

UCH-FC  
Biotecnología  
V443  
C.1



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

**"Efecto bioestimulante de *Arthrospira maxima* en plantas"**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular por

**Valentina del Carmen Veloso Giménez**

Director de Seminario de Título: Dr. Patricio Arce

Co-director de Seminario de Título: Dr. Franko Restovic

Patrocinante de Seminario de Título: Dr. Michael Handford

Diciembre, 2016

Santiago – Chile



**INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Valentina del Carmen Veloso Giménez**

**“Efecto bioestimulante de *Arthrospira maxima* en plantas”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. Patricio Arce

**Director Seminario de Título**

Dr. Franko Restovic

**Co-Director**

Dr. Michael Handford

**Patrocinante**

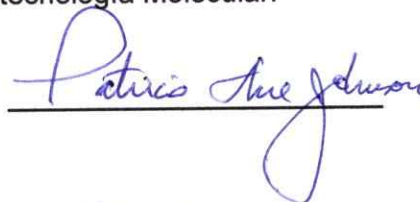
**Comisión de Evaluación**

Dra. Claudia Stange


**Presidente Comisión**

Dra. Loreto Prat

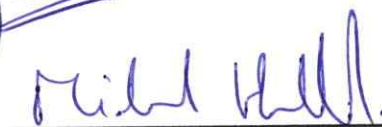
**Evaluador**



---



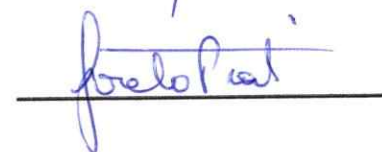
---



---



---



---

Santiago de Chile, .....



## BIOGRAFÍA



Llegué a este mundo un 12 de septiembre de 1991, a pesar del desolador pronóstico que les dieron a mis padres. Poco a poco, y gracias al amor de mi familia fui tomando fuerzas y creciendo paso a paso.

Mi infancia estuvo llena de momentos felices, siempre jugando, saltando, riendo y corriendo junto a mi hermano y mis primos. En el colegio tuve un curso increíble. Viví grandes experiencias, que sacan más de una sonrisa cuando las recordamos juntos. Conocí a grandes personas junto con las que crecí y me forjé, y lo más importante, conocí a grandes amigos que conservo hasta el día de hoy.

Entré a estudiar ingeniería en biotecnología molecular muy motivada por mi vocación por la ciencia, aunque no estaba muy segura como sería mi futuro una vez que saliera. El paso por la universidad sin duda tuvo varios momentos dulces y algunos no tanto. Conocí a personas maravillosas y grandes amigos. Estudiar en la facultad me hizo abrir los ojos al mundo, madurar y vivir nuevas experiencias, sin duda, si tuviera que volver a elegir, recorrería el mismo camino. Luego, hice mi seminario de título en la Pontificia Universidad Católica, donde conocí a un gran grupo, y crecí profesionalmente.

Es tiempo de cerrar este ciclo para seguir recorriendo caminos, pero sin duda agradezco a la vida los momentos felices y los difíciles que me han hecho muchas veces, sin darme cuenta, recorrer lo vivido.



Dedicada a mi familia por ser el pilar de mi vida,  
en especial a mi madre por darme y enseñarme la vida  
y por apoyarme incondicionalmente

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a al Dr. Patricio Arce, mi director de seminario de título, por permitir integrarme a su laboratorio, por su confianza y apoyo durante este proceso.

Al Dr. Michael Handford, por su constante preocupación, excelente disposición y por su colaboración en este trabajo.

A Franko, mi tutor de seminario de título, gracias por darme la libertad y la confianza que necesité durante este periodo de aprendizaje, por tu enorme paciencia y conocimientos que fueron esenciales en todo el desarrollo de este trabajo.

A Roy y Alejandra, por su siempre buena disposición y colaboración en este trabajo. Gracias por enseñarme y apoyarme en tantas cosas.

A Martita, por ser una excelente compañera, por tu apoyo y por tu buena onda siempre. Agradezco a todos los integrantes y ex integrantes del laboratorio, porque son un grupo increíble, gracias por su ayuda, compañía, buena onda, apoyo y gratos momentos que compartimos.

A mis padres que me dieron la vida y me han alentado y apoyado en cada etapa de este proceso.

A todos y cada uno de los integrantes de mi familia, porque son lo más preciado, gracias por creer en mí y por acompañarme desde siempre.

A Guille, por ser el mejor partner, por tu comprensión y apoyo siempre.

Al Dany, por tu paciencia infinita y gran disposición en la elaboración de las figuras de este seminario

A mis amigos y amigas, por construir muchos de los bonitos recuerdos de esta vida.

Y a cada persona que de alguna u otra forma me acompañó y apoyó en este proceso.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>BIOGRAFÍA</b> .....	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Situación actual de la agricultura mundial.....	1
Bioestimulantes.....	2
Mecanismos moleculares involucrados en la bioestimulación de plantas.....	8
Rol de las cianobacterias en la bioestimulación de plantas.....	10
<i>Arthrospira maxima</i> como potencial bioestimulante.....	12
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
1. Cultivos cianobacterianos y condiciones de crecimiento.....	16
1.1. Origen.....	16
1.2. Estandarización de las condiciones de cultivo de <i>Arthrospira maxima</i> .....	16
1.3. Crecimiento de <i>Arthrospira maxima</i> en fotobiorreactores tipo batch.....	16
1.4. Obtención de biomasa de <i>Arthrospira maxima</i> .....	17
2. Material vegetal, condiciones de crecimiento y ensayos con <i>Arthrospira maxima</i> .....	18
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Lactuca sativa</i> .....	18
2.1.1. Análisis fenotípico de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Lactuca sativa</i> .....	19
2.1.1.1. Diámetro de la roseta, biomasa fresca y seca.....	19
2.1.1.2. Desarrollo del sistema radicular.....	20
2.1.1.3. Cuantificación de clorofila a, b y total.....	20
2.1.1.4. Germinación.....	21

2.1.1.5. Tolerancia al estrés salino.....	22
2.2. <i>Solanum lycopersicum</i> .....	22
2.2.1. Análisis fenotípico de <i>Solanum lycopersicum</i> .....	23
2.2.1.1. Número de frutos, diámetro ecuatorial, número de semillas, biomasa, rendimiento y % de sólidos solubles totales de los frutos y biomasa fresca de las plantas .....	23
3. Análisis de la expresión génica de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> tratadas con <i>Arthrospira maxima</i> .....	24
3.1. Extracción de RNA de tejido aéreo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	24
3.2. Síntesis de cDNA.....	25
3.3. Amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26
3.4. PCR en tiempo real o q-RT-PCR .....	27
3.4.1. Estandarización de partidores .....	27
3.4.2. Determinación de los niveles de expresión génica en <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> .....	29
4. Análisis estadístico y procesamiento de imágenes .....	30
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
1. Estandarización de las condiciones de cultivo y obtención de biomasa de <i>Arthrospira maxima</i> .....	31
1.1. Condiciones de cultivo de <i>Arthrospira maxima</i> .....	31
1.2. Obtención de biomasa de <i>Arthrospira maxima</i> .....	33
2. Análisis fenotípico del crecimiento vegetativo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Lactuca sativa</i> tratadas con <i>Arthrospira maxima</i> .....	35
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	35
2.1.1. Crecimiento aéreo y radicular .....	35
2.1.2. Germinación .....	39
2.1.3. Contenido de clorofila.....	40
2.1.4. Tolerancia al estrés salino.....	42
2.2. <i>Lactuca sativa</i> .....	44
2.2.1. Crecimiento aéreo .....	44
2.2.2. Tolerancia al estrés salino.....	48
3. Análisis fenotípico de los frutos de plantas <i>Solanum lycopersicum</i> tratadas con <i>Arthrospira maxima</i> .....	50

3.1. Número de frutos por planta, diámetro ecuatorial, % de sólidos solubles totales de los frutos y número de semillas por fruto .....	50
3.2. Biomasa y rendimiento de los frutos .....	53
3.3. Biomasa del tejido aéreo y radicular .....	55
4. Análisis de la expresión génica de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> tratadas con <i>Arthrospira maxima</i> .....	56
4.1. Estandarización de partidores .....	57
4.2. Determinación de los niveles de expresión génica en <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
<b>DISCUSIONES</b> .....	<b>60</b>
Obtención de biomasa de <i>Arthrospira maxima</i> .....	60
Efecto del tratamiento con <i>A. maxima</i> sobre el crecimiento vegetativo.....	62
Efecto del tratamiento con <i>A. maxima</i> sobre la tolerancia al estrés salino .....	68
Efecto del tratamiento con <i>A. maxima</i> sobre la producción de frutos .....	71
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>74</b>
<b>PROYECCIONES</b> .....	<b>76</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>78</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>84</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1:** Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y q-RT-PCR..... 26

**Tabla 2:** Estandarización de partidores obtenida para el análisis de q-RT-PCR..... 57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Diagrama explicativo del montaje y configuración de fotobiorreactores tipo batch para el crecimiento de <i>Arthrospira maxima</i> .....	17
<b>Figura 2:</b> Curva de crecimiento de <i>Arthrospira maxima</i> determinada mediante densidad óptica .....	32
<b>Figura 3:</b> Montaje y configuración de fotobiorreactores tipo batch para el crecimiento de <i>Arthrospira maxima</i> .....	33
<b>Figura 4:</b> Imágenes de microscopía óptica con tinción alcian blue del proceso de fragmentación de los filamentos de <i>Arthrospira maxima</i> durante el proceso de liofilización y/o autoclave .....	34
<b>Figura 5:</b> Crecimiento aéreo y radicular de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> crecidas en presencia de <i>Arthrospira maxima</i> .....	38
<b>Figura 6:</b> Efecto de <i>Arthrospira maxima</i> sobre la germinación de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	40
<b>Figura 7:</b> Contenido de clorofila a, b y total de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> tratadas con biomasa de <i>Arthrospira maxima</i> .....	41
<b>Figura 8:</b> Supervivencia de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidas a estrés salino y tratadas con <i>Arthrospira maxima</i> .....	43
<b>Figura 9:</b> Crecimiento vegetativo de plantas de <i>Lactuca sativa</i> crecidas en MS 0,5X con diferentes concentraciones de <i>Arthrospira maxima</i> .....	45
<b>Figura 10:</b> Crecimiento vegetativo de plantas de <i>Lactuca sativa</i> crecidas en insuficiencia de nutrientes con diferentes concentraciones de <i>Arthrospira maxima</i> .....	47
<b>Figura 11:</b> Plantas de <i>Lactuca sativa</i> crecidas en diferentes condiciones de estrés salino y tratadas con <i>Arthrospira maxima</i> .....	49
<b>Figura 12:</b> Análisis de los frutos de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-tom control, tratadas con <i>Arthrospira maxima</i> (500 y 1000 mg/L) o con Algamax .....	52
<b>Figura 13:</b> Biomasa y rendimiento de los frutos de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-tom control, tratadas con <i>Arthrospira maxima</i> o con Algamax .....	54
<b>Figura 14:</b> Crecimiento de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-tom control, tratadas con <i>Arthrospira maxima</i> o con Algamax .....	56
<b>Figura 15:</b> Análisis de la expresión de genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> posiblemente involucrados en el efecto bioestimulante de <i>Arthrospira maxima</i> .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b><i>AspAT</i></b>	Aspartato aminotransferasa
<b>CCAP</b>	Culture Collection of Algae and Protozoa
<b>Chl a</b>	Clorofila A
<b>Chl b</b>	Clorofila B
<b>CS</b>	Citrato sintasa
<b>Ct</b>	Threshold cycle
<b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a daño
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EPS</b>	Sustancias poliméricas extracelulares
<b>ET</b>	Etileno
<b><i>GOGAT</i></b>	Glutamato sintasa
<b>GS</b>	Glutamina sintetasa
<b>hpi</b>	Horas post imbibición
<b><i>IDH</i></b>	Isocitrato dehidrogenasa
<b>JA</b>	Ácido jasmónico
<b>MAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a microorganismos
<b><i>MDH</i></b>	Malato dehidrogenasa
<b>MES</b>	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
<b>MS</b>	Medio basal de Murashige y Skoog
<b><i>NIR</i></b>	Nitrito reductasa
<b><i>NR</i></b>	Nitrato reductasa

<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PA</b>	Proteínas relacionadas a la patogénesis
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PGPR</b>	Bacterias promotoras del crecimiento de plantas
<b>qPCR</b>	PCR en tiempo real o PCR cuantitativo
<b>q-RT-PCR</b>	PCR cuantitativo acoplado a transcripción reversa
<b>SA</b>	Ácido salicílico
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SST</b>	Sólidos solubles totales

## RESUMEN

La agricultura convencional basada en el uso de fertilizantes químicos ha ocasionado graves daños a los ecosistemas y a la salud humana, por lo que el uso de bioestimulantes naturales se ha propuesto como una solución innovadora frente al desafío de la agricultura sustentable. Los bioestimulantes son sustancias naturales que generan diversos beneficios en el crecimiento y desarrollo de las plantas cuando son aplicados en bajas dosis, ya que no actúan como nutrientes, sino más bien como señal, gatillando una respuesta positiva en la planta. A pesar del origen diverso de los bioestimulantes, existen constituyentes comunes presentes en ellos, como los ácidos húmicos, aminoácidos, péptidos, polisacáridos, y betaínas, entre otros. En este trabajo se propone la utilización de biomasa de la cianobacteria *Arthrospira maxima* como bioestimulante en plantas en el marco de la agricultura sustentable, ya que presenta una alta cantidad de proteínas, polisacáridos y varias de estas sustancias benéficas para las plantas.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto bioestimulante de *Arthrospira maxima* en el crecimiento vegetativo de *Arabidopsis thaliana* y *Lactuca sativa*, y desarrollo de *Solanum lycopersicum*, siendo las dos últimas hortalizas de importancia agronómica y comercial. Para ello, primero se estandarizaron las condiciones de crecimiento de *Arthrospira maxima* en pequeña y mediana escala, luego se determinó que el tiempo de cosecha óptimo era a los 22 días post inoculación (inicio de la fase de crecimiento estacionario). Adicionalmente, los procesos de liofilización y autoclave en conjunto permitieron una mayor fragmentación de los filamentos de *A. maxima* respecto a ambos procesos por separado, lo que permitiría una mayor biodisponibilidad de las

sustancias benéficas para las plantas. Una vez obtenida la biomasa, esta fue añadida en diferentes concentraciones al medio de crecimiento vegetal, lo cual generó un efecto bioestimulante sobre el crecimiento vegetativo a través de un mayor diámetro de la roseta (*A. thaliana*) y una mayor biomasa fresca (*A. thaliana* y *L. sativa*), respecto a las plantas control, lo cual ocurriría a través de una mayor acumulación de agua en ambas. Se realizó un análisis de expresión génica cuantitativa, para elucidar los mecanismos moleculares involucrados en el efecto bioestimulante, sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de transcritos los genes marcadores *PR1*, *PDF1.2*, *NCED3*, *RD29*, *FD-GOGAT* y *EXPA10* de *A. thaliana* tras el tratamiento. Adicionalmente, el tratamiento con *A. maxima* aumentó la tolerancia al estrés salino de *A. thaliana*, evidenciado a través de la mayor sobrevivencia de las plantas tratadas. *A. maxima* también mostró un efecto bioestimulante en el desarrollo reproductivo de *S. lycopersicum*, ya que las plantas tratadas presentaron un mayor rendimiento de los frutos respecto al control, debido al incremento en el número de frutos totales por planta, sin disminuir el diámetro ecuatorial ni la biomasa de los frutos. El % de sólidos solubles totales de los frutos y la biomasa fresca del tejido aéreo y radicular no fueron afectados tras el tratamiento.

De esta manera, se recopiló evidencia que respalda el posible uso de *Arthrospira maxima* como un nuevo bioestimulante en el marco de la agricultura sustentable.

## ABSTRACT

Conventional agriculture based on the use of chemical fertilizers has caused serious damage to ecosystems and the health of people, so the use of natural plant biostimulants has been proposed as an innovative solution to address the challenge of sustainable agriculture. Biostimulants generally come from natural substances, which generate various beneficial effects in plant growth and development when applied at low doses. They do not act as nutrients, but rather as a signal, triggering positive plant responses. Despite the great diversity in the origin of biostimulants, major constituents include humic acids, amino acids, peptides, sugars, vitamins and betaines, among others.

In this work, we propose the use of *Arthrospira maxima* biomass, a cyanobacterium, as a plant biostimulant in the context of sustainable agriculture, because it contains a high protein content, polysaccharides and several plant beneficial substances. The aim of this work is to evaluate the biostimulant effect of *Arthrospira maxima* on vegetative growth of *Arabidopsis thaliana* and *Lactuca sativa* and reproductive development of *Solanum lycopersicum*, the latter two vegetables with agronomic and commercial importance. First, we standardized *Arthrospira maxima* growth conditions in small and medium-scale. Then, we determined that the optimal harvest point was 22 days post- inoculation (start of stationary growth phase). In addition, both lyophilization and autoclave processes allowed greater fragmentation of *A. maxima* filaments regarding both processes separately, which could enable greater bioavailability of beneficial substances for plants. After obtaining the *A. maxima* biomass, it was added at different concentrations to the growth medium, which generated a biostimulant effect on vegetative growth evidenced on a larger diameter of *A. thaliana* rosette and higher fresh biomass of *A. thaliana* and *L.*

la absorción óptima de nutrientes, un mayor rendimiento de los cultivos, la calidad de los productos y la protección frente al estrés y que además, conserven las propiedades del suelo y no tengan efectos negativos sobre el medio ambiente (Bhardwaj y col., 2014; Povero y col., 2016). Los bioestimulantes por definición del Consejo Europeo de la Industria de Bioestimulantes (EBIC), consisten en "materiales que contiene(n) sustancia(s) y/o microorganismos cuya función cuando son aplicados a las plantas o a la rizósfera, es estimular procesos naturales que mejoran o benefician la adquisición de nutrientes, la eficiencia del uso de nutrientes, la tolerancia a estrés abiótico y la calidad de los cultivos" (EBIC, 2016a). Complementariamente, los bioestimulantes fomentan el crecimiento y desarrollo de las plantas desde la germinación de la semilla hasta la madurez de la planta en un número demostrado de maneras (pero no limitado a: mejorar la eficiencia del metabolismo de las plantas, aumentando de esta manera el rendimiento y la calidad del cultivo; aumentar la tolerancia y la recuperación al estrés abiótico; facilitar la asimilación, translocación y uso de los nutrientes; mejorar los atributos de calidad del producto; regular y mejorar el balance de agua de la planta; potenciar propiedades fisicoquímicas del suelo y fomentar el desarrollo de microorganismos del suelo (EBIC, 2016b). Sin embargo, es importante destacar las diferencias principales de los bioestimulantes respecto a otros productos utilizados comúnmente en la agricultura. En primer lugar, los bioestimulantes operan a través de mecanismos diferentes a los fertilizantes, de hecho, no son considerados nutrientes *per se*. Además, actúan únicamente sobre el vigor de la planta y no tienen ninguna acción directa sobre las plagas o enfermedades. Adicionalmente, la bioestimulación de los cultivos es complementaria a la nutrición vegetal y a la protección de los cultivos (EBIC, 2016b), por lo que se pueden aplicar como complementos a los fertilizantes convencionales para disminuir el uso de estos. De hecho, una característica importante de los bioestimulantes es que actúan en



medioambientales. Dentro de estos, el más común es la eutrofización de cuerpos de agua. Los excesos de N y P pueden infiltrarse en aguas subterráneas o cursos de agua, lo que genera una sobrecarga de nutrientes que estimula el desarrollo y proliferación de productores primarios (como fitoplancton, algas bentónicas y macrófitos). Esta proliferación y posterior descomposición de la materia orgánica, conlleva una disminución de la concentración del oxígeno disuelto en los ecosistemas acuáticos eutróficos y provoca la muerte de peces e invertebrados. Este ambiente promueve la formación de compuestos reducidos tóxicos, como el  $H_2S$ , los que causan más mortalidad en la fauna acuática. Más aún, también se promueve la proliferación de algas tóxicas, las que están asociadas a varias enfermedades humanas (Camargo & Alonso, 2006; Good & Beatty, 2011). Adicionalmente, la agricultura representa la mayor proporción de uso de tierra por el hombre (37%) y aproximadamente 2/3 del agua utilizada por el hombre se destina a la agricultura. El sobreuso de fertilizantes en agricultura también afecta la salud de los suelos, ya que contribuye a la pérdida de fertilidad y aumenta la salinización, entre otros (FAO, 2003). Finalmente, las actividades agropecuarias son responsables del 30-35% de la emisión global de gases de efecto invernadero, como metano, óxido nitroso y dióxido de carbono (FAO, 2003; Good & Beatty 2011; Foley y col., 2011).

### **Bioestimulantes**

En los últimos años se ha visto un interés creciente por la agricultura sustentable, en donde se obtengan alimentos ricos en nutrientes y de alta calidad, donde se conjugue la protección al medio ambiente, la viabilidad económica, y la equidad social (ODEPA, 2015). En este contexto, una de las soluciones más innovadoras y prometedoras que cumplen con esta premisa, consiste en el uso de bioestimulantes naturales que aseguren

## INTRODUCCIÓN

### **Situación actual de la agricultura mundial**

La agricultura convencional consiste en sistemas de cultivo que usan de manera intensiva fertilizantes, pesticidas, herbicidas y sistemas de irrigación, entre otros. Con respecto a los primeros, estos son añadidos como fertilizantes químicos o sintéticos (nutrientes en su forma inorgánica), ya que se ha demostrado que el rendimiento de la mayoría de los cultivos aumenta linealmente con la cantidad de fertilizantes que absorben (Taiz y col., 2015). Un estudio realizado recientemente por la FAO, estimó que el consumo total de fertilizantes primarios (nitrógeno, fósforo, potasio; N,P,K) aumentará a una tasa anual de 1,8% desde 183,2 megatoneladas en el año 2013 a 200,5 megatoneladas en el año 2018 (FAO, 2015). Este aumento se explica por el incremento tanto de la demanda, como de la producción agrícola, debido al aumento de la población mundial (Alexandratos & Bruinsma, 2012). En cuanto a Chile, la importación neta de fertilizantes químicos alcanza 1,1 millones de toneladas anuales, lo que representa el 85% del volumen de fertilizantes comercializados en el país y el 15% restante es producido internamente. Esto hace que Chile se encuentre enfrentado constantemente a fluctuaciones de precios internacionales que repercuten en la agricultura nacional, considerando que los fertilizantes comprometen hasta un 60% de los costos de producción de algunos cultivos (ODEPA, 2009).

El problema de la agricultura convencional, radica en que los cultivos utilizan solo entre 10-40% de los fertilizantes químicos aplicados, mientras que el resto se pierde (Bhardwaj y col., 2014). Este uso indiscriminado de agroquímicos, en conjunto con las malas prácticas agrícolas y la falta de suelo óptimo cultivable, han generado graves problemas

*sativa*, in relation to the control plants, through increased water accumulation in both cases.

