

# Abordajes fisiológicos para el estudio del estrés abiótico en plantas

## Disertaciones y protocolos

Mariela I. Monteoliva  
Dolores A. Bustos  
Celina M. Luna

**INTA** Ediciones

*Colección*  
INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN

# Abordajes fisiológicos para el estudio del estrés abiótico en plantas

---

Disertaciones y protocolos

---

*Mariela Inés Monteoliva  
Dolores Bustos  
Luna Celina*



Secretaría  
de Agroindustria



Ministerio de Producción y Trabajo  
Presidencia de la Nación

*Ediciones INTA. Buenos Aires, 2019.*

581.19      Abordajes fisiológicos para el estudio del estrés abiótico en plantas :  
Ab76      disertaciones y protocolos / Mariela Inés Monteoliva, Dolores Bustos, Celina  
Luna. – Buenos Aires : Ediciones INTA, 2019.  
87 p. : il.

ISBN 978-987-521-986-1

i. Monteoliva, Mariela Inés. ii. Bustos, Dolores. iii. Luna, Celina

ESTRÉS ABIOTICO – PLANTAS – FISILOGIA VEGETAL – RESPUESTA FISIOLÓGICA

INTA - DD

**Proyectos en los que se enmarca la obra:**

PNAGUA-1133032 del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), y  
RC-2017-0227 del Fondo para la Investigación Científica y Tecnología (FONCYT)

**Contribuciones:**

Organizadoras del Taller, compiladoras de protocolos y del libro en general: Celina Luna, Dolores Bustos y Mariela Monteoliva.

Colaboradores en la compilación de protocolos y redacción de introducciones: Marianela Rodríguez y Leandro Ortega.

Disertantes (en orden de disertación): Celina Luna, Mariela Monteoliva, Marianela Rodríguez, Leandro Ortega, Carla Guzzo, Dolores Bustos, Edmundo Plostchuk (con la colaboración de Fernando Luna), Karina Grunberg, Claudia Vega y Nacira Muñoz.

**Diseño:**

Área de Comunicación Visual

Gerencia de Comunicación e Imagen Institucional

*Este libro*

*cuenta con licencia:*



# Contenidos

Prólogo .....	8
---------------	---

## Parte I

<b>Introducción .....</b>	<b>11</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>12</b>
<b>Contenidos mínimos .....</b>	<b>12</b>
<b>Modalidad .....</b>	<b>12</b>
<b>Disertantes .....</b>	<b>13</b>
Celina Luna	13
Dolores Bustos	13
Mariela Monteoliva	13
Marianela Rodríguez	13
Leandro Ortega	13
Carla Guzzo	13
Edmundo Ploschuk	14
Karina Grunberg	14
Claudia Vega	14
Nacira Muñoz	14
<b>Resúmenes .....</b>	<b>15</b>
Aportes de la fisiología vegetal al desarrollo de herramientas para la mitigación del estrés	17
El estrés oxidativo y la respuesta antioxidante como herramientas fisiológicas para la identificación de genotipos tolerantes	19
Ajuste osmótico. Detección de metabolitos y su rol fisiológico en la tolerancia al estrés	20
Técnicas de microscopía y HPLC para la detección de alteraciones morfológicas y metabolitos en plantas bajo estrés	21
Regulación génica durante la tolerancia al estrés abiótico: herramientas para su estudio	22

Fotosíntesis y su utilización en estudios relacionados con la tolerancia al estrés abiótico	23
Aportes de la fisiología al mejoramiento vegetal en forrajeras	24
Exploración y utilización de variabilidad genética de relativos silvestres de plantas de cultivo utilizando herramientas genómicas	25
Conclusiones del Taller	26

## Parte II

<b>Introducción</b> .....	<b>29</b>
<b>1. Estado hídrico</b> .....	<b>30</b>
<b>Determinación de Contenido Relativo de Agua</b>	<b>30</b>
Procedimiento	31
<b>2. Estado rédox</b> .....	<b>32</b>
<b>Tinciones histoquímicas para la detección de especies activas del oxígeno</b>	<b>32</b>
Detección de peróxido de hidrógeno por tinción con diaminobencidina (DAB)	33
Detección de anión superóxido por tinción con azul de tetrazolio (NBT)	33
Reactivos	34
Detección de peróxido de hidrógeno por tinción con diclorofluoresceína (DCF-DA)	34
Reactivos	35
Bibliografía	38
<b>Determinación de FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)</b>	<b>38</b>
Procedimiento	39
Mezcla de reacción	39
Reactivos	39
Curva de calibración con TROLOX	40
Bibliografía	40
<b>Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos</b>	<b>41</b>
<b>Determinación de glutatión total y reducido</b>	<b>41</b>
Procedimiento	41
Reactivos	42
Curva de calibración	43
<b>Determinación de ascorbato total y reducido</b>	<b>44</b>
Procedimiento	44
Reactivos	45
Curva de calibración	46

<b>Determinación de actividades de enzimas antioxidantes</b>	<b>47</b>
Procedimiento	47
Reactivos	47
<b>Actividad superóxido dismutasa</b>	<b>48</b>
Procedimiento	48
Cálculos	49
Reactivos	50
Bibliografía	51
<b>Actividad catalasa</b>	<b>51</b>
Procedimiento	51
Cálculos	52
Reactivos	52
Bibliografía	53
<b>Determinación de actividades enzimáticas en gel</b>	<b>54</b>
Geles discontinuos no desnaturizantes	54
Procedimiento	54
Reactivos de uso directo	55
Preparación de soluciones stock	56
Bibliografía	57
<b>Actividad superóxido dismutasa en gel</b>	<b>58</b>
Procedimiento	58
Reactivos	59
Actividad ascorbato peroxidasa en gel	60
Procedimiento	60
Reactivos	61
Bibliografía	62
<b>Determinación del contenido de proteínas totales</b>	<b>62</b>
<b>Determinación de proteínas por el método de Bradford</b>	<b>63</b>
Procedimiento	63
Reactivos	64
Curva de calibración	64
Bibliografía	64
<b>3. Integridad de membranas .....</b>	<b>66</b>
<b>Determinación de lípidos peroxidados (malondialdehído)</b>	<b>66</b>
Procedimiento	67
Mezcla de reacción	67
Cálculos	67
Bibliografía	68
<b>Determinación de permeabilidad de membranas</b>	<b>69</b>
Procedimiento	69
Cálculos	69
Bibliografía	70

<b>4. Ajuste osmótico .....</b>	<b>71</b>
<b>Determinación de prolina</b>	<b>71</b>
Procedimiento	72
Reactivos	73
Curva de calibración	73
Bibliografía	74
<b>Determinación de azúcares solubles totales por antrona</b>	<b>74</b>
Procedimiento	75
Reactivos	75
Curva de calibración	76
Bibliografía	77
<b>Determinación de sacarosa, glucosa, fructuosa y trehalosa por HPLC</b>	<b>77</b>
Procedimiento	77
Condiciones de corrida	78
Bibliografía	78
<b>Determinación de iones solubles por HPLC</b>	<b>78</b>
Procedimiento	79
Condiciones de corrida	79
Para medir cationes	79
Para medir aniones	80
Bibliografía	80
<b>5. Pigmentos asociados a la fotosíntesis .....</b>	<b>81</b>
<b>Determinación de clorofilas y carotenoides</b>	<b>81</b>
Procedimiento	81
Cálculos	82
Bibliografía	83
<b>Anexos .....</b>	<b>84</b>
<b>Anexo I .....</b>	<b>85</b>
<b>Buffer fosfato de potasio 0,1 M</b>	<b>85</b>
Bibliografía	86
<b>Anexo II .....</b>	<b>86</b>
<b>Buffer HEPES 1M (pH 8,3)</b>	<b>86</b>
Bibliografía	86
<b>Anexo III .....</b>	<b>87</b>
<b>EDTA 500 mM</b>	<b>87</b>
<b>EGTA 500 mM</b>	<b>87</b>

## **Agradecimientos**

Las responsables de la organización del Taller y de la edición de este libro queremos agradecer a todos los que contribuyeron a que ambos proyectos sean finalizados. A los disertantes Edmundo Ploschuk, Karina Grunberg, Marianela Rodríguez, Nacira Muñoz, María Carla Guzzo, Leandro Ortega, Fernando Luna. A los directores del Centro de Investigaciones Agropecuarias, Sergio Lenardón y Alejandro Rago, y al director del Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales, Oscar Ruiz. Al coordinador del Programa Nacional Agua, Daniel Prieto. A las secretarías de Postgrado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de La Pampa, Lía Molas y Silvia Gatica, por su buena predisposición. A todos los asistentes al Taller.



# Prólogo

Este libro es producto de un Taller de formación dictado en el Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV, CIAP, INTA) en 2017. El taller estuvo dirigido a la difusión de las técnicas y metodologías disponibles actualmente para el abordaje de investigaciones fisiológicas y ecofisiológicas de la tolerancia al estrés abiótico.

Así el libro consta de dos partes, una primera parte enfocada en difundir las disertaciones del taller y a sus autores; y una segunda parte, en la cual recopilamos y sistematizamos las técnicas bioquímicas y fisiológicas más difundidas y utilizadas actualmente para que estén disponibles para todo aquel que las necesite.

Además, se espera fortalecer y continuar las interacciones y colaboraciones entre grupos de diversas instituciones de todo el territorio nacional que se lograron durante el taller, para potenciar la producción de conocimiento básico, aplicado y tecnológico, en lo que respecta a la fisiología y ecofisiología vegetal. También buscamos contribuir a la capacitación y perfeccionamiento de los profesionales que trabajan en estas áreas mejorando la calidad científica nacional.



# Parte I



## Introducción

Las proyecciones en el crecimiento poblacional indican que para el año 2050 la población en los países en desarrollo habrá crecido en un 50 %. Esto demandará un crecimiento equivalente en el suministro de alimentos que, para ser sustentable, deberá lograrse con reducido impacto ambiental. El logro de esta meta plantea desafíos estratégicos en el escenario esperado de cambio climático con incrementos tanto en la ocurrencia como en la intensidad de situaciones de estrés ambiental que conllevarán asimismo a la exacerbación de la incidencia de plagas y enfermedades. Ello llevará a agravar la brecha entre demanda y suministro de alimentos, habida cuenta de que las situaciones de estrés abiótico son la principal causa de pérdida de productividad en los cultivos, seguidas por las plagas y enfermedades.

En este escenario, cobran particular interés los estudios vinculados a los condicionantes del rendimiento de los cultivos asociados al estrés abiótico, tanto los que derivan de situaciones climáticas (estrés hídrico y térmico) como los asociados a las características del sustrato (salino y nutricional) y, además y muy importante, los que abordan diferentes tipos de estrés en forma combinada.

Para ello, resulta esencial la identificación de las características fisiológicas asociadas al mantenimiento del rendimiento bajo condiciones de estrés, el conocimiento de sus bases bioquímicas y moleculares, la implementación de herramientas para una adecuada caracterización fenotípica de los germoplasmas existentes y el desarrollo de tecnologías sustentables para su manejo en los sistemas agropecuarios. El taller dictado en el Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales estuvo dirigido a la difusión de las técnicas y metodologías disponibles actualmente para el abordaje de investigaciones fisiológicas y ecofisiológicas de la tolerancia al estrés abiótico. Simultáneamente, se pretendió propiciar y favorecer las interacciones y colaboraciones entre grupos de diversas instituciones de todo el territorio nacional, con diversidad de facilidades tecnológicas y recursos humanos capacitados. De este modo, el Taller buscó contribuir a potenciar la producción nacional de conocimiento básico, aplicado y tecnológico en lo que respecta a la fisiología y ecofisiología vegetal en relación con el estrés abiótico.

## Objetivos

- Difundir conocimientos y metodología disponibles actualmente para el abordaje de investigaciones fisiológicas y ecofisiológicas de la tolerancia al estrés abiótico en cultivos de interés.
- Propiciar y favorecer las interacciones y colaboraciones entre grupos de diversas instituciones (Universidad Nacional, INTA, CONICET, etc.), de todo el territorio nacional con diversas facilidades y recursos humanos capacitados.

## Contenidos mínimos

- La Fisiología Vegetal en el estudio de la tolerancia al estrés abiótico.
- Sistemas experimentales en condiciones controladas para la realización de estudios de Fisiología Vegetal.
- La fotosíntesis y su utilización en estudios relacionados con la tolerancia al estrés abiótico.
- El estrés oxidativo y mecanismos de remoción de especies activas del oxígeno y su utilización en estudios relacionados con la tolerancia al estrés abiótico en plantas. Determinación del poder antioxidante y el daño oxidativo.
- El ajuste osmótico. Metabolitos involucrados y su rol fisiológico en la tolerancia al estrés abiótico.
- La regulación génica de la tolerancia al estrés abiótico: Generalidades.
- Estrategias ecofisiológicas para el estudio del efecto del estrés hídrico en rendimiento de cultivos.
- Herramientas fisiológicas para el mejoramiento genético de especies forrajeras megatérmicas tolerantes al estrés abiótico.

## Modalidad

El taller constó de una parte teórica en donde se explicaron los fundamentos y utilidades de algunas de las técnicas principales utilizadas en el estudio de mecanismos fisiológicos relacionados con la tolerancia al estrés abiótico y casos particulares en los cuales se aplican esas técnicas; y una parte práctica desarrollada en los invernaderos y laboratorios del IFRGV donde se llevaron a cabo algunas de esas técnicas.



## Disertantes

### **Celina Luna**

Bióloga y Dra. en Ciencias Biológicas, UNC. Investigadora de INTA e Investigadora Independiente de CONICET, en el IFRGV, CIAP, INTA. Directora del grupo de Fisiología del Estrés Hídrico y Térmico. Coordinadora del Proyecto Específico PNAGUA 1133032 – Herramientas para la Mitigación de la Incidencia del Estrés Abiótico en Cultivos.

### **Dolores Bustos**

Bióloga y Dra. en Ciencias Biológicas, UNC. Investigadora de INTA, en el IFRGV, CIAP. Integrante del Grupo de Fisiología del Estrés Salino y Nutricional. Coordinadora de módulo Mecanismos fisiológicos subyacentes a las respuestas al estrés abiótico, en el marco del proyecto específico coordinado por la Dra. Celina Luna.

### **Mariela Monteoliva**

Bióloga y Dra. en Ciencias Químicas, UNC. Investigadora de INTA e Investigadora Asistente de CONICET en el IFRGV, CIAP, INTA. Profesora de Fisiología Vegetal en Ciencias Agropecuarias, UCC. Especialista en bioquímica y fisiología del estrés hídrico en plantas.

### **Marianela Rodríguez**

Bioquímica, UBA, y Dra. en Ciencias Biológicas, UNC. Investigadora Asistente de CONICET e Investigadora de INTA en el IFRGV, CIAP, INTA. Profesora titular de Fisiología Vegetal en Ciencias Agropecuarias, UCC. Especialista en metabolismo del carbono y cambios redox en interacciones bióticas en plantas.

### **Leandro Ortega**

Biólogo y Dr. en Ciencias Biológicas, UNC. Responsable del equipo de microscopía confocal espectral y HPLC que prestan servicio a todo el país en el CIAP, INTA. Disertante y organizador en cursos sobre la utilidad de la microscopía láser confocal y organizador en jornadas de divulgación científica para escuelas.

### **Carla Guzzo**

Bióloga, UNC y Dra. en Ciencias Biológicas, UNMdP. Investigadora de INTA, en el IFRGV, CIAP. Especialista en biología molecular y fisiología del estrés hídrico en leguminosas.

### **Edmundo Ploschuk**

Ingeniero agrónomo y Dr. en Ciencias Agropecuarias, UBA. Profesor Adjunto de Cultivos industriales en la Facultad de Agronomía, UBA. Director del Departamento de Producción Vegetal en la UBA. Especialista en ecofisiología de cultivos oleaginosos perennes.

### **Karina Grunberg**

Bióloga y Dra. en Ciencias Biológicas, UNC. Investigadora Adjunta de CONICET e Investigadora de INTA, en el IFRGV, CIAP. Directora del grupo de mejoramiento genético de forrajeras megatérmicas con mayor tolerancia al estrés abiótico, en especial salinidad y sequía y coordinadora del módulo II PNPA -PE1126072.

### **Claudia Vega**

Ingeniera agrónoma y Dra. en Ciencias Agropecuarias, UNC. Investigadora de INTA, en la Estación Experimental Agropecuaria Manfredi. Profesora de posgrado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UNC. Referente nacional y especialista en ecofisiología del estrés térmico en cultivos extensivos.

