

## LA EVALUACIÓN DE BIOFORGE SOBRE PLÁNTULAS SOMETIDAS A ESTRÉS POR ELEVADA TEMPERATURA

Los cultivos se enfrentan a una multitud de situaciones adversas a lo largo de su ciclo de crecimiento, siendo el estrés abiótico en general, y el estrés por calor en particular, un factor determinante de las pérdidas anuales de producción en todo el mundo. Se estima que para el año 2050, la población mundial crecerá hasta alcanzar los 9.700 millones de personas. Con el aumento de la población, la seguridad alimentaria se convierte en una preocupación importante, especialmente en los países cuyo crecimiento poblacional excede su producción agrícola. Por lo tanto, cualquier efecto adverso en la producción de cultivos puede afectar directamente la seguridad alimentaria, teniendo consecuencias negativas para la población de esas áreas.

Para este fin, es de gran interés desarrollar productos que puedan hacer frente, a nivel fisiológico, a las condiciones de estrés en los cultivos, con el fin de reducir los efectos negativos producidos sobre el desarrollo del cultivo y en los rendimientos, manteniendo al mínimo las pérdidas de producción. Stoller, líder mundial en la producción de productos altamente tecnológicos basados en la Fisiología Vegetal, desarrolló un producto único contra el estrés, llamado **BIOFORGE**. En este ensayo se evalúa los efectos de la aplicación exógena de **BIOFORGE**, que contiene la tecnología Stoller patentada, para mejorar el crecimiento de plántulas de tomate cultivadas en un sistema hidropónico y sometidas a altas temperaturas (40 ° C).

Se realizaron 3 tratamientos basados en la aplicación de **BIOFORGE** utilizando diferentes dosis (0,5 mL/L, 1 mL/L y 2 mL/L, así como 2 controles, (control normal y control de estrés térmico). Durante el ensayo, se realizaron varias evaluaciones principalmente basado en el comportamiento fisiológico de la planta.

Los tratamientos se distribuyeron de la siguiente manera:

Nº	TRATAMIENTO	CONDICIÓN	DOSIS EQUIVALENTE (Litros/Ha)	MODO DE APLICACIÓN	MOMENTO DE APLICACIÓN
C	CONTROL	NORMAL	-	-	-
CT	CONTROL	ESTRÉS	-	-	-
B1	BIOFORGE 1	ESTRÉS	0,5 L/Ha	RADICULAR	Cada 7 días desde el trasplante, aplicado directamente en la disolución nutritiva.
B2	BIOFORGE 2	ESTRÉS	1,0 L/Ha	RADICULAR	
B3	BIOFORGE 3	ESTRÉS	2,0 L/Ha	RADICULAR	

### CONDICIONES DE DESARROLLO:

Para llevar a cabo el ensayo, se germinan las semillas de tomate en sustrato de arena de sílice regándose con una disolución nutritiva con macro y micronutrientes. Una semana tras la germinación se procede a trasplantar las plántulas en recipientes de plástico con volumen de 200 mL, donde las plántulas se desarrollarán individualmente en la misma cámara de cultivo. Es en este momento cuando se realiza la primera aplicación con **BIOFORGE**, pudiendo ayudar al crecimiento radicular inicial de las plántulas tratadas (B1, B2 y B3). Una semana tras el trasplante, se procede a aplicar el estrés térmico a las plántulas mediante el cambio a distintas cámaras de cultivo.



Image 1: plántulas en cámara de crecimiento.



Image 2: plántulas de tomate trasplantadas a recipientes hidropónicos.

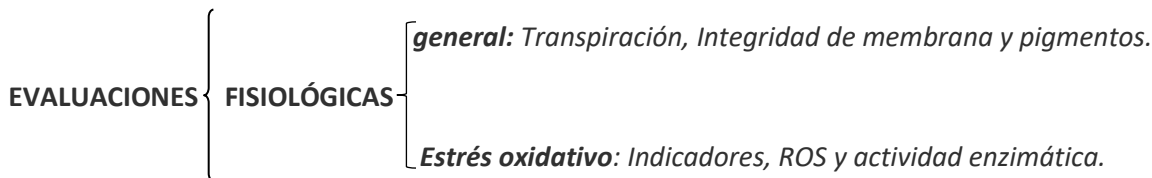
Las cámaras de cultivos contaban con las mismas condiciones de luz y de humedad, manteniéndose el valor de humedad en 70%. Mientras que la luz se ajustaba según el momento del día simulado. La temperatura en condiciones normales oscilaba entre los 18°C en la noche y 25°C durante el mediodía. En el caso de la cámara en condiciones de estrés, la temperatura nocturna era de 18°C mientras que alcanzaba la **temperatura máxima durante el mediodía** llegando a ser de 42°C. La temperatura máxima se mantenía durante **3 horas diarias** durante el transcurso del ensayo.

