50  $\text{mmol L}^{-1}$ ). En tanto en los niveles más altos de NaCl (100 y 150  $\text{mmol L}^{-1}$ ) el BR tuvo un efecto negativo (Nafie *et al.*, 2015).

En hojas de dos cultivares de trigo sometidas a diferentes niveles de salinidad, se observó un aumento de los azúcares solubles totales. La aspersión foliar con EBL 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  aumentó aún más este indicador (Talaat y Shawky, 2013).

Sin embargo, en plantas de maíz expuestas a dos niveles de salinidad (60 y 120 mmol L<sup>-1</sup>) se ha observado una disminución del contenido de azúcares solubles totales en hojas, aunque el pre-tratamiento a las semillas con EBL (10 μmol L<sup>-1</sup>) logró revertir este comportamiento (Agami, 2013).

De la misma manera, en trigo la aplicación de diferentes niveles de salinidad disminuyó el contenido de azúcares totales en hojas de 45 días de edad, mientras que la aspersión foliar con EBL aumentó estos osmolitos (Talaat y Shawky, 2012).

Una explicación a este fenómeno pudiera ser un aumento de las enzimas encargadas de la biosíntesis de carbohidratos bajo estrés salino. Otros autores, en hojas de arroz sometidas a salinidad (342 mmol L<sup>-1</sup>), han encontrado una correlación entre el aumento de los azúcares solubles totales y el incremento en la actividad enzimática y el contenido de transcritos de la fructosa 1,6 bifosfatasa, enzima clave en la síntesis de la sacarosa (Cha-um *et al.*, 2009).

En cuanto a los azúcares reductores, al igual que en los resultados presentados, se ha observado un aumento de los niveles de glucosa y fructosa en hojas de dos cultivares de arroz sometidas a salinidad; sin embargo, este indicador disminuyó en las raíces (Cha-um *et al.*, 2009).

En raíces de arroz sometidas a NaCl en condiciones iso-osmóticas, se han obtenido incrementos en la glucosa y los oligosacáridos estaquiosa y rafinosa (Siringam *et al.*, 2011). También, en plantas de maíz de diez días de edad pre-tratadas con EBL, y sometidas a diferentes niveles de salinidad, se ha informado un aumento de diferentes azúcares reductores como glucosa, fructosa, xilosa y galactosa (Rattan *et al.*, 2017).

En la tabla VI se muestran los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables del estado hídrico de las plantas y los solutos orgánicos determinados en las hojas y las raíces.

Se aprecia que, la prolina foliar fue el único osmolito que correlacionó significativamente con el  $\psi_{os}$ , tanto en las plantas asperjadas con BB-16 como con las asperjadas con EBL, a los siete días de estrés, por lo que al parecer, esta pudiera ser la responsable de la mayor parte del ajuste osmótico encontrado en las plantas de arroz. A los 14 días de recuperación, se mantiene esta correlación en el caso de la EBL y desaparece en el BB-16.

La concentración de azúcares reductores correlacionó positivamente con el potencial hídrico y osmótico en el caso de las plantas asperjadas con BB-16 y con el potencial hídrico, osmótico y

osmótico saturado, en el caso de las plantas asperjadas con EBL al finalizar el período de estrés, aunque a los 14 días de recuperación esta correlación fue negativa (Tabla VI).

El potencial hídrico de la raíz correlacionó con los diferentes osmolitos estimados en este órgano (Tabla VI). Se evidenció, que a los siete días de estrés, la prolina correlacionó con el  $\psi_{h \text{ raíz}}$  y el  $\psi_h$ , en el caso del BB-16, mientras que con la EBL correlacionó el  $\psi_{h \text{ raíz}}$  y el  $\psi_{os}$ . A los 14 días de recuperación se mantuvo el comportamiento del BB-16, en tanto en la EBL este osmolito correlacionó con todos los potenciales excepto el de presión.

En tanto, la GB correlacionó positivamente con el  $\psi_{h \text{ raíz}}$ , cuando se efectuó la aspersión foliar con la EBL a los siete días de estrés, mientras que con el BB-16 fue de forma negativa. Esta es otra de las diferencias entre las respuestas inducidas por ambos brasinoesteroides encontradas en este trabajo. Esto pudiera sugerir, que al menos en la raíz, tanto la prolina como la GB participan en el incremento del potencial hídrico de este órgano.