In order to understand the molecular mechanisms underlying this biostimulant effect, quantitative gene expression analysis was performed, nevertheless, no significant differences were detected in transcript levels of *PR1*, *PDF1.2*, *NCED3*, *RD29*, *FD-GOGAT* y *EXPA10* *A. thaliana* markers genes between control and treatment conditions. Furthermore, *A. maxima* increased salt stress tolerance in *A. thaliana*, evidenced by an increased survival of treated plants.

*A. maxima* biostimulant effect was also observed on the reproductive development of *S. lycopersicum*, since treated plants exhibited a higher fruit yield compared to the control condition, mostly due to increased total fruit number per plant, without decreasing the fruit equatorial diameter neither biomass, total soluble solids (%), and shoot and root fresh biomass.

Thus, evidence supporting the possible use of *Arthrospira maxima* as a new bioestimulante within the framework of sustainable agriculture is presented.

bajas dosis o en cantidades mínimas, las que no sustentan los requerimientos nutricionales del cultivo (du Jardin, 2015). En otras palabras, los bioestimulantes son sustancias naturales inocuas para el medio ambiente, que generan diversos beneficios en el crecimiento y desarrollo de las plantas cuando son aplicados en bajas dosis, ya que no actúan como nutrientes, sino más bien como señal, gatillando una respuesta positiva en la planta.

El mercado mundial actual de los bioestimulantes se calcula cercano a los \$USD 1000 millones y se proyecta que en el año 2020 alcance los \$USD 3000 millones, con una tasa de crecimiento anual del 13% (Colla & Rouphael, 2015a). En el caso de Chile, el mercado de los bioinsumos alcanzó 12 millones de dólares para el año 2014, de lo cual los bioestimulantes representan el 41%. Más aún, las importaciones de estos productos aumentaron en un 20% durante los últimos 5 años, con una tasa anual cercana al 3% (Martínez y col., 2016).

La situación actual en relación a la regulación de los bioestimulantes es compleja, debido a que son productos bastante nuevos en el mercado, y, por ende, aún no hay consenso en su definición legal, por lo que no existe un marco regulatorio específico y unificado. En la unión europea y en EEUU, no existe ninguna ley que norme específicamente a los bioestimulantes. Por ende, estos pueden entrar al mercado siguiendo dos rutas: la ley de fertilizantes o la ley de pesticidas (du Jardin, 2015). Chile tampoco cuenta con una normativa legal en relación a la producción o calidad de bioinsumos agrícolas, por lo que los estos reciben el mismo tratamiento legal que productos de origen sintético (Martínez y col., 2016).

Aunque la definición de bioestimulantes aún es un proceso en curso, estos se han clasificado en las siguientes categorías funcionales: inóculos microbianos, ácidos

húmicos, ácidos fúlvicos, extractos de algas, e hidrolizados de proteínas y aminoácidos (Calvo y col., 2014). En este trabajo, se evaluó la capacidad bioestimulante de la biomasa de la cianobacteria *A. maxima*, debido a que comparte varias características con estos tipos de bioestimulantes.

Los inóculos microbianos son productos biológicos que contienen microorganismos vivos que pueden aplicarse a las semillas, a la superficie de las plantas o al suelo. Se incluyen dentro de esta categoría a las bacterias de vida libre (como bacterias promotoras del crecimiento de plantas, o PGPR), hongos y micorrizas arbusculares. Uno de los principales efectos que ejercen sobre las plantas es aumentar la biodisponibilidad de los nutrientes mediante fijación de N, solubilización o mineralización de P o K y secuestro de hierro (Calvo y col., 2014).

Por otra parte, los ácidos húmicos y fúlvicos son los constituyentes de la materia orgánica del suelo producto de la descomposición de la biota y de la actividad metabólica de los microorganismos del suelo. Representan la mayor fuente de carbono orgánico de la superficie terrestre y son extraídos de la materia orgánica humificada, compost, o depósitos minerales. Uno de los efectos descritos más característicos que ejercen sobre las plantas es aumentar el metabolismo primario, por ejemplo, a través de la activación de enzimas claves del metabolismo del N y del carbono (C; Canellas y col., 2015).

Los extractos de algas por otro lado, son producidos a partir de algas pardas marinas en su mayoría, a través de extracción con álcali, con ácido o mediante tecnología de disrupción celular (Battacharyya y col., 2015). Estos extractos pueden ser aplicados a las raíces de las plantas mediante fertirriego o asperjados a la zona foliar (Battacharyya y col., 2015).

A pesar de que los productos que contienen extractos de algas están compuestos por una gran cantidad de moléculas beneficiosas para el desarrollo vegetal (ácidos grasos,

vitaminas, minerales, aminoácidos, entre otros), se ha reportado que el contenido nutritivo de estos productos es insuficiente para gatillar una respuesta fisiológica en las concentraciones que son utilizados normalmente en el campo (diluciones de 1/1000 o más). Es por esto que su efecto se atribuye a compuestos promotores del crecimiento y elicitores de la respuesta de defensa en plantas, como polifenoles y polisacáridos, siendo muchos de estos últimos únicos, ya que no se encuentran en plantas terrestres y están constituidos principalmente por alginatos, carragenanos, fucanos, laminaranos y ulvanos, (Stadnik & De Freitas, 2014; Battacharyya y col., 2015). Recientemente a los carbohidratos se les ha atribuido una función en la inmunidad de las plantas, ya sea como elicitores de la defensa o como moléculas señalizadoras de función similar a las hormonas (Stadnik & De Freitas, 2014; Trouvelot y col., 2014). De hecho, se ha reportado que plantas de *A. thaliana* tratadas con extractos provenientes del alga *A. nodosum* inducen la vía del ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico/etileno (JA/ET), las cuales participan en la respuesta contra patógenos microbianos y microorganismos benéficos (Sangha y col., 2011; Goñi y col., 2016).

Finalmente, la última categoría propuesta corresponde a los hidrolizados de proteínas y aminoácidos, los cuales son una mezcla de polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos producidos a partir de la hidrólisis térmica, química o enzimática de proteínas de diversas fuentes (Colla y col., 2015b; Nardi y col., 2016). Los aminoácidos más comunes en estos formulados alanina, glicina, glutamato, glutamina, leucina, prolina y la glicina betaína (Calvo y col., 2014). La aplicación exógena de los dos últimos a las plantas que se encuentran en diferentes condiciones de estrés abiótico, genera un aumento en el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Ashraf & Foolad, 2007).

En las últimas décadas se ha "re-descubierto" que el nitrato y el amonio no son las únicas fuentes de N para la nutrición de las plantas, ya que se ha demostrado que los

compuestos orgánicos que contienen N, como los aminoácidos, péptidos y proteínas, que se pueden encontrar en los bioestimulantes, también son metabolizados por las plantas. Se han identificado varios transportadores de aminoácidos que incorporan aminoácidos, di- y tri- péptidos a las raíces (Schmidt y col., 2013). De hecho, *A. thaliana* y *Hakea actites* pueden utilizar proteínas como fuente de N para su crecimiento sin la ayuda de microorganismos del suelo para realizarlo, ya sea liberando enzimas proteolíticas que digieren a las proteínas en la superficie de las raíces o incorporando la proteína completa (Paungfoo-Lonhienne y col., 2008). La adición de la proteína BSA a concentraciones entre 1,67-15 mM en el medio de crecimiento de *A. thaliana*, generó un aumento en la biomasa seca, en el grosor de la raíz y en el largo de los pelos radiculares. Sin embargo, al añadir concentraciones altas de BSA al medio (23-45 mM), se produjo una inhibición del desarrollo radicular (Lonhienne y col., 2014a). Es importante hacer notar que las proteínas *per se* no sustentaron el crecimiento de las plantas en la misma extensión que el N inorgánico (nitrato o amonio). Esto último se fundamenta en el hecho que las plantas que crecieron únicamente en presencia de proteínas como fuente de N, presentaron un menor crecimiento, sugiriendo que puede haber un "cuello de botella" metabólico asociado al catabolismo de N en ausencia de fuentes inorgánicas de este. Sin embargo, las proteínas pueden complementar la demanda de N de las plantas, además de generar los efectos positivos mencionados anteriormente (Paungfoo-Lonhienne y col., 2008).

Una característica importante de los bioestimulantes es el hecho que tienen máximos beneficios a muy bajas dosis y su efecto depende de la especie o cultivar, de la etapa fenológica, de las condiciones ambientales, el tiempo y modo de aplicación (foliar o radicular) y la permeabilidad de la hoja al bioestimulante (Colla y col., 2015b).

Si bien el modo de acción de las respuestas observadas en plantas tratadas con bioestimulantes es variado y aún no es completamente comprendido, existen constituyentes comunes en los formulados que podrían dar luz a los posibles mecanismos de acción. Entre las sustancias o moléculas comunes podemos encontrar a los ácidos húmicos, aminoácidos, péptidos, azúcares (glucósidos y polisacáridos), saponinas, ácidos grasos, vitaminas y betaínas, entre otros (Sharma y col., 2016).

### **Mecanismos moleculares involucrados en la bioestimulación de plantas**

Los bioestimulantes activan diversas respuestas de defensa de las plantas, por ejemplo, los polisacáridos provenientes de las algas y sus oligosacáridos derivados estimulan la respuesta inmune a través del aumento oxidativo local, la activación de la vía de señalización de ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y/o etileno (ET). La activación de este tipo de vías conduce a un aumento en la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas a la patogénesis (PR); enzimas de defensa como fenilalanina amonio liasa y lipooxigenasa, involucradas en la acumulación de compuestos fenilpropanoides y oxilipinas. Estas proteínas y compuestos promueven la protección contra patógenos en plantas tratadas con estos bioestimulantes (Vera y col., 2011). Por ejemplo, se ha reportado que plantas de *A. thaliana* tratadas con extractos provenientes del alga *A. nodosum* inducen la expresión de *PR1* y *PDF1.2*, los cuales son genes marcadores de la expresión génica de respuesta a SA y JA/ET, respectivamente (Sangha y col., 2011; Pieterse y col., 2012; Goñi y col., 2016).

Uno de los efectos de los bioestimulantes sobre las plantas es promover su crecimiento, el cual está dado por dos factores: proliferación y expansión celular. En este contexto, las expansinas son proteínas de la pared celular que tienen la capacidad única de inducir la extensión de la pared celular mediante hidrólisis sin comprometer los componentes



principales de la pared celular. Se ha postulado que estas proteínas juegan un rol importante en la regulación del crecimiento celular vegetal, ya que servirían como un agente que distiende la pared celular para promover la expansión celular. En *A. thaliana* existen 30 genes que codifican para diferentes expansinas cuya función es redundante. En particular, *EXPA10* tiene como rol principal el control del tamaño de la hoja de *A. thaliana*. En líneas silenciadas el tamaño de la hoja se redujo sustancialmente, mientras que la sobreexpresión de *EXPA10* resultó en plantas con hojas más grandes (Cho & Cosgrove, 2000).

Los bioestimulantes también actúan sobre el metabolismo, por ejemplo, los hidrolizados de proteínas estimulan el metabolismo primario a través de la inducción de la actividad enzimática y de genes que codifican para enzimas claves en el metabolismo de C (malato dehidrogenasa, *MDH*; isocitrato dehidrogenasa, *IDH*; citrato sintasa, *CS*); y el metabolismo de N (nitrato reductasa, *NR*; nitrito reductasa, *NiR*; glutamina sintetasa, *GS*; glutamato sintasa, *GOGAT*; aspartato aminotransferasa, *AspAT*; Schiavon y col., 2008; Ertani y col., 2013a). Por otro lado, se ha visto que los ácidos húmicos también estimulan el metabolismo de C y N a través de la inducción de *NR*, glutamato dehidrogenasa (*GDH*) y *GS* (Canellas y col., 2015)

Otro efecto asociado los bioestimulantes tiene relación con la inducción de la biosíntesis de hormonas. Aplicaciones con extractos de *A. nodosum* promueven el aumento de la expresión de genes de *A. thaliana* claves en la biosíntesis de ácido abscísico (ABA), *ABA2* y *NCED3*, lo que se correlacionó con el aumento de la concentración de ABA en las plantas tratadas con el extracto. Además, hubo un incremento en la transcripción del gen de respuesta a ABA, *RD29a* (Wally y col., 2013).

### **Rol de las cianobacterias en la bioestimulación de plantas**

Dado lo anterior, existe un gran desafío en cuanto a la búsqueda de nuevas fuentes de bioestimulantes que generen más de un efecto benéfico en las plantas, pero que a su vez sean inocuas y sustentables para el medio ambiente, altamente biodisponibles y económicamente viables (García-Mina & Hadavi, 2016). El uso de microorganismos se ha alzado como un importante complemento a fertilizantes inorgánicos y se ha demostrado que su uso ayuda en la eficiencia en el uso de fertilizantes (Adesemoye & Kloepper, 2009; Bhardwaj y col., 2014). Entre los microorganismos con mayor potencial bioestimulante se encuentran las cianobacterias, las cuales realizan fotosíntesis oxigénica, es decir, utilizan la luz solar y dióxido de carbono para sintetizar materia orgánica, generando también oxígeno atmosférico (Kamal & Ahmad, 2014). Entre sus ventajas se encuentra el hecho que se pueden producir de forma masiva; su crecimiento es sustentable y no estacional; no compiten por terrenos cultivables; disminuyen la huella de carbono y no dependen de la extracción marina como es el caso de las macroalgas. Se ha reportado que ejercen muchos efectos benéficos sobre las plantas debido a que sintetizan y liberan moléculas elicitoras y sustancias promotoras del crecimiento vegetal (como proteínas, vitaminas, carbohidratos, aminoácidos, fitohormonas y polisacáridos; Singh, 2014; Kamal & Ahmad, 2014).

Cabe destacar que las cianobacterias son productoras de exopolisacáridos, los cuales son parte de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que además pueden elicitar una variada respuesta en las plantas (Pereira y col., 2009; Singh, 2014). La composición del EPS varía según el tipo de microorganismo que lo secreta, la disponibilidad de nutrientes, la fase de crecimiento y las condiciones ambientales (Pereira y col., 2009). En cuanto a las aplicaciones biotecnológicas, el EPS cianobacteriano es una excelente alternativa a los polisacáridos bioestimulantes obtenido a partir de plantas o algas, ya

que aparte de poseer propiedades únicas respecto a las otras fuentes, las cianobacterias que lo producen presentan altas tasas de crecimiento, bajo requerimiento nutricional, propiedades fisicoquímicas reproducibles y menores costos de producción (Pereira y col., 2009; Nwodo y col., 2012; Rossi & De Philippis, 2015).

Por otra parte, se han descrito múltiples efectos beneficiosos de las cianobacterias sobre las plantas. En cuanto a la protección frente al estrés abiótico, por ejemplo, se ha reportado que el tratamiento con el extracto extracelular de la cianobacteria *Scytonema hofmanni* aumentó la tolerancia al estrés salino en *Oryza sativa*, ya que este tratamiento aumentó significativamente la biomasa seca aérea y radicular de las plantas sometidas a estrés salino, entre otros parámetros (Rodríguez y col., 2006). Es muy importante hacer notar que una de las ventajas de usar extractos o fracciones de la biomasa de microorganismos, tal como se utilizó en el trabajo recién mencionado y en este seminario de título, en comparación al uso de microorganismos vivos, radica en que un número importante de los inoculantes microbianos son biotróficos, por lo que su propagación a gran escala es difícil. Otra desventaja de usar microorganismos vivos es la variabilidad de la respuesta, la cual es dependiente del tipo de cultivo y del ambiente en el cual es utilizado, lo cual puede generar resultados difíciles de reproducir (du Jardin, 2015). Más aún, para usar este tipo de microorganismos es completamente necesario que estos puedan sobrevivir en el formulado y en el ambiente donde serán inoculados a lo largo del tiempo (Calvo y col., 2014). Por último, es necesario que la liberación de microorganismos exógenos sea regulada, ya que estos pueden ocasionar un grave desbalance biológico medioambiental (Macouzet, 2016).

### ***Arthrospira maxima* como potencial bioestimulante**

Una de las cianobacterias más cultivadas a gran escala es *Arthrospira maxima*. Esta cianobacteria comúnmente conocida como Spirulina, es multicelular, filamentosa y de forma helicoidal. Se encuentra naturalmente en regiones tropicales y subtropicales en cuerpos de agua cálida con alto contenido de carbonato o bicarbonato, alto pH y salinidad. Esta cianobacteria ha sido ampliamente utilizada en nutrición humana y animal, ya que cuenta con una composición nutricional excepcional, dado por un alto contenido de proteínas que llega a un 60-71% de su peso seco total (lo que se traduce en aminoácidos y en N orgánico disponible). Es por lo anterior que es considerada uno de los microorganismos con mayor cantidad de proteínas. Además de tener todos los aminoácidos esenciales (Sialve y col., 2009), también contiene otros componentes como polisacáridos y carbohidratos (13-16% de su peso seco total); ácidos grasos esenciales (ácido linoleico, palmitoleico, esteárico, oleico, entre otros), vitaminas (B1, B2, B6, B12, E, biotina, folato, entre otros), minerales (Ca, P, K, Mn, Fe, Mg, Zn, Cu, entre otros), y pigmentos como carotenos, clorofila a y ficocianina (Clément y col., 1967; Falquet, 2006; Becker, 2007; Ali & Saleh, 2012; Inglesby & Fisher, 2012; Mohan y col., 2014). También se ha reportado que varias cepas de Spirulina producen prolina y glicina betaína en condiciones normales y de estrés, las cuales otorgan protección frente a varios tipos de estrés abiótico en plantas (Liu y col., & Li, 2016). Por otra parte, la composición de polisacáridos de *Arthrospira maxima* UTEX LB2342 fue determinada por cromatografía líquida de gases. Esta determinó que los exopolisacáridos estaban constituidos principalmente por xilosa, ramnosa y glucosa. Además, se detectaron ácidos urónicos (ácido glucorónico y galacturónico) y 6 monosacáridos neutros (fucosa, ramnosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa) (Nie y col., 2002). Todas estas moléculas podrían tener un putativo rol en la promoción del desarrollo vegetal por parte de esta cianobacteria.

*A. maxima* es uno de los microorganismos más cultivados a gran escala, ya que ha sido ampliamente utilizada como suplemento nutricional y entre sus ventajas se encuentra el hecho que es un recurso sustentable y económicamente viable, tiene un bajo requerimiento nutricional, es de fácil obtención, presenta bajos costos asociados a la recuperación de la biomasa debido a su tamaño y estructura filamentosa (tiende a agregarse) y contribuye a la disminución de la huella de carbono (Vonshak, 2002; Cheng y col., 2012; Usharani y col., 2012).

A pesar de que existen registros del uso de *Spirulina* por parte de humanos desde hace siglos, actualmente existen muy pocos antecedentes de su posible uso como bioestimulante de plantas. Se ha descrito que el extracto acuoso de *Arthrospira platensis* aumenta la biomasa de los pelos radicales de *Beta vulgaris* y la concentración del pigmento betalaína en este tejido (Rao y col., 2001). Por otra parte, la ficocianina, un pigmento azul que es la principal biliproteína captadora de luz de *Arthrospira platensis*, mostró un efecto elicitor al aumentar la acumulación de capsaicina y antocianina en cultivos celulares de *Capsicum frutescens* y *Daucus carota*, respectivamente (Rao y col., 1996). También se ha descrito el uso de *Arthrospira platensis* junto con ácidos húmicos para reemplazar parcialmente los fertilizantes inorgánicos nitrogenados aplicados en plantas de *Prunus persica*, donde el reemplazo del 50% del N inorgánico por ácidos húmicos (80 mL/árbol/año) y por *A. platensis* (25 mL/árbol/año) promovió un mayor crecimiento y contenido de N, P, K de la zona aérea, y un mayor rendimiento y calidad de los frutos en comparación con las plantas tratadas con 100% N inorgánico (El-Khawaga, 2011).

Expuesto lo anterior, en este trabajo se propone la utilización de biomasa de *Arthrospira maxima* como bioestimulante en plantas, ya que es una excelente fuente de proteínas, péptidos, aminoácidos, N orgánico y exopolisacáridos; además de poseer una gran



cantidad de sustancias benéficas para las plantas que podrían potenciar el crecimiento, desarrollo y la protección de estas frente a diferentes tipos de estrés. En este trabajo, se propone estudiar los efectos de la biomasa de *A. maxima* en el crecimiento vegetativo y reproductivo de plantas. Como modelo de tejido vegetativo, se escogió a *Arabidopsis thaliana*, ya que esta planta cuenta con una serie de ventajas que la convierten en un excelente modelo de investigación, como por ejemplo, su pequeño tamaño, requerimientos nutricionales simples, facilidad del cultivo en laboratorio, se autopoliniza, tiene ciclo de vida corto (8 semanas) y su genoma es está completamente secuenciado (Somerville & Koornneef, 2002). Lo anterior se complementó con la planta *Lactuca sativa* (lechuga), ya que es un excelente modelo comercial, la cual se cosecha en etapa vegetativa y su zona aérea es la consumida. Además, actualmente es la hortaliza de hojas de mayor consumo crudo (ODEPA, 2002) y tiene un rápido crecimiento vegetativo *in vitro*. Por otro lado, se determinó el efecto bioestimulante de la biomasa de *A. maxima* sobre la producción de frutos. Para esto se escogió a *Solanum lycopersicum* (tomate), ya que es una de las hortalizas más importantes en el mercado de vegetales frescos, como también en la industria de alimentos procesados. Se utilizó el cultivar enano Micro-Tom, el cual cuenta con una serie de ventajas que lo hacen ideal como modelo de fruto, ya que este último es una baya carnosa de tamaño pequeño (10-20 cm), con un ciclo de vida relativamente rápido (70-90 días), posee hábito determinado, puede crecer en altas densidades y puede ser cultivado en condiciones de invernadero (Meissner y col., 1997; Emmanuel & Levy, 2002; Martí y col., 2006) . De esta manera, se pretendió obtener evidencia que permitiera apoyar el uso de *Arthrospira maxima* como un nuevo bioestimulante en el marco de la agronomía sustentable.

**Objetivo general**

Evaluar el efecto bioestimulante de *Arthrospira maxima* en crecimiento vegetativo de *Arabidopsis thaliana* y *Lactuca sativa*, y reproductivo de *Solanum lycopersicum*.

**Objetivos específicos**

1. Estandarizar las condiciones de cultivo de *Arthrospira maxima* y determinar el punto de cosecha óptimo.
2. Analizar el efecto de tratamientos con *A. maxima* sobre el crecimiento vegetativo de *Arabidopsis thaliana* y *Lactuca sativa*.
3. Analizar el efecto de tratamientos con *A. maxima* sobre la producción de frutos de *Solanum lycopersicum*.
4. Evaluar el efecto de tratamientos con *Arthrospira maxima* sobre la expresión de genes posiblemente involucrados en la respuesta bioestimulante en *Arabidopsis thaliana*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cultivos cianobacterianos y condiciones de crecimiento

#### 1.1. Origen

Se utilizó la cepa de *Arthrospira maxima* CCAP 1475/9, la cual se obtuvo del cepario Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), Oban, Escocia, Reino Unido.