### **Nacira Muñoz**

Bióloga y Dra. en Ciencias Biológicas, UNC. Investigadora de INTA, en IFRGV, CIAP. Profesora de Fisiología Vegetal en Ciencias Biológicas, UNC. Especialista en metabolismo del carbono y nitrógeno en interacciones bióticas.



# Resúmenes







# Aportes de la fisiología vegetal al desarrollo de herramientas para la mitigación del estrés

*Celina Luna*

El estrés ambiental promueve cambios que disminuyen el rendimiento en los cultivos. El déficit o el exceso de agua en el suelo, las temperaturas subóptimas y supraóptimas, la salinidad de los suelos etc. pueden causar restricciones durante la etapa de crecimiento del cultivo, de manera que la producción, al final de dicha etapa, expresa solo una pequeña fracción de su potencial genético. Por ello comprender los procesos fisiológicos y los mecanismos de adaptación y aclimatación de las plantas al estrés ambiental es de gran importancia para la agricultura y el ambiente. En tal sentido, la fisiología vegetal (FV), considerada por algunos como una subdisciplina de la botánica, es la que se dedica al estudio y entendimiento de los procesos metabólicos en las plantas, por ejemplo, bajo condiciones medioambientales desfavorables. La FV estudia el funcionamiento de las plantas profundizando en mecanismos fundamentales para su vida, tales como fotosíntesis, respiración, aprovechamientos de nutrientes minerales, etc. durante la germinación, desarrollo y senescencia de las plantas. En la FV, el abordaje del conocimiento puede realizarse en distintos escenarios: desde sistemas experimentales modelo, hasta condiciones de campo. Todo esto ha favorecido la aparición de distintos enfoques y especializaciones. Por ejemplo, el fisiólogo vegetal, propiamente dicho, crea sistemas experimentales *in vivo* o *in vitro* para resolver hipótesis en cuanto al funcionamiento celular, tejido u órgano en la planta. El fisiólogo vegetal puede desarrollar sistemas experimentales más controlados para el estudio de un estrés ambiental en particular o, incluso, para abordar los estreses combinados. Por su parte, el ecofisiólogo trabaja en un nivel de complejidad mayor al realizar sus estudios en escenarios completos como son las condiciones de campo. En el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) se promueven los estudios interdisciplinarios que asocian la visión de los fisiólogos, ecofisiólogos y se suman los mejoradores vegetales en la búsqueda de la identificación de genotipos con tolerancia diferencial al estrés ambiental.

En el Proyecto Nacional Agua de la cartera programática 2013, en el PE 1133032, la visión fue la de aportar soluciones desde la FV, tales como la identificación de genotipos tolerantes, el desarrollo de modelos y de estrategias sustentables, que ayuden a que las plantas resistan el estrés por sequía, salinidad y temperatura, con mayor eficiencia y mejoras en los rindes del cultivo. En tal sentido, desde la FV, se estudian procesos complejos como el fenómeno del estrés oxidativo y la regulación de la defensa antioxidante, que apoyan la obtención de criterios de selección sencillos y económicos de medir, los cuales permiten la caracterización de genotipos con tolerancia diferencial al estrés. La evaluación del contenido en malondialdehído

como un indicador del daño oxidativo en las membranas, el contenido de ácido ascórbico y glutatión reducido (antioxidantes no enzimáticos), enzimas claves (superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, catalasa) como indicadores de la defensa antioxidante enzimática y el contenido en prolina como metabolito osmótico y antioxidante son algunas de las herramientas fisiológicas de nivel bioquímico y molecular que se miden para la caracterización de genotipos con tolerancia potencial al estrés abiótico y biótico. Por ejemplo, en los estudios realizados en forrajeras megatérmicas, que promovieron la integración entre fisiólogos y mejoradores, indicadores fisiológicos, como la capacidad para mitigar el daño oxidativo, permitieron la caracterización de la tolerancia a salinidad y sequía de genotipos pertenecientes a la colección activa de *Cenchrus ciliaris*, del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP). Actualmente el estudio del maní y el efecto del estrés biótico y abiótico sobre su rendimiento encuentra resolución gracias a la acción de fisiólogos y mejoradores que desarrollando sistemas experimentales semicontrolados evalúan parámetros relacionados con la mitigación del daño oxidativo, caracterizando el comportamiento de genotipos de maní de interés comercial. Estos y otros ejemplos hacen evidente que la integración de prácticas disciplinarias entre el fisiólogo, el ecofisiólogo y el mejorador vegetal dan sustento y facilitan la toma de decisiones en la identificación de genotipos con tolerancia diferencial a diferentes estreses abióticos y bióticos.

### ***Bibliografía***

- CHOUDHURY, F.K.; RIVERO, R.M.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. 2017. *Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. Plant J* 90: 856-867 doi: 10.1111/tpj.13299
- MITTLER, R.; BLUMWALD, E. 2010. *Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. Annu Rev Plant Biol* 61:443-462.

# El estrés oxidativo y la respuesta antioxidante como herramientas fisiológicas para la identificación de genotipos tolerantes

*Mariela Monteoliva*

El estrés oxidativo es un componente común en numerosos estreses bióticos y abióticos. Está definido como un incremento del estado oxidado de las moléculas (aumentan las especies activas del oxígeno y del nitrógeno, la peroxidación de lípidos, etc.) debido a que las oxidaciones superan la capacidad del sistema antioxidante de los tejidos vegetales. Este sistema antioxidante está constituido por complejos enzimáticos (peroxidasas, catalasas, superóxido dismutasas, entre otras) y no enzimáticos (compuestos antioxidantes como ascorbato, glutatión, tocoferoles, prolina, etc.) que actúan en conjunto para mantener el balance redox en los tejidos. En particular, para evaluar el estado oxidativo de los tejidos vegetales disponemos de indicadores, métodos directos e indirectos de detección de especies activas del oxígeno y daño oxidativo. En la disertación se revisaron los métodos más usados, con sus fundamentos, ventajas y limitaciones. Asimismo, se abordaron los métodos disponibles para evaluar los componentes del sistema antioxidante: actividades enzimáticas y métodos para la detección de metabolitos antioxidantes. Se desarrollaron, mediante algunos casos de estudio, diversas estrategias experimentales para estudiar el rol de las especies activas del oxígeno y los diversos sistemas antioxidantes en la tolerancia al estrés abiótico de las plantas mediante: a) indicadores, que sugieren la participación de estos factores como los niveles de actividad de enzimas y compuestos antioxidantes, incluyendo el uso de plantas mutantes y transgénicas como herramientas para el estudio de mecanismos fisiológicos involucrados en la tolerancia al estrés oxidativo; b) detección indirecta de la presencia de especies activas del oxígeno, mediante la evaluación de moléculas oxidadas como proteínas, lípidos o ADN, mediante tinciones histoquímicas fluorescentes, luminiscentes, microelectrodos, proteínas recombinantes sensibles a estado redox o espectroscopia de resonancia electrónica paramagnética; y, por último, c) detección directa de especies activas del oxígeno. En cada una de las aproximaciones se mencionaron ventajas y desventajas de cada método destacando en cada caso en que sistemas experimentales es conveniente utilizar uno u otro y como se complementan entre sí las diversas estrategias.

# Ajuste osmótico. Detección de metabolitos y su rol fisiológico en la tolerancia al estrés

*Marianela Rodríguez*

Entre los factores más limitantes para la producción agrícola se encuentran los estreses abióticos que, previsiblemente, se agravarán aún más en el contexto del cambio climático. Dichos estreses no solo reducen la cantidad y la calidad de las cosechas, produciendo pérdidas millonarias cada año, sino que además limitan entre otros aspectos, el terreno y las especies cultivables. Por lo tanto, es crucial comprender los procesos fisiológicos subyacentes a la tolerancia al estrés de cada cultivo a la hora de establecer programas de mejoramiento genético, tanto desde abordajes tradicionales como biotecnológicos. En líneas generales, los puntos convergentes de las diferentes situaciones de estrés son: marcadas alteraciones en el metabolismo general de las plantas, inducción de proteólisis, caída de fotosíntesis, aumento de la respiración, alteraciones en el metabolismo del carbono y el nitrógeno, desequilibrio redox. De esta manera, las plantas requieren de respuestas metabólicas adaptativas y emplean diferentes mecanismos fisiológicos para modular la homeostasis de la célula vegetal. A nivel celular, como respuesta de resistencia a una disminución en la disponibilidad de agua, las plantas superiores acumulan selectivamente solutos en sus células. Esta respuesta se conoce como osmorregulación o ajuste osmótico y tiene un papel fundamental en la aclimatación de las plantas a condiciones de sequía, salinidad y congelamiento. El ajuste osmótico es un proceso que disminuye el potencial de solutos y el potencial hídrico total de tallos, hojas y raíces. Como resultado, las plantas pueden absorber agua a menores potenciales hídricos del suelo y mantener la presión de turgencia y la actividad fisiológica relacionada con el contenido hídrico en los tejidos. Durante el taller hemos repasado los principales metabolitos implicados en las respuestas a estreses abióticos junto con el análisis de las principales técnicas utilizadas para su determinación. Entre los compuestos osmocompatibles hemos visto glicina-betaína, prolina, trehalosa, entre otros.

# Técnicas de microscopía y HPLC para la detección de alteraciones morfológicas y metabolitos en plantas bajo estrés

*Leandro Ortega*

Cualquier tipo de estrés produce un desbalance de los productos finales del metabolismo que en último término se manifiestan en una alteración de la estructura celular, llevando a los síntomas que se pueden observar macroscópicamente. Para el estudio de estas alteraciones a nivel celular, la microscopía ofrece un rico abanico de técnicas, factibles de ser adaptadas a casi cualquier tipo de material y condición. En esta exposición, les mostré un panorama completo con fundamentos y ejemplos de aplicaciones, desde las técnicas más básicas, pasando por contraste de fase y contraste interferencial, hasta la microscopía de barrido láser confocal (LCSM en inglés). Con esta última en particular, abordamos cómo se pueden visualizar especies químicas a concentraciones en el rango micromolar y cómo se pueden semicuantificar, acercando el microscopio a las capacidades de un espectrofotómetro.

Ahora para la identificación y cuantificación de metabolitos en niveles "traza" (en concentraciones del rango nano a picomolar) existe la cromatografía líquida a alta presión (HPLC en sus siglas en inglés) que, dentro del amplio universo de técnicas cuantitativas, es una de las más versátiles y sensibles. Permite la detección de una variada clase de componentes que van desde iones inorgánicos hasta moléculas orgánicas complejas como proteínas. Esta segunda exposición trató sobre los fundamentos, ventajas y limitaciones de esta técnica en detalle, mostrando como ejemplo la identificación y cuantificación de seis cationes en extractos de tejidos vegetales.

# Regulación génica durante la tolerancia al estrés abiótico: herramientas para su estudio

*Carla Guzzo*

Los diferentes estreses ambientales inducen cambios a niveles génicos. Comprender la estructura de los genes, y cómo la información que portan se traduce en funciones o características determinadas nos permite hacer abordajes moleculares para inferir mecanismos involucrados en las respuestas de tolerancia al estrés. La regulación génica incluye procesos que afectan desde la transcripción y transducción, así como también la conformación del ADN (estudiada por la epigenética). La comparación de diferentes perfiles de expresión génica a partir de plantas sometidas a estrés es una herramienta básica para responder un gran número de respuestas biológicas. Una técnica muy utilizada son los microarreglos, que permiten identificar numerosos genes involucrados en la respuesta a una determinada condición ambiental. Además, en los últimos años las técnicas de secuenciación masiva de ARN (RNAseq) permiten detectar cambios en el transcriptoma mediante el análisis completo de este bajo diversas condiciones de estrés. En el caso de no contar con la secuencia completa del genoma en estudio, aún se utilizan técnicas que permiten hacer diferentes abordajes como por ejemplo el análisis en serie de la expresión de genes (SAGE), la hibridación supresiva sustractiva (SSH), entre otras. El objetivo de la charla fue abordar diferentes técnicas, sus fundamentos y ventajas. Además, se abordaron casos de estudio de la regulación génica bajo diferentes condiciones de estrés.

# Fotosíntesis y su utilización en estudios relacionados con la tolerancia al estrés abiótico

*Edmundo Ploschuk*

Por una parte, la fotosíntesis es un proceso fundamental de las especies vegetales para convertir la energía solar en carbohidratos que resultan imprescindibles para el crecimiento. Por otra parte, en los sistemas de cultivos, se requieren altas tasas de crecimiento en los momentos críticos para la determinación del rendimiento. El estrés abiótico puede afectar sensiblemente a la tasa fotosintética ( $A$ ) y a la productividad, por lo que es importante contar con una tecnología adecuada de medición para cuantificar su impacto. En la actualidad, se cuenta con aparatos de medición de  $A$  y otras variables de intercambio gaseoso, que se basan en la utilización de un sensor de infrarrojo (IRGA) para medir las concentraciones de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y vapor de agua. Una variable típicamente asociada con  $A$  es la conductancia estomática ( $g_s$ ), pero en los últimos años las evidencias indican que el factor causal es frecuentemente la conductancia interna del mesófilo ( $g_m$ ). Existen diversas metodologías para estimar  $g_m$ , y una de las más apropiadas requiere mediciones simultáneas de fotosíntesis e intercambio gaseoso con fluorescencia, y los sistemas de medición Li-Cor 6400 y 6800 cuentan con la posibilidad de medir bajo esta tecnología. Con estos aparatos,  $A$  se mide mediante la comparación de la concentración de  $\text{CO}_2$  en una celda de referencia, con otra en una celda que está en contacto con una hoja que consume el  $\text{CO}_2$ . Así, cuanto mayor es el gradiente de concentraciones entre celdas mayor resulta ser la tasa fotosintética. Del mismo modo, pero en sentido inverso, los aparatos miden la tasa de transpiración ( $E$ ) a través del gradiente de concentraciones de vapor de agua entre ambas celdas. Otras variables de intercambio gaseoso, tales como  $g_s$  y la concentración interna de  $\text{CO}_2$  en la cámara subestomática de la hoja ( $C_i$ ) son estimadas mediante ecuaciones clásicas de fisiología vegetal, utilizando como variables de entrada  $A$ ,  $E$ , y la temperatura de la hoja (medida con una termocupla de la cámara apoyada sobre la muestra). Por otra parte, los aparatos cuentan con un fluorómetro que, simultáneamente con las mediciones anteriormente descritas, estiman todos los parámetros clásicos de fluorescencia (tanto para hojas aclimatadas a la oscuridad como a la claridad), como por ejemplo la tasa de transporte de electrones (ETR). Precisamente, la técnica para estimar  $g_m$  se basa en una ecuación que combina  $A$ ,  $g_s$ ,  $C_i$  y ETR, por lo que solo puede realizarse mediante estos aparatos que miden todas esas variables en forma simultánea. En la actualidad, estos estudios son cada vez más imprescindibles para cuantificar el efecto del estrés abiótico sobre la economía de carbono en distintas escalas de observación.



# Aportes de la fisiología al mejoramiento vegetal en forrajeras

*Karina Grunberg*

Actualmente enfrentamos un escenario de cambio climático global en donde los estreses ambientales (incluyendo factores bióticos y abióticos) limitan la producción y la calidad de los cultivos. En este contexto, existe la necesidad de desarrollar germoplasma con mayor grado de tolerancia a diferentes tipos de estrés. El principal objetivo de la mejora vegetal es asegurar la producción y calidad de los cultivos para poder responder al aumento constante en la población mundial. Una de las premisas del mejoramiento genético es disponer de germoplasma con variabilidad genética en caracteres que contribuyan a dicha tolerancia. Ello implica la necesidad de evaluar en el germoplasma objeto del mejoramiento y bajo condiciones de estrés, caracteres morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y moleculares que permitan la discriminación de los materiales a nivel de la expresión de la tolerancia y que resulten útiles para la selección de genotipos promisorios. En la charla se mostraron trabajos en los cuales se utilizaron caracteres fisiológicos (respuesta de crecimiento, potencial osmótico, fluorescencia de la clorofila, estabilidad de la membrana celular, contenido relativo de agua, acumulación de compuestos osmocompatibles, etc.) para determinar la variabilidad en la respuesta a condiciones de salinidad y sequía en forrajeras megatérmicas y su utilidad en el mejoramiento genético de estas especies.