La concentración de azúcares reductores, de forma general, correlacionó negativamente con el potencial hídrico en la raíz. Esto sugiere, que estos carbohidratos pudieran ser la materia prima para la biosíntesis de sacarosa o ser la fuente a partir de la cual se obtiene el ATP y el NADPH necesarios para la biosíntesis de la prolina (Moharramnejad *et al.*, 2015).

#### **4.2.3 Contenido de cationes inorgánicos**

En la tabla VII se muestran los resultados de la concentración de cationes  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y la relación entre ellos en hojas y raíces de plantas de arroz, después de ser sometidas a NaCl durante siete días y al final de la recuperación. Como se puede apreciar, el estrés salino aumentó la concentración de sodio en las hojas y en las raíces; mientras que disminuyó la concentración de potasio en ambos órganos. La relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  aumentó tanto en hojas como en raíces. Similares resultados se han informado, anteriormente, en plantas de arroz sometidas a estrés salino (Wang *et al.*, 2012; Hakim *et al.*, 2014).

La aspersión foliar con ambos brasinoesteroides logró revertir parcialmente este comportamiento (Tabla VII). Los niveles de sodio en las hojas y las raíces disminuyeron significativamente para ambos BR, con un aumento del  $\text{K}^+$ , en comparación con el control con sal. La relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  también disminuyó en las plantas asperjadas con ambos BR.

**Tabla VI.** Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables de las relaciones hídricas y las concentraciones de prolina (**Pro**), glicina betaína (**GB**), azúcares solubles totales (**AT**) y reductores (**AR**), en hojas (H) y raíces (R) de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup> durante siete días.

BB-16	Pro				GB				AT				AR			
	7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación	
	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R
$\psi_h$	0.230	<b>0.979*</b>	<b>0.877*</b>	<b>0.706*</b>	-0.630	<b>0.749*</b>	0.367	-0.222	0.679	<b>0.927*</b>	0.173	0.538	<b>0.999*</b>	-0.922*	-0.374	0.078
$\psi_s$	0.480	<b>0.854*</b>	0.275	0.211	-0.532	0.685	0.004	0.098	0.458	<b>0.994*</b>	-0.291	-0.199	<b>0.923*</b>	-0.985*	-0.365	-0.592
$\psi_p$	0.538	-0.659	-0.724	-0.606	0.467	-0.425	-0.434	0.410	-	-0.167	-0.575	-0.920	-0.547	0.177	0.005	-0.848
$\psi_{os}$	<b>0.867*</b>	0.376	0.375	0.109	-0.328	0.472	0.250	0.292	-0.172	<b>0.803*</b>	-0.049	-0.211	0.484	<b>-0.801*</b>	-0.140	-0.415
$\psi_{h\text{ raíz}}$	0.472	<b>0.712*</b>	<b>0.983*</b>	<b>0.762*</b>	-0.99*	<b>-0.979*</b>	0.498	-0.282	0.115	0.597	0.389	<b>0.752*</b>	0.612	<b>-0.646</b>	-0.259	0.393
EBL	Pro				GB				AT				AR			
	7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación	
	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R
$\psi_h$	0.261	0.449	<b>0.976*</b>	<b>0.950*</b>	-0.366	0.719*	0.362	0.205	0.279	0.959*	-0.978	-0.546	<b>0.854*</b>	-0.512	-0.838*	-0.837*
$\psi_s$	0.440	0.599	<b>0.779*</b>	<b>0.749*</b>	-0.329	0.835*	0.562	0.074	0.424	0.984*	-0.609	-0.427	<b>0.937*</b>	-0.664	-0.977*	-0.943*
$\psi_p$	0.212	-0.017	-0.454	-0.452	0.399	-0.326	0.157	-0.209	0.117	-0.749*	0.664	0.270	-0.519	0.062	0.018	0.059
$\psi_{os}$	<b>0.933*</b>	<b>0.833*</b>	<b>0.800*</b>	<b>0.755*</b>	0.157	<b>0.899*</b>	0.664	0.234	0.661	0.732*	-0.701	-0.574	<b>0.883*</b>	<b>-0.939*</b>	<b>-0.967*</b>	<b>-0.987*</b>
$\psi_{h\text{ raíz}}$	0.384	0.671*	<b>0.856*</b>	<b>0.837*</b>	-0.645	<b>0.825*</b>	0.175	0.244	0.586	0.851*	-0.959	-0.496	0.856*	<b>-0.649</b>	-0.562	-0.584

( $\psi_h$ ) potencial hídrico foliar, ( $\psi_s$ ) potencial osmótico, ( $\psi_p$ ) potencial de presión, ( $\psi_{os}$ ) potencial osmótico saturado, ( $\psi_{h\text{ raíz}}$ ) potencial hídrico de raíz

Después de 14 días de recuperación, las plantas sometidas a estrés salino todavía mostraban un alto contenido de sodio en sus órganos, aproximadamente la tercera parte de la concentración que se obtuvo al finalizar el tratamiento salino (Tabla VII). Esto pudiera justificar, en parte, los efectos negativos mostrados durante la recuperación, tanto en el crecimiento como en las relaciones hídricas y la conductancia estomática.