#### 1.2. Estandarización de las condiciones de cultivo de *Arthrospira maxima*

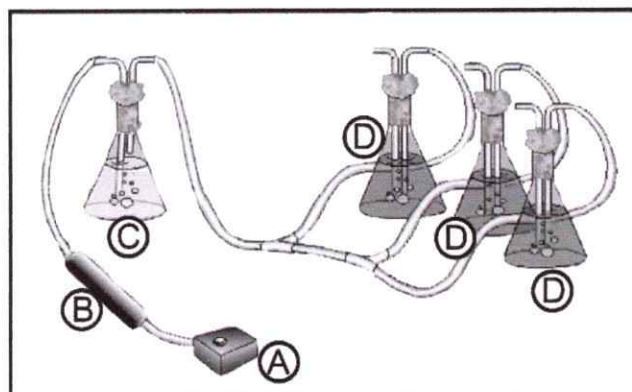
En matraces de 250 mL, se agregaron 100-150 mL de medio Schlösser modificado (Anexo 1) y se inoculó *A. maxima* a una razón de 1:10 en condiciones estériles. Estos cultivos se incubaron a 23°C en agitación continua a 180 rpm o sin agitación, y a una intensidad lumínica de 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con fotoperiodo de 16 h (horas) luz/8 h oscuridad. Los cultivos fueron renovados cada 3 a 4 semanas, mediante el mismo procedimiento. Para determinar el tiempo de cosecha de los cultivos de *A. maxima*, se realizó una curva de crecimiento mediante la determinación de la densidad óptica. Para ello, se tomaron periódicamente muestras de cultivos provenientes de 3 matraces independientes (en triplicado biológico) y se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific™, USA) en triplicado técnico.

#### 1.3. Crecimiento de *Arthrospira maxima* en fotobiorreactores tipo batch

El montaje de estos sistemas se realizó en condiciones de esterilidad y consistió en la siguiente configuración: una bomba de aire (RC-006, CALM; Fig. 1A) conectada mediante mangueras de silicona estériles de 6 mm de diámetro interior (Aquamundo) a filtros esterilizadores de aire de 0,2  $\mu\text{m}$  (Fig. 1B) con membrana hidrófoba (Aervent-50, Merck Millipore, Alemania). A su vez, estos se conectaron a una botella de vidrio de 1 L (SCHOTT DURAN®, Alemania) que contenía agua estéril (humidificador del flujo; Fig.



1C). El aire húmedo estéril se inyectó en matraces de 2-5 L (SCHOTT DURAN®, Alemania) y/o botellas de vidrio de 5-10L (SCHOTT DURAN®, Alemania; Fig. 1D) que contenían cultivos de *A. maxima*, los cuales fueron inoculados en medio Schlösser modificado a una razón de 1:10.



**Figura 1:** Diagrama explicativo del montaje y configuración de fotobiorreactores tipo batch para el crecimiento de *Arthrospira maxima*. A: Bomba de aire que inyecta flujo al sistema, B: Filtro de aire de 0,2 µm, C: Humidificador de aire, D: Fotobiorreactores. (Adaptado de Reichert y col, 2006).

Estos cultivos se incubaron a 23°C en condiciones de agitación constante mediante influjo de aire con una intensidad lumínica de 60 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> y fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Los cultivos fueron cosechados y renovados cada 3 a 4 semanas.

#### 1.4. Obtención de biomasa de *Arthrospira maxima*

Una vez que los cultivos llegaban a su fase exponencial tardía, se cosecharon mediante centrifugación a 8000 x g durante 10 minutos (min) a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado, el pellet sumergido en nitrógeno líquido y posteriormente se deshidratado en un liofilizador (FreeZone 1 Liter Benchtop Freeze Dry System número de catálogo 7740030, Labconco USA) durante 48 h. Transcurrido este tiempo, la biomasa liofilizada fue pulverizada en un mortero y almacenado a 4°C hasta su uso.

El rendimiento de los cultivos se calculó como:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{biomasa seca (g)}}{\text{Volumen de cultivo inicial (L)}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Se visualizó mediante microscopía el grado de fragmentación de los filamentos de *A. maxima* en cultivo fresco y durante los procesos de liofilización y autoclave en el microscopio óptico Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., Japón), registrando al menos 3 campos por muestra. Estas se tiñeron con Alcian blue con ácido acético al 3%, pH 2,5 (Sigma-Aldrich, USA).

## **2. Material vegetal, condiciones de crecimiento y ensayos con *Arthrospira maxima***

### **2.1. *Arabidopsis thaliana* y *Lactuca sativa***

En los ensayos de crecimiento vegetativo se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0) y de lechuga (*Lactuca sativa* cv. milanesa), las cuales fueron obtenidas a partir de la colección de semillas del laboratorio del Dr. Patricio Arce y de ANASAC (Chile), respectivamente.

Para ambos tipos de semillas, se esterilizó la superficie con una solución 50% v/v de hipoclorito de sodio comercial por 7 min en agitación. Las semillas se dejaron decantar y se removió el sobrenadante en una cámara de flujo laminar, tras lo cual se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril con agitación durante 3 min. Luego, se estratificaron las semillas incubándolas en agua destilada estéril a 4°C por 72 h en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se sembraron bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar en placas de Petri que contenían 2,465 g/L de medio basal modificado de Murashige y Skoog (MS) 0,5X (Phytotechnology Laboratories, USA, número de catálogo M530), suplementado con 8 g/L de agar-agar (Merck), 5 g/L de sacarosa (Winkler). La biomasa liofilizada descrita en la sección materiales y métodos 1.4 fue añadida a este medio de cultivo en diferentes concentraciones: 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 mg/L, previo a la esterilización del medio de cultivo mediante autoclave.

Para los experimentos de estrés salino, se agregó cloruro de sodio (NaCl; Winkler) al medio de cultivo MS 0,5X de *A. thaliana* (100 o 150 mM de NaCl) y al medio agua-agar para *L. sativa* (50 o 200 mM de NaCl).

Adicionalmente, con el fin de evaluar el efecto bioestimulante de la biomasa de *A. maxima* en condiciones limitantes de nutrientes, se realizaron ensayos de crecimiento vegetativo de plantas de *L. sativa in vitro*, las cuales fueron crecidas en placas de Petri que contenían agua y 8 g/L de agar-agar (Merck) y pH 5,7. Al igual que las placas con MS 0,5X, la biomasa liofilizada de *A. maxima* fue añadida a diferentes concentraciones: 50, 100, 250, 500, 750 y 1000 mg/L, previo a la esterilización mediante autoclave.

Complementariamente, se evaluó la capacidad bioestimulante de dos productos a base de Spirulina producidos a escala industrial: Spirulina nature (Aeon Biogroup, Chile) y Spirulina del Consorcio Algaefuels S.A., (Chile), lo cual se realizó de la misma forma que se evaluó la capacidad bioestimulante de la biomasa de *A. maxima* producida en laboratorio, como se menciona arriba.

Las placas se dejaron incubando a 22°C en una cámara de crecimiento (Percival scientific, Inc, USA) con fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad y con intensidad lumínica de 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### **2.1.1. Análisis fenotípico de *Arabidopsis thaliana* y *Lactuca sativa***

Al cabo de 2-3 semanas post-siembra (*Arabidopsis thaliana*) y 11-21 días post-siembra (*Lactuca sativa*), se cosecharon las plantas y se procedió con el análisis fenotípico.

#### **2.1.1.1. Diámetro de la roseta, biomasa fresca y seca**

Las plantas de *A. thaliana* cosechadas, se dividieron en su parte aérea y radicular. Se les midió el diámetro de la roseta con una regla y la biomasa fresca de la parte aérea

con una balanza analítica y posteriormente se dejaron deshidratando a 60°C en un horno de secado durante 3 días, tras lo cual se determinó su biomasa seca.

La biomasa fresca y seca de *L. sativa* se obtuvo de la misma manera que la descrita anteriormente.

El contenido de agua se calculó de la diferencia entre la biomasa fresca y seca, tanto para *A. thaliana*, como para *L. sativa*.

#### **2.1.1.2. Desarrollo del sistema radicular**

Para evaluar el efecto fenotípico de la biomasa de *A. maxima* sobre las raíces, se crecieron plántulas de *A. thaliana* en medio MS 0,5X con diferentes concentraciones de biomasa de *A. maxima* en placas Petri cuadradas, las que fueron orientadas verticalmente para evaluar el crecimiento radicular. Se escanearon periódicamente y se determinó el largo de la raíz principal y la densidad de las raíces laterales (número de raíces laterales dividido por el largo de la raíz principal) usando el software ImageJ 1.50i (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

#### **2.1.1.3. Cuantificación de clorofila a, b y total**

Para la medición de clorofila se adaptó el protocolo descrito por (Arnon, 1949). Se pesó 0,1 g del tejido a analizar (hojas de *A. thaliana* de 3 semanas), se sumergió en nitrógeno líquido y se molió en presencia de esferas de óxido de zirconio de 1,4 mm (precellys, Francia) con un homogeneizador de tejido (precellys21, Bertin instruments, Francia) y se resuspendió en 1 mL de acetona (Merck) al 100%. Luego se centrifugó la muestra por 5 min a 3024 x g y se guardó el sobrenadante en hielo hasta su uso. Para el análisis de las muestras se tomaron 0,05 mL del extracto y se mezclaron con 0,95 mL de acetona al 80%. Posteriormente, se midió la absorbancia a 663 nm, para cuantificar la clorofila a;

a 645 nm, para determinar la clorofila b; y a 750 nm para medir otros compuestos que pueden interferir en la medición final. Para el cálculo final se consideró:

$$A_{663^*} = A_{663} - A_{750} \text{ y } A_{645^*} = A_{645} - A_{750} \text{ (Ecuación 2)}$$

$$Chl a \left( \frac{mg}{g PF} \right) = \frac{(12,7 \cdot A_{663^*}) - (2,69 \cdot A_{645^*})}{gPF} \cdot V(0,05 mL) \text{ (Ecuación 3)}$$

$$Chl b \left( \frac{mg}{g PF} \right) = \frac{(22,9 \cdot A_{645^*}) - (4,68 \cdot A_{663^*})}{gPF} \cdot V(0,05 mL) \text{ (Ecuación 4)}$$

$$Chl a + b \left( \frac{mg}{g PF} \right) = \frac{(20,08 \cdot A_{645^*}) + (8,02 \cdot A_{663^*})}{gPF} \cdot V(0,05 mL) \text{ (Ecuación 5)}$$

Donde, V = el volumen del extracto (0,05 mL) empleado para determinar clorofilas y PF= peso fresco de la muestra inicial utilizada para preparar el extracto.

Se analizaron 6 plantas por placa y 3 placas por condición. La cuantificación en el espectrofotómetro se realizó por triplicado técnico.

#### 2.1.1.4. Germinación

Se realizó un seguimiento de la germinación (emergencia de la radícula) de las semillas de *A. thaliana* sembradas en medio MS 0,5X con diferentes concentraciones de biomasa de *A. maxima* (0,100 y 500 mg/l) y crecidas en las condiciones señaladas en la sección materiales y métodos 2.1, mediante la visualización en un estereomicroscopio (SMZ800, Nikon Instruments Inc, Japón).

Por otra parte, se estratificaron semillas de *A. thaliana* en soluciones acuosas autoclavadas que contenían diferentes concentraciones de biomasa liofilizada de *A. maxima*: 0, 100, 500 y 1000 mg/L. Se realizó seguimiento de la germinación de estas semillas en medio MS 0,5X crecidas en las condiciones mencionadas en la sección materiales y métodos 2.1, de la misma manera que la mencionada en este punto anteriormente.

### **2.1.1.5. Tolerancia al estrés salino**

Se cuantificó el porcentaje de sobrevivencia de plantas de *A. thaliana* y de *L. sativa* de 18-24 días y 6-16 días respectivamente, en condiciones de estrés salino según lo mencionado en la sección materiales y métodos 2.1 (100 o 150 mM de NaCl para *A. thaliana* y 50 o 200 mM de NaCl para lechuga) tratadas con la biomasa de *A. maxima*, considerando la sobrevivencia como el establecimiento de hojas verdaderas no cloróticas.

### **2.2. *Solanum lycopersicum***

Las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Micro-Tom utilizadas en los experimentos desarrollados en este seminario de título fueron obtenidas a partir de la colección de semillas del laboratorio del Dr. Patricio Arce. Las semillas se estratificaron incubándolas en agua destilada estéril a 4°C por 48 h en oscuridad, luego se sembraron directamente en sustrato, (turba: vermiculita 2:1; turba Kekkilä DSM 2W, de Kekkilä Group, Finlandia; vermiculita Intersum® tipo grueso, Argentina, respectivamente) en bandejas de poliestireno con tapa. Una vez germinadas, las plantas se aclimataron a las condiciones de humedad del invernadero, abriendo progresivamente la tapa hasta destaparlas completamente en el transcurso de una semana. Posteriormente, se transfirieron a vasos de polipropileno con fondo perforado de 1 L (11 cm de diámetro) que contenían el sustrato antes descrito (3 semanas a partir de la siembra).

Las plantas se mantuvieron en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 4^\circ\text{C}$ ), con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, intensidad lumínica de  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y humedad relativa promedio del ambiente de 40%. Se realizaron riegos dos veces por semana, una con agua y otra con solución nutritiva de Hoagland 0,5X (Anexo 2) intercaladamente.

Para los tratamientos con la biomasa de *A. maxima*, se dividieron al azar las plantas en 4 grupos: 9 plantas control (asperjadas con agua destilada), 17 y 16 plantas tratadas con 500 y 1000 mg/L de solución acuosa autoclavada de biomasa liofilizada de *A. maxima*, respetivamente, y 10 plantas tratadas con Algamax (Best garden, Chile), el cual es un bioestimulante comercial. Estas concentraciones se escogieron de acuerdo a reportes previos (Bhowmik, y col., 2010). Se realizaron aspersiones 2 veces a la semana en conjunto con el riego, tanto en la zona foliar como en el sustrato, con 15-20 mL para las plantas control y las tratadas con la biomasa de *A. maxima*, y 8-15 mL para las plantas tratadas con Algamax, el cual fue aplicado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

### **2.2.1. Análisis fenotípico de *Solanum lycopersicum***

Se recolectaron los frutos de *S. lycopersicum* cv. Micro-tom que presentaron madurez de cosecha, es decir, al menos un 30% de su superficie de color rosa o rojo (Suslow & Cantwell, 1997). Esto se realizó en dos oportunidades: a las 18 y 21 semanas post siembra. El tejido aéreo y radicular fue recolectado a las 21 semanas post siembra.

#### **2.2.1.1. Número de frutos, diámetro ecuatorial, número de semillas, biomasa, rendimiento y % de sólidos solubles totales de los frutos y biomasa fresca de las plantas**

Se registró el número de frutos por planta y se determinó el diámetro ecuatorial de cada uno de ellos, definido como el diámetro máximo de la sección ecuatorial (FAO, 2007) mediante un calibre digital. Luego, se determinó la biomasa fresca de cada uno de los frutos en una balanza analítica. Se cuantificó el contenido (%) de los sólidos solubles totales de los frutos que se encontraban en etapa final de madurez (mayor 90% de la superficie de color rojo; Suslow & Cantwell, 1997) con un refractómetro y se determinó

el número de semillas por fruto. Finalmente, se deshidrataron a 60°C durante 3 días, tras lo cual se obtuvo el peso seco y subsecuentemente el contenido de agua como fue descrito anteriormente. El rendimiento de cada planta se calculó como la biomasa total (en gramos) de fruto maduro por planta. Por otra parte, se separó el tejido aéreo y radicular de las plantas de *S. lycopersicum*. Las raíces fueron cuidadosamente desprendidas del sustrato y sumergidas en agua para eliminar cualquier remanente, se secaron con papel absorbente y se registró la biomasa de las raíces y de la parte aérea de cada una de las plantas en una balanza analítica.

### **3. Análisis de la expresión génica de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con *Arthrospira maxima*.**

#### **3.1. Extracción de RNA de tejido aéreo de *Arabidopsis thaliana***

Para extraer RNA total de *A. thaliana* se utilizó el reactivo comercial TRIzol (Ambion, Life Technologies) y se siguieron las instrucciones del fabricante. En breve, se sumergieron 50 – 100 mg del tejido en N<sub>2</sub> líquido y se pulverizó en presencia de esferas de óxido de zirconio de 1,4 mm (precellys, Francia) con un homogeneizador de tejido (precellys21, Bertin instruments, Francia), luego se añadió 1 mL de TRIzol y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó a cada tubo 0,2 mL de cloroformo, agitando vigorosamente a mano por 15 seg y después se centrifugó a 4°C durante 15 min a 12 000 x g. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo con 0,5 mL de isopropanol, se mezcló y se dejó a temperatura ambiente por 10 min o por toda la noche a -80°C para la precipitación del RNA. Luego, se centrifugó a 4°C a 12 000 x g durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, el pellet de RNA se lavó con etanol 75%, se centrifugó a 4°C a 7500 x g por 5 min y se removió el sobrenadante. El pellet se dejó secar al aire por 10 min, se añadió 20 µL de agua sin nucleasas (Winkler) y se incubó a



55°C por 10 min. Finalmente, para determinar la concentración y pureza del RNA se calcularon los índices 260/280, que permite identificar contaminación por fenoles o proteínas y 260/230, que proporciona información sobre contaminantes residuales como el TRIzol y algunos carbohidratos (ThermoScientific, 2011), midiendo la absorbancia de 1 µL de la muestra en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™, USA. Las muestras de RNA se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

### 3.2. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizó 1 µg de RNA por muestra, a la cual se le agregó 0,8 unidades de RNasa (kit TURBO DNA-free™, Ambion), 1 µL de buffer 10X Turbo DNase buffer y agua sin nucleasas (Winkler) hasta completar un volumen de 10 µL. Luego, se incubó a 37°C por 30 min y se agregó 1 µL de la solución de inactivación DNase Inactivation Reagent (resuspendida) a cada muestra, las que fueron incubadas a 22°C y luego centrifugadas a 10 000 x g durante 1,5 min, de donde se rescató el sobrenadante (8 µL aproximadamente). Posteriormente se agregó 1 µL de partidores hexanucléotidos de secuencias al azar (Random primers) a 100 ng/µL (Invitrogen, USA), 1 µL de dNTPs a 10 mM (Invitrogen) y 2 µL de agua destilada sin nucleasas (Winkler) y se incubó a 65°C por 5 min en un termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems®, USA) y luego en hielo por 2 min. A continuación, se adicionó 4 µL de buffer 5X First-Strand (KCl 375mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM y Tris-HCl 250 mM a pH 8,3; Invitrogen) y 2 µL de DTT a 0,1 M, se incubó a 25°C por 2 min y luego se añadió 1 µL (200 unidades/ µL) de la enzima transcriptasa reversa SuperScript™ II (Invitrogen) y se incubó nuevamente a 25°C durante 10 min. Luego, se realizó la transcripción inversa incubando durante 50 min a 42°C, tras lo cual se inactivó la reacción al calentar a 70°C por 15 min. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

### 3.3. Amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para confirmar la integridad del cDNA de *A. thaliana* mencionados en la sección materiales y métodos 3.2 se amplificaron genes de expresión constitutiva como *CLN* y *ACT2* (Tabla 1), mediante PCR. También se amplificaron los fragmentos de los genes cuya expresión se cuantificó por q-RT-PCR (sección materiales y métodos 3.4). Para ello, en cada reacción se utilizó 0,8 µL de cDNA de cada muestra, 2 µL de buffer 10X (Invitrogen), 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen), 0,4 µL de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 0,4 µL de partidor sentido (F), 0,4 µL de partidor antisentido (R) 10 µM, 0,16 µL de Taq Polimerasa (5 U/µL; Invitrogen) y 15,24 µL de agua sin nucleasas (Winkler). Además, se incluyó un control positivo de DNA y un control negativo sin templado. El programa de termociclado consistió en: segmento 1 (fase inicial) de un ciclo de 95°C por 5 min, segmento 2 de 35 ciclos de 95°C por 30 seg (desnaturalización), 55°C por 30 seg (alineamiento) y 72°C por 30 seg (extensión), y segmento 3 (extensión final) de 72°C por 5 min.

**Tabla 1:** Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y q-RT-PCR. Las secuencias se encuentran representadas de 5' a 3'.

Nombre partidor	Gen	Secuencia	Producto DNA(pb)	Producto cDNA(pb)
<b>act2</b> <sup>1</sup>	AT3G18780	F: ACAGCAGAGCGGAAATT	148	148
	<i>ACT2</i>	R: ACCAATCGTGATGACTTGCC		
<b>cln3</b> <sup>1</sup>	AT4G24550	F: ATACGCGCTGAGTTCCTT	261	105
	<i>CLN</i>	R: AGCACCGGGTTCTAACTC		
<b>Express</b> <sup>1</sup>	AT2G32170	F: ATCGAGCTAAGTTTGGAGGATGTAA	60	60
	<i>EXPRS</i>	R: CATTTTGGGTTTGTGATCGAGA		
<b>Expa-10</b> <sup>2</sup>	AT1G26770	F: ACGCTCACGCCACTTTTAC	144	68
	<i>EXPA10</i>	R: ACCATATCCACAAGCACCAC		
<b>FD-GOGAT</b> <sup>2</sup>	AT5G04140	F: GCTGTGTAGTCGTGCTTGGA	308	221
	<i>FD-GOGAT1</i>	R: CTCCTGTCATACCAGCAGCA		
<b>NCED3</b> <sup>2</sup>	AT3G14440	F: AAATTTTGCTCCGGTGAATG	91	91

	<i>NCED3</i>	R: GCGCACATACACTCCTTTGA		
<b>PDF1.2<sup>2</sup></b>	AT5G44420	F: CACCCTTATCTTCGCTGCTC	168	76
	<i>PDF1.2</i>	R: GCACAACTTCTGTGCTTCCA		
<b>PR1<sup>2</sup></b>	AT2G14610	F: TCAGTGAGACTCGGATGTGC	91	91
	<i>PR1</i>	R: CGTTCACATAATTCCCACGA		
<b>RD29<sup>2</sup></b>	AT5G52300	F: CCAGGAGGAGGATCGGATTA	239	169
	<i>RD29B</i>	R: CTCGCGTCCTTGTCTTGAT		

<sup>1</sup>Partidores diseñados previamente por el grupo del Dr. Patricio Arce

<sup>2</sup>Partidores diseñados con la versión web del programa Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>), y sintetizados en Integrated DNA Technologies (USA).

Los fragmentos obtenidos de las reacciones de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Brevemente, entre 10-20  $\mu$ L de los fragmentos amplificados por PCR se cargaron en gel de agarosa al 2% o 2,5% (p/v) en solución buffer TAE 1X (Winkler), con 2-4  $\mu$ L de solución de carga 6X (glicerol 30% p/v; azul de bromofenol 0,25% p/v y xilen-cyanol FF 0,25% p/v; Winkler). La electroforesis se realizó a 100 V por 30-45 min en presencia de buffer de corrida TAE 0,5X. Los geles se tiñeron durante 30 min en una solución acuosa de GelRed® al 0,03% (Biotium). Los fragmentos de DNA se visualizaron en un transiluminador UV (Vilber Lourmat, Francia) y se fotografiaron utilizando una cámara digital con filtro UV (PowerShot G6, Canon, Japón).