### EVALUACIONES:

Después de someter las diferentes tesis al estrés durante 20 días, se llevaron a cabo las diferentes evaluaciones.

Las evaluaciones se basaron en evaluaciones fisiológicas, con diferentes sub evaluaciones que se llevaron a cabo en esta categoría.

En resumen, tenemos:

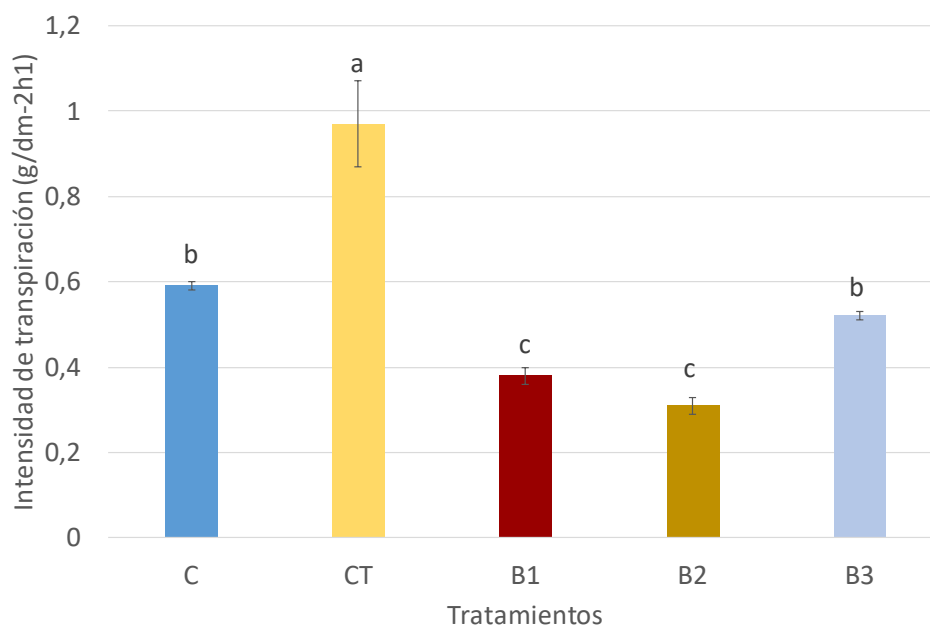


### EVALUACIONES FISIOLÓGICAS:

Estas evaluaciones son esenciales para tener una idea sobre el comportamiento fisiológico de la planta. El estrés afecta las barreras físicas de la planta en primer lugar, seguidamente afectará a las células y su equilibrio fisiológico, alterando diferentes reacciones químicas que afectarían negativamente el desarrollo de la planta. El epítome del estrés fisiológico de la planta es el estrés oxidativo que finalmente conduce a la muerte celular. El estrés oxidativo se produce cuando las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen en grandes cantidades debido a la incapacidad de las células para eliminarlas, causando daños irreversibles a los diferentes orgánulos que terminan en apoptosis celular. Cuando se generan en grandes cantidades, el estrés oxidativo inhibe los procesos fisiológicos vitales a tener lugar, lo que afecta negativamente el desarrollo de la planta.

Aquí, se miden varios factores que afectan el comportamiento fisiológico general de la planta, incluyendo la transpiración, la integridad de la membrana y el contenido de clorofila. Más allá de esto, el estrés oxidativo se mide mediante el análisis de los indicadores de estrés, las moléculas de ROS y, finalmente, la actividad enzimática antioxidante.