# Exploración y utilización de variabilidad genética de relativos silvestres de plantas de cultivo utilizando herramientas genómicas

*Nacira Muñoz*

La diversidad genética en plantas de cultivos está severamente reducida debido a largos procesos de domesticación y posterior mejoramiento intenso. Esta reducción en diversidad y variabilidad genética implica un gran desafío para las propuestas de mejoramiento genético vegetal, en contextos cada vez más demandantes de sustentabilidad para la producción de alimentos. Existe consenso respecto de que los relativos silvestres de plantas de cultivo son un reservorio único de diversidad para explorar y, potencialmente, utilizar variabilidad genética que permita hacer frente a problemáticas actuales y futuras a través de programas de mejoramiento asistidos por genómica. En la actualidad, existen una gran diversidad de estrategias de abordaje disponibles para la exploración y utilización de esta potencialidad tendiente a mejorar caracteres complejos de interés agronómico como el incremento en contenido de antioxidantes en semillas. A partir de una población líneas endogámicas recombinantes o RILs (por su sigla en inglés) interespecíficas altamente homocigota y polimórfica, generada por cruzamiento entre un parental de soja silvestre (*Glycine soja* Siebold y Zucc.) y uno cultivado (*Glycine max* L.), se construyó un mapa genético y físico altamente denso en marcadores bin, utilizando la metodología de resecuenciación de genoma completo. A partir de estos materiales y de la información genética y genómica, hemos identificado regiones coincidentes con un QTL mayor (locus de un carácter cuantitativo), que condiciona el contenido total en semillas de antioxidantes, fenoles y flavonoides. Comparando las secuencias de este QTL entre el parental silvestre y el cultivado, se identificaron tres genes que codifican para transportadores de tipo MATE (Multidrug And Toxic Compound Extrusion) dentro de este QTL (GmMATE 1, 2 y 4) y un gen adyacente (GmMATE3). Asimismo, identificamos cambios no sinónimos entre GmMATE1 y GmMATE2, mientras GmMATE3 codifica para un transcrito en antisentido que se expresa en la vaina de soja. Hemos propuesto dos posibles hipótesis que podrían explicar por qué la variabilidad genética en estos transportadores serían determinantes genéticos mayores para el contenido de antioxidantes en semillas de soja. Los transportadores tipo MATE son conocidos por su importancia en el transporte de metabolitos secundarios en plantas y de sus precursores. El carácter general de contenido de fenoles en semilla puede haber sido por generar sabor o palatabilidad particular, un carácter no deseable, que puede haberse seleccionado negativamente y perdido durante periodos de domesticación y posterior mejoramiento. En este marco, es clave ampliar la base genética a partir de la cual se estudian procesos fisiológicos para lograr un entendimiento más global y completo. Asimismo, el conocimiento generado en plantas modelo (como la previa caracterización y función

de transportadores MATE) es fundamental para la identificación de determinantes genéticos mayores en plantas de cultivo utilizando abordajes genómicos. Del mismo modo, estos abordajes, que amplían la diversidad bajo estudio y con visión poblacional, pueden contener y exponer funciones y variaciones de procesos fisiológicos, genéticos y moleculares aun no definidos u ofrecer ser redefinidos por diferentes disciplinas.

## Conclusiones del Taller

El Taller de posgrado **“Herramientas fisiológicas para el estudio de los efectos del estrés abiótico en plantas”** se dictó del 1 al 3 de noviembre de 2017 en el Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV, CIAP, INTA), en el marco del Proyecto Nacional Agua (PNAGUA 1133032) avalado por el Postgrado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de La Pampa; contó con la asistencia de 20 alumnos (becarios y tesis doctorales) provenientes de Santiago del Estero, Chaco, La Pampa, San Juan, Buenos Aires y Córdoba.

Con este Taller se buscó abrir las puertas de nuestro Instituto, invitando a toda la comunidad científica a conocer lo que hacemos, las capacidades que tenemos en técnicas fisiológicas y bioquímicas, y también el equipamiento, puesto a disposición de los interesados para resolver problemas relacionados con el estrés ambiental en las plantas.

Además, el Taller se planteó como una oportunidad de interacción entre diversas instituciones del país y de generación de nuevos vínculos mediante los cuales iniciar colaboraciones que permitan potenciar nuestras capacidades profesionales.

### Las organizadoras

Mariela Monteoliva, Dolores Bustos y Celina Luna

*Extracto de la nota publicada en la nota titulada “El PNAGUA y el IFRGV-CIAP-INTA apoyan al desarrollo de herramientas fisiológicas para la identificación de genotipos tolerantes al estrés abiótico” publicada en la página web institucional de INTA: <https://inta.gob.ar/noticias/el-pnagua-y-el-ifrgv-ciap-inta-apoyan-al-desarrollo-de-herramientas-fisiologicas-para-la-identificacion-de-genotipos-tolerantes-al-estres-abiotico>*



# Parte II



x,y:200 um

*Hoja de Panicum coloratum teñida con la sonda fluorescente blanco de calcofluor vista en el microscopio confocal.*

## **Introducción**

En esta sección se detallarán los diversos protocolos utilizados frecuentemente en el Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV) CIAP INTA para los cuales contamos con los recursos humanos capacitados, la infraestructura y el equipamiento para desarrollarlos completamente.

De esta forma, esperamos contribuir a difundir procedimientos y recomendaciones esenciales, así como sistematizar el uso de técnicas comunes y contribuir a mejorar la reproducibilidad de los resultados mediante la difusión de protocolos más detallados que los que podemos encontrar en las publicaciones científicas.

A continuación, los protocolos se presentan organizados según secciones temáticas para facilitar el análisis de los diversos procesos fisiológicos.



## 1. Estado hídrico

La cantidad de agua que fluye a través de una planta depende de la oferta de agua del suelo, de las características estructurales y funcionales de la planta y de las condiciones ambientales. El balance entre el agua que la planta absorbe y la que transpira determinará su estado hídrico en esas condiciones. Un exceso de transpiración con respecto a la absorción determina un balance hídrico negativo, generándose una situación de déficit cuyas consecuencias dependerán de su intensidad y duración. El déficit hídrico puede reducir fuertemente el crecimiento y la acumulación de materia seca, afectando así el rendimiento de los cultivos.

El estado hídrico de una planta en determinadas condiciones ambientales puede ser caracterizado mediante la determinación del potencial hídrico (o nivel energético del agua) que puede ser evaluado mediante diversos métodos e instrumentos como la bomba de Scholander, el psicrómetro, el método de Chardacov, entre otros, y mediante el contenido relativo de agua, que se detalla a continuación.

### Determinación de contenido relativo de agua

*(Barr y Weatherley, 1962)*

El contenido relativo de agua (CRA) indica la cantidad de agua que contiene un tejido respecto del máximo que puede contener (turgencia plena). La medición del CRA es una medición confiable y simple que se utiliza para describir el estado hídrico, dando un indicador fuerte de la respuesta de la planta a las condiciones ambientales (Sade y col., 2009; Sade y col., 2012). Para la obtención del índice se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{CRA} = \frac{(\text{Psat} - \text{PF})}{(\text{PF} - \text{PS})} \times 100$$

Donde PSat: Peso Saturado; PF: Peso Fresco; PS: Peso Seco

## Procedimiento

1. Pesar muestras (Peso Fresco, PF) (pueden ser hojas completas o discos de hojas o segmentos, preferiblemente sin las venas grandes). Mínimo recomendado 0,5 g.
2. Poner las muestras en cámara húmeda (puede ser en táper con papeles húmedos, bolsitas tipo Ziploc o flotando en caja de Petri, por ejemplo) en oscuridad a 4 °C toda la noche (18 h) o a 25 °C por 2, 4 u 8 h. Algunos investigadores recomiendan que las condiciones de incubación estén cerca del punto de compensación de la luz para que el tejido no pierda peso por respiración ni gane peso por fotosíntesis (aprox. 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ).
3. Pesar nuevamente a los tiempos correspondientes (Peso Saturado, P<sub>sat</sub>)<sup>1</sup>.
4. Llevar a estufa 60-70 °C hasta que el peso sea constante 2-3 días (Peso Seco, PS).
5. Poner por lo menos 6-8 hojas de distintas plantas por tratamiento.

## **Bibliografía**

- BARR, H.D.; WEATHERLEY, P.E. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Aust. J Biol Sci* 15:413-428.
- CLAUSEN, J.J.; KOZLOWSKI, T.T. 1965. Use of the relative turgidity technique for measurement of water stresses in gymnosperm leaves. *Canadian Journal of Botany*, 43:305-316.
- MATIN, M.; BROWN, J.H.; FERGUSON, H. 1989. Leaf water potential, relative water content, and diffusive resistance as screening techniques for drought resistance in barley. *Agron J* 81:100-105.
- SADE, N.; GALKIN, E.; MOSHELION, M. 2015. Measuring Arabidopsis, Tomato and Barley Leaf Relative Water Content (RWC). *Bio-protocol* 5(8): e1451. (Disponibile: <http://www.bio-protocol.org/e1451> consultado: 28/01/2018).
- SADE, N.; GEBREMEDHIN, A.; MOSHELION, M. 2012. Risk-taking plants: anisohydric behavior as a stress-resistance trait. *Plant Signal Behav* 7: 767-770.
- SADE, N.; VINOCUR, B.J.; DIBER, A.; SHATIL, A.; RONEN, G.; NISSAN, H.; WALLACH, R.; KARACHI, H.; MOSHELION, M. 2009. Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SLTIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? *New Phytol* 181: 651-661.
- YAMASAKI, S.; DILLENBURG, L.R. 1999. Measurements of leaf relative water content in *araucaria angustifolia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11:69-75.

1. Es necesario ajustar el tiempo para lograr la saturación del tejido, pesando la muestra a diferentes tiempos hasta observar que el peso no cambia. Poner a punto el tiempo mínimo y máximo. Si es demasiado, las hojas van a respirar la biomasa y reducir el PS; si es poco, no van a llegar a la saturación y se sobrestimaría el contenido de agua de la muestra.





## 2. Estado rédox

El estrés oxidativo es un componente secundario común a las plantas sometidas a numerosos estreses bióticos y abióticos. Está definido como un aumento del estado oxidado de las moléculas debido a que las oxidaciones superan la capacidad de los sistemas antioxidantes de los tejidos, generando daño oxidativo en los componentes celulares. El sistema antioxidante de los tejidos vegetales está constituido por complejos enzimáticos (peroxidasas, catalasas, superóxido dismutasas, etc.) y no enzimáticos (ascorbato, glutatión, tocoferoles, prolina, etc.) que actúan en conjunto para mantener el balance rédox en los tejidos.

Para evaluar alteraciones en el estado rédox de los tejidos vegetales existen diversas aproximaciones experimentales disponibles como indicadores y detección indirecta de especies activas del oxígeno y moléculas oxidadas, así como actividades enzimáticas y metabolitos antioxidantes.

### **Tinciones histoquímicas para la detección de especies activas del oxígeno**

Existen numerosas técnicas para la detección de especies activas del oxígeno y del nitrógeno, cada una con sus ventajas y desventajas. Aquí solamente ilustramos algunas técnicas histoquímicas muy simples, útiles y representativas como son las tinciones con diaminobencidina y el nitroblue tetrazolio. Además, y solo a modo de ejemplo, describimos la detección de peróxido de hidrógeno mediante la sonda fluorescente 2'-7' dihidroclorofluoresceína diacetato (DCF-DA; Molecular Probes, Invitrogen), de amplio y generalizado uso en microscopía confocal. La DCF-DA al reaccionar con el peróxido de hidrógeno fluoresce y queda atrapada mayormente en el interior celular. También existen variantes de la sonda con otros sustituyentes químicos que modifican sus propiedades como la permeabilidad de membrana, lo cual permite detectar especies activas del oxígeno intracelulares o extracelulares con mayor especificidad. También existen otros tipos de sondas fluorescentes que permiten detectar diversos tipos de compuestos con mayor o menor sensibilidad (ver tabla 1).

## DetECCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO POR TINCIÓN CON DIAMINOBENCIDINA (DAB)

*(Alvarez y col., 1998)*

1. Preparar una solución 1 mg/ml DAB (3-3'-diamino bencidina (SIGMA D12384)) en agua a pH 7-8, dos a tres horas antes de usar. Algunos autores lo disuelven a pH 3 y después lo llevan a 7 para usarlo. Proteger de la luz.
2. Sumergir la hoja en la solución de DAB y hacer vacío (opcional).
3. Dejar toda la noche (16 h) en oscuridad y envuelto con papel de aluminio hasta que aparezca color marrón. No dejar más de 18 h.
4. Sacar del DAB y poner en etanol: acético (3:1 v/v) e incubar a 50 °C hasta clarificar completamente la muestra. Se puede cambiar varias veces la solución. En lugar de calentar se puede dejar toda la noche a 4 °C.
5. Conservar en etanol 70 % v/v hasta su observación con lupa o análisis posterior.

---

## DETECCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO POR TINCIÓN CON AZUL DE TETRAZOLIO (NBT)

*(Doke, 1983)*

Hay dos variantes: una es una tinción lenta con una solución más diluida y otra es una tinción más concentrada y más rápida:

1. Preparar en el momento una solución 0,05 % de NBT (azul de tetrazolio o nitroblue tetrazolium (SIGMA N6639)) en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,0) y dejar las muestras hasta dos horas en la solución de tinción hasta que aparezca coloración; o en la solución 0,5 % de NBT en el mismo buffer y dejar 15-30 minutos tiñendo.
2. Cambiar la solución de tinción por etanol 95 % v/v.
3. Calentar a 95 °C por 5 minutos para detener la reacción.
4. Desteñir en etanol:acético (3:1 v/v) hasta que las hojas queden completamente decoloradas<sup>2</sup>.
5. Conservar en etanol 70 % v/v hasta su observación con lupa o microscopio óptico.

*2. Para montar las muestras en portaobjetos es importante reemplazar el etanol progresivamente hasta reemplazar completamente por agua y luego aumentar la concentración de glicerol progresivamente hasta alcanzar el 10 % v/v. Si se hace en un solo paso, se pueden formar burbujas dentro del tejido.*

Ambas tinciones (DAB y NBT) se pueden cuantificar midiendo el número de píxeles teñidos mediante el uso del programa ImageJ 1.34 (Rasband WS, ImageJ) (Abramoff y col., 2004) de uso libre.

### Reactivos

Preparar el fosfato de potasio según se indica en el ANEXO I.

---

## DetECCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO POR TINCIÓN CON DICLOROFLORESCEÍNA (DCF-DA)

*(Bustos y col., 2008; Monteoliva y col., 2014)*

1. Los tejidos vegetales para analizar deben ser manipulados con mucho cuidado para no generar daño mecánico, que hará aumentar la fluorescencia por causas externas al tratamiento.
2. Colocar los tejidos en tubos plásticos de 1,5 o 15 ml, con una solución de DCF-DA 20  $\mu$ M.
3. Importante: mantener la solución y las muestras protegidas de la luz y teñir todas las muestras al mismo tiempo, o al menos, intentar aplicar las mismas condiciones y en tiempos escalonados, que deben respetarse en su observación y registro de imágenes, ya que la sonda fluoresce rápidamente.
4. Forzar la infiltración mediante una bomba de vacío ejerciendo baja presión durante 1 min.
5. Romper el vacío suavemente y mantener las muestras inmersas en la solución por 10 minutos.
6. Lavar rápidamente en agua y montarlas en un portaobjetos con una gota de agua o glicerol 10 % v/v.
7. Observar por microscopio confocal (filtro de excitación de  $\lambda = 488$  nm y filtros de emisión de  $\lambda = 505$  a 530 nm). Registrar la autofluorescencia de la clorofila mediante la excitación con láser  $\lambda = 633$  nm utilizando el filtro de emisión de  $\lambda = 650$  nm.

Para cuantificar los niveles de especies activas del oxígeno, cuantificar la densidad de fluorescencia (fluorescencia integrada/número de píxeles) de imágenes correspondientes a la fluorescencia de la sonda, usando el programa ImageJ 1.34 (Rasband WS, ImageJ) (Abramoff y col., 2004) de uso libre según el instructivo.

## Reactivos

### **DCF-DA 20 $\mu\text{M}$ (pH 7,0).**

Peso molecular 487,29 g/l.

Preparar una solución stock 2 mM en DMSO (100X).

- Pesar 487,29 mg.
- Disolver en 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO).
- Conservar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

En el momento de usar, preparar una dilución 1/100 en agua destilada en volumen suficiente para sumergir la muestra vegetal completamente.



**TABLA 1**

Sondas fluorescentes para la detección de compuestos por microscopía de epifluorescencia y confocal.