### 3.4. PCR en tiempo real o q-RT-PCR

#### 3.4.1. Estandarización de partidores

Para analizar la calidad y la eficiencia de los partidores utilizados en las reacciones de q-RT-PCR, se prepararon una serie de diluciones a partir de un molde de cDNA de la siguiente manera: se realizó un PCR y los fragmentos amplificados para cada pareja de partidores se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (sección materiales y métodos 3.3) Se utilizó como templado cDNA de hoja obtenido tal como se describió en la sección materiales y métodos 3.2. A continuación, se purificaron las bandas de agarosa que contenían los fragmentos únicos con el kit FavorPrep® GEL/PCR

Purification Kit (Favorgen® Biotech Corp.) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

La concentración del producto se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop.

Se confirmó mediante secuenciación (Macrogen Corp, USA) que los fragmentos obtenidos por PCR en la sección materiales y métodos 3.3 correspondían al segmento del gen esperado. Se compararon las secuencias obtenidas con las secuencias depositadas en la base de datos TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) o PHYTOZOME (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) y se alinearon utilizando el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Posteriormente, se diluyó cada producto de amplificación hasta una concentración final de 1 ng/ $\mu$ L. A continuación, se realizaron 6 diluciones seriadas 1/10 que van desde los 5 pg/ $\mu$ L hasta los 0,00005 pg/ $\mu$ L, los cuales fueron utilizadas como templado en las reacciones de q-RT-PCR. Se utilizó el equipo Agilent Mx3000P qPCR System, Stratagene de acuerdo a las instrucciones del fabricante (obtenido de Agilent Technologies Inc, USA) y el sistema comercial PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, USA), el cual contiene el fluoróforo SYBR Green I y el fluoróforo ROX como referencia. La reacción de q-RT-PCR se llevó a cabo en un volumen total de 10  $\mu$ L, el cual contenía 5  $\mu$ L PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, 1  $\mu$ L de cDNA diluido (1/2,5), volúmenes variables de partidores sentido (F) y antisentido (R) detallados en la Tabla 2 en la sección Resultados y agua libre de nucleasas (Winkler) hasta completar el volumen final. Para cada muestra se realizó un duplicado técnico. El programa de amplificación utilizado fue: 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 30 segundos. Finalmente, se incubó a 95°C por 10 seg, 60°C por 10 segundos y 95°C por 10 seg y 25°C por 30 seg para determinar la curva de disociación del producto amplificado. Se realizó un análisis de las curvas de disociación utilizando el software MxPro, para corroborar que sólo un producto fue amplificado. Se determinó la

eficiencia (E) de los partidores en base a las curvas estándar obtenidas para cada pareja de partidores al graficar en la ordenada el Ct obtenido para cada dilución (Ct o Threshold cycle, se define como el ciclo en el cual la fluorescencia es significativamente diferente al background) vs. log de la concentración de templado en (pg) en eje de la abscisa. Para el cálculo de la eficiencia para cada pareja de partidores se utilizó la siguiente ecuación:

$$Eficiencia = 10^{-1/pendiente\ curva\ estandar} \text{ (Ecuación 6)}$$

Las eficiencias utilizadas debían estar en el rango entre 90-110%.

### 3.4.2. Determinación de los niveles de expresión génica en *Arabidopsis thaliana*

Para la determinación de los niveles de transcritos (mRNA) se siguió el mismo procedimiento que en el punto anterior. Se utilizaron 3 réplicas biológicas (RNA y cDNA) para cada condición (tratamiento con diferentes concentraciones de biomasa de *A. maxima*) y cada cDNA se amplificó 2 veces (duplicado técnico). Los niveles de RNA se determinaron en relación al gen normalizador, tomando en cuenta las eficiencias de amplificación de los genes de interés y del normalizador elegido. La expresión relativa fue calculada según el método  $\Delta\Delta Ct$  basado en la eficiencia de los partidores determinadas previamente, utilizando las ecuaciones:

$$Expresión\ relativa = \frac{Expresión\ absoluta_{tratamiento}}{Expresión\ absoluta_{control}} \text{ (Ecuación 7)}$$

$$Expresión\ absoluta = \frac{(E_{GI}+1)^{-Ct_{GI}}}{(E_{GHK}+1)^{-Ct_{GHK}}} \text{ (Ecuación 8)}$$

Donde, E= Eficiencia, GI= gen de interés y GHK= gen housekeeping o normalizador.

Se seleccionó *ACT2* como normalizador de la expresión en *A. thaliana* mediante el uso del algoritmo geNorm (<https://genorm.cmgg.be/>). Esta herramienta selecciona el gen normalizador o housekeeping cuya expresión es más estable, es decir, el que presenta

un menor coeficiente de variación entre las muestras analizadas desde un set de genes normalizadores candidatos (en este trabajo: actina, clatrina y el gen que codifica para una proteína expresada desconocida (*EXPRS*)), ver Tabla 1 (Vandesompele y col., 2002). Para lo anterior, se utilizaron cDNAs provenientes de plantas crecidas en ausencia y presencia de biomasa de *A. maxima*.

#### **4. Análisis estadístico y procesamiento de imágenes**

El análisis estadístico se realizó para comparar las plantas de las diferentes condiciones (control y tratadas con la biomasa de *A. maxima*). Se utilizó el software GraphPad Prism 5 realizando test de Student o ANOVA y test de Tukey como análisis post-hoc, considerando diferencias significativas cuando el p value < 0,05.

Las imágenes mostradas en las figuras de este seminario de título fueron procesadas en los programas Adobe Illustrator CS6 y Adobe Photoshop CS6.

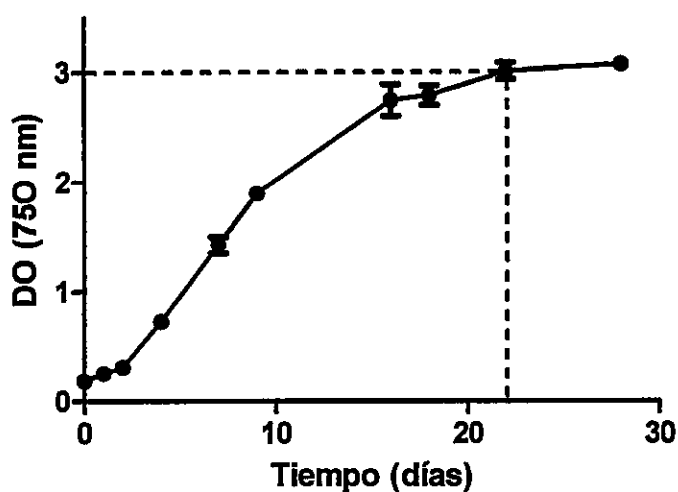
## RESULTADOS

### 1. Estandarización de las condiciones de cultivo y obtención de biomasa de *Arthrospira maxima*

#### 1.1. Condiciones de cultivo de *Arthrospira maxima*

Con el propósito de determinar las condiciones de crecimiento necesarias para la obtención de la biomasa de *A. maxima*, se escogió el medio Schlösser modificado (Anexo 1) para el cultivo de la cepa *Arthrospira maxima* CCAP 1475/9, dada su facilidad de preparación, bajo costo y composición nutricional adecuada para el crecimiento de este microorganismo.

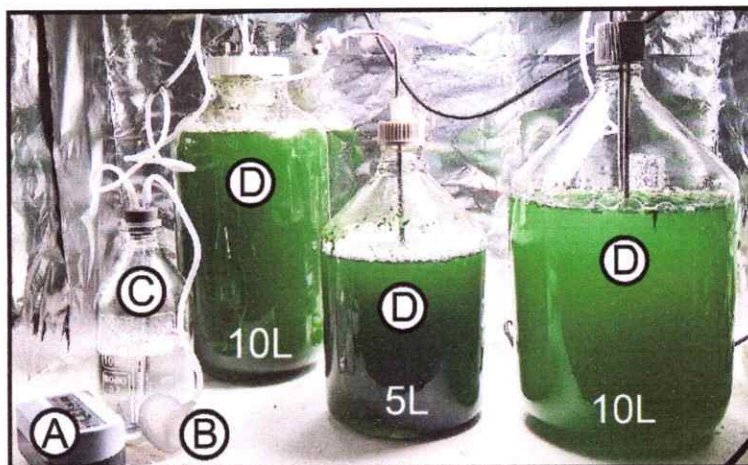
Se realizó una curva de crecimiento por densidad óptica (DO) a 750 nm de los cultivos de *A. maxima* con el fin de determinar y estandarizar el tiempo de cosecha donde se obtuviera la mayor cantidad de biomasa en el menor tiempo posible (Fig. 2). Se determinó que a los 22 días post inoculación se iniciaba la fase de crecimiento estacionario, donde teóricamente no aumenta ni disminuye el número de células, ya que la tasa de crecimiento es cero (Madigan y col., 2014).



**Figura 2:** Curva de crecimiento de *Arthropira maxima* determinada mediante densidad óptica. Se determinó el crecimiento de la cepa CCAP 1475/9 mediante DO a 750 nm en el transcurso del tiempo. La línea punteada muestra el inicio de la etapa de crecimiento estacionario (plateau). Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM (error estándar de la media) de 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas cada una.

Para asegurar un suministro constante y suficiente de biomasa de *A. maxima* para los ensayos en plantas, se diseñó un sistema de fotobiorreactores que permitiera una mayor capacidad en volumen del cultivo y biomasa final (15-30 L). Para ello, se utilizó el sistema descrito en la Fig. 3. Este consistió en 3 fotobiorreactores de 5-10 L que contenían cultivo de *A. maxima* en medio Schlösser modificado (Fig. 3D), a los cuales se les inyectó constantemente aire húmedo estéril, el que permitió por una parte la agitación continua de los cultivos y, por otra parte, la inyección de aire necesaria para el intercambio gaseoso.





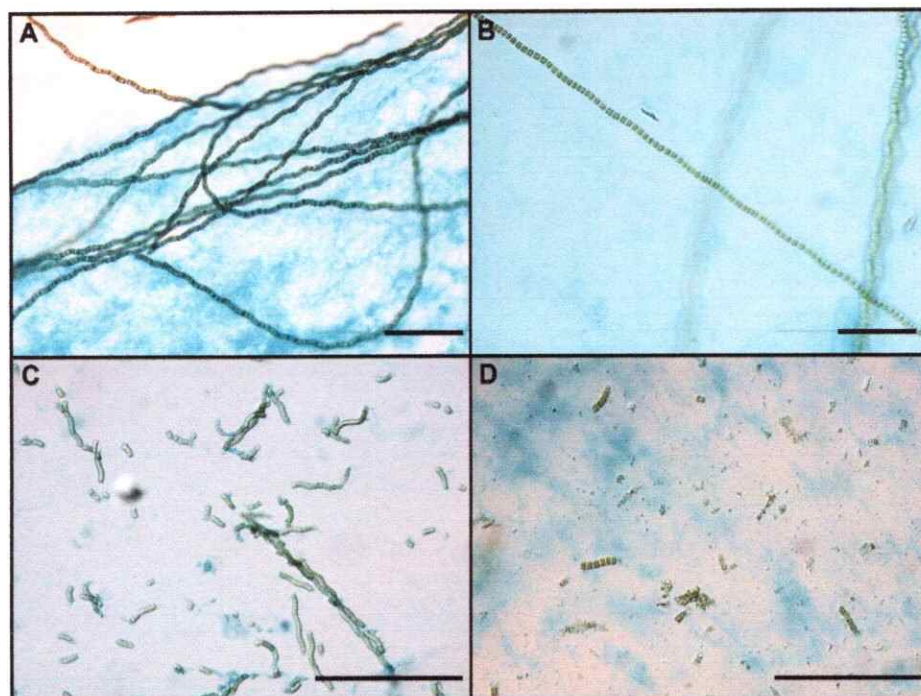
**Figura 3:** Montaje y configuración de fotobiorreactores tipo batch para el crecimiento de *Arthrospira maxima*. A: Bomba de aire, B: Filtro de aire de 0,2  $\mu\text{m}$ , C: Humidificador de aire, D: Fotobiorreactores, de 5 L y de 10 L.

### 1.2. Obtención de biomasa de *Arthrospira maxima*

Una vez que los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento estacionario (determinado por densidad óptica a 750 nm), tal como se mostró en la Fig. 2, se cosecharon mediante centrifugación. Posteriormente, el pellet se liofilizó, dando un rendimiento de 2,5 g/L para los cultivos en matraces de 250 mL, y de 1 g/L para los cultivos provenientes de los fotobiorreactores de 5-10L.

Adicionalmente, para evaluar el método de disrupción celular más eficiente, se observaron los filamentos de *A. maxima* en cultivo fresco y el grado de fragmentación de estos después de los procesos de liofilización y autoclave en el microscopio óptico, utilizando tinción alcian blue (Fig. 4). Se determinó que el proceso de autoclave al cultivo fresco no fue suficiente para que se fragmentaran los filamentos (Fig. 4A, B), lo que sí ocurrió con el proceso de liofilización, donde aún fue posible distinguir fracciones de *A. maxima* (Fig. 4C) y con ambos procesos en conjunto, se obtuvo un grado mayor de fragmentación, encontrándose los filamentos completamente destruidos (Fig. 4D), lo que contribuiría a una mayor biodisponibilidad de las sustancias que se encuentran en el

interior de las células de *A. maxima*, las cuales podrían promover el crecimiento de plantas.



**Figura 4:** Imágenes de microscopía óptica con tinción alcian blue del proceso de fragmentación de los filamentos de *Arthrospira maxima* durante el proceso de liofilización y/o autoclave. (A) Cultivo fresco de 2 semanas (20X). (B) Cultivo autoclavado (20X). (C) Cultivo liofilizado (40X). (D) Cultivo liofilizado y autoclavado (40X). La barra representa 100  $\mu\text{m}$ .

Resumiendo, se logró estandarizar las condiciones de crecimiento de la cepa *Arthrospira maxima* CCAP 1475/9 tanto en pequeña (250 mL), como a mediana escala (5-10L). Además, se determinó que el tiempo de cosecha óptimo correspondió a los 22 días post inoculación, momento en el cual se iniciaba la fase de crecimiento estacionario. Por otra parte, los procesos de liofilización y autoclave en conjunto permitieron un mayor grado de fragmentación de los filamentos de *A. maxima* respecto a ambos procesos por separado, ya que la deshidratación dada por la liofilización y la presión, y alta temperatura del autoclave, favorecen la lisis celular.

## **2. Análisis fenotípico del crecimiento vegetativo de plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Lactuca sativa* tratadas con *Arthrospira maxima***

### **2.1. *Arabidopsis thaliana***

#### **2.1.1. Crecimiento aéreo y radicular**

Para determinar el efecto bioestimulante de *A. maxima* sobre el crecimiento vegetativo de las plantas, se utilizó: 1) La biomasa de la cepa *Arthrospira maxima* CCAP 1475/9 desarrollado en el laboratorio en este seminario de título; 2) Spirulina nature (Aeon Biogroup, Chile), producida comercialmente con fines de nutrición humana; y 3) Spirulina del Consorcio Algaefuels S.A., (Chile), los dos últimos producidos a escala industrial. Se analizó la composición química de los dos últimos con el fin de asegurarse que fueran similares a lo reportado (Anexo 3). A grandes rasgos, Spirulina nature y Spirulina del Consorcio Algaefuels presentaron un contenido muy similar de N, P, K y Mg, pero Spirulina del Consorcio Algaefuels presentó mayores niveles de Ca (98,9%), Na (1497%), Mn (555%), Zn (922%) y B (330%) que los de Spirulina nature, es decir, presentó en general una mayor concentración de sales. La biomasa de *A. maxima* obtenida en el laboratorio no se pudo analizar, debido a que la cantidad mínima solicitada para el análisis era de 100 g, lo que requería grandes volúmenes de cultivo (hasta 100L), imposible dado los rendimientos obtenidos de los cultivos y el volumen máximo de crecimiento en el laboratorio (detalladas en la sección resultados 1.2).

Para evaluar el crecimiento vegetativo, se escogió la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, dada su facilidad de cultivo y a que distintos fenotipos se han descrito con relación a su desarrollo. Estas fueron cultivadas en medio MS 0,5X con diferentes concentraciones de Spirulina.

Los productos a base de Spirulina producidos a gran escala no mostraron efectos bioestimulantes. Por una parte, la Spirulina nature de Aeon Biogroup, producida para

consumo humano, no mostró efectos positivos ni negativos sobre el crecimiento de *A. thaliana* (resultados no mostrados), mientras que Spirulina proveniente de Algaefules S.A, producida para consumo humano y otros fines, generó un efecto negativo en el crecimiento aéreo de *A. thaliana*, ya que las plantas tratadas con 100, 250, 500, 750 y 1000 mg/L de Spirulina presentaron una elevada clorosis (resultados no mostrados).

Mientras que la biomasa de *A. maxima* de la cepa CCAP 1475/9 obtenida en el laboratorio durante este seminario de título, fue la única que mostró un efecto bioestimulante sobre las plantas, ya que gatilló un mayor crecimiento de la roseta en las plantas tratadas al compararlas con las plantas control (Fig. 5). Acorde con estos resultados, todos los ensayos posteriores se realizaron con la biomasa de *A. maxima* producida en el laboratorio.

Para evaluar el potencial bioestimulante de *A. maxima*, se crecieron plantas de *A. thaliana* en medio MS 0,5X, en presencia de diferentes concentraciones de la biomasa de *A. maxima* (50, 100, 250, 500 mg/L). Las plantas fueron cosechadas a las 3 semanas y se midió el diámetro de la roseta, la biomasa (fresca y seca) y el contenido de agua.

Las plantas crecidas en presencia de *A. maxima* (en todas las concentraciones) exhibieron un aumento significativo tanto en el diámetro de la roseta, como de la biomasa fresca respecto a las plantas control (crecidas en ausencia de *A. maxima*) (Fig. 5A, B).

En particular, las plantas tratadas con 50, 100, 250 y 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* obtuvieron un incremento significativo del diámetro de la roseta desde 2,1 (control) a 2,7 (28,5%), 2,5 (19%), 3,1 (47,6%) y 2,5 (19%) cm, respectivamente (Fig. 5A). En cuanto a la biomasa fresca, las plantas tratadas con *A. maxima* presentaron un aumento desde 20,7 (control) a 36,1 (74,4%), 41,0 (98,1%), 53,9 (160,4%) y 43,6 (110,6%) mg en las plantas tratadas con 50, 100, 250 y 500 mg/L de *A. maxima*, respectivamente (Fig. 5B).

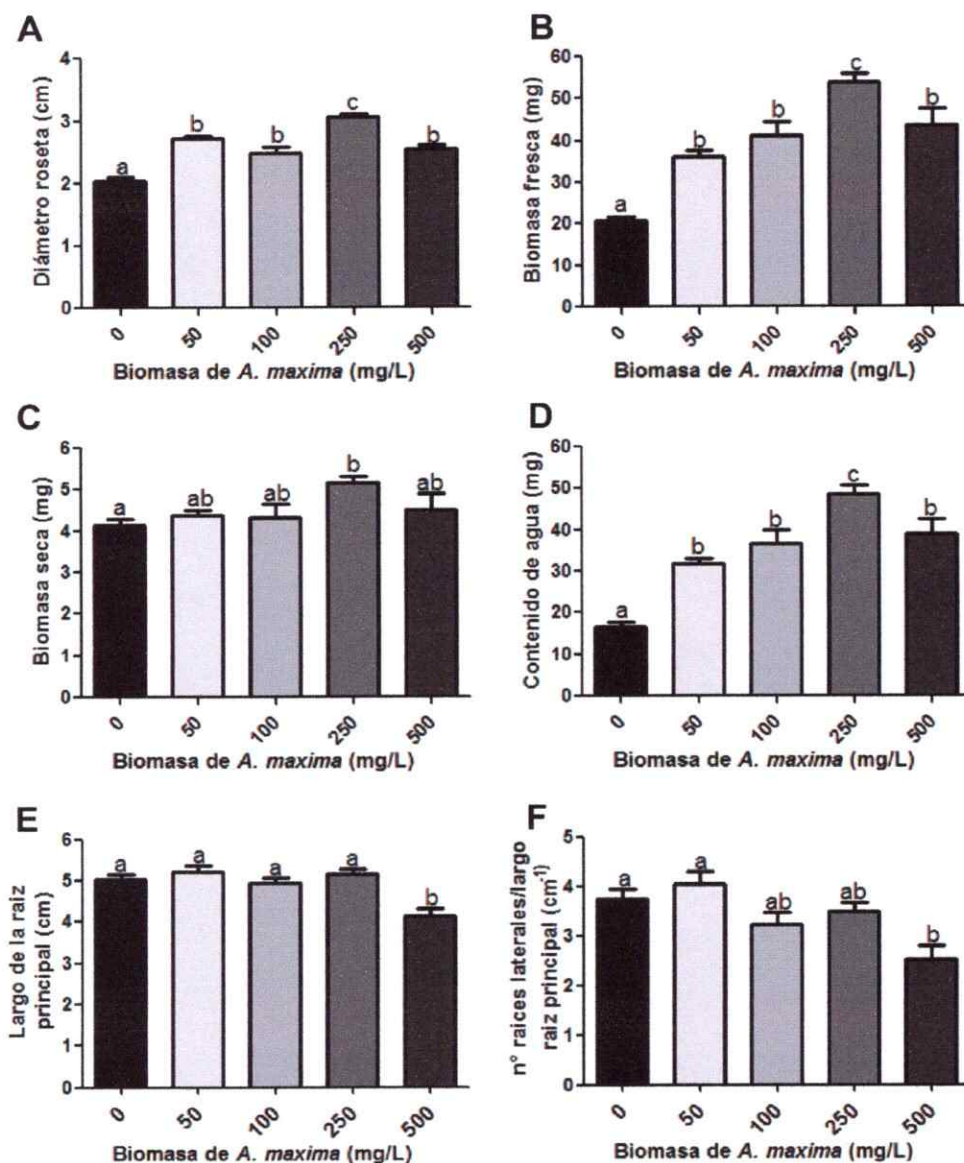
En cuanto a la biomasa seca, no hubo diferencias significativas entre las plantas tratadas y el control, a excepción de las plantas crecidas con 250 mg/L de biomasa de *A. maxima* (Fig. 5C), donde se detectó un aumento desde 4,1 (control) a 5,2 mg (26,8%). Cabe destacar que este aumento a pesar de ser estadísticamente significativo, no explica el aumento en la biomasa fresca, dada su magnitud.

El contenido de agua se calculó mediante la diferencia entre la biomasa fresca y seca. Se obtuvieron resultados muy similares a los de biomasa fresca. Las plantas tratadas con *A. maxima* presentaron un aumento significativo del contenido de agua, respecto a las plantas control (Fig. 5D). En el caso de las plantas con 50, 100, 250 y 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* el incremento fue desde 16,6 (control) a 31,7 (91%), 36,7 (121,1%), 48,7 (193,4%) y 39,1 mg (135,5%), respectivamente. Cabe destacar que la magnitud de este incremento, sí explica el aumento de la biomasa fresca, lo que sugiere que las plantas tratadas con *A. maxima* habrían aumentado su biomasa fresca mediante una mayor acumulación de agua.