En resumen tenemos:



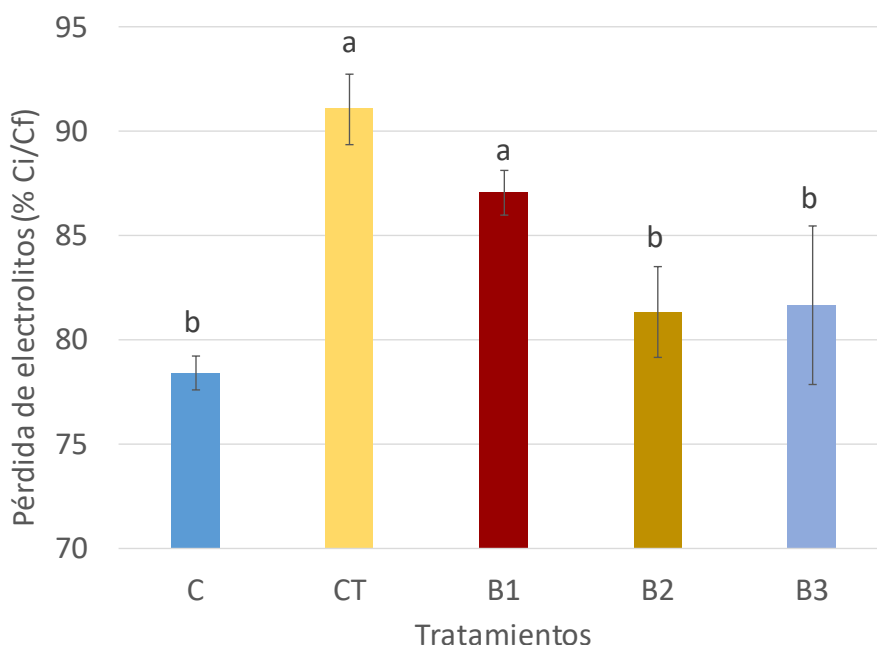
**Gráfica 1:** Intensidad de transpiración de las diferentes tesis.

Según los resultados mostrados en la gráfica 1, **en todas las tesis tratadas con BIOFORGE (B1, B2 y B3) se obtienen diferencias estadísticamente significativas frente al Control en estrés (CT)**. En el caso de B3, se tienen resultados similares a condiciones normales (C), mientras que en B1 y B2, existe una disminución de la intensidad de transpiración en comparación con el Control normal (C), siendo las diferencias estadísticamente significativas. Por tanto, la adición del producto **BIOFORGE** produce una disminución significativa de los valores de transpiración en comparación con el Control térmico (CT).

En condiciones normales, existe un nivel regulado de transpiración en la planta, tal como se observa en la tesis Control normal. En situaciones de estrés por temperatura elevada, la planta opta por aumentar la pérdida de agua como mecanismo de enfriamiento y así evitar los daños por ese tipo de estrés. **Las plántulas tratadas con BIOFORGE** tuvieron una menor tasa de transpiración probablemente debido a que **no sufrieron las consecuencias del estrés por la elevada temperatura** y por tanto **desarrollaron un comportamiento similar a las plántulas Control (C) desarrolladas en óptimas condiciones**.

### PÉRDIDA DE ELECOTROLITOS

La PÉRDIDA de electrolitoS es una medida de la integridad de la membrana, una membrana más dañada presenta una mayor PÉRDIDA y, por lo tanto, más daño a la célula. El análisis realizado muestra lo siguiente:

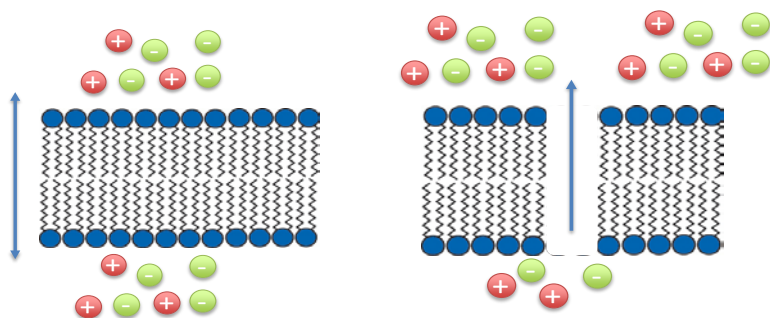


**Gráfica 2:** pérdida de electrolitos en las diferentes tesis.

Los resultados de la gráfica 2 muestran que existe **una menor pérdida de electrolitos en las membranas de las tesis B2 y B3**, consiguiendo **diferencias significativas frente al Control en estrés (CT)** a la vez que obtienen valores similares al del Control en condiciones normales (C).