ROS detectada	Sonda	Especificidad	Estabilidad	Citas
$^1\text{O}_2$	SOSG (Singlet Oxygen Sensor Green).	No reacciona con $\text{H}_2\text{O}_2$ o $\text{O}_2\cdot^-$ .		Mattila y col., 2015.
	DanePy (dansil-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol).	Reacción menor con $\text{H}_2\text{O}_2$ o $\text{O}_2\cdot^-$ y radicales lipídicos.		Mattila y col., 2015.
	DPAX (9-[2-(3-carboxi-9,10-dimetil)antril]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona).	No reacciona con NO, $\text{H}_2\text{O}_2$ o $\text{O}_2\cdot^-$ .		Mattila y col., 2015.

Continúa en la página siguiente ►

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Scopoletina.	-	-	Mattila y col., 2015.
	Eu3Tc (Complejo europium-tetraciclina).	Señal afectada por varios metabolitos y pH.	Disminución lineal hasta <50 % en 4-5 min en hojas.	Mattila y col., 2015.
	Amplex Red (10-acetil-3,7-ihidroxifenoxazina).	Muy específico, límite de detección de 50 nM.	6-8 min.	Mattila y col., 2015; Sue Goo Rhee y col., 2010.
	Amplex Ultrared (Amplex Red modificado).	-	Disminución lineal hasta <50 % en 15 min.	Mattila y col., 2015.
	HyPer (sonda codificada genéticamente a partir de la proteína OxyR sensible a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).	Específica para H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pero puede ser afectada por otros oxidantes.	-	Mattila y col., 2015.
	OxyFRET y PerFRET (sondas codificadas genéticamente a partir de proteínas Orp1 y Yap1, respectivamente, sensibles a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).	Específica para H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in vivo, pero no fue testeada con la proteína aislada in vitro.	-	Mattila y col., 2015.
	Peroxigreen (PG1). Peroxicrimson (PC1).	Altamente específicas, de reacción lenta e irreversible. Útil para medir acumulación, pero no cambios transitorios rápidos.	Muy estables. Baja a nula reacción con otras especies activas.	Sue Goo Rhee y col., 2010.
O <sub>2</sub> <sup>1*</sup>	HE o DHE (hidroetidina).	Reacciona con citocromos, grupos hemo, complejos Mn-porfirina, ácido hipocloroso, NO y ONOO <sup>-</sup> .	-	Mattila y col., 2015.
	Mito-cpYFP.	-	-	Mattila y col., 2015.

Continúa en la página siguiente ►

HO*	Fluoroforenitroxido proxil fluorescamina (5-((2-carboxi) fenil)-5-hidroxi-1-((2,2,5,5-tetrametil-1-oxipirrolidin-3-il) metil)-3-fenil-2-pirrolin-4-ona sal de sodio).	Reacciona también con O <sub>2</sub> ·.	-	Mattila y col., 2015.
	Ácido tereftálico (benzeno-1,4- dicarboxílico).	Puede reaccionar con otros radicales, pero la señal es específica para HO*.	Estable.	Mattila y col., 2015.
R-OOH	DPPP (difenil-1-pirenilfosfina).	Puede reaccionar con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ·.	Estable.	Mattila y col., 2015.
	MitoDPPP (ioduro de [3-(4-fenoxifenilpirenilfosfina) propil] trifenilfosfonio).	Puede reaccionar con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ·.	Estable.	Mattila y col., 2015.
	Spy-HP (2-(4-difenilfosfanilfenil)-9-(1-hexilheptil) antra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f] diisoquinoline-1,3,8,10-tetraona).	Específica para peróxidos lipofílicos. Reacciona lentamente con peróxidos hidrofílicos y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ·.	Estable.	Mattila y col., 2015.
	Liperfluor (2-(4-difenilfosfanil-fenil)-9-(3,6,9,12-tetraoxatridecil)-antra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f] diisoquinolina-1,3,8,10-tetraona).	Específica para peróxidos lipofílicos. Reacciona lentamente con peróxidos hidrofílicos y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ·.	Estable.	Mattila y col., 2015.
	Mito-Bodipy-TOH.	-	Estable.	Mattila y col., 2015.

## Bibliografía

- ABRAMOFF, M.D.; MAGELHAES, P.J.; RAM, S.I. 2004. *Image processing with ImageJ*. *Biophot Internatl* 11:36-42.
- ALVAREZ, M.E.; PENNELL, R.; MEIJER, P.J.; ATSUSHI, I.; DIXON, R.; LAMB, C. 1998. *Reactive Oxygen Intermediates Mediate a Systemic Signal Network in the Establishment of Plant Immunity*. *Plant Cell* 92: 773-784.
- BUSTOS, D.; LASCANO, H.R.; VILLASUSO, A.L.; MACHADO, E.; SENN, M.E.; CÓRDOBA, A.; TALEISNIK, E. 2008. *Reductions in maize root tip elongation by salt and osmotic stress do not correlate with apoplastic O<sub>2</sub>- levels*. *Ann Bot* 102:551-559.
- DOKE, N. 1983. *Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of Phytophthora infestans and to the hyphal wall components*. *Physiol Plant Pathol* 23:345-357.
- MATTILA, H.; KHOROBRYKH, S.; HAVURINNE, V.; TYYSTJÄRVI, E. 2015. *Reactive oxygen species: Reactions and detection from photosynthetic tissues*. *J Photochem Photobiol B*. 152:176-214.
- MILLER, G.; HONIG, A.; STEIN, H.; SUZUKI, N.; MITTLER, R.; ZILBERSTEIN, A. 2009. *Unraveling delta 1-pyrroline-5-carboxylate (P5C) /proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes*. *J Biol Chem* 284:26482-26492.
- MONTEOLIVA, M.I.; RIZZI, Y.S.; CECCHINI, N.M.; HAJIREZAEI, M.R.; ALVAREZ, M.E. 2014. *Context of action of Proline Dehydrogenase (ProDH) in the Hypersensitive Response of Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 14(1):21.
- RHEE, S.G.; CHANG, T.S.; JEONG, W.; KANG, D. 2010. *Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells*. *Mol Cells* 29: 539-49.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H.; BRANDT, J.; CHO, B.H.; GREGERSEN, P.L.; RASMUSSEN, S.K.; SMEDEGAARD-PETERSEN, V.; COLLINGE, D.B. 1992. *cDNA cloning and characterization of two barley peroxidase transcripts induced differentially by the powdery mildew fungus Erysiphe graminis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 40:395-409. (Disponible: <https://imagej.nih.gov/ij/> consultado: 01/02/2018).

---

## Determinación de FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

(Benzie y Strain, 1996)

Comúnmente antioxidantes no enzimáticos como el glutatión y el ascorbato son descritos como reductores. La inactivación de oxidantes por sustancias reductoras ocurre mediante reacciones redox en las cuales se reducen las especies reactivas y se oxidan las sustancias reductoras. En este contexto, el poder antioxidante sería análogo a la "capacidad reductora".

Siendo este el caso, el método de FRAP utiliza al hierro como agente reductor de una reacción redox asociada a una reacción colorimétrica que permite cuantificar la capacidad reductora (o "antioxidante") no enzimática, basada en la reducción del ion férrico (Fe<sup>+3</sup>) a ferroso (Fe<sup>+2</sup>). El procedimiento implica la obtención de un extracto alcohólico del extracto vegetal, que al mezclarse con la mezcla de reacción se vuelve azul en la medida que se reduce el hierro.

## Procedimiento

1. Homogeneizar el tejido vegetal (100 mg) en 1 ml de etanol 80 % (v/v).
2. Centrifugar el homogenato 15 min a 12000 a 4 °C y recuperar el sobrenadante.
3. Poner 20 µl del sobrenadante en un multipocillo colocado sobre hielo y agregar 180 µl de la mezcla de reacción.
4. Sacar del hielo, incubar 40 min a 25 °C y medir a 600 nm.

Nota: si fuera necesario, diluir la muestra para que la lectura se encuentre dentro de los valores de la curva de calibración.

## *Mezcla de reacción*

Para 6 ml volumen final:

- 5 ml buffer acetato 0,3 M.
- 0,5 ml TPTZ 10 mM.
- 0,5 ml FeCl<sub>3</sub> 200 mM.

## Reactivos

### **Buffer Acetato 0,3 M (pH 3,6)**

- Pesar 0,31g acetato de Na.
- Agregar 1,6 ml ácido acético glacial. Advertencia: el ácido acético debe estar nuevo para obtener el pH requerido.
- Enrasar a 100 ml con agua destilada.

### **HCl 40 mM**

- Diluir HCL 38 % v/v 8,25 ml en 100 ml (1 M).
- Diluir 1/10 para obtener una solución 0,1 M.
- Diluir 1/2,5 para obtener la solución 0,04 N=40 mM.

### **TPTZ (2,4, 6 Tris (2 piridil) s-triazina)**

- Pesar 0,0312 g TPTZ y diluir en 1 ml 40 mM HCl.

### **FeCl<sub>3</sub> 200 mM**

- Pesar 0,027 g (27 mg) of FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O y diluir en 500 µl H<sub>2</sub>O.



## Curva de calibración con TROLOX

### **TROLOX: ácido 6 hidroxí-2,5,7,8 tetrametilcromano-2-carboxílico**

Para preparar la solución stock 2 mM en etanol y luego un substock de trabajo 250  $\mu\text{M}$ :

- Diluir 0,005 g de TROLOX en 10 ml etanol 80 % (v/v).
- Hacer una segunda dilución en etanol 1/8 con etanol 80 % (v/v) para obtener el substock 250  $\mu\text{M}$ . Conserva a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y realizar las diluciones el mismo día en las que se van a utilizar.



**TABLA 2**

Concentraciones y volúmenes para preparar la curva de calibración.

Concentración TROLOX ( $\mu\text{M}$ )	Trolox 250 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{l}$ )	Alcohol 80 % v/v ( $\mu\text{l}$ )
0	0	100
62,5	25	75
125	50	50
187,5	75	25
250	100	0

### ***Bibliografía***

- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. 1996. *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power". The FRAP Assay. Analytical Biochemistry 239:70–76.*

## Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos

*(Grümbert, 2015)*

La capacidad antioxidante de un tejido puede ser estudiada mediante la determinación de los metabolitos antioxidantes, los cuales suelen cuantificarse en sus estados oxidado y reducido, como es el caso del ascorbato y glutatión; o de la determinación de las actividades de las propias enzimas antioxidantes, sea mediante métodos espectrofotométricos, que miden la actividad total de cada enzima, o mediante geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, que permiten visualizar la actividad, diferenciando las isoformas en función de su tamaño y su inhibición específica mediante compuestos químicos.

---

## Determinación de glutatión total y reducido

*(Lascano y col., 2001)*

Los tioles reaccionan con el compuesto ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) o DTNB, rompiendo el puente disulfuro para dar 3-tio-6-nitrobenzoato (TNB) que se ioniza a TNB-2 en agua a pH neutro y alcalino. Esta reacción es rápida y estequiométrica, liberándose un ion por cada tiol. El TNB-2 tiene un color amarillo lo que permite su cuantificación en un espectrofotómetro por la medición de la absorbancia a 412 nm.

### Procedimiento

1. Homogeneizar 100 mg de tejido vegetal con mortero y aire líquido.
2. Agregar 0,75 ml de ácido tricloroacético (TCA) 3 % (p/v).
3. Centrifugar a 12.000 g durante 10 minutos a 4 °C y recuperar el sobrenadante.
4. Preparar la mezcla de reacción para la medición de glutatión total (GST) y de glutatión reducido (GSH) de la siguiente manera:

Reacción para GST:

- 90 µl de muestra, 90 µl de mezcla de reacción GR y 105 µl de agua.

Reacción para GSH:

- 90 µl de muestra, 120 µl de buffer Tris 1 M (pH 8,0) y 75 µl de agua.

1. Incubar las mezclas de reacción a 28 °C durante 30 minutos.
2. A continuación, inactivar la enzima glutatión reductasa (GR) solo en las mezclas de medición de GST, incubándolas a 90 °C durante 3 min.
3. Agregar 15 µl de DTNB 5 mM, e incubar las mezclas 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Medir la absorbancia a 412 nm.

El contenido en glutatión se determina por medio de una curva con estándares para GST y otra para GSH. Para la construcción de dicha curva se utiliza GSH 0,1 mM preparado en TCA 3 % (p/v) y se reemplaza el volumen de muestra por 90 µl de las distintas diluciones de GSH en las mezclas de reacción. Para el blanco de muestra se utilizan 90 µl de TCA 3 % (p/v) (tabla 3).

## Reactivos

### **TCA 3% (p/v)**

- Tomar 3 ml de TCA 100 % (p/v).
- Enrasar a 100 ml con agua destilada.

### **Cloruro de magnesio 60 mM**

- Pesar 5,71 ml de  $MgCl_2$ .
- Diluir en 1 ml de agua destilada.

### **NADPH 1 mM**

- Pesar 1,7 mg de NADPH.
- Diluir en 2 ml de buffer Tris-Cl 25 mM (pH 8,0).

### **GSH 100 mM**

- Pesar 0,0307 g de GSH.
- Diluir en 1 ml de TCA 3 % (p/v).

### **EDTA 20 mM**

- Pesar 0,372 g de EDTA.
- Enrasar a 50 ml con agua destilada.

### **Buffer Tris-Cl 2 M (pH 8,0)**

- Pesar 12,1 g de Tris Base.
- Ajustar el pH en 8,0 con HCl.
- Enrasar a 50 ml con agua destilada.

## DTNB 5 mM

- Pesar 1 mg de ácido 5-5'-ditiobis-(-2-nitrobenzoico) (DTNB).
- Diluir en 1 ml de buffer Tris-Cl 1 M (pH 8,0).

## Mezcla de reacción de glutatión reductasa<sup>3</sup>

- 5 µl MgCl<sub>2</sub> 60 mM.
- 15 µl NADPH 1 mM.
- 5 µl EDTA 20 mM.
- 73 µl Buffer Tris-Cl 2 M pH 8.
- 0,1 µl enzima GR 453,6 U/ml.

## Curva de calibración



**TABLA 3**

Concentración y volúmenes para preparar la curva de calibración.

Concentración de GSH (µM)	Volumen de GSH 0,1 mM (µl)	TCA 3 % (p/v) (µl)
5	5	95
10	10	90
20	20	80
30	30	70
40	40	60

## **Bibliografía**

- GRÜMBERG, B.C. 2015. *Utilización de cepas nativas de hongos micorrícicos arbusculares en la regulación del estrés por sequía en un genotipo de soja susceptible. Participación del estrés oxidativo y la defensa antioxidante. Tesis Doctoral Ciencias Biológicas, UNC.*
- LASCANO, R.; ANTONICELLI, G.E.; LUNA, C.M.; MELCHIORRE, M.; GOMEZ, L.D.; RACCA, R.W.; TRIPPI, V.S.; CASANO, L.M. 2001. *Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. Austr J. Plant Physiol. 28:1095-1102.*

[ 3. Calcular el número total de muestras (n) para medir y agregarle una extra (n+1, hasta 5 muestras; n+2 hasta 10 muestras, etc.) para calcular el volumen necesario de mezcla de reacción. ]

## Determinación de ascorbato total y reducido

(Law y col.,1983)

Este ensayo se basa en la reducción de férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) por ascorbato en solución ácida. El  $\text{Fe}^{+2}$  luego forma complejos con bipyridilo, dando un color rosa que absorbe a 525 nm. El ascorbato total se determina por la reducción del dihidroascorbato a ascorbato por ditioneitol (DTT).

### Procedimiento

1. Homogeneizar 100 mg de tejido vegetal con mortero y aire líquido.
2. Agregar 0,75 ml de ácido tricloroacético (TCA) 3 % (p/v).
3. Centrifugar a 12.000 g durante 10 minutos a 4 °C y recuperar el sobrenadante.
4. Preparar las mezclas de reacción para la medición de ascorbato total y ascorbato reducido, según la tabla siguiente:



**TABLA 4**

Volúmenes para preparar las mezclas de reacción.

	Ascorbato total	Ascorbato reducido
Muestra	75 $\mu\text{l}$	75 $\mu\text{l}$
Buffer fosfato de potasio 75 mM (pH 7,0)	25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$
DTT 10 mM	25 $\mu\text{l}$	-
Agua	-	50 $\mu\text{l}$

5. Incubar a temperatura ambiente (25 °C) durante 10 minutos.
6. Agregar 25  $\mu\text{l}$  de NEM 0,5 % p/v solo a las reacciones para medir ascorbato total y 300  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción a ambas reacciones.
7. Incubar 60 min a 37 °C durante.
8. Finalizar la reacción agregando 50  $\mu\text{l}$  de cloruro férrico 3 % (p/v) a todas las mezclas de reacción.
9. Medir la absorbancia a 525 nm.