Resultados similares se han informado por otros autores en plantas de arroz del cultivar INCA LP-7, que mostraron aumentos en los niveles de sodio y disminución del potasio en hojas y raíces después de siete días de recuperación del estrés salino (Morales *et al.*, 2008).

Por otra parte, el estrés salino disminuyó significativamente las concentraciones de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  en hojas y raíces a los siete días de estrés y al final de la recuperación (Tabla VIII).

La aspersión foliar con BB-16 y EBL aumentó la concentración de calcio y magnesio en las plantas que estuvieron sometidas a estrés. A los 14 días de recuperación, solamente la aspersión foliar con BB-16 incrementó significativamente estos dos cationes respecto al control con sal (Tabla VIII).

Resultados similares se han encontrado en plantas de fresa sometidas a  $NaCl$  ( $35\text{ mmolL}^{-1}$ ), donde la aspersión foliar con EBL disminuyó los niveles de sodio y aumentó la concentración de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Fe^{2+}$  (Karlidag *et al.*, 2011). Por otra parte, en trigo la aspersión foliar con EBL incrementó la concentración de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y redujo las concentraciones de  $Na^+$  en vástagos y granos de dos cultivares sometidos a estrés salino (Talaat y Shawky, 2013).

La concentración de  $Na^+$  significativamente superior y la concentración de  $K^+$  significativamente inferior, encontradas en hojas y raíces de las plantas tratadas con  $NaCl$ , demostró el desbalance nutricional provocado por la salinidad en estas plantas.

Las altas concentraciones de  $Na^+$  reducen la absorción de  $K^+$  ya que este es un proceso competitivo. Aunque los transportadores de las plantas tienen una selectividad alta por el  $K^+$  con respecto al  $Na^+$  estos pueden ser bloqueados por este último ion ante estrés salino. Por ejemplo, a altas concentraciones de sodio, la absorción de potasio a través del transportador de alta afinidad  $K^+-Na^+$ , HKT 1, es inhibida y el transportador funciona como un sistema de absorción de sodio (Negrao *et al.*, 2017).

**Tabla VII.** Efecto de la aspersión foliar con BB-16 (0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) o EBL (2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) en el contenido de los cationes  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , y la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de hojas (H) y raíces (R) de plantas de arroz del cultivar J-104 después de ser sometidas a  $\text{NaCl}$  100  $\text{mmol L}^{-1}$  durante siete días.

	7 DÍAS DE ESTRÉS						14 DÍAS DE RECUPERACIÓN					
	$\text{Na}^+$ ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)		$\text{K}^+$ ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)		$\text{Na}^+/\text{K}^+$		$\text{Na}^+$ ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)		$\text{K}^+$ ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)		$\text{Na}^+/\text{K}^+$	
	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R
SN	2,68 c	2,40 c	36,43 ab	42,69 b	0,077 c	0,057 c	2,75 e	2,83 c	26,27 b	37,13 a	0,105 d	0,076 d
SN+BB-16	2,81 c	2,23 c	34,91 b	47,64 a	0,081 c	0,047 c	2,85 e	2,23 c	24,96 c	36,17 a	0,114 d	0,062 d
SN+EBL	2,00 c	2,85 c	39,38 a	41,00 bc	0,051 c	0,070 c	1,98 d	2,42 c	28,17 a	36,79 a	0,070 e	0,066 d
SN+NaCl	36,68 a	43,69 a	25,86 d	29,36 e	1,481 a	1,499 a	12,80 a	15,97 a	22,28 d	27,03 c	0,574 a	0,591 a
SN+BB-16+NaCl	<b>25,64 b</b>	<b>29,91 b</b>	<b>29,95 c</b>	<b>38,11 c</b>	<b>0,856 b</b>	<b>0,785 b</b>	<b>9,38 c</b>	<b>13,48 b</b>	<b>23,86 c</b>	<b>30,43 b</b>	<b>0,393 c</b>	<b>0,443 c</b>
SN+EBL+NaCl	<b>26,69 b</b>	<b>31,11 b</b>	<b>32,78 bc</b>	<b>33,87 d</b>	<b>0,814 b</b>	<b>0,918 b</b>	<b>10,76 b</b>	<b>14,24 b</b>	<b>24,17 c</b>	28,57 bc	<b>0,445 b</b>	<b>0,499 b</b>
<i>Es<sub>x</sub></i>	1,17***	0,623***	1,01***	0,923***	0,097***	0,051***	0,22***	0,345***	0,42***	1,02***	0,00732*	0,00976*

Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=9$

**Tabla VIII.** Efecto de la aspersión foliar con BB-16 (0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) o EBL (2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) en el contenido de los cationes  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  de hojas (H) y raíces (R) de plantas de arroz del cv. J-104 después de ser sometidas a  $\text{NaCl}$  100  $\text{mmol L}^{-1}$  durante siete días.

	7 DÍAS DE ESTRÉS				14 DÍAS DE RECUPERACIÓN			
	$\text{Mg}^{2+}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)		$\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)		$\text{Mg}^{2+}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)		$\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)	
	H	R	H	R	H	R	H	R
SN	3,466 b	4,677 d	7,875 b	22,906 a	3,734 c	4,738 c	7,896 b	20,672 a
SN+BB-16	3,923 a	5,561 b	8,214 a	22,631 a	4,412 b	5,237 a	8,371 a	20,897 a
SN+EBL	3,229 bc	6,053 a	8,455 a	22,852 a	2,644 d	4,817 c	7,314 bc	19,483 ab
SN+NaCl	2,118 d	2,697 f	5,8475 e	15,495 c	2,535 e	3,90 d	6,893 cd	15,295 c
SN+BB-16+NaCl	<b>3,251 bc</b>	<b>5,168 c</b>	<b>7,140 c</b>	<b>18,237 b</b>	<b>4,715 a</b>	<b>4,986 b</b>	<b>8,001 a</b>	<b>18,657 b</b>
SN+EBL+NaCl	<b>3,096 c</b>	<b>4,114 e</b>	<b>6,734 d</b>	12,975 d	2,147 f	3,973 d	6,632 d	14,005 c
<i>Es<sub>x</sub></i>	0,082***	0,067***	0,109***	0,376***	0,0323***	0,028***	0,175***	0,523***

Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí según prueba de Rangos Múltiples de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $n=9$

La relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  se ha correlacionado con la capacidad de las plantas de tolerar la salinidad, puesto que se ha observado que esta relación es más baja en los cultivares tolerantes que en los sensibles (Gupta y Huang, 2014). Por tanto, la reducción de esta relación observada en las plantas asperjadas con BR pudiera inducir tolerancia al estrés en las mismas.

Por otro lado, el calcio es esencial para el mantenimiento de la integridad de la membrana celular y la síntesis de nueva pared en las células en división. La membrana celular de arroz se ha visto dañada y se ha incrementado su permeabilidad debido al desplazamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  por el  $\text{Na}^+$  en el sitio de unión con los fosfolípidos de la membrana (Reddy *et al.*, 2017). También el calcio es necesario para la señalización celular actuando como segundo mensajero en numerosos procesos tanto en condiciones naturales como en condiciones de salinidad (Hussain *et al.*, 2017).

El magnesio es parte integral de la molécula de clorofila, además cumple un papel muy importante en los cloroplastos con la activación de enzimas como la RuBisCO, la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la glutamato sintasa. También, activa la ARN polimerasa y participa en la biosíntesis de proteínas y en la unión y estabilización de los ribosomas. Altas concentraciones de sodio pueden dificultar la absorción de  $\text{Mg}^{2+}$  (Hussain *et al.*, 2017) y un aumento este catión en las plantas sometidas a estrés y asperjadas con BR pudiera redundar en el mantenimiento de numerosos procesos celulares.

La respuesta positiva encontrada en este trabajo, con la aplicación de ambos BR, pudiera ser debido al papel que juegan estos compuestos en el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática y en la regulación de la absorción de nutrientes. Los brasinoesteroides, según Sharma *et al.* (2017), pueden regular la expresión y la actividad de diferentes transportadores de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y de las bombas de  $\text{H}^+$  que generan el gradiente para el transporte. Algunos de los canales regulados por brasinoesteroides son: Chloride channel (CLC), OsAKT, OsHKT, OsNHX y Non-Selective Cation Channel (NCC) (Tanveer *et al.*, 2018).