Cabe destacar que las plantas tratadas con 250 mg/L de biomasa de *A. maxima* presentaron no solo un aumento significativo del diámetro de la roseta, de la biomasa fresca y del contenido de agua respecto a las plantas control, sino que también respecto a los demás tratamientos con *A. maxima*, es decir, con 250 mg/L de biomasa de *A. maxima* se obtuvo máximos resultados.

Para evaluar el potencial bioestimulante de *A. maxima* en el tejido radicular, se midió el largo de la raíz principal y la densidad de las raíces laterales de plantas de *A. thaliana* de 18 días en medio MS 0,5X, en presencia de diferentes concentraciones de biomasa de *A. maxima* (50, 100, 250, 500 mg/L). Solo las plantas tratadas con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* presentaron diferencias significativas respecto a las plantas

control, con una disminución en el largo de la raíz principal (Fig. 5E) y en la densidad de las raíces laterales (Fig. 5F).

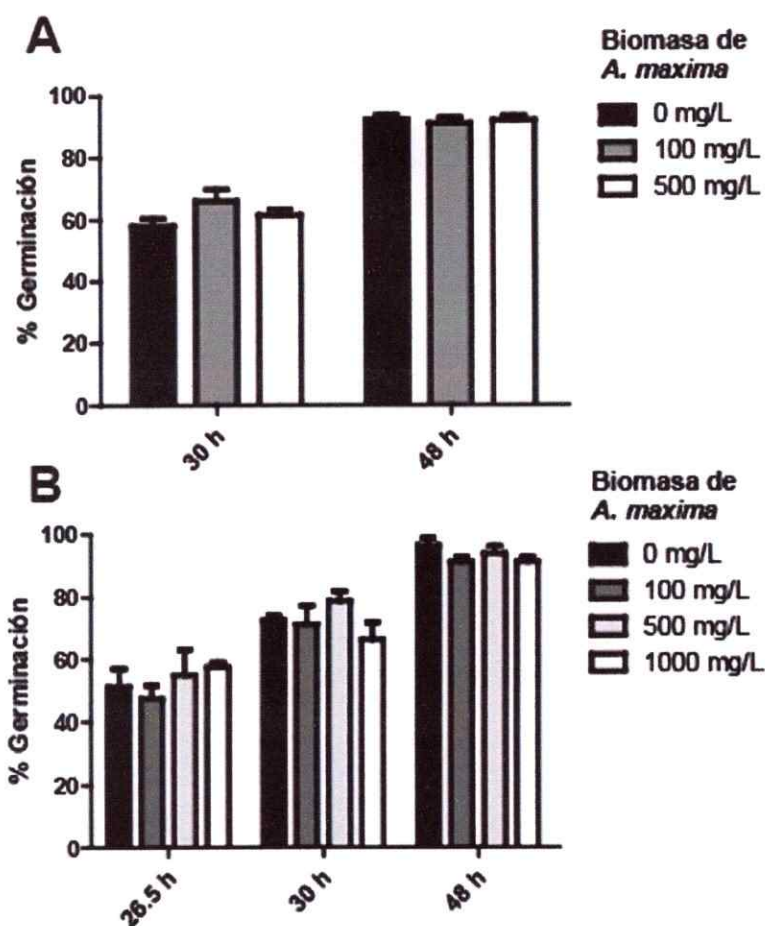


**Figura 5:** Crecimiento aéreo y radicular de plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en presencia de *Arthrospira maxima*. (A) Diámetro de la roseta. (B) Biomasa fresca (C) Biomasa seca. (D) Contenido de agua. (E) Largo de la raíz principal. (F) Densidad de raíces laterales (definido como el número de raíces laterales normalizado por el largo de la raíz principal). Todos los experimentos son tratamientos de plantas de *A. thaliana* crecidas en medio MS 0,5X en ausencia (control) o presencia de biomasa de *A. maxima* (50-500 mg/L). Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de 6-8 placas con 3 plantas cada una (A, B, C, D) y de 3 placas 4-12 plantas cada una (E, F) de 3 semanas (A, B, C, D) y de 18 días (E, F) por condición. Letras diferentes indican la significancia estadística mediante ANOVA y análisis post hoc Tukey con  $p < 0,05$ . Se obtuvieron resultados similares en al menos otros 3 experimentos independientes.

Resumiendo, los productos a base de Spirulina producidos a escala industrial no mostraron efectos bioestimulantes o más aún, presentaron efectos negativos sobre el crecimiento vegetativo de *A. thaliana*. En cambio, la biomasa producida en el laboratorio a partir de la cepa de *A. maxima* CCAP 1475/9 sí presentó un efecto bioestimulante sobre el crecimiento vegetativo de *A. thaliana*. Las plantas tratadas con esta biomasa, presentaron un mayor diámetro de la roseta y una mayor biomasa fresca (presumiblemente a través de una mayor acumulación de agua), respecto a las plantas control, ya que la magnitud del aumento de la biomasa seca no explica el aumento en la biomasa fresca. *A. maxima* no presentó efectos negativos sobre el largo de la raíz principal o en la densidad de raíces laterales de las plantas tratadas, a excepción de las plantas crecidas con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima*, donde se observó una disminución significativa de ambos parámetros respecto a las plantas control.

#### 2.1.2. Germinación

Por otra parte, con el fin de estudiar el efecto de *A. maxima* sobre la germinación (emergencia de la radícula) de semillas de *A. thaliana*, se realizaron 2 experimentos: se sembraron semillas en medio MS 0,5X que contenía diferentes concentraciones de biomasa de *A. maxima* (0, 100 y 500 mg/L) (Fig. 6A) y, por otra parte, se estratificaron semillas en soluciones acuosas de biomasa de *A. maxima* (0, 100, 500 y 1000 mg/L) (Fig. 6B) y luego se sembraron en medio MS 0,5X. En ambos casos no se registraron diferencias significativas entre las plantas control y las crecidas en presencia de *A. maxima* en cuanto al porcentaje de germinación a las 26,5; 30 y 48 horas post imbibición (hpi).



**Figura 6:** Efecto de *Arthrospira maxima* sobre la germinación de *Arabidopsis thaliana*. (A) Las semillas fueron sembradas en placas con MS 0,5X que contenían 0 (Control), 100 o 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* y se midió la germinación (emergencia de la radícula) a las 30 y 48 hpi. (B) Adicionalmente, se midió el efecto de *A. maxima* sobre la germinación de semillas de *A. thaliana* estratificadas en una solución con 0 (control), 100, 500 y 1000 mg/L de biomasa de *A. maxima* a las 26,5 hpi, 30 hpi y 48 hpi. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de 4 placas con 20 semillas cada una por condición. Se realizó como análisis estadístico ANOVA y Test de Tukey como análisis post hoc.

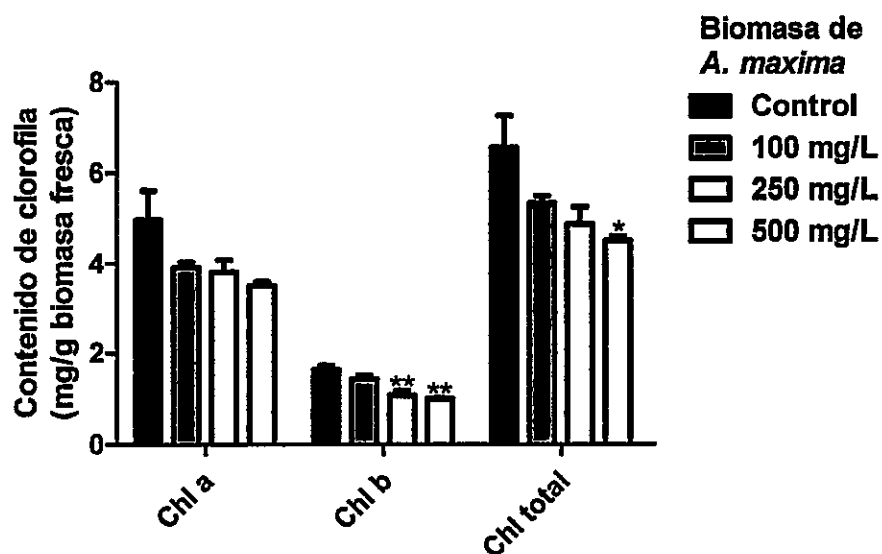
Resumiendo, *A. maxima* no afectó la germinación de semillas de *A. thaliana* tanto en tratamientos pre- y post-estratificación.

### 2.1.3. Contenido de clorofila

Con el fin de evaluar si el aumento del crecimiento de las plantas de *A. thaliana* estaba relacionado con un aumento de la fotosíntesis, se cuantificó el contenido de clorofila a (Chl a), b (Chl b) y total (Chl total) de plantas de *A. thaliana* crecidas en diferentes



concentraciones de biomasa de *A. maxima* (100, 250, 500 mg/L). Para el caso de la Chl a, no se encontraron diferencias significativas entre las distintas condiciones (Fig. 7; gráfico izquierda). En cambio, el contenido de Chl b en las plantas tratadas con 250 y 500 mg/L de biomasa de *A. maxima*, fue significativamente menor respecto a las plantas control. Las plantas tratadas con 100 mg/L de biomasa de *A. maxima* por su parte, no presentaron diferencias significativas (Fig. 7; gráfico al medio). Finalmente, el contenido de Chl total solo disminuyó significativamente en las plantas tratadas con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* al compararlas con las plantas control (Fig. 7; gráfico derecha).



**Figura 7:** Contenido de clorofila a (izquierda), b (al medio) y total (derecha) de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con biomasa de *Arthrospira maxima*. Las mediciones fueron realizadas en hojas de plantas de 3 semanas. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de 3 placas con 6 plantas por condición. Cada medición se realizó por triplicado técnico. Los datos fueron analizados mediante ANOVA y análisis post hoc Tukey. Los asteriscos indican el valor de la diferencia estadística (\*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ ).

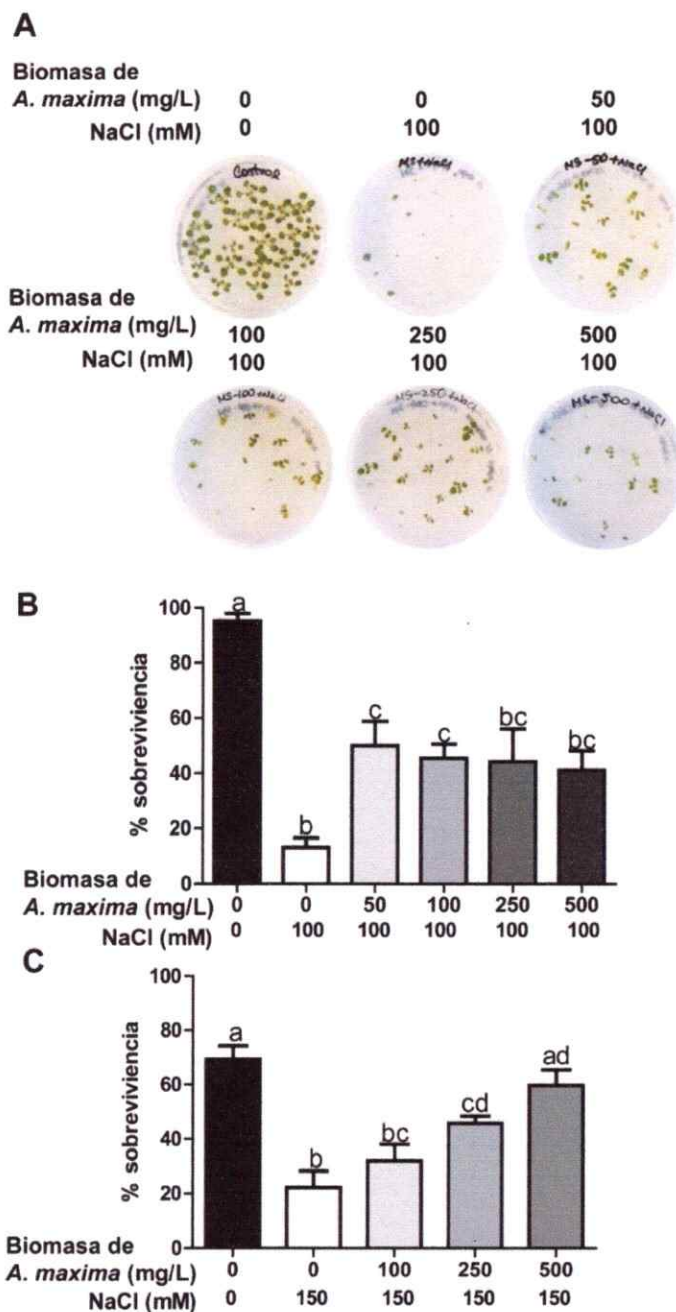
Resumiendo, el contenido de Chl a no presentó diferencias significativas en los tratamientos con *A. maxima*. En cambio, el contenido de Chl b disminuyó significativamente en las plantas tratadas con 250 y 500 mg/L de biomasa de *A. maxima*,

mientras que el contenido de Chl total solo fue negativamente afectado en las plantas tratadas con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima*.

#### 2.1.4. Tolerancia al estrés salino

Para evaluar si las plantas de *A. thaliana* tratadas *A. maxima* son capaces o no de tolerar de mejor forma el estrés salino, se crecieron plantas *in vitro* en medio MS 0,5X con NaCl (100 o 150 mM) y diferentes concentraciones de biomasa de *A. maxima* (50, 100, 250 y 500 mg/L).

En primer lugar, las plantas sometidas a estrés salino (100 o 150 mM) de NaCl, presentaron una disminución significativa en la sobrevivencia al compararlas con las plantas control (sin NaCl y sin *A. maxima*) de un 96,8 % a un 15,8% para 100 mM de NaCl y de un 69,4% a un 22,2% para 150 mM de NaCl (Fig. 8B y C). Por otra parte, las plantas que se encontraban a 100 mM NaCl y en presencia de 50 y 100 mg/L de biomasa de *A. maxima* aumentaron significativamente su sobrevivencia respecto a las plantas sometidas a estrés salino y en ausencia de *A. maxima* desde un 15,8% a un 58,5% y 50,1%, respectivamente (Fig. 8B). De igual manera, las plantas que se crecieron en presencia de 150 mM de NaCl y en presencia de 250 y 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* aumentaron significativamente su sobrevivencia respecto a las plantas crecidas en presencia de NaCl 150 mM y sin biomasa de *A. maxima* desde un 22,2% a un 45,8% y 59,7%, respectivamente. Es decir, el tratamiento con *A. maxima* aumenta la tolerancia al estrés salino.



**Figura 8:** Sobrevivencia de plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés salino y tratadas con *Arthrospira maxima*. Plantas de *A. thaliana* de (A) 18, (B) 22 y (C) 24 días cultivadas en medio MS 0,5X en ausencia (control) o presencia de biomasa de *A. maxima* (50-500 mg/L) y en ausencia o presencia de (A y B) NaCl 100 mM o (C) 150 mM. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de 3-4 placas con 18-21 plantas cada una por condición. Letras diferentes indican la significancia estadística mediante ANOVA y análisis post hoc Tukey con  $p < 0,05$ . Se obtuvieron resultados similares en al menos otros 2 experimentos independientes.

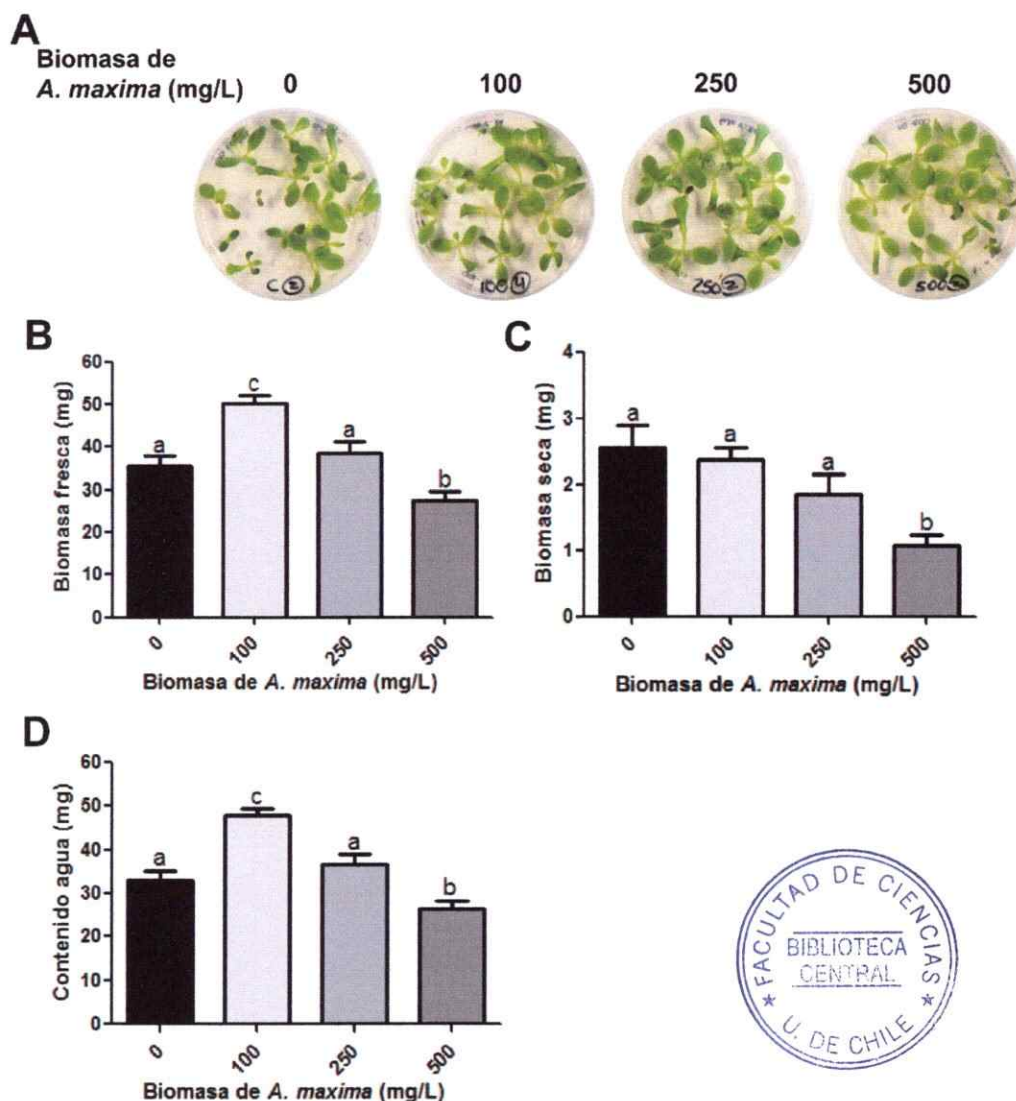
Resumiendo, las plantas de *A. thaliana* tratadas con *A. maxima* (50 y 100 mg/L) y sometidas a 100 mM NaCl aumentaron la tolerancia al estrés salino, respecto al control salino respectivo, al igual que plantas sometidas a 150 mM NaCl con 250 y 500 mg/L de *A. maxima*.

## **2.2. *Lactuca sativa***

### **2.2.1. Crecimiento aéreo**

Para evaluar el efecto bioestimulante de *A. maxima* sobre el crecimiento vegetativo de una planta de interés agronómico, se eligió a *Lactuca sativa* (lechuga) como modelo a utilizar. Para ello, se crecieron estas plantas en medio MS 0,5X (condiciones de suficiencia nutritiva), o en agua-agar (condiciones limitantes de nutrientes), los cuales contenían diferentes concentraciones de biomasa de *A. maxima* (0,100 ,250 y 500 mg/L), esto para evaluar si el efecto bioestimulante de *A. maxima* variaba en ambos casos. Transcurridos 11 y 21 días respectivamente, se midió la biomasa fresca y seca de las plantas. El contenido de agua se calculó como la diferencia entre ambas biomásas.

Las plantas crecidas en MS 0,5X en presencia de 100 mg/L de biomasa de *A. maxima* presentaron un aumento significativo de la biomasa fresca y el contenido de agua en comparación a las plantas control crecidas en ausencia de *A. maxima* de 36,5 (control) a 50,3 mg (41,3%) y de 33 (control) a 47,9 mg (45,2%), respectivamente (Fig. 9B, y D). Sin embargo, no hubo efectos positivos en la biomasa seca (Fig. 9C). Esto quiere decir que el aumento del peso fresco se podría explicar debido a una mayor acumulación de agua en las plantas tratadas *A. maxima* y no de su biomasa seca. Las plantas tratadas con 250 mg/L de *A. maxima* no presentaron diferencias significativas respecto al control, en cambio las tratadas con 500 mg/L de *A. maxima* presentaron una disminución significativa de la biomasa fresca, seca y contenido de agua respecto a las plantas control (Fig.9B, C, D).

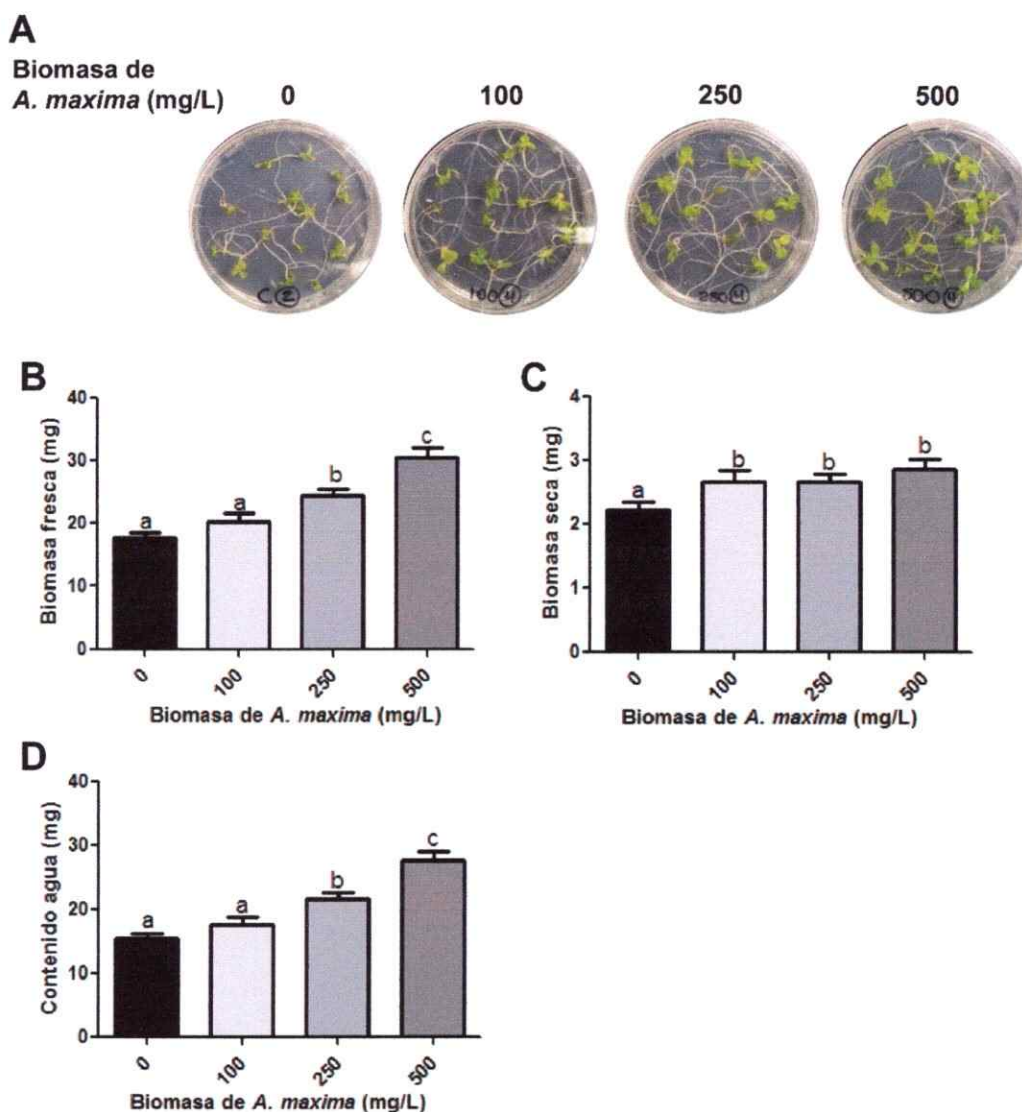


**Figura 9:** Crecimiento vegetativo de plantas de *Lactuca sativa* crecidas en MS 0,5X con diferentes concentraciones de *Arthrospira maxima*. (A) Plantas de *L. sativa* control y tratadas con biomasa de *A. maxima*. (B) Biomasa fresca. (C) Biomasa seca. (D) Contenido de agua. Todos los experimentos fueron realizados en medio MS 0,5X en ausencia (control) o presencia de biomasa de *A. maxima* (100-500 mg/L). Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de 3 placas con 5 plantas de 11 días cada una por condición. Letras diferentes indican la significancia estadística mediante test de Student con  $p < 0,05$ . Se obtuvieron resultados similares en al menos otros 2 experimentos independientes.