El contenido en ascorbato se determina por medio de una curva de calibración para la medición de ascorbato total y otra para ascorbato reducido, utilizando diluciones de una solución de ácido ascórbico 1 mM preparado en TCA 3 % (p/v) y reemplazando el volumen de muestra por 75 µl de las distintas cantidades de ácido ascórbico. Para los blancos de muestra se utilizaron 75 µl de TCA 3 % (p/v) en lugar de la muestra.

## Reactivos

### **TCA 3 % (p/v)**

- Diluir 3 ml de TCA 100% (p/v).
- Enrasar hasta 100 ml con agua destilada.

### **Bipiridilo 4 % (p/v)**

- Pesar 200 mg de bipiridilo.
- Disolver en 5 ml de etanol 70 % (v/v).

### **DTT 10 mM**

- Pesar 1,5 mg de ditioneitol.
- Disolver en 1 ml de agua destilada.
- Conservar a -20 °C.

### **NEM 0,5 % (p/v)**

- Pesar 5 mg de N-etilmaleimida (NEM).
- Disolver en 1 ml de agua milli-Q.

### **Cloruro férrico 3 % (p/v)**

- Pesar 300 mg de FeCl<sub>3</sub>.
- Disolver en 10 ml de agua milli-Q.

### **Buffer fosfato de potasio (pH 7,0)**

- Ver Anexo I

### **Ácido ascórbico**

- Pesar 17,6 mg de ácido ascórbico.
- Disolver en 1 ml de TCA 3 % (p/v).

## Mezcla de reacción

- 100  $\mu$ l TCA 3 % (p/v).
- 100  $\mu$ l ácido fosfórico 50 % (v/v).
- 100  $\mu$ l biperidilo 4 % (p/v).

## Curva de calibración

Se recomienda preparar la curva de calibración como se indica en la siguiente tabla.



**TABLA 5**

Concentración y volúmenes para preparar la curva de calibración.

Concentración de ácido ascórbico (nM)	Volumen de ácido ascórbico 1 mM ( $\mu$ l)	TCA 3 % (p/v) ( $\mu$ l)
5	5	70
10	10	65
15	15	60
20	20	55
25	25	50

## Bibliografía

- LAW, M.Y.; CHARLES, S.A.; HALLIWELL, B. 1983. *Glutathione and ascorbic acid in spinach (Spinacia oleracea) chloroplast. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. Biochem J.* 210(3):899-903.



# Determinación de actividades de enzimas antioxidantes

(Grümbert, 2015)

Este procedimiento de extracción de proteínas de tejidos vegetales es apto para la determinación de diversas enzimas antioxidantes, así como de otro tipo de actividades enzimáticas.

## Procedimiento

1. Homogeneizar 100 mg de tejido vegetal con mortero y aire líquido.
2. Agregar 0,75 ml de buffer de extracción (fosfato de potasio 0,05 M (pH 7,4)) y una cucharadita de polivinilpolipirrolidona (PVPP; antioxidante para evitar la oxidación por fenoles). Se pueden adicionar también diversos inhibidores de proteasas generales o específicos según el uso que se vaya a dar a la muestra.
3. Centrifugar a 12.000 g durante 30 minutos 4 °C y recuperar el sobrenadante.
4. Centrifugar nuevamente a 12.000 g durante 10 minutos a 4 °C.
5. Mantener en hielo hasta su utilización para las determinaciones enzimáticas.
6. Determinar el contenido de proteínas según el método de Bradford (ver "Determinación del contenido de proteínas totales").

Para la determinación de la composición isoenzimática de las enzimas superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa, mediante geles de actividad ND-PAGE, agregar ácido ascórbico a concentración final 5 mM (PM: 198,1).

## Reactivos

### **Fosfato dibásico de potasio 75 mM**

Ver Anexo I

### **EDTA 10 mM**

- Pesar 0,760 g de ácido etilendiaminotetracético tetra sódico (EDTA).
- Disolver en 200 ml de agua milli-Q.

### Buffer de extracción

- 1 ml de buffer fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,4).
  - 1 ml de EDTA 10 mM.
  - 8 ml de agua destilada.
- 

## Actividad superóxido dismutasa

*(Beauchamp y Fridovich, 1973)*

La luz ultravioleta (UV) influye sobre la riboflavina, la cual se oxida reduciendo el oxígeno a ion superóxido. El superóxido en presencia de metionina como catalizador, reduciendo el azul de tetrazolio (NBT) a formazan, responsable de la coloración azul. Así la concentración del ion superóxido está directamente relacionada con el color. El extracto vegetal incluye la enzima SOD, la cual dismuta o secuestra el ion superóxido. Es por esto que a mayor cantidad de SOD se reduce menor cantidad de NBT y se obtiene una menor coloración azul.

### Procedimiento

1. En primer lugar, debe determinarse la concentración óptima de riboflavina en los tubos testigos sin extracto vegetal, realizando una curva desde 10 a 100  $\mu$ l de la solución stock (40  $\mu$ M), completando el volumen hasta 1 ml con agua milli-Q.
  - Exponer a luz UV durante 9 min (siempre a la misma distancia de la lámpara).
  - Medir la absorbancia a 560 nm en cubetas de cuarzo. Utilizar como blanco un tubo con 100  $\mu$ l de riboflavina no expuesto a luz UV.
  - Selecciona aquella concentración de riboflavina a la cual la DO sea cercana a 0,25.

Precaución: agregar la riboflavina al final, mezclar bien e inmediatamente colocar debajo de la luz UV.

2. En segundo lugar, es necesario determinar el volumen óptimo de extracto vegetal:
  - Colocar 5, 10, 20 y 30  $\mu$ l de extracto vegetal obtenido según las indicaciones de la sección anterior; la cantidad de riboflavina seleccionada en el ítem anterior, 400  $\mu$ l de mezcla de reacción y completar el volumen con agua milli-Q.
  - No olvidar hacer un testigo, reemplazando el volumen de extracto vegetal por agua.
  - Exponer a la luz UV por 9 min y medir la absorbancia a 560 nm.
  - Seleccionar el volumen de extracto cuya absorbancia se encuentre entre 0,25 y 0,30.

3. Por último, proceder a la medición de las muestras para determinar según el esquema mostrado en la siguiente tabla:



**TABLA 6**

Esquema de trabajo para las mediciones con UV.

	Mezcla de reacción	Extracto vegetal	UV
Blanco	+	-	-
Testigo	+	-	+
Problema	+	+	+

Se pueden preparar todos los tubos inicialmente, ya que la reacción se inicia al agregar la riboflavina. Colocar cada tubo en la incubación bajo UV cada 30 segundos, inmediatamente después de agregar la riboflavina, y los retiramos al concluirse los 9 min, cada 30 segundos en el orden de ingreso. El testigo será la muestra que mayor color desarrolla.

### Cálculos

Una unidad SOD ( $U_{SOD}$ ) se define como la cantidad de enzima que produce el 50 % de inhibición de la reducción fotoquímica del NBT.

$$U_{SOD} = (DO \text{ Testigo} / DO \text{ problema}) - 1$$

Si la DO del problema y del testigo son iguales, el cociente es 1 y el resultado final es 0. Si la DO del problema es la mitad de la del testigo, el cociente es 2 y el resultado final es 1.

$$U_{SOD} = \frac{U_{SOD} \times \text{Vol. extracción}}{PF \times \text{vol. extracto}}$$

*Vol. extracción* ( $\mu\text{l}$ ); *Vol. extracto utilizada en la reacción* ( $\mu\text{l}$ ); *PF*, peso fresco (g)

La actividad SOD se refiere finalmente a 1 mg de proteína presente en la muestra, determinada por el método de Bradford.

## Reactivos

### **EDTA 1 $\mu$ M**

- Diluir EDTA 10 mM: tomar 2,5  $\mu$ l.
- Enrasar a 25 ml con agua milli-Q.

### **Metionina 130 mM**

- Pesar 48,5 mg de metionina.
- Disolver en 2,5 ml de agua milli-Q.

### **NBT 750 $\mu$ M**

- Pesar 1,5 mg de azul de tetrazolio (NBT).
- Disolver en 2,5 ml de agua milli-Q.

### **Riboflavina 40 $\mu$ M**

- Pesar 3,8 mg de riboflavina.
- Disolver en 250 ml de agua milli-Q.

Preparar en el momento.

### **Premezcla de reacción**

- 2,5 ml de buffer fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,8).
- 2,5 ml de EDTA 1  $\mu$ M.
- 2,5 ml de metionina 130 mM.
- 2,5 ml de azul de tetrazolio (NBT) 750  $\mu$ M.

Mantener en oscuridad, a temperatura ambiente porque en frío se precipita.

### *Mezcla de reacción*

Preparar una mezcla general de los reactivos de la cual se agregan 400  $\mu$ l en el momento de la lectura. Esta mezcla se debe mantener en oscuridad, a temperatura ambiente.

**TABLA 7**

Esquema de trabajo para las mediciones.

Tratamiento	Premezcla (μl)	Riboflavina (μl)	Extracto vegetal	Agua milli-Q
Blanco	400	100	-	500 μl
Testigo	400	100	-	500 μl
Problema	400	100	5-30 μl	470-495 μl

### ***Bibliografía***

- BEAUCHAMP, C.O.; FRIDOVICH, I. 1973. *Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ*. *Biochim Biophys Acta* 317:50-64.
- GRÜMBERG, B.C. 2015. *Utilización de cepas nativas de hongos micorrícicos arbusculares en la regulación del estrés por sequía en un genotipo de soja susceptible. Participación del estrés oxidativo y la defensa antioxidante*. Tesis Doctoral Ciencias Biológicas, UNC.

## Actividad catalasa

***(Aebi, 1984)***

En este protocolo se mide la cinética de disminución de la absorbancia del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en el espectrofotómetro. El extracto vegetal contiene CAT, la cual reacciona con el  $H_2O_2$ . A medida que aumenta la cantidad de enzima CAT en el extracto, aumenta la velocidad de reducción del  $H_2O_2$  y se observa una mayor pendiente de caída de DO.

### **Procedimiento**

1. En primer lugar, ajustar la concentración de  $H_2O_2$  en la mezcla de reacción. El testigo sin extracto vegetal con  $H_2O_2$  debería dar una DO=0,5. Si diera diferente, es necesario modificar la concentración de  $H_2O_2$ .
2. En segundo lugar, ajustar la concentración óptima del extracto vegetal: evaluar diversos volúmenes de extracto entre 10 a 50 μl de muestra.

Importante: verificar que ante un aumento del volumen de extracto la diferencia de  $DO_{240nm}$  sea proporcional, y así comprobar que la medición se encuentra dentro del rango de sensibilidad y linealidad de la técnica.

3. Preparar la mezcla de reacción para todas las muestras a medir, e iniciar la reacción por adición del  $H_2O_2$ .
4. Mezclar bien con pipeta e iniciar la medición durante 30 segundos con intervalos de 1 segundo. Medir en cubetas de cuarzo, longitud de onda de 240 nm.

## Cálculos

Para calcular la actividad de la enzima catalasa, se considera el coeficiente de extinción molar  $43,6 M^{-1} cm^{-1}$ . La actividad se expresa como mmoles de  $H_2O_2$  consumidos por minuto por mg de proteína.

$$CAT \text{ (mmoles } H_2O_2/\text{min} \times g \text{ PF)} = \frac{(\Delta A_{240} \cdot \text{min} - 1) \times \text{Vol. Extracción} \times \text{Dilución}}{(43,6 \times \text{peso fresco de muestra})}$$

$\Delta A_{240} / (\text{min}^{-1})$ : es la diferencia entre la densidad óptica inicial y la final a 240 nm en 1 min (si lo evaluamos en 30 segundos, debemos multiplicar por 2).

La actividad CAT se refiere finalmente a mg de proteína presente en la muestra. Para ello calcular los mg de proteínas presentes en 1 mg de peso fresco de muestra y relativizas el cálculo anterior a esa unidad.

## Reactivos

### **Solución de peróxido de hidrógeno 50 mM**

- Titular el peróxido de hidrógeno puro:
- Leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 240 nm.
- Calcular su molaridad con el siguiente coeficiente de extinción molar:  $38 M^{-1} \times cm^{-1}$ .

$$[H_2O_2]_{\text{puro}} = \frac{38}{A_{240 \text{ nm}}}$$

$$\text{Volumen para extraer} = \frac{\text{Volumen final} \times [H_2O_2]_{\text{final}}}{[H_2O_2]_{\text{puro}}}$$

$$= \frac{10 \text{ ml} \times 0,050 \text{ M}}{[H_2O_2]_{\text{puro}}}$$

## Mezcla de reacción

Preparar los tubos de reacción según se indica en la siguiente tabla:



**TABLA 8**

Esquema de trabajo para las mediciones.

Tratamientos	Agua destilada ( $\mu$ l)	Buffer fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,4) ( $\mu$ l)	Extracto vegetal ( $\mu$ l)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 mM ( $\mu$ l)
Blanco	900	100	-	-
Testigo	800	100	-	100
Problema	100	10 – 50	100	-

Si se ve una disminución muy errática en la caída de DO se puede probar bajando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 50 a 25 mM.

### **Bibliografía**

- AEBI, H. 1984. *Catalase in vitro. Methods Enzymol* 105:121-126.

# Determinación de actividades enzimáticas en gel

## Geles discontinuos no desnaturalizantes

*(Davis, 1962)*

Este método consiste en la separación electroforética de proteínas en geles de poli-acrilamida, pero con la particularidad de que la técnica se realiza en condiciones en las que las proteínas no se desnaturalizan, a fin de conservar su actividad. Esta técnica permite separar isoformas de enzimas con diferentes pesos moleculares que tienen la misma actividad o que utilizan el mismo sustrato y no podrían discernirse midiendo una actividad colorimétrica. Este método permite diferenciar isoformas mediante reacciones químicas que colorean diferencialmente el gel de acrilamida en los sitios en donde se encuentran las enzimas en estudio luego de la separación electroforética. En presencia de inhibidores específicos, incluso es posible diferenciar isoformas con pesos moleculares similares.

### Procedimiento

1. Ensamblar los vidrios con los separadores de 1,5 mm.
2. Marcar el límite hasta donde la matriz de acrilamida será vertida, trazando una línea horizontal en el vidrio con un marcador indeleble. Para saber la ubicación exacta de la línea, colocar el peine entre ambos vidrios y medir 1 centímetro por debajo de los dientes del peine.
3. Realizar la mezcla del gel de separación a una concentración de acuerdo al tamaño de la proteína de la cual se va a medir la actividad, mezclando los distintos componentes, para los geles SOD y APX se utilizan concentraciones del 11 %.
4. Añadir todos los componentes, mezclando bien después de añadir cada uno, dejando para el final los catalizadores APS y TEMED. La polimerización de la solución se desencadena al agregar ambos catalizadores y demora entre 15 y 30 min dependiendo de la temperatura ambiente.
5. Inmediatamente colocar la mezcla entre los vidrios con una pipeta.
6. Luego añadir aproximadamente 1 ml de isobutanol para evitar el ingreso de oxígeno.
7. Dejar polimerizar a temperatura ambiente por 15-30 min, usando como control de polimerización la solución de poli-acrilamida remanente. Una vez polimerizado el gel, se descarta el solvente, se lava con agua destilada y se seca el exceso de agua con papel absorbente.



8. Preparar la mezcla del gel concentrador, repitiendo el proceso de forma similar al del gel separador, pero en este caso se preparará un gel de concentración fija.
9. Agregar la solución entre los vidrios de la cámara y sobre el gel de separación ya polimerizado. Inmediatamente colocar el peine entre ambos vidrios.
10. Una vez formado el gel, se coloca en la cuba, se agregan 150 ml de buffer de corrida 1X con 2 mM de ácido ascórbico en el espacio entre los geles y se retiran los peines cuidadosamente.
11. Lavar todos los pocillos ya formados con chorro suave del mismo buffer.
12. Colocar 200 ml de buffer corrida 1X con 2 mM de ácido ascórbico en el exterior de los geles.
13. Sembrar entre 40 y 70  $\mu\text{g}$  de proteína por calle. Verificar que al sembrar concentraciones crecientes de proteínas y se observa mayor actividad.
14. Las muestras para sembrar se prepararon calculando 1 parte de buffer muestra 4X y 3 de muestra, volumen final de 40  $\mu\text{l}$ .
15. Depositar cuidadosamente una muestra en cada pocillo, evitando la contaminación del pocillo contiguo.
16. Seleccionar para mantener el amperaje constante, bajo esta condición el voltaje aumenta durante la corrida. El valor del amperaje o corriente eléctrica (medida en amperios o miliamperios) dependerá de la fuerza iónica del buffer. En el caso de trabajar con buffer Tris-glicina 1X el valor recomendado es de  $I=12,5$  mA por gel. Se corre hasta que el frente de corrida (visualizado como una línea azul por el colorante del buffer) llegó al límite inferior del gel.
17. Retirar el gel de la cuba. Separar los vidrios con una espátula, suavemente
18. Teñir el gel.