En la tabla IX se muestran los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables del estado hídrico de las plantas y los cationes inorgánicos determinados en las hojas y las raíces.

En este caso el sodio correlacionó positivamente con los potenciales hídrico y osmótico en las hojas en ambos momentos de evaluación, tanto para el BB-16 como para la EBL. Este comportamiento sugiere que este catión es el responsable de que estos potenciales sean más negativos en la célula.

**Tabla IX.** Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables de las relaciones hídricas y el contenido de los cationes Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> y la relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en hojas (H) y raíces (R) de plantas de arroz del cultivar J-104 sometidas a NaCl 100 mmol L<sup>-1</sup> durante siete días.

BB-16	Na <sup>+</sup>				K <sup>+</sup>				Mg <sup>2+</sup>				Ca <sup>2+</sup>				Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>			
	7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación	
	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R
Ψ <sub>h</sub>	0.94*	0.95*	0.99*	0.97*	-0.91*	-0.98*	-0.90*	-0.98*	-0.99*	-0.91*	-0.61	-0.82*	-0.99*	-0.95*	-0.87*	-0.98*	0.97*	0.98*	0.98*	0.98*
Ψ <sub>s</sub>	0.98*	0.98*	0.77*	0.84*	-0.94*	-0.97*	-0.84*	-0.77*	-0.91*	-0.76*	0.15	-0.14	-0.96*	-0.97*	-0.24	-0.56	0.97*	0.96*	0.75*	0.79*
Ψ <sub>p</sub>	-0.26	-0.26	-0.24	-0.12	0.25	0.38	0.04	0.22	0.52	0.70	0.95*	0.83	0.45	0.31	0.76*	0.48	-0.34	-0.40	-0.24	-0.19
Ψ <sub>os</sub>	0.75*	0.74*	0.76*	0.85*	-0.75*	-0.61	-0.76*	-0.75*	-0.46	-0.19	0.10	-0.22	-0.57	-0.71*	-0.31	-0.56	0.69	0.63	0.75*	0.80*
Ψ <sub>h raíz</sub>	0.69	0.69	0.88*	0.83*	-0.77*	-0.49	-0.73*	-0.87*	-0.49	-0.37	-0.84*	-0.96*	-0.60	-0.71*	-0.98*	-0.96*	0.70*	0.70*	0.89*	0.87*
EBL	Na <sup>+</sup>				K <sup>+</sup>				Mg <sup>2+</sup>				Ca <sup>2+</sup>				Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>			
	7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación		7 días de estrés		14 días de recuperación	
	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R
Ψ <sub>h</sub>	0.89*	0.90*	0.98*	0.97*	-0.89*	-0.94*	-0.99*	-0.96*	-0.98*	-0.78*	-0.49	-0.97	-0.86*	-0.66	-0.70*	-0.85*	0.94*	0.93*	0.98*	0.97*
Ψ <sub>s</sub>	0.94*	0.95*	0.82*	0.85*	-0.88*	-0.98*	-0.63	-0.86*	-0.94*	-0.77*	-0.88*	-0.86*	-0.89*	-0.78*	-0.96*	-0.97*	0.96*	0.96*	0.79*	0.84*
Ψ <sub>p</sub>	-0.64	-0.65	-0.41	-0.35	0.76*	0.70*	0.65	0.34	0.94*	0.66	-0.37	0.35	0.65	0.25	-0.163	0.05	-0.75*	-0.71*	-0.45	-0.38
Ψ <sub>os</sub>	0.82*	0.81*	0.85*	0.88*	-0.62	-0.77*	-0.70*	-0.87*	-0.43	-0.62	-0.79*	-0.89*	-0.76*	-0.98*	-0.91*	-0.97*	0.71*	0.76*	0.82*	0.86*
Ψ <sub>h raíz</sub>	0.77*	0.79*	0.84*	0.80*	-0.66	-0.85*	-0.96*	-0.80*	-0.86*	-0.49	-0.14	-0.81*	-0.66	-0.63	-0.38	-0.59	0.79*	0.80*	0.86*	0.82*

(Ψ<sub>h</sub>) potencial hídrico foliar, (Ψ<sub>s</sub>) potencial osmótico, (Ψ<sub>p</sub>) potencial de presión, (Ψ<sub>os</sub>) potencial osmótico saturado, (Ψ<sub>h raíz</sub>) potencial hídrico de raíz