Resumiendo, las plantas de lechuga crecidas en presencia de 100 mg/L de biomasa de *A. maxima* presentaron un aumento significativo de la biomasa fresca y del contenido de agua en comparación a las plantas control. Al aumentar la concentración de *A. maxima*

diferencias con la condición control. Al aumentar a 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* en el medio de cultivo de estas plantas, se generó un efecto negativo sobre el crecimiento vegetativo en comparación a la condición control.

Por otra parte, las plantas de lechuga crecidas en condiciones limitantes de nutrientes (agua-agar) y tratadas con *A. maxima* presentan un aumento notorio en el crecimiento de las zonas aérea y radicular conforme al aumento de la concentración de biomasa de *A. maxima* (Fig. 10A). Las plantas de lechuga crecidas en presencia de 250 y 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* presentaron un incremento significativo en la biomasa fresca respecto a las plantas control de 17,7 (control) a 24,4 (37,9%) y 30,5 mg (72,3%), respectivamente. Esta última condición también presentó un aumento significativo en la biomasa fresca respecto a todos los demás tratamientos con *A. maxima* (Fig. 10B). El peso seco de las plantas tratadas con 100, 250 y 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* aumentó significativamente respecto a las plantas control desde 2,2 a 2,7 (22,7%), 2,7 (22,7%) y 2,9 mg (31,8%), respectivamente (Fig. 10C). En cuanto al contenido de agua, se obtuvieron resultados similares a la biomasa fresca, donde las plantas tratadas con 250 y 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* mostraron un incremento significativo respecto a las plantas control de 15,5 (control) a 21,7(40%) y 27,6 mg (78,1%), respectivamente. Cabe destacar que las plantas tratadas 500 mg/L de *A. maxima* también aumentaron significativamente el contenido de agua respecto a los demás tratamientos con *A. maxima* (Fig. 10D). Nuevamente, el aumento de la biomasa fresca observado se explicaría debido al incremento del contenido de agua y no al de la biomasa seca, dadas las magnitudes de estos incrementos.



**Figura 10:** Crecimiento vegetativo de plantas de *Lactuca sativa* crecidas en insuficiencia de nutrientes con diferentes concentraciones de *Arthrospira maxima*. (A) Plantas de *L. sativa* control y tratadas *A. maxima*. (B) Biomasa fresca (C) Biomasa seca. (D) Contenido de agua. Plantas de lechuga fueron crecidas en agua-agar en ausencia (control) o presencia de biomasa de *A. maxima* (100-500 mg/L). Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de 3 placas con 7 plantas de 21 días cada una por condición. Letras diferentes indican la significancia estadística mediante test de Student con  $p < 0,05$ . Se obtuvieron resultados similares en al menos otros 2 experimentos independientes.

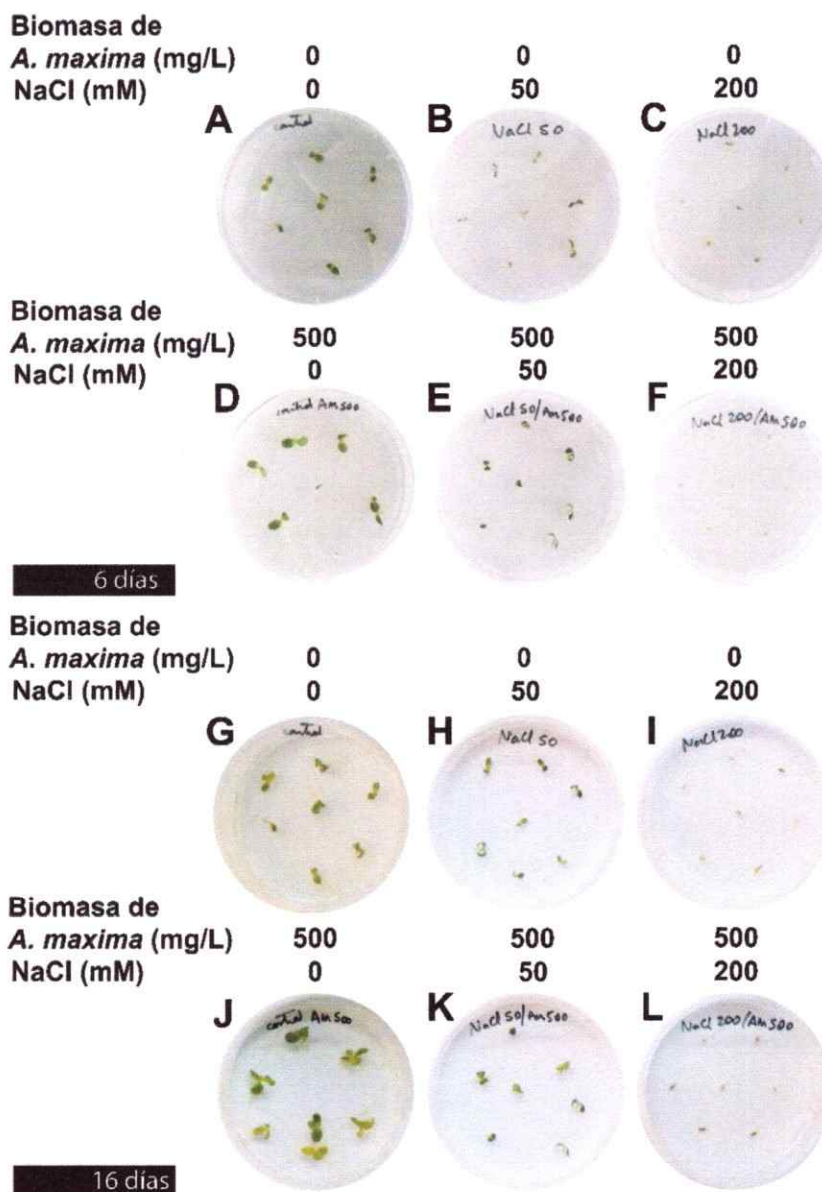
En resumen, las plantas de lechuga crecidas en condiciones limitantes de nutrientes y en presencia de 250 y 500 mg/L de *A. maxima* presentaron mayor biomasa fresca y contenido de agua respecto a las plantas control.

### 2.2.2. Tolerancia al estrés salino

Para evaluar si las plantas de *L. sativa* tratadas con *A. maxima* presentaban una mejor capacidad de tolerar el estrés salino, se crecieron plantas *in vitro* en agua-agar en presencia/ ausencia de NaCl (50 o 200 mM) y 500 mg/L de biomasa de *A. maxima*.

Las plantas crecidas en ausencia de NaCl y en presencia de *A. maxima*, presentaron un mayor crecimiento aéreo respecto a las plantas control crecidas en ausencia de NaCl y en ausencia de *A. maxima* (Fig. 11A, D, G, J) de la misma manera que se demostró anteriormente. Por otro lado, las plantas sometidas a estrés salino (50 mM de NaCl) presentaron una notoria disminución en su crecimiento y un retraso en su desarrollo, al compararlas con las plantas control (Fig. 11B e H). Sin embargo, las plantas sometidas al mismo tipo de estrés, pero crecidas en presencia de 500 mg/L de biomasa de *A. maxima*, no exhibieron una tasa mayor de sobrevivencia (Fig. 11E y K). Las plantas crecidas en presencia de 200 mM de NaCl no germinaron, tanto en presencia como en ausencia de *A. maxima* (Fig. 11C, F, I, L).





**Figura 11:** Plantas de *Lactuca sativa* crecidas en diferentes condiciones de estrés salino y tratadas con *Arthrospira maxima*. Crecimiento de plantas de lechuga a los 6 (A-F) o 16 días (G-L) crecidas en agua-agar en ausencia (A, D, G, J), presencia de 50 mM (B, E, H, K) y de 200 mM de NaCl (C, F, I, L); en ausencia (A, B, C, G, H, I) y presencia de 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* (D, E, F, J, K, L). Para cada condición se sembraron 4 placas con 7 semillas cada una.

En resumen, las plantas de lechuga tratadas con *A. maxima*, presentaron un mayor crecimiento vegetativo respecto a las plantas control, tal como se esperaba. Sin embargo, la adición de 50 mM de NaCl afectó negativamente el crecimiento y retardó el desarrollo vegetativo de estas plantas. Al aumentar a 200 mM de NaCl, el estrés salino

impidió la germinación de las semillas. La adición de biomasa de *A. maxima* no revirtió el fenotipo causado por el estrés salino.

### **3. Análisis fenotípico de los frutos de plantas *Solanum lycopersicum* tratadas con *Arthrospira maxima***

Para este experimento, se utilizaron plantas de *S. lycopersicum* (tomate) cv. Micro-tom, las cuales fueron divididas en 4 grupos según el tratamiento recibido: plantas control que fueron tratadas con agua, plantas con 500 y 1000 mg/L de solución acuosa autoclavada de biomasa liofilizada de *A. maxima* y plantas tratadas con el bioestimulante comercial Algamax. Este último corresponde, según a la información dispuesta en su envase, a un bioestimulante recomendado para utilizarse en todo tipo de plantas. Es fabricado a partir de algas marinas frescas, rico en fitohormonas, aminoácidos, vitaminas, entre otras sustancias activas.

Los tratamientos se hicieron mediante aspersiones 2 veces a la semana según lo descrito en Materiales y Métodos 2.2. Los frutos fueron recolectaron en madurez de cosecha, tal como se menciona en la sección materiales y métodos 2.2.1, en 2 oportunidades: a las 18 y 21 semanas, mientras que la biomasa fresca de las plantas fue determinada a las 21 semanas. Para ambos casos (fruto y tejido vegetativo) se midieron una serie de parámetros que se muestran a continuación.

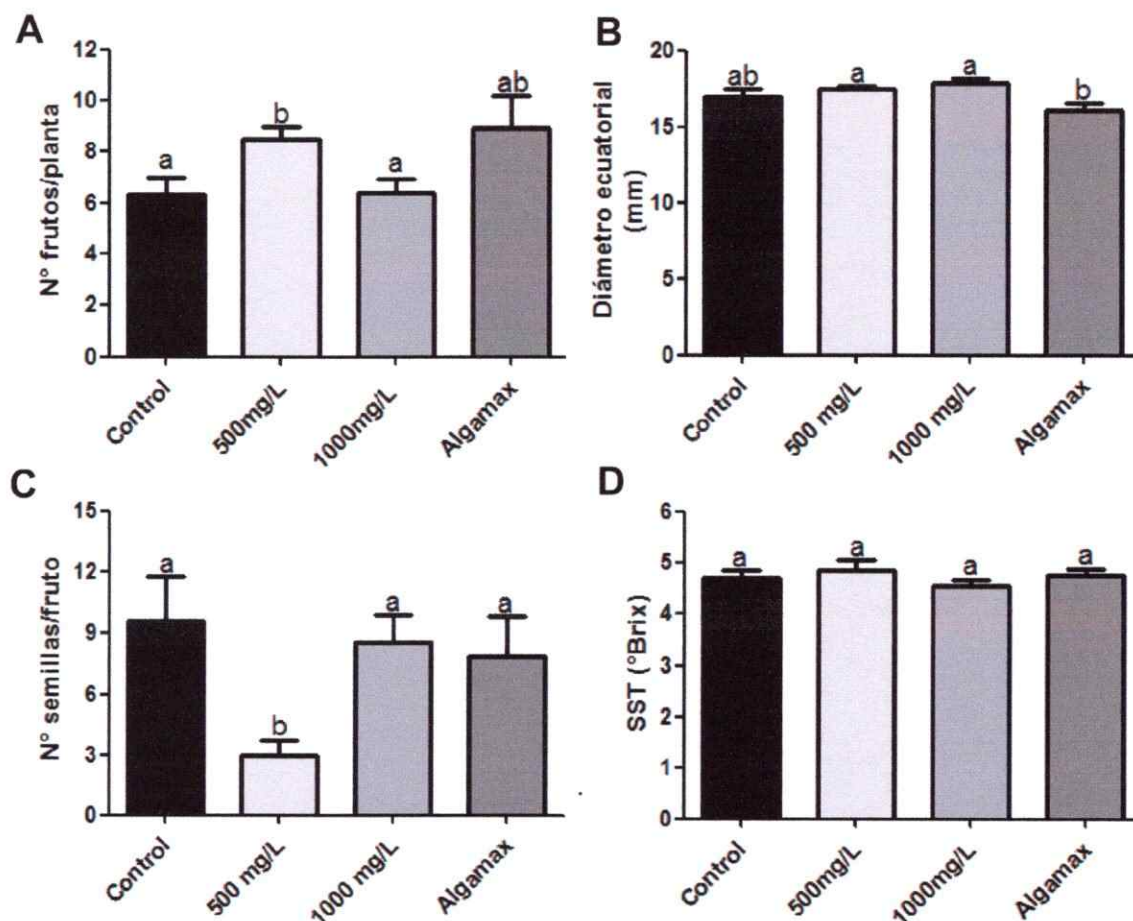
#### **3.1. Número de frutos por planta, diámetro ecuatorial, % de sólidos solubles totales de los frutos y número de semillas por fruto**

El número de frutos totales promedio por planta de aquellas tratadas con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* aumentó significativamente de 6,3 a 8,5 (34,9%) con respecto a las plantas control (Fig. 12A). Las plantas tratadas con una concentración mayor de biomasa de *A. maxima* (1000 mg/L) y las plantas tratadas con Algamax, no presentaron diferencias significativas respecto a las plantas control (Fig. 12A).

Por otro lado, el diámetro ecuatorial promedio de los frutos de las plantas tratadas con biomasa de *A. maxima* (500 y 1000 mg/L) y con Algamax no varió significativamente respecto a la condición control. Sin embargo, el diámetro ecuatorial de los frutos de las plantas tratadas con 500 mg/L y 1000 mg/L de biomasa de *A. maxima* fue mayor respecto a la condición con Algamax, aumentando de 16,1 mm a 17,0 mm (8,1%) y de 16,1 mm a 17,9 (11,2%), respectivamente (Fig. 12B).

Con respecto al % de sólidos solubles totales de los frutos, los tratamientos con *A. maxima* y con Algamax no los afectaron, ya que éstos no presentaron diferencias significativas respecto al control, obteniéndose un promedio de 4,7; 4,9; 4,5 y 4,8°Brix por fruto por condición para los tratamientos control, 500 mg/L, 1000 mg/L de biomasa de *A. maxima* y Algamax, respectivamente (Fig. 12C).

El número de semillas promedio por fruto de las plantas tratadas con 1000 mg/L de biomasa de *A. maxima* y tratadas con Algamax no presentaron diferencias significativas respecto al control, dando en promedio 9,6; 8,5 y 7,8 semillas por fruto por condición para los tratamientos control, 1000 mg/L de *A. maxima* y Algamax, respectivamente. En cambio, las plantas tratadas con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima*, exhibieron una disminución significativa en este parámetro respecto al control, dando en promedio 3 semillas por fruto, lo que representa una disminución de un 68,8% respecto a la condición control (Fig. 12D).



**Figura 12:** Análisis de los frutos de plantas de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-tom control, tratadas con *Arthrospira maxima* (500 y 1000 mg/L) o con Algamax. (A) Número de frutos por planta. (B) diámetro ecuatorial de los frutos promedio por planta. (C) % de sólidos solubles totales (SST) de los frutos promedio por planta. (D) número de semillas por fruto promedio de las plantas de 21 semanas de cada tratamiento. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de 9 plantas control, 17 y 16 plantas tratadas con 500 y 1000 mg/L de biomasa de *A. maxima*, respectivamente, 10 plantas tratadas con Algamax y de 57-145 frutos por planta para B (57: control, 145: 500mg/L de *A. maxima*, 102: 1000 mg/L de *A. maxima*, 89: Algamax), 1 fruto por planta para C y 1-3 frutos por planta para D. Letras diferentes indican la significancia estadística mediante test de Student con  $p < 0,05$ .

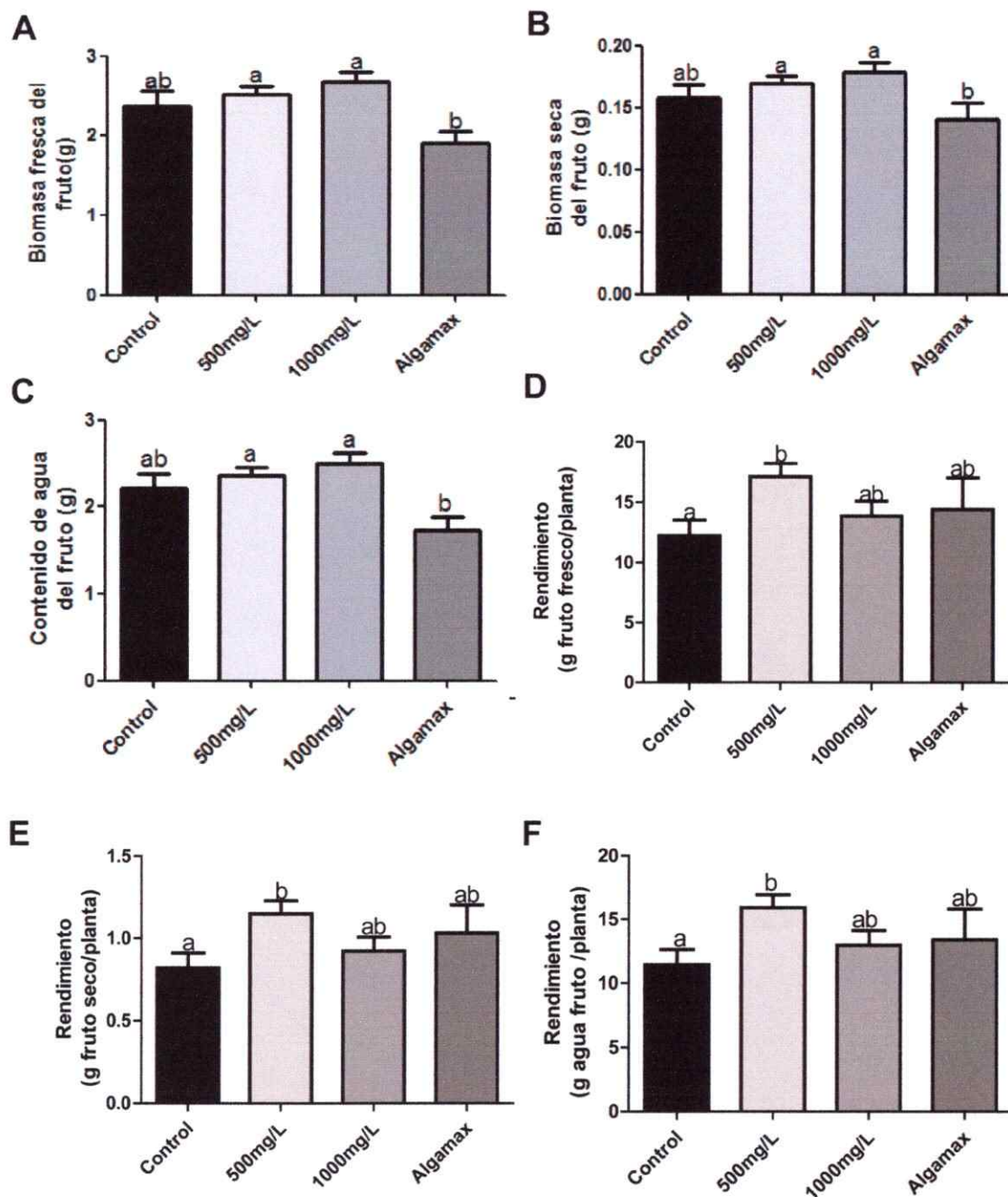
Resumiendo, el número de frutos totales por planta de tomate tratada con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* aumentó significativamente respecto a las plantas control. Sin embargo, el diámetro ecuatorial de los frutos de las plantas tratadas con *A. maxima* (500 y 1000 mg/L) no presentó diferencias significativas respecto a la condición control. El % de sólidos solubles totales de los frutos por su parte, no fueron afectados tras el

tratamiento de las plantas con *A. maxima*. Por otro lado, el número de semillas por fruto de las plantas tratadas con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* disminuyó significativamente respecto al control.

### **3.2. Biomasa y rendimiento de los frutos**

La biomasa fresca, seca y el contenido de agua de los frutos de las plantas tratadas con biomasa de *A. maxima* (500 y 1000 mg/L) no variaron significativamente respecto a la condición control, pero los frutos de las plantas tratadas con Algamax presentaron una disminución de estos parámetros respecto a la condición control.

Además, se calculó el rendimiento de cada planta como la biomasa de los frutos maduros total por planta (fresca y seca) y también el rendimiento del contenido de agua de los frutos total por planta. Las plantas tratadas con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* tuvieron el mayor rendimiento tanto para biomasa fresca (17,1 g fruto maduro/planta), seca (1,2 g fruto maduro/planta) y de contenido de agua (15,9 g fruto maduro/planta). Además, estas plantas presentaron un incremento significativo del rendimiento de la biomasa fresca, de la biomasa seca y del contenido de agua respecto a las plantas control, de 40%, 40,2% y de 39,5%, respectivamente (Fig. 13D, E, F). Las plantas tratadas con 1000 mg/L de *A. maxima* y con Algamax no presentaron diferencias significativas respecto a la condición control.