El tratamiento B1, consigue valores inferiores al Control en estrés, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Por tanto, a la vista de los resultados, se tiene una clara disminución de la pérdida de electrolitos en las tesis tratadas con **BIOFORGE**, con los efectos más notables en las tesis con dosis más elevadas del producto (B2 y B3).

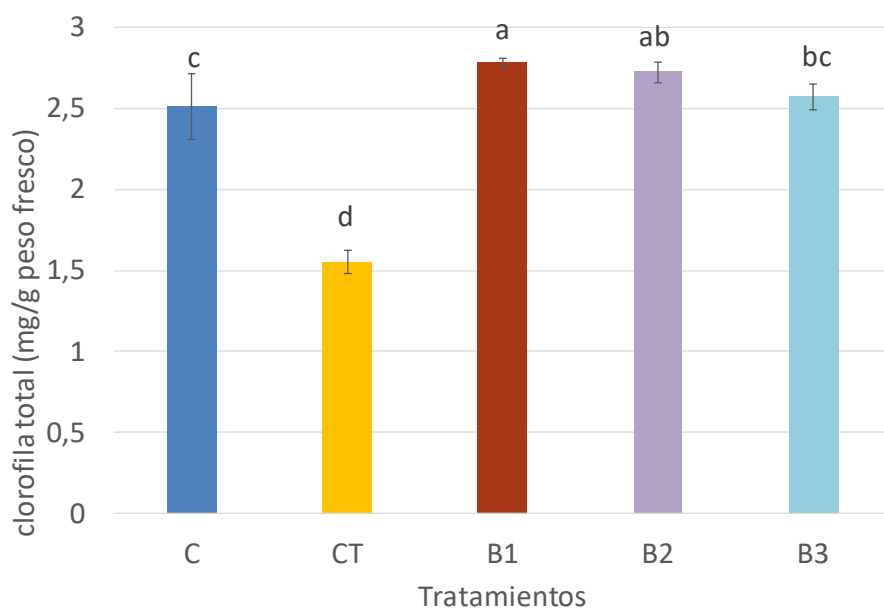
En condiciones normales, existe un buen intercambio de iones entre las células y su entorno, mientras en casos de estrés ese intercambio puede verse afectado debido a distintos daños en la membrana. La membrana en situaciones de estrés puede ver afectada su fluidez, dando lugar a una mayor pérdida de iones desde su interior tal como se observa en el siguiente diagrama.



**Diagrama 1:** Intercambio de iones en membrana en buen estado (Izquierda) y en membrana dañada (Derecha)

### PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

En este caso, se analizó el contenido de clorofila en las hojas frescas para determinar la capacidad fotosintética de la planta. Para ello se emplea un estudio espectrofotométrico de una disolución con extracto de clorofila, con los resultados expuestos en la siguiente gráfica:



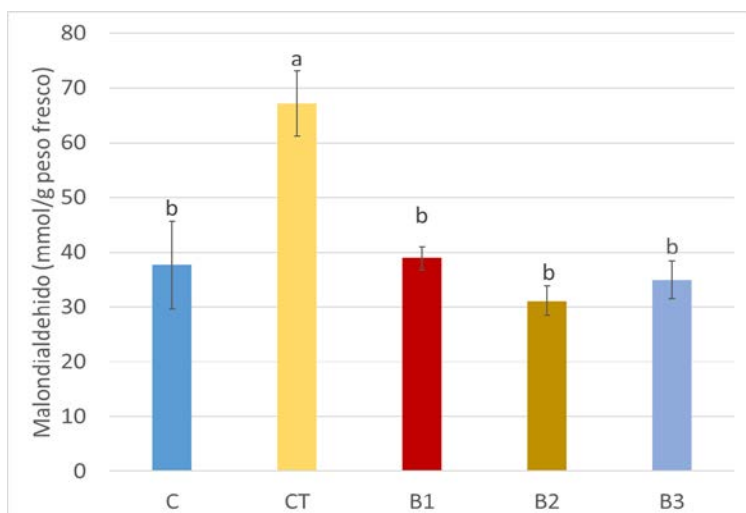
**Imagen 3:** Extracto de clorofila de todas las tesis.