### Reactivos de uso directo

#### **Gel de separación 11 %**

- 2,18 ml de agua.
- 2,93 ml de mezcla acrilamida/bisacrilamida 30:0,8 %.
- 2,00 ml de buffer de separación.
- 0,80 ml de glicerol puro.

En el momento de preparar el gel, agregar:

- 12  $\mu\text{l}$  de TEMED.
- 120  $\mu\text{l}$  de persulfato de amonio (APS) 10 % (p/v).

#### **Gel de concentración**

- 0,556 ml de agua.
- 2 ml de mezcla acrilamida/bisacrilamida 10:2 %.

- 1 ml de buffer de concentración.
- 0,4 ml de glicerol puro.

En el momento de preparar el gel, agregar:

- 8  $\mu$ l de TEMED.
- 80  $\mu$ l de persulfato de amonio (APS) 10 % (p/v).

### **Buffer de corrida 1X**

- 50 ml de buffer de corrida 10X.
- 0,198 g de ácido ascórbico 2 mM.
- Enrasar con agua destilada hasta 500 ml.

## *Preparación de soluciones stock*

### **Buffer de corrida 10X**

- Pesar 30 g de tris base.
- Pesar 144 g de glicina.
- Disolver y enrasar a 1l con agua destilada.

### **Buffer de separación Tris-Cl 1,3 M (pH 8,8)**

- Pesar 18,15 g tris base.
- Disolver en 50 ml de agua destilada.
- Ajustar el pH a 8,8 con HCl.
- Enrasar a 100 ml con agua destilada.

### **Buffer de concentración Tris-Cl 0,22 M (pH 7,0)**

- Pesar 2,66 g de tris base.
- Disolver en 50 ml de agua destilada.
- Ajustar el pH a 7,0 con HCl.
- Enrasar a 100 ml con agua destilada.

### **Acrilamida/bisacrilamida 30:0,8 % para el gel de separación**

- Pesar 30 g de acrilamida.
- Pesar 0,8 g de bisacrilamida.
- Disolver en 100 ml de agua.

Conservar protegida de la luz y refrigerada a 4 °C.

### **Acrilamida/bisacrilamida 10:2 % para el gel de concentración**

- Pesar 10 g de acrilamida.
- Pesar 2 g de bisacrilamida.
- Disolver en 100 ml de agua.

Conservar protegida de la luz y refrigerada a 4 °C.

### **Azul de bromofenol**

- Pesar 30 mg de azul de bromofenol.
- Disolver en 10 ml (vol. final) de agua destilada.

Conservar protegido de la luz y refrigerado.

### **Buffer muestra 4X**

- Tomar 2 ml del buffer tris (pH 7,0) (concentrador).
- Agregar 2 ml de glicerol puro.
- Agregar 2 ml de solución de azul de bromofenol.
- Mezclar y conservar a temperatura ambiente, protegido de la luz.

### **APS 10 % (p/v)**

- Pesar 1 g de persulfato de amonio (APS).
- Enrasar a 10 ml.
- Separar en alícuotas de 1 uso.
- Mantener a -20 °C.

### ***Bibliografía***

- DAVIS, B.J. 1962. *Disc electrophoresis II—Method and application to human serum proteins. Annals New York Academy of Sciences* 121:404-427.

## Actividad superóxido dismutasa en gel

(Beauchamp y Fridovich, 1971)

### Procedimiento

1. Sembrar entre 40 y 70  $\mu\text{g}$  de proteína por calle. Verificar que al sembrar concentraciones crecientes de proteínas y se observa mayor actividad.
2. Las muestras para sembrar se prepararon calculando 1 parte de buffer muestra 4X y 3 de muestra, volumen final de 40  $\mu\text{l}$ .
3. Depositar cuidadosamente una muestra en cada pocillo, evitando la contaminación del pocillo contiguo.
4. Seleccionar para mantener el amperaje constante, bajo esta condición el voltaje aumenta durante la corrida. El valor del amperaje o corriente eléctrica (medida en amperios o miliamperios) dependerá de la fuerza iónica del buffer. En el caso de trabajar con buffer tris-glicina 1X el valor recomendado es de  $I=25-30$  mA por gel. Se corre hasta que el frente de corrida (visualizado como una línea azul por el colorante del buffer) llegó al límite inferior del gel.
5. Separar el gel de empacamiento del gel de resolución realizando un corte transversal. Hacer una pequeña muesca en una de las esquinas del gel, a fin de que sirva de orientación para ubicar el orden en que fueron cargadas las muestras.
6. Remover el gel y usar una espátula para levantarlo por una de las puntas.

### *Revelado del gel*

1. Colocar el gel en la solución de preincubado agitando constantemente durante 30 min, en oscuridad, cambiando la solución cada 15 min, mientras se prepara la solución de tñido.
2. Retirar la solución de preincubado y colocar la solución de tñido manteniendo las condiciones de agitación y oscuridad por 25 min.
3. Enjuagar con agua destilada y exponer a la luz hasta que aparecen bandas claras (actividad SOD) sobre el fondo azul oscuro.
4. Las isoenzimas individuales de SOD se pueden identificar (de acuerdo a Sandalio y col., 1987). Para ello se deben preincubar los geles por 30 min en buffer fosfato 50 mM (pH 7,8), que contiene:
  - a. 2 mM KCN, o
  - b. 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$

Luego revelar con la solución de tñido. Las enzimas que contienen Cu/Zn son inhibidas por KCN e inactivadas por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mientras que las enzimas Fe-SOD son resistentes a KCN e inhibidas por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las MnSOD son resistentes tanto a KCN como a  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## Reactivos

### *Soluciones Stock*

#### **Buffer fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,8)**

Ver Anexo I

#### **Buffer fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,4)**

Ver Anexo I

### *Soluciones de uso*

#### **Buffer de reacción**

- Pesar 0,01 g de ácido ascórbico.
- Agregar 1 ml de buffer fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,4).
- Agregar 1 ml de EDTA 10 mM.
- Enrasar a 10 ml con agua destilada.

#### **Solución de preincubado**

- Tomar 8 ml de buffer fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,8).
- Agregar 8 ml de EDTA 10 mM.
- Enrasar a 80 ml con agua destilada.

#### **Riboflavina 6,6 mM**

- Pesar 2,5 mg de riboflavina.
- Disolver en 1 ml de agua milli-Q.
- Almacenar como máximo 1 semana a 4 °C, protegido de la luz.

#### **Solución de teñido**

- Pesar 10 mg de NBT (Cf: 0,61 mM).
- Agregar:
  - 0,1 ml de riboflavina 6,6 mM (Cf: 66  $\mu$ M).
  - 2 ml de buffer fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,8).
  - 2 ml de EDTA 10 mM (Cf: 1 mM).
  - 27  $\mu$ l de TEMED (Cf: 0,135 %).
- Enrasar a 20 ml con agua destilada.

## **Bibliografía**

- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. 1971. *Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels*. *Anal Biochem* 44:276-287.
  - BEAUCHAMP, C.O.; FRIDOVICH, I. 1973. *Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ*. *Biochim Biophys Acta* 317:50-64.
  - DONAHUE, J.L.; OKPODU, C.M.; CRAMER, C.L.; GRABAU, E.A.; ALSCHER, R.G. 1997. *Responses of antioxidants to paraquat in Pea leaves (relationships to resistance)*. *Plant Physiol* 113:249-257.
  - SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; RIO, L.A.D. 1987. *Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from Pisum sativum L.* *Plant Science* 51:1-8.
- 

## **Actividad ascorbato peroxidasa en gel**

*(Mittler y Zilinskas, 1993)*

En ausencia de la enzima ascorbato peroxidasa (APX), el azul de tetrazolio (NBT) es reducido a formazan, en presencia de  $H_2O_2$ , coloreando el gel de color azul. La enzima APX al secuestrar el  $H_2O_2$  impide el paso del NBT a formazan, visualizándose como bandas incoloras, por falta de tinción.

### Procedimiento

Para la obtención del extracto, la preparación de la muestra y la corrida electroforética se procede de igual manera que para los geles de actividad, presentado en las secciones anteriores.

1. Colocar el gel en la solución de equilibrado por 30 min, cambiando el buffer cada 10 min.
2. Incubar 20 min en la solución con peróxido de hidrógeno.
3. Enjuagar el gel en buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0) por 1 min.
4. Sumergirlo en la solución de tinción por 10 min.
5. Detener la reacción lavando el gel con agua.

La actividad APX se observa como una banda sin color en un fondo azul.

## Reactivos

### **Solución de equilibrado**

- Pesar 0,0326 g de ácido ascórbico (Cf: 2 mM).
- Agregar:
  - 10 ml de buffer fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,0) (Cf: 50 mM).
  - 10 ml de EDTA 10 mM (cf: 1 mM).
- Enrasar a 100 ml con agua destilada.

### **Solución con peróxido de hidrógeno**

- Pesar 12 mg de ácido ascórbico (Cf: 4 mM).
- Agregar:
  - 3 ml de buffer fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,0) (Cf; 50 mM).
  - 3 ml de EDTA 10 mM (Cf 1 mM).
  - 70  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 8,66 M (Cf: 2 mM).
- Enrasar a 30 ml con agua destilada.

### **Solución de tinción**

- Pesar 40 mg de NBT (Cf: 2,45 mM).
- Agregar:
  - 2 ml de buffer fosfato de potasio 0,5 M (pH 7,8) (Cf: 50 mM).
  - 2 ml de EDTA 10 mM (Cf: 1 mM).
  - 85  $\mu$ l de TEMED (Cf: 28 mM).
- Enrasar a 20 ml con agua destilada.

### **Bibliografía**

- MITTLER, R.; ZILINSKAS, B.A. 1993. *Detection of Ascorbate Peroxidase Activity in Native Gels by Inhibition of the Ascorbate-Dependent Reduction of Nitroblue Tetrazolium*. *Anal Biochem* 212:540-546.

## Determinación del contenido de proteínas totales

Las proteínas de extractos vegetales pueden ser determinadas por algunos métodos comúnmente denominados según el apellido de sus creadores tales como Biuret o Bradford. Ninguno de estos ensayos es totalmente específico para proteínas, ni igual de precisos para distintos tipos de proteínas. Además, algunas modificaciones postraduccionales como la metilación pueden también interferir con la determinación. Sin embargo, su utilización está ampliamente difundida para la determinación de proteínas. En la tabla a continuación se comparan algunas características básicas entre ellas a modo de ejemplo.



**TABLA 9**

Métodos para la cuantificación de proteínas en extractos vegetales.

Método	Bradford	Biuret (Smith)	Biuret (Lowry)	Directo
Reacción	El colorante reacciona principalmente con arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina.	Reducción de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ a $\text{Cu}^{1+}$ ). Reacción del ácido biocinónico (BCA) con $\text{Cu}^{1+}$ .	Reducción de cobre por proteínas, reducción de Folin Ciocalteu por el complejo de cobre con proteína.	Detección de la absorción de tirosina y triptófano en el rango de luz UV.
Absorción	595 nm	562 nm	750 nm	280 nm
Límite de detección	20-2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ >3 KDa	20-2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,1 – 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Interferentes	Detergentes.	Agentes reductores, tioles, ácido ascórbico y úrico, tirosina, cisteína, triptófano, imidazole, tris, glicina.	Clorofilas, detergentes, agentes reductores, tioles, disulfuros, compuestos quelantes de cobre, carbohidratos, glicerol, tris, tricina, iones $\text{K}^+$ .	Detergentes y agentes desnaturizantes, pigmentos, ácidos nucleicos, etc.
Ventajas	Compatible con agentes reductores.	Compatible con detergentes y agentes desnaturizantes, baja variabilidad.	Alta sensibilidad y precisión.	Pequeño volumen de muestra, rápido, económico.

Fuente: Jonhson, 2012. <http://www.labome.es/method/Protein-Quantitation.html>



# Determinación de proteínas por el método de Bradford

*(Bradford, 1976)*

Este método se basa en la reacción de las proteínas con el colorante azul brillante de Coomassie. Este método es el más ampliamente utilizado para la determinación de proteínas en extractos totales de tejidos vegetales. Este colorante tiene su capacidad de absorción máxima a 465 nm y cuando se acopla con proteínas este pico de absorción se traslada a 595 nm. Existe una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteínas en la muestra. Presenta poca o nula interferencia de iones y carbohidratos como sacarosa. Los componentes que más interfieren son algunos detergentes como SDS y tritón X-100 en concentraciones elevadas. En caso de ser imprescindible utilizarlos, pueden ser removidos por cromatografía de exclusión molecular, diálisis o precipitación con fosfato de calcio o acetona, según el caso.

## Procedimiento

Este protocolo permite cuantificar entre 1 a 10 µg de proteínas en un volumen total de reacción de 300 µl en una placa de multipocillo.

1. Tomar una alícuota de los extractos preparados previamente.
2. Preparar los tubos con la mezcla de reacción, los blancos y la curva de calibración con los testigos con 150 µl de agua (blanco), solución de patrón o muestra de extracto vegetal y 150 µl de mezcla de reacción con azul de Coomassie.
3. Incubar 5 min a 25 °C.
4. Medir la absorbancia a 595 nm en un lector de ELISA. Si la concentración de la muestra supera a la máxima concentración de la curva se debe hacer una dilución de la muestra y utilizar 150 µl de esta dilución para una nueva medición.
5. De la curva con estándares se obtiene una función lineal que relaciona la absorbancia a 595 nm con la concentración de proteína en la mezcla de reacción. Esto permite calcular la concentración de proteína de la muestra, en relación con el peso fresco o peso seco de la muestra o relativizar otras determinaciones al contenido de proteínas.

## Reactivos

### Reactivo de Coomasie

- Pesar 10 mg de azul brillante de Coomasie (G-250).
- Disolver en 5 ml de etanol 95 %.
- Agregar 10 ml de ácido fosfórico 85 % (p/v).
- Enrasar a 100 ml con agua milli-Q.
- Filtrar con papel Whatman N1.
- Precaución: al disolver el reactivo, no agitar. No debe hacer espuma.
- Almacenar en frasco color caramelo a temperatura ambiente.

### Curva de calibración

- Preparar la curva de calibración a partir de dilución de una solución de albúmina de suero bovino 0,1 mg/ml en agua.
- A partir de esta solución stock preparar las distintas concentraciones de BSA con las que se compararán las muestras para determinar en estudio.



**TABLA 10**

Concentración y volúmenes para preparar la curva de calibración.

Concentración final de BSA (µg/ml)	Volumen de BSA (0,1 mg/ml) (µl)	Volumen de agua (µl)
25	250	750
20	200	800
15	150	850
10	100	900
5	50	950
2,5	25	975
1,25	12,5	987,5

### **Bibliografía**

- BONJOCH, N.P.; TAMAYO, P.R. 2001. *Protein Content Quantification by Bradford Method*. En: REI-GOSA, R.M.J. (eds.). *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Springer, Dordrecht.
- BRADFORD, M.M. 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding*. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- JONHSON, M. (traducción Carbajal A). 2012. *Cuantificación de proteínas*. *Mater Methods* 2:115. (Disponible: <http://www.labome.es/method/Protein-Quantitation.html> consultado: 01/02/2018).

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- SEDMARK, J.; GROSSBERG, J.E. 1977. A rapid, sensitive and versatile assay for proteins using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Anal. Biochem.* 79:544-552.
- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook. Ed. Thermo Scientific, 2009. 45 p. (Disponible: [www.piercenet.com/files/1602063\\_PAAssayHB\\_122910.pdf](http://www.piercenet.com/files/1602063_PAAssayHB_122910.pdf) consultado: 30/01/2018).



### 3. Integridad de membranas

La membrana plasmática de las células vegetales está constituida por una bicapa lipídica y proteínas asociadas. La composición y propiedades de los lípidos y proteínas que la constituyen le otorgan características funcionales específicas. Además, las membranas han sido reconocidas como sitios de reacción en diversas condiciones ambientales inductoras de estrés, observándose cambios en los lípidos, como peroxidaciones, y en diferentes actividades enzimáticas. Esto altera la integridad y propiedades fisicoquímicas de la membrana como, por ejemplo, su permeabilidad, resultando en cambios en la capacidad de liberar solutos o electrolitos.