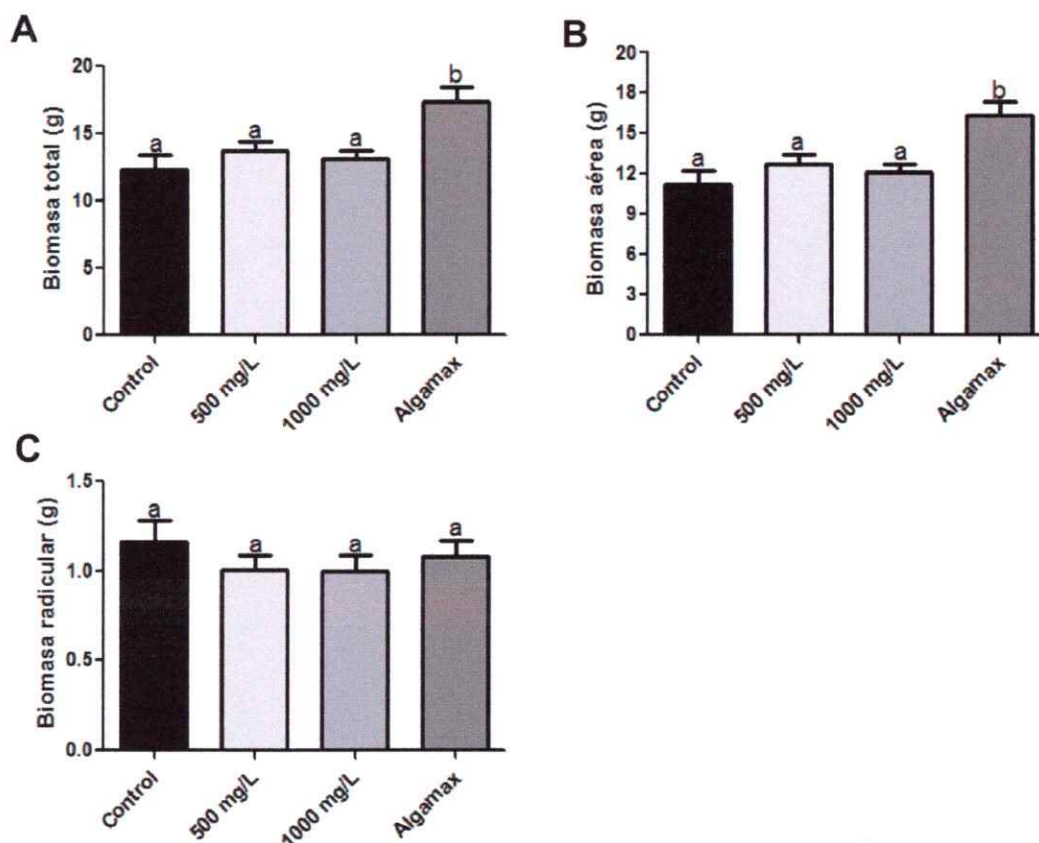


**Figura 13:** Biomasa y rendimiento de los frutos de plantas de *Solanum lycopersicum* cv. Microtom control, tratadas con *Arthrospira maxima* o con Algamax. (A) Biomasa fresca, (B) seca, (C) contenido de agua promedio del fruto por planta y sus respectivos rendimientos (D, E y F). Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de 9 plantas control, 17 y 16 plantas tratadas con 500 y 1000 mg/L de biomasa de *A. maxima*, respectivamente, y de 10 plantas tratadas con Algamax, todas de 21 semanas. Se analizaron 48-117 frutos por planta (48: control, 117: 500mg/L de *A. maxima*, 85: 1000 mg/L de *A. maxima*, 75: Algamax). Letras diferentes indican la significancia estadística mediante test de Student con  $p < 0,05$ .

En resumen, la biomasa fresca, seca y el contenido de agua de los frutos de las plantas tratadas con *A. maxima* (500 y 1000 mg/L) y con Algamax no presentaron diferencias significativas respecto al control. El tratamiento con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* presentó mayor rendimiento que las plantas control, debido a un aumento en el número de frutos por planta, por lo que *A. maxima* efectivamente tendría efectos bioestimulantes en *Solanum lycopersicum*.

### 3.3. Biomasa del tejido aéreo y radicular

Las plantas tratadas con *A. maxima* (500 y 1000 mg/L) no presentaron diferencias significativas en cuanto a su biomasa fresca total (Fig. 14A), aérea (Fig. 14B) o radicular (Fig. 14C) respecto a las plantas control. Sin embargo, las plantas tratadas con Algamax presentan un incremento significativo de su biomasa total de 12,33 (control) a 17,36 g (40,8%) y aérea de 11,17 a 16,28 g (45,7%) respecto a la condición control, pero no de la biomasa de las raíces, por lo que el aumento de la biomasa total ocurriría debido a un aumento en la biomasa aérea (Fig. 14).



**Figura 14:** Crecimiento de plantas de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-tom control, tratadas con *Arthrospira maxima* o con Algamax. (A) Biomasa fresca de la planta completa. (B) Biomasa fresca de la parte aérea. (C) Biomasa fresca de las raíces de plantas. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de 9 plantas control, 10 plantas tratadas con Algamax, 17 y 16 plantas tratadas con 500 y 1000 mg/L de biomasa de *A. maxima*, respectivamente, todas de 21 semanas. Letras diferentes indican la significancia estadística mediante test de Student con  $p < 0,05$ .

Resumiendo, *A. maxima* no afectó la biomasa fresca total, tanto aérea como radicular de las plantas de tomate respecto a las plantas control. Las plantas tratadas con Algamax presentaron un incremento significativo en su biomasa total y aérea respecto a las demás condiciones, pero no en la biomasa de las raíces.

#### 4. Análisis de la expresión génica de plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con *Arthrospira maxima*

Se realizaron experimentos de PCR cuantitativo en tiempo real (q-RT-PCR) para evaluar los cambios de expresión génica en *A. thaliana* que se podrían relacionar con los fenotipos obtenidos tras el tratamiento con la biomasa de *A. maxima*. Para ello, se



estudiaron genes marcadores pertenecientes a 4 grupos: relacionados con la respuesta de defensa en plantas a través de las hormonas ácido salicílico (*PR1*) y ácido jasmónico (*PDF1.2*), genes marcadores y de respuesta a ácido abscísico (*NCED3* y *RD29*), genes del metabolismo y asimilación del nitrógeno (*FD-GOGAT*) y genes relacionados con el crecimiento y expansión celular (*EXPA10*).

#### 4.1. Estandarización de partidores

Se realizó PCR convencional con los partidores mencionados en la Tabla 1 (sección materiales y métodos 3.3) usando como templado cDNA de *Arabidopsis thaliana*. Los productos amplificados fueron secuenciados y se alinearon con las secuencias depositadas en la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), dando en todos los casos un 100 % de identidad de secuencia. Con estos productos de PCR se procedió a realizar la estandarización de los partidores para su uso en el q-RT-PCR. La eficiencia para cada pareja de partidores se resume en la Tabla 2.

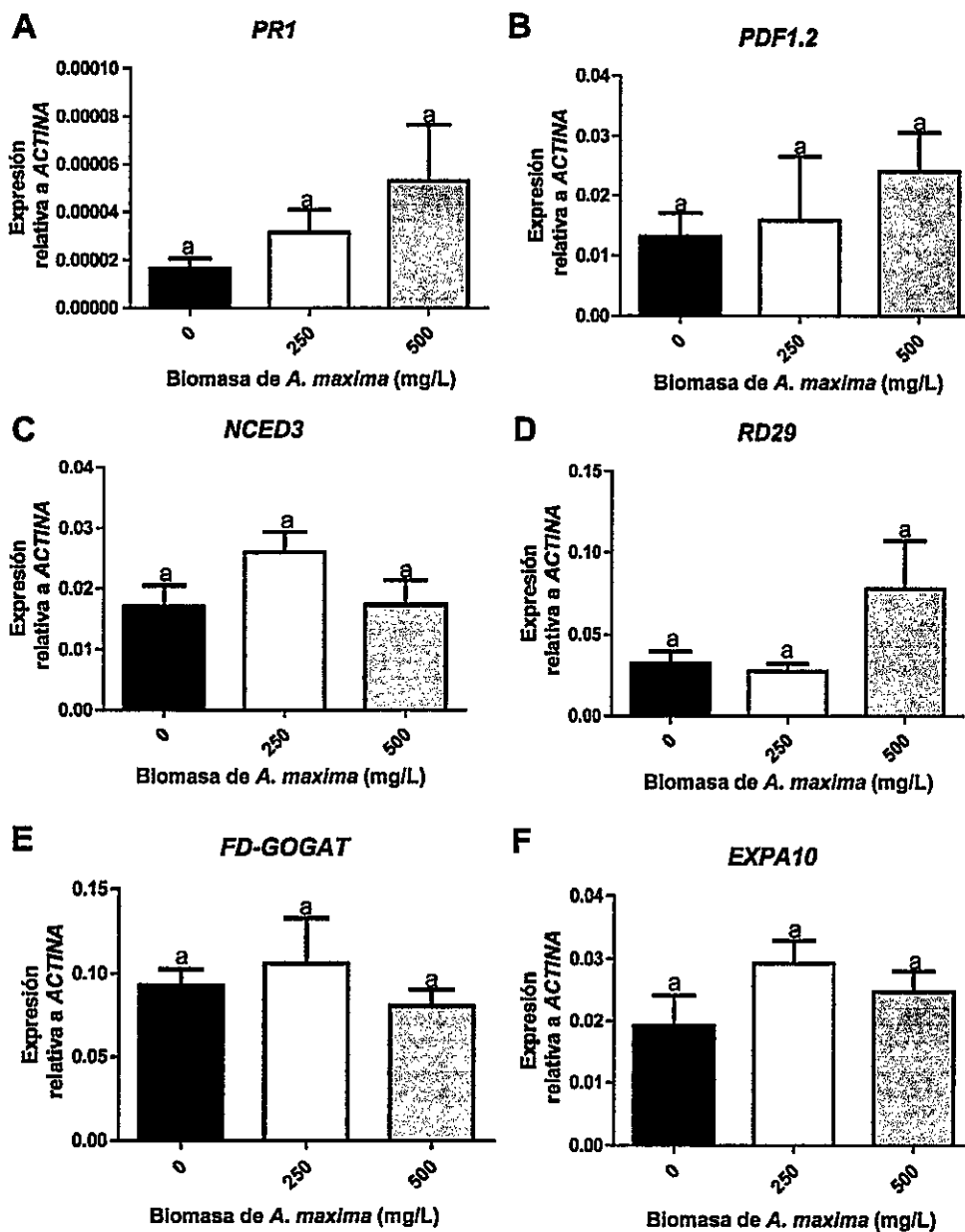
**Tabla 2:** Estandarización de partidores obtenida para el análisis de q-RT-PCR.

Partidores	Volumen de partidores utilizado por reacción (µL)	Concentración final de los partidores en la reacción (µM)	Eficiencia (%)
act2	0,15	0,15	93,3
cln3	0,075	0,075	95,6
argos	0,375	0,375	98,4
Express	0,075	0,075	91,1
Expa-10	0,3	0,3	99,8
FD-GOGAT	0,075	0,075	98,7
NCED3	0,15	0,15	96,3
PDF1.2	0,15	0,15	91,8
PR1	0,3	0,3	107,3
RD29	0,15	0,15	90,1

#### **4.2. Determinación de los niveles de expresión génica en *Arabidopsis thaliana***

Se realizó el análisis de expresión relativa de los genes mencionados en la Tabla 2 mediante q-RT-PCR. Para seleccionar la mejor pareja de partidores normalizadores en este experimento, se amplificaron los genes de actina, clatrina y express por q-RT-PCR usando cDNAs de muestras de *A. thaliana* tratadas y no tratadas con *A. maxima*, y los resultados fueron analizados con el algoritmo geNorm (<https://genorm.cmgg.be/>). De lo anterior, se concluyó que el gen actina era el más indicado a utilizar, ya que era el que menos variaba entre la situación control y el tratamiento con *A. maxima*.

Con respecto a la expresión de los genes antes mencionados, no se detectaron diferencias significativas en cuanto a la expresión relativa de *PR1*, *PDF1.2*, *NCED3*, *RD29*, *FD-GOGAT* ni *EXPA10* entre las plantas crecidas en presencia de biomasa de *A. maxima* (250 y 500 mg/L) y las plantas pertenecientes a la condición control (Fig. 15).



**Figura 15:** Análisis de la expresión de genes de *Arabidopsis thaliana* posiblemente involucrados en el efecto bioestimulante de *Arthrospira maxima*. Se cuantificaron los niveles de expresión génica mediante q-RT-PCR de genes involucrados en la señalización por (A) ácido salicílico (*PR1*), (B) ácido jasmónico (*PDF1.2*), (C) ácido abscísico (*NCED3*); (D) marcador de estrés abiótico (*RD29*); (E) asimilación de nitrógeno (*FD-GOGAT*) y (F) elongación celular (*EXPA10*). Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de 3 réplicas biológicas (rosetas de 2 plantas de *A. thaliana* de 3 semanas de una placa por réplica) en duplicado técnico para cada condición. Letras diferentes indican la significancia estadística mediante test de Student con  $p < 0,05$ .

En resumen, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de transcritos de estos genes marcadores entre la condición control y tratada con *A. maxima*.

## DISCUSIONES

En los últimos años, se han propuesto nuevas estrategias para aumentar la producción agrícola que supla la demanda mundial por alimentos y que vayan de la mano con una reducción en el uso de agroquímicos y de la contaminación medioambiental, junto con un aumento en la productividad de los recursos naturales. Dentro de este contexto, una de las soluciones más prometedoras e innovadoras es el uso de bioestimulantes, los cuales mejoran los parámetros de calidad y rendimiento de los cultivos, la eficiencia del uso de nutrientes y otorgan protección frente al estrés biótico y abiótico (Ruzzi & Aroca, 2015). En este seminario de título se abordó esta problemática global, evaluando el potencial efecto bioestimulante de la biomasa de *Arthrospira maxima* sobre el tejido vegetativo y reproductivo de distintas plantas.

### **Obtención de biomasa de *Arthrospira maxima***

Para asegurar la eficacia, calidad y consistencia en la respuesta al bioestimulante, es necesario mantener constante la composición de la biomasa de *A. maxima* en el tiempo (Povero y col., 2016). Esto se logra estandarizando, por una parte, las condiciones de crecimiento y por otra, el tiempo de cosecha de los cultivos de *A. maxima*, ya que la composición de estos depende de la fase de crecimiento en que se encuentran (Madigan y col., 2014). Las cianobacterias poseen varios compuestos o sustancias activas que tienen efectos benéficos para las plantas, por ejemplo, una de las moléculas candidatas a tener capacidad bioestimulante es el exopolisacárido presente en *A. maxima*, cuya composición varía, dentro de otros factores, dependiendo de la fase de crecimiento en que se encuentra el cultivo (Pereira y col., 2009). La máxima producción de exopolisacáridos ocurre en la fase estacionaria (Nie y col., 2002). Los péptidos y

aminoácidos de *A. maxima* también podrían ser compuestos activos candidatos en la bioestimulación.

La curva de crecimiento obtenida para la cepa *Arthrospira maxima* CCAP 1475/9 es muy similar a la reportada previamente en la literatura (Fig. 2), con la excepción que la fase de crecimiento estacionario se retrasó 6 días (Prasad & Mishra, 2015), lo que se puede atribuir a que la intensidad lumínica ( $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y la temperatura ( $23^\circ\text{C}$ ) a la cual se creció *A. maxima* fueron menores a los reportados, los que corresponden a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , y  $30^\circ\text{C}$ , ya que bajo estas condiciones se obtiene un rendimiento óptimo de los cultivos. No obstante, esta cianobacteria puede crecer en un amplio rango de temperaturas que van desde los  $20\text{-}40^\circ\text{C}$  (De Oliveira y col., 1999; Vonshak, 2002).

En cuanto a los rendimientos de los cultivos de *A. maxima*, estos fueron mayores en los cultivos a pequeña escala (250 mL; con rendimiento de 2,5 g/L) que en los cultivos a mediana escala (Fig. 3; fotobiorreactores 5-10 L; con rendimiento de 1 g/L), lo cual es esperable, ya que los cultivos crecidos en fotobiorreactores tenían menor intensidad lumínica ( $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), además que comparativamente tenían menor superficie de contacto, por lo que cada célula tenía un menor acceso efectivo a la radiación que se utilizaba para la fotosíntesis, lo que finalmente se traduce en un menor rendimiento. De hecho, se ha reportado que la irradiación y la temperatura son los principales factores limitantes en los rendimientos obtenidos de los cultivos de *Spirulina* a gran escala (Trabelsi y col., 2009). Si bien, se obtuvo un menor rendimiento en los cultivos que crecieron en los fotobiorreactores, el mayor volumen de crecimiento permitió obtener una mayor cantidad de biomasa final total de *A. maxima* para realizar los tratamientos en plantas.

Con respecto a la determinación de la capacidad bioestimulante de la biomasa de *A. maxima*, se evaluaron distintos métodos de disrupción celular para aumentar la

biodisponibilidad de las sustancias activas de estas cianobacterias. Se pudo observar que el proceso más eficiente consistió en la liofilización seguido por el autoclave, lo cual generó la mayor fragmentación de los filamentos de *A. maxima* (Fig. 4), debido a la lisis celular ocasionada por la deshidratación, alta presión y temperatura. Esto contribuiría, por una parte, a la liberación de las sustancias que se encuentran en el interior de las células de *A. maxima*, y por otra, a la hidrólisis de macromoléculas como polisacáridos, proteínas y péptidos, lo que en conjunto podrían contribuir a una mayor actividad biológica y biodisponibilidad de las sustancias que podrían gatillar una respuesta en las plantas.

#### **Efecto del tratamiento con *A. maxima* sobre el crecimiento vegetativo**

En concordancia con la literatura, el efecto bioestimulante máximo de biomasa de *A. maxima*, ocurrió a bajas concentraciones (100 y 250 mg/L), las que no sustentan los requerimientos nutricionales de las plantas y la dosis óptima aplicada fue dependiente de la especie y de las condiciones de crecimiento, tal como se ha reportado previamente. Dado esto, es necesario realizar estudios específicos de la respuesta de cada cultivo a *A. maxima*, para encontrar el punto óptimo de dosis/respuesta (Sharma y col., 2016).

El uso de ensayos de crecimiento *in vitro* de plantas es una herramienta útil para realizar una primera aproximación a los bioestimulantes, por ejemplo, para realizar una curva de respuesta dosis-efecto, ya que en estas condiciones se elimina la influencia del suelo y de otros parámetros ambientales como la competencia con hongos y bacterias (Povero y col., 2016). Para determinar el efecto bioestimulante de *A. maxima* sobre el crecimiento vegetativo de las plantas, se utilizó biomasa liofilizada de la cepa *A. maxima* CCAP 1475/9 desarrollado en el laboratorio. Adicionalmente se probaron dos productos a base de Spirulina producidos a escala industrial: Spirulina nature (Aeon Biogroup, Chile) y Spirulina del Consorcio Algaefuels S.A., (Chile). En relación a estos dos últimos,

Spirulina Nature no tuvo efectos sobre el crecimiento vegetativo de *A. thaliana*, lo que se podría explicar si la(s) sustancia(s) bioestimulante(s) estuviese(n) en la fracción soluble o extracelular de este, ya que en comunicación personal con Aeon biogroup (productores de Spirulina Nature), fue informado que el producto es lavado previo al proceso de deshidratación. Por otra parte, Spirulina del Consorcio Algaefuels S.A., mostró efectos negativos sobre el crecimiento vegetativo de *A. thaliana*, ya que las plantas tratadas presentaron clorosis y menor diámetro (resultados no mostrados) de la roseta que las plantas control, lo cual se podría explicar por el alto contenido de elementos como Ca, Na, Mn, Zn y B, los cuales en altas concentraciones podrían tener un efecto negativo en el crecimiento vegetal (Taiz y col., 2015). En cambio, la biomasa de la cepa *Arthrospira maxima* CCAP 1475/9 producida en el laboratorio sí tuvo un efecto bioestimulante sobre el crecimiento de *A. thaliana* y *L. sativa*. Las plantas de *A. thaliana* tratadas con la biomasa de *A. maxima* presentaron un mayor crecimiento vegetativo evidenciado como un mayor diámetro de la roseta, biomasa fresca y contenido de agua respecto a las plantas control (Fig. 5). De manera similar, las plantas de *L. sativa* crecidas en presencia de biomasa de *A. maxima* presentaron un aumento significativo de la biomasa fresca y contenido de agua respecto al control, tanto en suficiencia, como en suficiencia de nutrientes (Fig. 9 y 10). El aumento en el crecimiento vegetativo ha sido ampliamente reportado como uno de los principales efectos de los bioestimulantes en las plantas (Calvo y col., 2014). El aumento de la biomasa fresca, en general, puede ocurrir de 3 maneras: mediante el aumento de la biomasa seca, el aumento del contenido de agua o mediante ambos. En este caso, el aumento en la biomasa fresca de las plantas tratadas con *A. maxima* ocurriría debido a un aumento significativo del contenido de agua de estas plantas y no debido al aumento de la biomasa seca, ya que, por una parte, hubo plantas que aumentaron significativamente su biomasa fresca en respuesta al

tratamiento con *A. maxima*, pero no la biomasa seca, y por otra, la magnitud del aumento en la biomasa seca (cuando ocurrió) no explica el incremento en la biomasa fresca, tanto en *A. thaliana*, como en *L. sativa*. Por ejemplo, las plantas de *A. thaliana* tratadas con 250 mg/L de biomasa de *A. maxima* aumentaron su biomasa fresca en 33,2 mg respecto al control, de lo cual solo 1,1 mg corresponden a biomasa seca y 32,1 mg corresponden a agua, por lo que el aumento en el contenido de agua explicaría el aumento en la biomasa fresca.

Además, cabe destacar que el efecto bioestimulante observado de *A. maxima* fue dependiente de la especie vegetal y de la concentración en la cual fue añadido al medio de cultivo vegetal. Se observó en *A. thaliana* que el efecto de la biomasa de *A. maxima* sobre el diámetro de la roseta, biomasa fresca y seca, y contenido de agua fue máximo a 250 mg/L (Fig. 5), ya que estas plantas presentaron un aumento significativo de los parámetros mencionados, no solo respecto al control, sino que también respecto a todas las demás condiciones tratadas con *A. maxima*. A menores (50 y 100 g/L) o mayores (500 mg/L) concentraciones de *A. maxima*, el diámetro y la biomasa siguieron siendo significativamente mayores respecto a las plantas control, pero fueron significativamente menores respecto a las plantas tratadas con 250 mg/L de *A. maxima*. En cambio, el efecto máximo (biomasa fresca y contenido de agua) observado en lechuga es a 100 mg/L (en suficiencia de nutrientes; Fig. 9), pero al aumentar la concentración de biomasa de *A. maxima* a 250 mg/L, se pierde el efecto bioestimulante, ya que estas plantas no presentaron diferencias respecto al control. Más aún, al aumentar a 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* en el medio de cultivo de estas plantas, se generó un efecto negativo sobre la biomasa fresca, seca y contenido de agua. Este fenómeno, donde el efecto máximo bioestimulante se alcanza a bajas dosis, ha sido reportado previamente como una de las características de los bioestimulantes (du Jardin, 2015). También se ha



reportado que a altas concentraciones de bioestimulante, se genera un efecto perjudicial en las plantas (Ertani y col., 2009).