**Gráfica 3:** contenido de clorofila en las diferentes tesis.

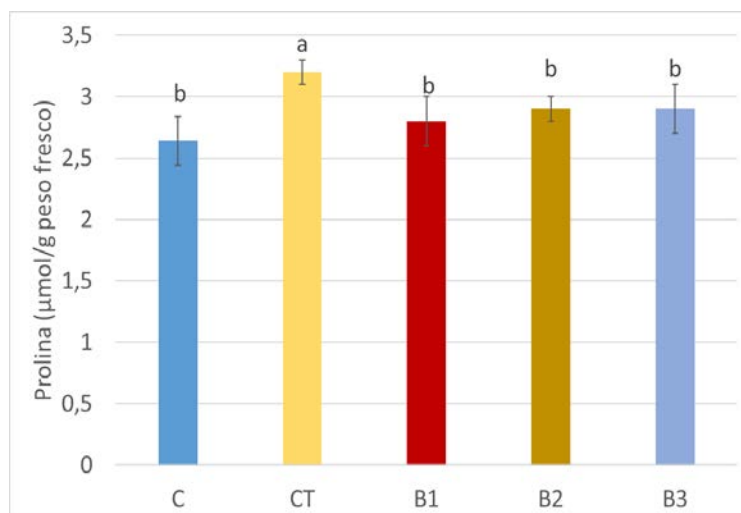
A la vista de los datos de la gráfica 3, se consigue un aumento considerable de clorofila en las tesis tratadas con **BIOFORGE**, obteniendo diferencias estadísticamente significativas en comparación con el Control en estrés (CT). La tesis B1 consigue superar los valores del Control normal con diferencias estadísticamente significativas. Los resultados obtenidos, confirman el efecto que tiene **BIOFORGE** en la estimulación de la fotosíntesis gracias a su influencia en la expresión de genes responsables de la fotosíntesis, aumentando así la acumulación de los pigmentos fotosintéticos, concretamente la clorofila.

### INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

n situaciones de estrés oxidativo, se produce la acumulación de unos compuestos capaces de aliviar los daños producidos. Los osmolitos como son conocidos pueden ser desde azúcares hasta aminoácidos. En este estudio, se analizaron las concentraciones del dialdehído conocido como Malondialdehído (MDA), el cual es un subproducto indicador de daños de la membrana. La prolina es el siguiente indicador analizado ya que es un aminoácido que se acumula en situaciones de estrés oxidativo debido a su efecto protector frente al daño producido por este tipo de estrés.



Gráfica 4: contenido de MDA en las diferentes tesis.



Gráfica 5: contenido de prolina en las diferentes tesis.

Los resultados obtenidos en este estudio están en línea con lo observado en cuanto a la integridad de la membrana. Como se conoce, el MDA es indicador del daño de la membrana. En ambos casos, todas las tesis tratadas con **BIOFORGE**, presentan una membrana en buen estado, un hecho reforzado por la concentración de MDA presente en las tesis estudiadas. En el Control en estrés existe una mayor acumulación de MDA y por tanto un mayor daño de la membrana, tal como se observa en la gráfica 2.

Al igual que en el caso del MDA, la cantidad de prolina acumulada es estadísticamente inferior en las tesis tratadas con **BIOFORGE** frente al Control en estrés e igualando los resultados del Control normal (Gráfica 5). Este hecho refuerza de nuevo el hecho de que las plántulas tratadas con el producto no se encuentran en situación de estrés oxidativo. La prolina es una molécula que se acumula para aliviar el daño producido por las moléculas ROS, por tanto, una menor acumulación de este osmolito es indicador de una menor presencia del estrés oxidativo.