#### Determinación de lípidos peroxidados (malondialdehído)

*(Heath y Packer, 1968; Taulavuori y col., 2001)*

Las oxidaciones celulares generan entre otras modificaciones químicas, la peroxidación de lípidos, lo cual cambia sus propiedades químicas y altera la permeabilidad de las membranas biológicas. Midiendo los productos finales de la peroxidación de lípidos como el malondialdehído (MDA), que es un producto aldehídico secundario de la peroxidación de lípidos, se obtiene un indicador del daño de membranas biológicas por el estrés oxidativo.

Sin embargo, al calentar la mezcla de reacción pueden liberarse lípidos que no estaban peroxidados y también medirse azúcares, antocianinas, polifenoles, entre otros compuestos que absorben a 532 nm. Para sortear estas interferencias, se pueden realizar diversas correcciones.

## Procedimiento

1. Homogeneizar el tejido vegetal (100 mg) en 1 ml de etanol 80 % (v/v) (o TCA 0,1 % (p/v)).
2. Centrifugar el homogenato por 15 min a 12.000 g a 4 °C y recuperar el sobrenadante.
3. Tomar 200 µl de sobrenadante y agregar 400 µl de la mezcla de reacción con TBA.
4. Tomar otros 200 µl de sobrenadante y agregarle 400 µl de la mezcla de reacción sin TBA.
5. Incubar ambas mezclas a 95 °C por 25 min. Frenar la reacción poniendo los tubos en hielo. En lo posible hacer cada muestra por triplicado.
6. Mezclar con vórtex, hacer un spin (12.000 g 1 min) con precaución ya que, si los tubos están muy llenos, al agitarlos vigorosamente, acumulan presión y se abren.
7. Leer la absorbancia a 440, 532 y 660 nm.

## *Mezcla de reacción*

### **Con TBA**

- Disolver 0,01 g de tolueno hidroxibutilado (BHT 0,01 % butylated hydroxyl toluene, inhibidor de peroxidación de lípidos) y disolverlo en etanol.
- Pesar 0,65 g de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,65 % (p/v)) en 100 ml de ácido tricloroacético (TCA) 20 % (p/v).
- Agregar polivinilpirrolidona (PVP) para eliminar polifenoles (Blokhina y col., 1999).

### **Sin TBA**

- Disolver 0,01 g de BTH en TCA 20 % (p/v).
- Agregar PVP para eliminar polifenoles (Blokhina y col., 1999).

## Cálculos

La cantidad final de MDA (µM) se calcula según la siguiente fórmula, sin la corrección de azúcares ni la interferencia inespecífica a 532 nm (sin TBA).

$$MDA = 6,45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0,56A_{440}$$

Para corregir la interferencia de azúcares y otros compuestos con absorbancia inespecífica a las longitudes de onda medidas se hacen los siguientes cálculos:

$$\text{MDA} = \frac{(\text{A} - \text{B})}{156000} \times 10^6$$

$$\text{A} = (\text{A}_{532+\text{TBA}} - \text{A}_{600+\text{TBA}}) - (\text{A}_{532-\text{TBA}} - \text{A}_{600-\text{TBA}})$$

$$\text{B} = (\text{A}_{440+\text{TBA}} - \text{A}_{600+\text{TBA}}) \times 0,0571$$

532 nm: MDA; 600 nm: turbidez; 440nm: absorción de azúcares en complejo con TBA. Coeficiente de extinción molar: 156 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> DO 532nm.

El resultado obtenido de los cálculos previos está expresado en nmoles/ml. A partir de esos valores, calcular los mg de peso fresco o seco que hay en 1 ml de extracto para expresar como nmoles o μmoles/mg de peso fresco o peso seco. También se puede relativizar el contenido de proteínas o ARN por unidad de peso fresco o seco de la muestra.

Haciendo una curva de calibración de sacarosa con TBA y midiendo a 440 nm se puede obtener una aproximación del contenido de azúcares solubles de las muestras.

Importante: al poner a punto la técnica, no solo es necesario determinar la cantidad óptima de tejido para las mediciones, sino también corroborar la interferencia de azúcares y otros compuestos, según el tejido y la especie vegetal con la que se trabaje, midiendo la misma muestra, por ejemplo, con y sin TBA o con y sin PVP, etc., tanto en la condición control como en el tratamiento.

## Bibliografía

- BLOKHINA, O.B.; FAGERSTEDT, K.V.; CHIRKOVA, T.V. 1999. Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post anoxic reaeration. *Physiol. Plant* 105:625-632.
- DHINDSA, R.; PLUM-DHINDSA, P.; THORPE, A. 1981. Leaf Senescence: Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation, and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase. *J. Exp. Bot.* 32: 93-101.
- DU, Z.; BRAMLAGE, W.J. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J Agric Food Chem* 40:1566-1570.
- HEATH, R.L.; PACKER, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:189-198.
- HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207:604-611.
- TAULAVUORI, E.; HELLSTRÖM, E.K.; TAULAVUORI, K.; LAINE, K. 2001. Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *J. Exp. Bot.* 52:2375-80.

# Determinación de permeabilidad de membranas

*(Modificado de Blum y Ebercon, 1981)*

Otro de los impactos del estrés en los tejidos vegetales es la alteración de la integridad de las membranas celulares, lo cual resulta en perturbaciones o su pérdida total de la función biológica y finalmente en la muerte de la célula.

Se sabe que la pérdida de funcionalidad de las membranas biológicas debido al estrés aumenta su permeabilidad con lo cual se incrementa la liberación de iones al medio. Esto puede ser medido por cambios en la conductividad, generadas por el aumento de la concentración de iones provenientes del interior celular.

## Procedimiento

1. Cortar las hojas o discos de hoja (área foliar entre 15 y 25 cm<sup>2</sup>).
2. Lavar 3 veces con agua milli-Q o desionizada para eliminar los electrolitos liberados debido al corte del tejido. No dejar que se deshidraten antes de sumergir en el líquido del ensayo.
3. Colocar cada hoja en un tubo de Khan con 10-20 ml de agua mili-Q.
4. Incubar 24 h a temperatura ambiente (25 °C) en oscuridad.
5. Medir la conductividad eléctrica (CE1).
6. Calentar 100 °C durante 30 min en un baño termostatzado (o autoclavar 15 min), para destruir la integridad de las membranas celulares permitiendo la liberación completa del contenido celular. Verificar que luego del calentamiento, los tubos mantengan constante el volumen de líquido.
7. Una vez enfriados los tubos, medir la conductividad eléctrica (CE2). Precaución: medir la conductividad siempre a la misma temperatura para evitar sesgos en las mediciones.

## Cálculos

Calcular el porcentaje de daño de membrana y de injuria según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Daño de membrana (\%)} = 1 - \frac{\left(\frac{T_f - T_i}{T_f}\right)}{\left(\frac{C_f - C_i}{C_i}\right)} \times 100$$

$$\text{Injuria (\%)} = 1 - \frac{1 - (T_f - T_i)}{1 - (C_f - C_i)} \times 100$$

Donde T y C son los valores de CE de los materiales en los tratamientos y en control; los subíndices 1 y 2 representan las lecturas: inicial y final, respectivamente. La relación  $(T_2 - T_1)/T_2$  indicaría la proporción de retención de electrolitos en el tejido.

Calcular el  $\Delta C$  promedio de cada tratamiento o genotipo y luego calcular el % para cada  $\Delta T$ .

### **Bibliografía**

- BLUM, A.; EBERCON, A. 1981. Cell Membrane Stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop. Sci.* 21: 43-47. (Disponible: [http://www.plantstress.com/Methods/CMS\\_method.htm](http://www.plantstress.com/Methods/CMS_method.htm) consultado: 20/12/2017).





## 4. Ajuste osmótico

El ajuste osmótico consiste en la acumulación de solutos en respuesta al déficit hídrico y a la disminución del potencial hídrico total de los tejidos vegetales; como resultado, las plantas pueden absorber agua y mantener la actividad fisiológica. La acumulación activa de solutos en la célula puede contribuir a mantener la turgencia, factor fundamental para el crecimiento o la supervivencia durante el estrés hídrico.

El ajuste osmótico se da en las plantas a través de la biosíntesis de osmolitos (compuestos orgánicos de bajo peso molecular) y por la acumulación de iones, fundamentalmente  $K^+$ . Dado que en general, las enzimas son sensibles a las altas concentraciones de otros iones, como el  $Na^+$ , su acumulación durante el ajuste osmótico ocurre en compartimentos subcelulares, principalmente en la vacuola; mientras, en el citoplasma se acumulan solutos osmocompatibles que no afecten la funcionalidad de macromoléculas celulares. Estos osmolitos compatibles pueden ser principalmente polialcoholes (azúcares), metilaminas, aminoácidos libres y derivados de aminoácidos, entre otros.

A continuación, presentamos algunos métodos comunes para la determinación de algunos de estos compuestos osmocompatibles (prolina, azúcares e iones).

### Determinación de prolina

*(Bates y col., 1973)*

La prolina es uno de los metabolitos osmocompatibles más estudiados y se acumula en numerosas condiciones de estrés. En vegetales, se acumula principalmente bajo condiciones que causan deshidratación, tales como sequía, alta salinidad y congelamiento. También ocurre, aunque en menor magnitud, en respuesta a metales pesados, en interacciones planta-patógeno y otros estímulos bióticos y abióticos.

La acumulación citosólica de prolina reduce el potencial hídrico intracelular, lo cual disminuye el daño debido a las altas fuerzas iónicas causadas por la deshidratación. También se ha propuesto que la acumulación de prolina y la consecuente alteración de su metabolismo durante el estrés tiene efectos a distintos niveles y podría afectar la provisión de energía, distribución de equivalentes de reducción en distintas localizaciones subcelulares, alteraciones de estado redox, entre otros, con efectos esenciales en la supervivencia de la planta. Durante la recuperación del estrés, la prolina acumulada sufre de potencial reductor y electrones para generar energía y esqueletos carbonados, contribuyendo a restablecer el funcionamiento celular y promover el crecimiento del organismo.

Aquí presentamos el método más usado, por lo simple y económico, para su determinación por espectrofotometría, aunque también puede determinarse por otras técnicas como HPLC y TLC.

### *Procedimiento*

1. Pesar hojas y congelar. Se recomienda utilizar entre 20 y 100 mg de tejido fresco.
2. Homogeneizar muy bien en nitrógeno líquido y luego agregar el ácido sulfosalicílico; u homogeneizar directamente con el ácido sulfosalicílico en mortero frío (a 4 °C, en hielo). El ácido sulfosalicílico contribuye a la precipitación de las proteínas del extracto vegetal.
3. Agregar 5 µl de ácido sulfosalicílico 3 % (p/v) por miligramo de peso fresco (20 mg/100 µl sulfosalicílico). Precaución: la cantidad mínima de tejido necesaria para la detección de prolina en condiciones control debe ser ajustada, dado que en numerosas especies el contenido basal en tejidos no estresados es muy bajo. Además, varía con la edad del tejido.
4. Mezclar con vórtex.
5. Centrifugar 10 min a 13.000 g a 4 °C.
6. Sacar 100 µl sobrenadantes y agregar 100 µl de ácido sulfosalicílico 3 % (p/v), 200 µl de ninhidrina ácida 2,5 % (p/v) y 200 µl de ácido acético 96 % (v/v). Precaución: se pueden modificar los volúmenes, pero no las proporciones. No olvidar hacer la curva de calibración en iguales volúmenes que el sobrenadante (100 µl en este caso). No olvidar el blanco con ácido sulfosalicílico. Se recomienda hacer las mediciones por triplicado.
7. Mezclar bien.
8. Incubar 1 hora a 95 °C. Hacer orificios muy pequeños para que no se abran los tubos y no se evapore la solución.
9. Enfriar en hielo.
10. Agregar 600 µl de tolueno (o proporcional, es 1 volumen de mezcla: 1 volumen de tolueno). Agitar vigorosamente y dejar que las fases se separen (1 min aproximadamente o dar un spin en la centrifuga).

11. Tomar el sobrenadante (fase de tolueno coloreado, arriba) y colocar en tubos nuevos. Se puede diluir con tolueno si está saturado.
12. Medir en cubetas de cuarzo a 520 nm.

## Reactivos

### **Ninhidrina ácida 2,5 % (p/v)**

- Pesar 1,25 g de ninhidrina.
- Agregar 30 ml de ácido acético glacial.
- Agregar 20 ml de ácido orto fosfórico (6M).
- Enrasar a 50 ml.
- Calentar hasta disolver.
- Guardar a 4 °C por dos semanas como máximo.

### **Ácido sulfosalicílico 3 % (p/v)**

- Disolver 0,6 g de ácido sulfosalicílico en 20 ml de agua destilada.

### **Ácido ortofosfórico 6M**

- Diluir 13,82 ml de ácido ortofosfórico 85 % v/v en 20 ml de volumen final agregando 6,18 ml H<sub>2</sub>O milli-Q.

## Curva de calibración

- Preparar un stock de prolina 100 mM (PM: 115,13 g).
- Conservar a -20 °C.

En cada medición preparar diluciones por duplicado desde 0,01 mM hasta 1 mM (dependiendo del rango de medición del espectrofotómetro).

**TABLA 11**

Concentración y volúmenes para preparar la curva de calibración.

Concentración de prolina ( $\mu\text{M}$ )	Prolina 5 mM ( $\mu\text{l}$ )	Ácido sulfosalicílico 3 % ( $\mu\text{l}$ )
0 (Blanco)	0	500,0
25	2,5	492,5
50	5	485,0
100	10	490,0
150	15	485,0
250	25	475,0
500	50	450,0

### **Bibliografía**

- BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. 1973. *Rapid determination of proline for water-stress studies. Plant & soil* 39: 205-207.
- MONTEOLIVA, M.I. 2012. *Contribución del catabolismo de L-prolina a la Respuesta Hipersensible en Arabidopsis. Tesis Doctoral, UNC.*
- MORENO, L.P. 2009. *Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión Agron. colomb.* 27:179-191.
- RIZZI, Y.S.; MONTEOLIVA, M.I.; FABRO, G.; GROSSO, C.L.; LARÓVERE, L.E.; ALVAREZ, M.E. 2015. *P5CDH affects the pathways contributing to Pro synthesis after ProDH activation by biotic and abiotic stress conditions. Front Plant Sci* 6:572.

## **Determinación de azúcares solubles totales por antrona**

**(Morris, 1948)**

En los tejidos vegetales, los azúcares, productos primarios de la fotosíntesis, proveen energía y esqueletos carbonados para formar otros compuestos orgánicos, pero al mismo tiempo desempeñan otras funciones claves como contribuir al ajuste osmótico, mencionado previamente en esta sección y, a bajas concentraciones, señalizan diversos procesos celulares.

Entre los métodos más utilizados para la determinación del contenido de azúcares en tejidos vegetales se encuentra la reacción con antrona. Esta es una prueba

general para hidratos de carbono con una sensibilidad de 3 µg/ml. El ácido sulfúrico concentrado hidroliza enlaces glucosídicos para dar monosacáridos que pueden ser luego deshidratados dando furfural y sus derivados. Estos productos se combinan luego con antrona (9,10 dihidro-9-oxoantraceno) dando un complejo azul-verdoso.

### Procedimiento

1. Homogeneizar 50 mg (peso fresco) de tejido vegetal y extraer con 0,5 ml de buffer de extracción.
2. Centrifugar 30 min a 13.000 g a 4 °C.
3. Recuperar el sobrenadante para determinar el contenido de azúcares. El pellet puede ser utilizado para determinar el contenido de almidón.
4. Tomar 0,5 ml de sobrenadante y agregar 1 ml de solución de antrona 0,1 % (p/v). Mantener en hielo. No olvidar la curva patrón de glucosa (10-100 µg/ml) y el blanco con el buffer de extracción. Precaución: el reactivo de antrona una vez preparado es muy viscoso, especialmente cuando está frío.
5. Mezclar y calentar por 5 min a 100 °C y enfriar rápidamente en hielo.
6. Leer la absorbancia a 620 nm dentro de la hora siguiente por triplicado, contra el blanco.

En el ensayo de antrona no se diferencian azúcares monoméricos reductores de no reductores. El resultado refleja los azúcares solubles totales.

También se puede realizar una extracción alcohólica (etanol 80 %; 80 °C) o con metanol/cloroformo/agua.