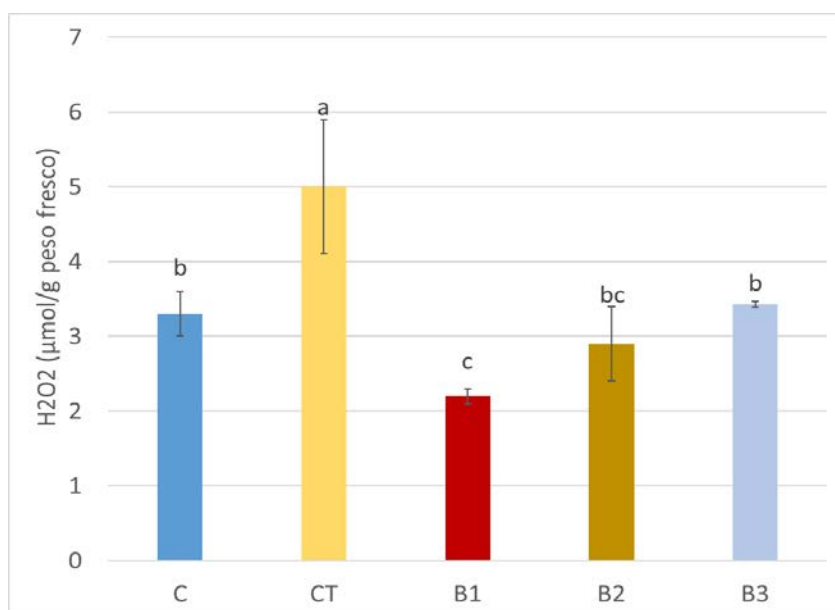
Para comprobar la menor incidencia del estrés oxidativo en las plántulas tratadas, se estudia una molécula de ROS como es el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y la actividad de enzimas responsables de la degradación del ROS (Catalasa y Ascorbato Peroxidasa).

### PERÓXIDO DE HIDROGENO ( $H_2O_2$ ):

El peróxido de hidrogeno se considera como una especie reactiva de oxígeno (ROS), por lo que en altas concentraciones forma parte del fenómeno conocido como el estrés oxidativo, por tanto, resulta ser tóxica para las células cuando se encuentra en exceso.

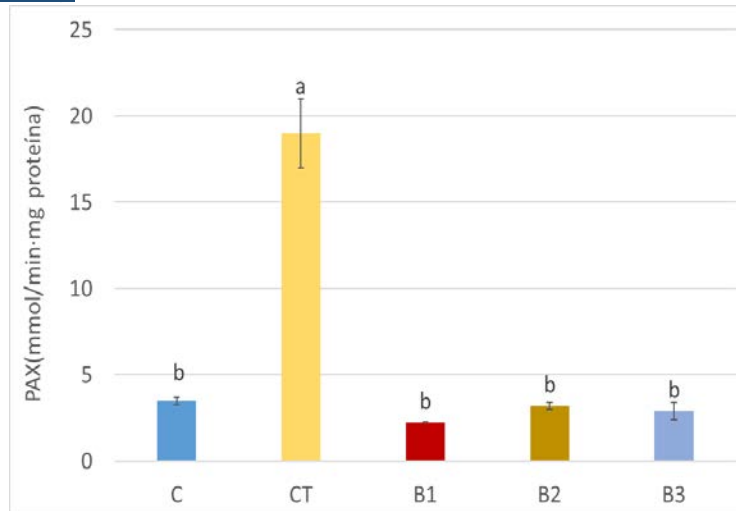
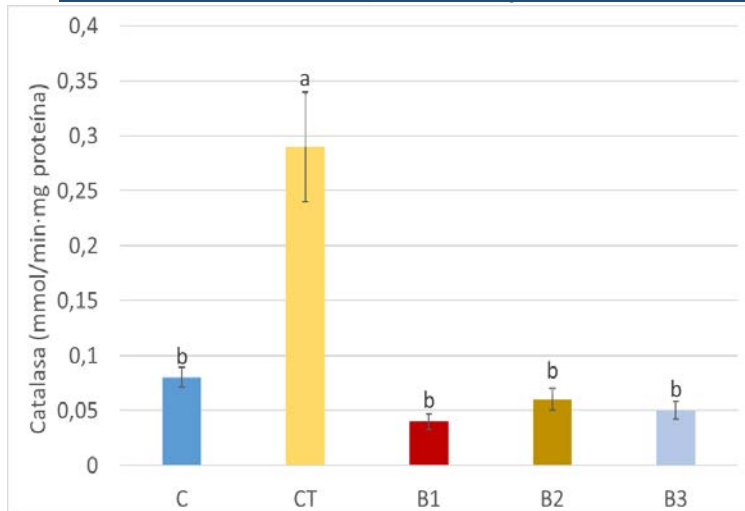
Tal como se puede observar en la gráfica 6, existe una disminución importante de la presencia del peróxido de hidrogeno en las tesis tratadas con **BIOFORGE**, todas presentando diferencias estadísticamente significativas frente al Control térmico, el cual presenta la mayor concentración de la molécula ROS. **Las tesis B2 y B3 consiguen valores similares al Control normal**, sin diferencias significativas entre ellas. **La tesis B1 por su parte, consigue la menor concentración de la molécula**, con **diferencias estadísticamente significativas comparado con el Control normal**.