### Reactivos

#### **Buffer de extracción**

Preparar el buffer de extracción tomando las alícuotas correspondientes de las soluciones de stock, para que las concentraciones finales sean las que se detallan a continuación:

- 50 mM HEPES–KOH (pH 8,3)
- 2 mM EDTA
- 2 mM EGTA
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 mM MnCl<sub>2</sub>
- 2 mM DTT

### **Reactivo de antrona 0,1 % (p/v)**

- Disolver 0,5 g de antrona en 500 ml de ácido sulfúrico concentrado 72 % v/v.

Para mantener su estabilidad por hasta 3-4 días, se puede conservar protegido de la luz en botella de color caramelo a 4 °C. Se debe realizar una nueva curva patrón cada vez que se prepara reactivo nuevo.

### **Soluciones stock para buffer de extracción**

- HEPES–KOH 50 mM (pH 8,3)

Ver Anexo II

### **Cloruro de magnesio 10 mM (10X)**

- Pesar 9,5 mg de  $MgCl_2$ .
- Diluir y enrasar a 10 ml con agua destilada.

### **Cloruro de manganeso 10 mM (10X)**

- Pesar 12,58 mg de  $MnCl_2$ .
- Diluir y enrasar a 10 ml con agua destilada.

### **DTT 20 mM**

- Pesar 3 mg de ditioneol.
- Disolver en 1 ml d agua destilada.
- Conservar a -20 °C.

### **EDTA y EGTA**

Ver Anexo III

## *Curva de calibración*

Se recomienda preparar la curva de calibración según la siguiente tabla:

**TABLA 12**

Concentración y volúmenes para preparar la curva de calibración.

Concentración de glucosa (µg/ml)	Volumen de glucosa 1 mg/ ml (µl)	Volumen de agua (µl)
Blanco	0	500
20	10	490
40	20	480
60	30	470
80	40	460

### ***Bibliografía***

- FALES, F.W. 1951. *The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells.* J. Biol. Chem. 193:113-24.
- MORRIS, D.L. 1948. *Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent.* Science 107:254-255.
- RODRÍGUEZ, M.; TALEISNIK, E.L.; LENARDON, S.; LASCANO, H.R. 2010. *Are Sunflower chlorotic mottle virus infection symptoms modulated by early increases in leaf sugar concentration?* J. Plant. Physiol. 166:1123-1140.
- SUNKAR, R. (ed.). 2010. *Plant Stress Tolerance, Methods in Molecular Biology* 639, DOI 10.1007/978-1-60761-702-0\_22

## Determinación de sacarosa, glucosa, fructuosa y trehalosa por HPLC

(Rodríguez y col., 2010)

### Procedimiento

1. Cortar 100 mg de peso fresco de tejido vegetal con escalpelo<sup>4</sup>.
2. Extraer en 0,9 ml de etanol 80 % (v/v).
3. Calentar 20 min a 80 °C.
4. Centrifugar el extracto 10 min a 12.000 g.
5. Recuperar el sobrenadante y repetir 3 veces el proceso de extracción con etanol caliente.

[ 4. Es importante que este paso se haga rápido para evitar que cambien las proporciones de los carbohidratos por hidrólisis enzimáticas. ]

6. Evaporar el sobrenadante en estufa a 60 °C y resuspender en 0,5 ml de agua milli-Q.
7. Centrifugar 5 min a 12.000 g.
8. Filtrar las muestras con filtros de 0,2 µm de diámetro de poro para evitar tapar las columnas del HPLC.
9. Conservar a 4 °C hasta su determinación, por no más de 3 meses.

### *Condiciones de corrida*

El equipo es un HPLC Shimadzu A20 con horno e inyector automático de capacidad máxima 100 µl.

- Detección: índice de refracción. Detector: RID A10.
- Columna: Luna NH2 Phenomenex (25 x 4 cm, 5 µm).
- Fase móvil: acetonitrilo:agua (80:20 v/v).
- Flujo: (3 ml/min).
- Temperatura: 40 °C.
- Tiempo de corrida: 7 min.
- Supresión: no.

### *Bibliografía*

- SUNKAR, R. (ed.). 2010. *Plant Stress Tolerance, Methods in Molecular Biology* 639, DOI 10.1007/978-1-60761-702-0\_22
- RODRÍGUEZ, M.; TALEISNIK, E.L.; LENARDON, S.; LASCANO, H.R. 2010. *Are Sunflower chlorotic mottle virus infection symptoms modulated by early increases in leaf sugar concentration?* *J. Plant. Physiol.* 166:1123-1140.

---

## Determinación de iones solubles por HPLC

*(Cataldi y col., 2003; Munns y col., 2010)*

El mantenimiento de la homeostasis iónica es crucial para el normal crecimiento de las plantas durante el estrés por salinidad. Bajo este estrés se producen alteraciones en la concentración de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> a nivel celular. Este último catión es esencial para el crecimiento y el desarrollo, y la inhibición de su absorción puede conducir a una menor productividad e incluso a la muerte de las plantas. La selectividad de K<sup>+</sup>, el intercambio K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> y la reabsorción de Na<sup>+</sup> en tejidos han sido extensamente estudiados en numerosas especies para evaluar la tolerancia a salinidad.



Existe variabilidad genética en diferentes especies en la tasa de acumulación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en hojas, así como en el grado de tolerancia a estos iones en distintos tejidos. En trigo, por ejemplo, menor concentración de ion  $\text{Na}^+$  a nivel de hoja se correlacionó con mayor tolerancia a la salinidad. Asimismo, se ha identificado una correlación positiva entre tolerancia a salinidad y exclusión de  $\text{Na}^+$  en otras poblaciones de gramíneas.

### Procedimiento

1. Se aconseja usar un peso fresco de muestra de entre 10 a 100 mg.
2. Pesar el material en una balanza de precisión sobre papel de aluminio debidamente identificado.
3. Una vez pesado, hacer un sobrecito con el papel de aluminio y congelar inmediatamente en  $\text{N}_2$  líquido.
4. Moler en mortero con más  $\text{N}_2$  líquido hasta obtener un polvo fino (esto es muy importante).
5. Recuperar este polvito en un tubo de centrifuga y resuspender con agua milli-Q hasta el enrase final (conviene usar tubos de 2 ml o más para esto). No olvidar agregar un tubo más con agua Milli-Q sola, al procesar como el resto de las muestras a partir de este momento, para usar como blanco en el equipo de medición.
6. Agitar en vórtex por 15 min.
7. Centrifugar a  $>3.000$  rpm por 10 min para obtener un buen pellet.
8. Separar el sobrenadante y filtrar (filtro de nylon  $0.22 \mu\text{m}$  de diámetro de poro) directamente en los tubos de HPLC si va a realizar la corrida en el momento.
9. En caso contrario, colectar el filtrado en viales y conservar a  $-20^\circ\text{C}$  (si no hay cambios de temperatura accidentales, se puede guardar indefinidamente). El día de la medición, descongelar en la mesada a temperatura ambiente y pasar luego directamente a los viales del HPLC.

### *Condiciones de corrida*

El equipo es un HPLC Shimadzu A20 con horno e inyector automático de capacidad máxima  $100 \mu\text{l}$ .

Detector: conductímetro.

#### **Para medir cationes**

- Columna: Shim-pack IC-C3 con precolumna IC-C3G.

- Fase móvil: ácido oxálico 3 mM filtrado y desgasificado en el momento (15 min en sonicador de baño, modo "degassing").
- Temperatura: 40 °C.
- Tiempo de corrida: 20 min.
- Supresión: no.

### **Para medir aniones**

- Fase móvil aniones concentrada 36 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (105,98 g/mol): pesar 3,81 g/L. La fase móvil diluida para la separación es 3,6 mM: diluir usando 100 ml de la concentrada por cada litro de solución final. Desgasificar igual que la anterior.
- Columna: Shim-pack IC-SA3 con precolumna.
- Fase móvil: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3,6 mM filtrado y desgasificado en el momento (15 min en sonicador de baño, modo "degassing").
- Temperatura: 45 °C.
- Tiempo de corrida: 25 min.
- Supresión: sí.

### **Bibliografía**

- CATALDI, T.R.; MARGIOTTA, G.; DEL FIORE, A.; BUFO, S.A. 2003. *Ionic Content in Plant Extracts Determined by Ion Chromatography with Conductivity Detection. Phytochem Anal.* 14:176-183.
- MUNNS, R.; JAMES, R.A.; SIRAUULT, X.R.R.; FURBANK, R.T.; JONES, H.G. 2010. *New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. J. Exp. Bot.* 61: 3499-3507.



## 5. Pigmentos asociados a la fotosíntesis

### Determinación de clorofilas y carotenoides

*(Wickliff y Aronoff, 1962)*

Las clorofilas son los principales pigmentos fotosintéticos y forman parte de los complejos antena junto con los carotenoides, que también actúan como antioxidantes en algunas condiciones de estrés. Existen algunos métodos que permiten determinar el verdor, pero en condiciones de deshidratación de los tejidos los valores de verdor pueden estar distorsionados por el espesor y la densidad del tejido.

#### Procedimiento

1. Pesar y congelar muestra a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  solo se conserva unos días). Pesar una muestra equivalente para relativizar los resultados finales al peso seco dado que los tratamientos de deshidratación generan cambios en la biomasa fresca que puede conducir a sobrestimar el contenido medido.
2. Homogeneizar las muestras en hielo, con  $50\text{ }\mu\text{l}$  de solvente/mg de peso fresco (etanol 95 % v/v, metanol puro o acetona pura, fríos, para reducir la degradación de clorofilas a feofitinas). Proteger de la luz (reducir la exposición lo más que se pueda).
3. Calentar 20 min a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , centrifugar 5 min a 5.000 rpm a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Volver a extraer con el mismo volumen. Centrifugar 12.000 g por 5 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
4. Tomar el sobrenadante, diluir y medir (1/5 o 1/10, ajustar la dilución).

**TABLA 13**

Longitudes de onda a las cuales medir clorofilas según el solvente.

	Clorofila a	Clorofila b
Etanol 95 % (v/v)	664 nm	649 nm
Acetona 100 % (v/v)	662 nm	645 nm
Acetona 80 % (v/v)	663 nm	647 nm
Metanol 100 % (v/v)	665 nm	652 nm
Metanol 90 % (v/v)	665 nm	652 nm
Medir carotenoides a 470 nm en todos los solventes		

Hacer triplicados (biológicos) como mínimo y de cada muestra medir también por triplicado (técnicos).

Calcular la concentración de clorofilas con las fórmulas presentadas a continuación. La última permite el cálculo para carotenoides. Las concentraciones obtenidas son en µg de clorofilas o carotenoides/ml de extracto. Hacer los cálculos para relativizarlo a peso fresco, según como se haya hecho la extracción (o a peso seco en caso de tratamientos con déficit hídrico).

### Cálculos

#### **Etanol (95 %)**

$$C_a = 13,36 A_{664,2} - 5,19A_{648,6}$$

$$C_b = 27,43A_{648,6} - 8,12A_{664,2}$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{1000 A_{470} - 2,13 C_a - 97,64 C_b}{209}$$

#### **Acetona (100 %)**

$$C_a = 11,24 A_{661,6} - 2,04 A_{644,8}$$

$$C_b = 20,13 A_{644,8} - 4,19 A_{661,6}$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{1000 A_{470} - 1,90 C_a - 63,14 C_b}{214}$$

### Acetona (80 %)

$$Ca = 12,25 A_{663,2} - 2,79 A_{646,8}$$

$$Cb = 21,50 A_{646,8} - 5,10 A_{663,2}$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{1000 A_{470} - 1,83 C_a - 85,02 C_b}{198}$$

### Metanol (100 %)

$$Ca = 16,72 A_{665,2} - 9,16 A_{652,4}$$

$$Cb = 34,09 A_{652,4} - 15,28 A_{665,2}$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{1000 A_{470} - 1,63 C_a - 104,96 C_b}{221}$$

### Metanol (90 %)

$$Ca = 16,82 A_{665,2} - 9,28 A_{652,4}$$

$$Cb = 36,92 A_{652,4} - 16,54 A_{665,2}$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{1000 A_{470} - 1,91 C_a - 95,15 C_b}{225}$$

### Bibliografia

- BRUINSMA, J. 1963. *The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. Photochem and Photobiol (Chlor. Metabol. Sym.)* 2:241-249.
- LICHTENTHALER, H.K. 1987. *Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. Methods in Enzymology* 148:350-382.
- WICKLIFF, J.L.; ARNOFF, S. 1962. *Quantitative measurement of leaf chlorophylls by spectrophotometry of their pheophytins in aqueous alcoholic extracts. Plant Physiology* 37:584-589.



# A n e x o s

## Anexo I

### Buffer fosfato de potasio 0,1 M

#### Solución A (1 M)

- Pesar 68,045 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- Disolver y enrasar a 500 ml de agua.

#### Solución B (1 M)

- Pesar 87,09 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .
- Disolver y enrasar a 500 ml de agua.

Según indica la tabla A1, seleccionar el pH deseado, mezclar los volúmenes indicados de las soluciones A y B, y diluir con agua hasta 1000 ml (concentración final 0,1 M).

Esto puede hacerse para diluciones o soluciones más concentradas entre 5 y 10 veces, proporcionando las cantidades de fosfato de potasio (o sodio) en el mismo volumen. Los buffers de fosfato muestran cambios de pH dependientes de la concentración, por lo cual es necesario confirmar el pH de la solución luego de diluirla y luego enrasar al volumen final.



**TABLA A.1.**

Preparación de buffer fosfato de potasio (o sodio) 0,1 M.

pH deseado (25 °C)	Solución A $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1 M (ml)	Solución B $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1 M (ml)
5,8	91,5	8,5
6,0	86,8	13,2
6,2	80,8	19,2
6,4	72,2	27,8
6,6	61,9	38,1
6,8	50,3	49,7
7,0	38,5	61,5
7,2	28,3	71,7

pH deseado (25 °C)	Solución A KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M (ml)	Solución B K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M (ml)
7,4	19,8	80,2
7,6	13,4	86,6
7,8	9,2	90,8
8,0	6,0	94,0

### ***Bibliografía***

- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. A1.5.

## **Anexo II**

### **Buffer HEPES 1 M (pH 8,3)**

- Pesar 238,3 g de ácido N-(2-Hidroxietil)-piperazina-N'-etanosulfónico (HEPES).
- Disolver en una parte del agua destilada necesaria.
- Ajustar el pH con NaOH o KOH.
- Enrasar a 500 ml con agua destilada.
- Filtrar si es necesario y conservar a -20 °C.

### ***Bibliografía***

- <http://biologicalworld.com/hepes.htm> consultado: 14/01/2018.



## Anexo III

### **EDTA 500 mM**

Peso molecular: 292,24 g/l.

- Pesar 73,06 g de EDTA.
- Disolver en una fracción del volumen final de agua destilada.
- Agregar NaOH hasta que se disuelva completamente (alrededor de pH 8,0).
- Se puede llevar a pH 7,5 o dejar en pH 8,0.
- Enrasar a 500 ml con agua destilada.

### **EGTA 500 mM**

Peso molecular: 380,35 g/l.

- Pesar 95,0875 g de EGTA.
- Disolver en una fracción del volumen final de agua destilada.
- Agregar NaOH hasta que se disuelva completamente (alrededor de pH 8,0).
- Se puede llevar a pH 7,5 o dejar en pH 8,0.
- Enrasar a 500 ml con agua destilada.

Este libro es producto de un Taller de formación dictado en el Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (IFRGV, CIAP, INTA) en 2017. El taller estuvo dirigido a la difusión de las técnicas y metodologías disponibles actualmente para el abordaje de investigaciones fisiológicas y ecofisiológicas de la tolerancia al estrés abiótico.

Así el libro consta de dos partes, una primera parte enfocada en difundir las disertaciones del taller y a sus autores; y una segunda parte, en la cual recopilamos y sistematizamos las técnicas bioquímicas y fisiológicas más difundidas y utilizadas actualmente para que estén disponibles para todo aquel que las necesite.

Además, se espera fortalecer y continuar las interacciones y colaboraciones entre grupos de diversas instituciones de todo el territorio nacional que se lograron durante el taller, para potenciar la producción de conocimiento básico, aplicado y tecnológico, en lo que respecta a la fisiología y ecofisiología vegetal. También buscamos contribuir a la capacitación y perfeccionamiento de los profesionales que trabajan en estas áreas mejorando la calidad científica nacional.



Ministerio de Ciencia,  
Tecnología e Innovación Productiva  
Presidencia de la Nación



Secretaría  
de Agroindustria



Ministerio de Producción y Trabajo  
Presidencia de la Nación