Por todo ello, se puede verificar que efectivamente existe una menor presencia de las moléculas ROS en las tesis tratadas con **BIOFORGE** y por tanto estas tesis están en ausencia del estrés oxidativo. **BIOFORGE**, ha sido capaz de inhibir la síntesis de la hormonal del estrés, el etileno, de manera que se reduce la síntesis de las moléculas ROS, evitando, por tanto, los daños del estrés.



Gráfica 6: Concentración de  $H_2O_2$  en las diferentes tesis.

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (CATALASA y ASCORBATO PEROXIDASA):

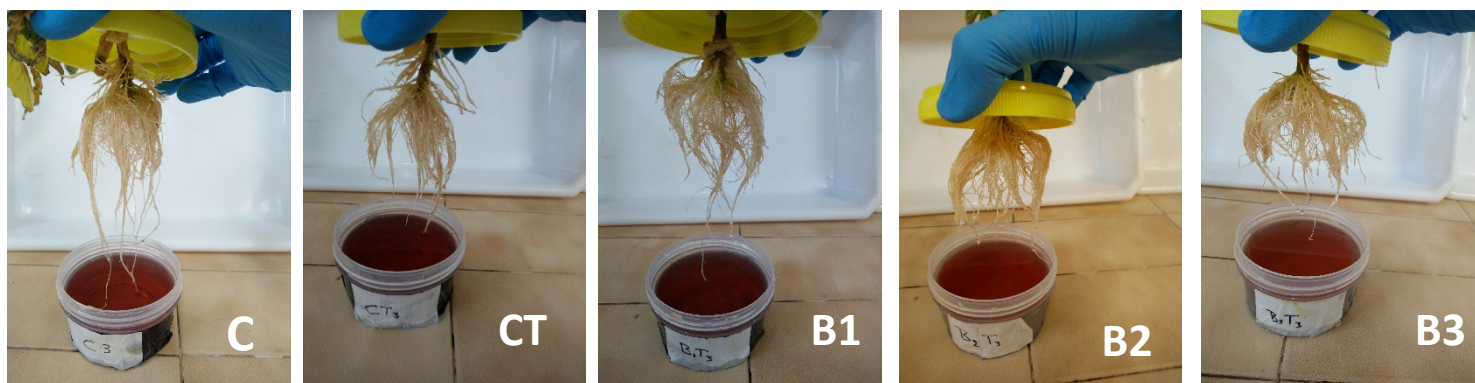


Gráficas 7 y 8: Actividad enzimática de las muestras de las diferentes tesis.

Las plántulas del Control en estrés presentan una elevada actividad de las enzimas antioxidantes con diferencias estadísticamente significativas frente al resto de las tesis. Este hecho se debe a que las plántulas se encuentran en estrés oxidativo (Gráficas 4, 5 y 6) y para ello, requieren de una alta actividad de estas enzimas para evitar el daño que se puede producir. La tecnología presente en **BIOFORGE**, evita que las plántulas lleguen a esta situación ya que, en todos los parámetros de estrés oxidativo analizados, las plántulas de las tesis tratadas presentan resultados indicativos de la ausencia de este tipo de estrés.

### DESARROLLO RADICULAR

Se realizó una evaluación visual del crecimiento de la raíz, observándose incrementos significativos en la masa de raíces en las plantas tratadas con **BIOFORGE** en comparación con el Control en estrés.



Imágenes 4 - 8: Desarrollo radicular de las diferentes tesis.

En conclusión, todos los resultados de este ensayo verifican el efecto positivo de **BIOFORGE** sobre la fisiología global de las plántulas, inhibiendo la síntesis del etileno, reduciendo así la presencia del estrés en las plántulas, devolviéndolas a un estado equilibrio fisiológico a pesar de estar en un entorno inadecuado, todo ello gracias a la tecnología única y patentada de **BIOFORGE**.