Cabe destacar que a pesar de que la biomasa de *A. maxima* fue añadido en el medio de cultivo vegetal de las plantas, donde el contacto físico entre *A. maxima* y la planta fue en las raíces, el efecto bioestimulante ocurrió en la zona aérea, y no en las raíces. Esto se evidenció en que el largo de la raíz principal de las plantas de *A. thaliana* tratadas con *A. maxima* no presentó diferencias significativas respecto al control, a pesar que estas plantas sí presentaron efectos positivos en el tejido vegetativo, a excepción de las plantas tratadas con una alta concentración de biomasa de *A. maxima* (500 mg/L), donde hubo una disminución significativa tanto del largo de la raíz principal, como de la densidad de las raíces laterales (Fig. 5). Lo anterior se condice con el efecto reportado de la proteína BSA en cultivos de *A. thaliana* crecidas en MS 0,5X, donde concentraciones bajas e intermedias de esta proteína (1,67-15  $\mu$ M) no generaron cambios en el largo de la raíz principal, pero altas concentraciones (23-45  $\mu$ M) inhibieron el largo de esta (Lonhienne y col., 2014).

Por otra parte, plantas de lechuga crecidas en condiciones limitantes de nutrientes (agua-agar) presentaron un retraso en su crecimiento y desarrollo, tal como es de esperarse, pero el tratamiento con *A. maxima* generó un aumento en el crecimiento de las zonas aérea y radicular conforme al aumento de la concentración de biomasa de *A. maxima* (Fig. 10). Las plantas crecidas en presencia de 250 y 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* presentaron un incremento en la biomasa fresca, seca y en el contenido de agua respecto a las plantas control. A diferencia de los experimentos en suficiencia de nutrientes, en este caso el efecto máximo en cuanto a biomasa fresca, seca y contenido de agua, se alcanzó a altas concentraciones de *A. maxima* (500 mg/L), sin embargo, el aumento en la biomasa fresca se explicaría también mediante una mayor acumulación

de agua. Lo anterior indicaría que, dependiendo de las condiciones de crecimiento, la dosis óptima del bioestimulante podría cambiar. Además, esto sugiere que el uso de *A. maxima* como bioestimulante no solo serviría para mejorar el crecimiento de plantas que se encuentran en condiciones nutricionales adecuadas, sino que también para cultivos que no disponen de todos los nutrientes en el medio.

En cuanto al efecto de *A. maxima* sobre la germinación, se probó, por un lado, la estratificación de semillas en soluciones acuosas autoclavadas con diferentes concentraciones de biomasa de *A. maxima* y por otro, la germinación en medio de cultivo con diferentes concentraciones de biomasa de *A. maxima* (Fig. 6). En ambos casos no se observó ninguna diferencia significativa entre las semillas estratificadas o sembradas en presencia de *A. maxima* y el control, ya sea en tiempos tempranos post imbibición (26, 5 y 30 hpi), lo que indica que la biomasa de *A. maxima* no generó un retraso en la germinación; como en tiempos tardíos post imbibición (48 hpi), lo que indica que *A. maxima* no afectó la germinación. Este resultado fue el esperable considerando que la germinación es un proceso intrínseco de la semilla que depende principalmente de factores externos como temperatura, agua y luz, y también, del estado nutricional y el balance hormonal entre ácido abscísico (pro-dormancia) y giberelinas (pro-germinación) dentro de la semilla (Bewley, 1997).

Para medir el estado fotosintético de las plantas tratadas con *A. maxima*, se midieron los niveles de clorofila a, b y total (Fig. 7). En cuanto al contenido de clorofila a, no hubo diferencias significativas entre las plantas control y las plantas tratadas con *A. maxima*. En cambio, el contenido de clorofila b disminuyó significativamente en las plantas tratadas con 250 y 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* y el contenido de clorofila total solo fue negativamente afectado en las plantas tratadas con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima*. La disminución de la clorofila se puede explicar debido a que las plantas

tratadas con *A. maxima* exhibieron mayor biomasa fresca con mayor acumulación de agua, es decir, que para una misma cantidad de biomasa fresca, las plantas tratadas con *A. maxima* tienen más agua que tejido en comparación a las plantas control, por lo que al medir el contenido de clorofila y normalizarlo por la biomasa fresca del tejido, daría un menor contenido de clorofila (ecuación 3, 4 y 5). Para solucionar este problema habría que normalizar por la biomasa seca o por el contenido de proteínas del tejido analizado. Este resultado refuerza que el aumento de la biomasa vegetativa fresca ocurriría mediante una mayor acumulación de agua.

Por otro lado, el uso de herramientas moleculares como los microarreglos o q-RT-PCR ha permitido elucidar el efecto de los bioestimulantes y los posibles modos de acción a nivel molecular. Para el caso del q-RT-PCR, es útil el uso de genes marcadores, los cuales están involucrados en diferentes vías bioquímicas. (Povero y col., 2016). En este caso, se estudió la expresión genes marcadores de *A. thaliana* de diversos procesos involucrados en la respuesta al tratamiento con bioestimulante o relacionados al fenotipo observado, como por ejemplo, genes de defensa en plantas a través de las hormonas ácido salicílico (*PR1*) y ácido jasmónico (*PDF1.2*), genes marcadores y de respuesta a ácido abscísico (*NCED3* y *RD29*), genes del metabolismo y asimilación del nitrógeno (*FD-GOGAT*) y genes relacionados con el crecimiento y expansión celular (*EXPA10*). No se detectaron diferencias significativas en cuanto a la expresión relativa de estos genes entre las plantas crecidas en presencia de la biomasa de *A. maxima* (250 y 500 mg/L) y las plantas pertenecientes a la condición control (Fig. 15). En este caso, se midió la expresión de los genes mencionados anteriormente en plantas de *A. thaliana* de 3 semanas, ya que este es el tiempo de tratamiento donde se detectó el fenotipo. Sin embargo, existe la posibilidad que de haber un cambio de expresión en los genes marcadores mencionados (ya sea activación o represión), o en otros genes, este haya

ocurrido en un momento previo a la detección del fenotipo. Además, se utilizó tejido vegetativo aéreo para la cuantificación génica, ya que tal como se mencionó antes, fue en este tejido donde se detectó el fenotipo, lo que no implica necesariamente que no haya cambios de expresión génica en otros tejidos como, por ejemplo, el radicular. Es por lo anterior, que queda como proyección, la realización de una cinética, donde se tomen muestras periódicamente y se mida la expresión de estos genes en varios tejidos. Otra posibilidad es que los genes seleccionados efectivamente no cambian su expresión en respuesta a *A. maxima* y que la respuesta esté mediada por genes que no se consideraron en este análisis. Idealmente, para detectar todos los genes cuya expresión varían con el tratamiento con biomasa de *A. maxima*, se tendría que realizar un RNAseq que consiste en la secuenciación del transcriptoma completo, lo que permitiría evaluar los cambios de expresión génica global. Esto último con el fin de encontrar la(s) vía(s) mediante la(s) cual(es) actuaría *A. maxima*.

En síntesis, la biomasa de *A. maxima* CCAP 1475/9 generó un efecto bioestimulante sobre el crecimiento vegetativo a través de un mayor diámetro de la roseta (*A. thaliana*) y una mayor biomasa fresca (*A. thaliana* y *L. sativa*), respecto a las plantas control, presumiblemente a través de una mayor acumulación de agua. Además, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de transcritos los genes marcadores de *A. thaliana* en condiciones normales y de tratamiento con la biomasa de *A. maxima*.

#### **Efecto del tratamiento con *A. maxima* sobre la tolerancia al estrés salino**

El estrés salino en plantas genera una gran variedad de respuestas fisiológicas que incluye la adquisición alterada de nutrientes, acumulación de iones tóxicos, estrés osmótico y oxidativo. Una de las maneras más sencillas de estudiar el estrés salino en plantas es incorporando NaCl a las placas agar que contienen el medio de crecimiento vegetal, ya que este compuesto es el mayor componente de la mayoría de los suelos

salinos. Luego, las semillas pueden ser germinadas directamente en estas placas o ser transferidas una vez germinadas. Experimentos realizados previamente con plántulas de *A. thaliana* crecidas *in vitro* en 100 mM NaCl presentaron inhibición del crecimiento de la zona aérea y de la raíz. Para cuantificar la respuesta a la salinidad se puede medir el crecimiento y sobrevivencia (Verslues y col., 2006). Las plantas de *A. thaliana* sometidas a estrés salino (100 o 150 mM) de NaCl, presentaron una disminución significativa de su sobrevivencia al compararlas con las plantas control (sin NaCl y sin *A. maxima*). Sin embargo, plantas crecidas en presencia de 100 mM NaCl y tratadas con 50 y 100 mg/L de biomasa de *A. maxima* aumentaron significativamente su sobrevivencia respecto a las plantas control salino, no así las tratadas con concentraciones mayores (Fig. 8B). Esto es coincidente con el hecho que el efecto bioestimulante en estas plantas se obtuvo a bajas concentraciones en condiciones normales. De forma similar, las plantas de *A. thaliana* que se crecieron en presencia de 150 mM de NaCl y en presencia de 250 y 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* aumentaron significativamente su sobrevivencia respecto a las plantas control salino (Fig. 8C), aumentando su tolerancia al estrés salino. Esto indica que, a mayor severidad del estrés salino, el efecto de bioestimulante de *A. maxima* se alcanza a mayores concentraciones. Esto se podría explicar por la presencia de compuestos osmorreguladores en la biomasa de *A. maxima*. Los principales solutos compatibles orgánicos que se acumulan en una variedad de especies vegetales son glicina betaína y prolina, y se acumulan en respuesta a varios tipos de estrés como hídrico, salino, térmico, entre otros. Estos compuestos contribuyen al ajuste osmótico celular, detoxificación de especies reactivas de oxígeno, protección de la integridad de la membrana y estabilización de enzimas y proteínas. La aplicación exógena de estos osmoprotectores a las plantas en condiciones de estrés, genera un aumento en el crecimiento y rendimiento de los cultivos. La concentración eficaz, el número de



aplicaciones y la etapa de crecimiento donde deben ser aplicados, pueden variar de una especie a otra (Ashraf & Foolad, 2007). También se ha reportado que varias cepas de *Spirulina* pueden crecer en condiciones de alta salinidad (hasta 600 mM de NaCl), ya que producen prolina (hasta 120 µg/g peso seco) y glicina betaína (6,5 mg//g peso seco) (Liu y col., 2016). En particular, la cepa utilizada en este seminario de título, *Arthrospira maxima* CCAP 1475/9, fue aislada de un ambiente hipersalino, por lo que es muy probable que sintetice altas cantidades de estos compuestos osmorreguladores (CCAP, 2016).

Por otra parte, también se realizó ensayos de estrés salino en plantas de lechuga. La presencia de 50 mM de NaCl afectó el crecimiento y desarrollo vegetativo de estas plantas y la adición de *A. maxima* no generó cambios en las plantas sometidas a estrés salino (Fig.11), a diferencia de los ensayos de estrés salino con *A. thaliana*. Al aumentar a 200 mM de NaCl, el estrés salino impidió la germinación de las semillas. Esto se puede explicar debido a que cada especie vegetal tiene una sensibilidad diferente al estrés salino, de hecho, existen plantas que son afectadas negativamente con la presencia de bajos niveles de sal, mientras otras pueden sobrevivir a altos niveles (plantas tolerantes) o incluso desarrollarse bajo tales condiciones (halófitas) (Taiz y col., 2015). Además, estas plantas fueron crecidas en condiciones de insuficiencia de nutrientes (agua-agar), por lo que el estrés salino les podría haber afectado en mayor medida que en condiciones de suficiencia de nutrientes (MS 0,5 X).

Resumiendo, las plantas de *A. thaliana* sometidas a estrés salino (100 y 150 mM de NaCl) tratadas con biomasa de *A. maxima* aumentaron su tolerancia al estrés salino, evidenciado a través de la mayor sobrevivencia de estas, indicando un efecto osmoprotector de *A. maxima*. Este efecto no pudo ser replicado en *L. sativa*.

### **Efecto del tratamiento con *A. maxima* sobre la producción de frutos**

Con el fin de estudiar el efecto de *A. maxima* sobre la producción de frutos, se eligió el cultivar de tomate enano Micro-tom, ya que es un excelente modelo de fruto carnoso que se puede cultivar en invernadero. Se ha reportado que presenta al menos 2 alelos disfuncionales que dan cuenta de su fenotipo enano: *self-pruning*, responsable del hábito de crecimiento determinado y *dwarf*, responsable del tamaño pequeño y relacionado con una mutación en la biosíntesis de brasinoesteroides (Martí y col., 2006; Campos y col., 2010). Estas mutaciones no interfieren y son compatibles con el tipo de ensayo realizado y con el fenotipo observado en este seminario de título.

Las plantas tratadas con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima*, presentaron un mayor número de frutos por planta respecto a las plantas control (Fig. 12A), pero no presentaron diferencias significativas en el diámetro ecuatorial del fruto, representado por el diámetro ecuatorial (Fig. 12B) y la biomasa (fresca y seca, Fig. 13A y 13B). El rendimiento, gramos de fruto maduro total por planta, de aquellas tratadas con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* aumentó de manera significativa respecto a las plantas control (Fig. 13D, 13E y 13F). En general, el rendimiento puede variar al cambiar el número de frutos por planta o el diámetro ecuatorial de los mismos. En este caso, el aumento observado del rendimiento, se explica debido al incremento del número de frutos por planta y no por disminución del diámetro ecuatorial de los frutos.

En contraste, el número de semillas por fruto de las plantas tratadas con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* disminuyó significativamente respecto a las demás condiciones (Fig. 13D). Una posible explicación a esto último, sería que en respuesta al tratamiento con *A. maxima* (500 mg/L), el metabolismo se direccionaría hacia la generación de biomasa del fruto en desmedro de la generación de semillas, por esto, las plantas tratadas con 500 mg/L de biomasa de *A. maxima* presentarían mayor rendimiento y

menor número de semillas. De hecho, se ha descrito que el desarrollo del fruto es un proceso que está directamente relacionado a la transición floral del meristema apical del tallo, lo que conlleva un importante cambio del flujo metabólico (Périlleux y col., 2014). Se ha reportado previamente que existe una relación positiva entre el rendimiento del fruto de tomate y el número de semillas, sin embargo, en este trabajo se muestra el efecto contrario (Imanishi & Iwao, 1974). No obstante, fenotipos similares en tomate han sido reportados previamente con bioestimulantes derivados de algas marinas, donde el tratamiento con el alga *Kappaphycus alvarezii*, aumentó el rendimiento de las plantas del tomate mediante un aumento en el número de frutos por planta y del diámetro ecuatorial de los frutos (Zodape y col., 2011).

Adicionalmente, el % de sólidos solubles totales de los frutos en etapa final de maduración, no fue afectados tras el tratamiento de las plantas con *A. maxima* (Fig. 12C), indicando que la calidad de estos frutos se mantiene tras el tratamiento. Esto es debido a que los sólidos solubles totales representan un índice refractométrico que indica la proporción (%) de los sólidos disueltos en una solución, los que incluyen azúcares, ácidos y otros componentes minoritarios. Es ampliamente utilizado debido a que se correlaciona muy bien con el contenido de azúcares en el tomate y estos azúcares son los responsables del sabor y aroma de este fruto (Beckles, 2012).

Por otra parte, la biomasa vegetativa (total, aérea y radicular) de las plantas tratadas con *A. maxima* no presentaron diferencias significativas respecto al control (Fig. 14). En cambio, las plantas tratadas con Algamax presentaron un aumento significativo de su biomasa fresca, debido a un aumento en la biomasa aérea, respecto al control. De lo anterior, se explicaría que el efecto bioestimulante de Algamax ocurre en el tejido vegetativo y no en los frutos y debido a esto, no se habría obtenido el aumento en el rendimiento de los frutos que sí se obtuvo al tratar las plantas con *A. maxima*.



El efecto de la biomasa de *A. maxima* sobre los frutos de *S. lycopersicum* es bioestimulante, ya que como se ha descrito anteriormente, estos actúan a bajas concentraciones, en este caso a 500 mg/L. Las plantas de tomate de 21 semanas recibieron en total 720 mL de la biomasa de *A. maxima*, lo que se traduce en 360 y 504 mg totales aplicados de biomasa de *A. maxima* para las condiciones 500 y 1000 mg/L, respectivamente. Luego, conociendo que la composición de proteínas de *A. maxima* alcanza el 70% de su peso seco, se obtiene que las plantas recibieron un total de 252 y 504 mg de proteínas para el tratamiento con 500 y 1000 mg/L de biomasa de *A. maxima*, respectivamente. Al usar el factor de conversión nitrógeno-proteína de *Arthrospira platensis* (6,27) (Mariotti y col., 2008; Safi y col., 2012), se llega a que la cantidad de nitrógeno total aplicada por planta es de 40,19 y de 80,38 mg de N, para los tratamientos con 500 y 1000 mg/L de *A. maxima*, respectivamente. Este valor se condice con lo reportado previamente (Inglesby & Fisher, 2012). Este N es insuficiente para suplir la demanda de este nutriente, por lo que es de esperarse que tenga un efecto nutricional mínimo en el crecimiento y desarrollo de esta planta, ya que la tasa de fertilización de N recomendada para el cultivo de tomate es de 168 kg/Ha, lo que equivale a 16,8 g/m<sup>2</sup>, o 1,4 g/planta crecida en macetero (Escalona y col., 2009). Dado lo anterior, la respuesta bioestimulante se podría atribuir a la presencia de compuestos bioactivos en la biomasa de *A. maxima*, más que a través de fertilización (Sharma y col., 2016).

Finalmente, la biomasa de *A. maxima* tuvo efectos bioestimulantes en la producción de frutos de *Solanum lycopersicum*, ya que las plantas tratadas presentaron un mayor rendimiento dado por el aumento del número de frutos, en comparación al control.

## CONCLUSIONES

- Se logró estandarizar las condiciones de crecimiento de la cepa *Arthrospira maxima* CCAP 1475/9, tanto a pequeña como a mediana escala. Se determinó que el tiempo de cosecha óptimo correspondió a los 22 días post inoculación (inicio de la fase de crecimiento estacionario).
- Los procesos de liofilización y autoclave en conjunto, permitieron una mayor fragmentación de los filamentos de *A. maxima*, lo que contribuiría a una mayor biodisponibilidad de las sustancias activas con capacidad bioestimulante.
- *A. maxima* presentó un efecto bioestimulante en el crecimiento vegetativo de *A. thaliana*, ya que las plantas tratadas presentaron mayor diámetro de la roseta y una mayor biomasa fresca respecto a las plantas control, lo que ocurriría mediante una mayor acumulación de agua.
- *A. maxima* presentó un efecto bioestimulante en el crecimiento vegetativo de *L. sativa*, ya que estas plantas presentaron una mayor biomasa fresca respecto a las plantas control, tras el tratamiento, lo que también ocurriría mediante una mayor acumulación de agua.
- *A. maxima* aumentó la tolerancia al estrés salino de *A. thaliana*, mediante un aumento significativo en la sobrevivencia de las plantas tratadas con la biomasa de *A. maxima* y crecidas en condiciones de estrés salino
- *A. maxima* presentó un efecto bioestimulante sobre la producción de frutos de *S. lycopersicum*, ya que las plantas tratadas presentaron un mayor rendimiento de frutos (gramos de fruto maduro por planta) respecto a las plantas control, debido al aumento del número de frutos totales por planta, sin disminuir el diámetro ecuatorial de los frutos,

ni la biomasa, ni el contenido (%) de sólidos solubles de estos (indicador de calidad). Contrariamente, se observó una disminución significativa en el número de semillas por fruto de las plantas tratadas con *A. maxima*, respecto al control.

- La biomasa fresca aérea y radicular de las plantas de *S. lycopersicum* no fueron afectadas tras el tratamiento con *A. maxima*. Sin embargo, las plantas tratadas con Algamax presentaron un incremento significativo en su biomasa aérea respecto al control, pero no en la biomasa de las raíces, indicando una actividad bioestimulante distinta a la observada para la biomasa de *A. maxima*.
- El efecto bioestimulante observado de *A. maxima* fue dependiente de la especie vegetal y de las condiciones de crecimiento, ya que la concentración óptima donde se obtuvo el efecto bioestimulante máximo fue diferente en las tres especies vegetales y condiciones de cultivo.
- No se detectaron diferencias significativas en los niveles de transcritos de los genes marcadores de *A. thaliana* *PR1*, *PDF1.2*, *NCED3*, *RD29*, *FD-GOGAT* y *EXPA10* tras el tratamiento con *A. maxima*.

## PROYECCIONES

Los resultados de este seminario de título son a nivel de laboratorio, sin embargo, establece las bases para el desarrollo de un posible prototipo comercial. Para determinar lo anterior, se deben realizar pruebas en campo para la validación final del producto, con el fin de asegurar resultados robustos y estadísticamente significativos en diversos climas y condiciones de crecimiento. Superada esta etapa, se debe desarrollar un método de fabricación eficiente y consistente, con rendimientos y costos optimizados para llegar a un nivel industrial y comercial (Povero y col., 2016).

También, se propone realizar ensayos de estrés salino en *S. lycopersicum* y en *L. sativa* en condiciones de invernadero, para evaluar si la tolerancia al estrés salino que otorga la biomasa de *A. maxima* en *A. thaliana*, ocurre también en otras especies, resultados que podrían ampliar el mercado al cual se quiere llegar.

Con respecto al estudio de cómo estaría funcionando esta capacidad bioestimulante, se presenta como una proyección inmediata el determinar los mecanismos y las vías moleculares implicadas en esta respuesta, lo cual se podría realizar con el uso de sistemas reporteros vegetales, como por ejemplo plantas transformadas con DR5::GUS, ARR5::GUS, AOS::GUS y PR1::GUS, los cuales responden a auxina, citoquininas, ácido jasmónico y ácido salicílico, respectivamente (Rayorath y col., 2008; Subramanian y col., 2011; Khan y col., 2011). Otra proyección a corto plazo, sería el realizar un análisis transcriptómico mediante RNAseq, lo que permitiría evaluar los cambios de expresión génica global entre la condición control y con el tratamiento de *A. maxima*. Además, esto se podría evaluar en diferentes tejidos (como aéreo y radicular) y en diferentes tiempos, para detectar cuándo y dónde ocurrirían estos cambios.

Por otro lado, para corroborar si el aumento de la biomasa fresca ocurre mediante un aumento del tamaño celular (expansión) o mediante proliferación (división), se podrían realizar estudios mediante microscopía, y así determinar número de células y/o tamaño de estas entre las distintas condiciones de crecimiento (control y con tratamiento con *A. maxima*).

Se espera que en un futuro este trabajo logre ser un aporte en la creación de un bioestimulante comercial a base de *A. maxima*, para de esta manera, contribuir al desarrollo de una agricultura más sustentable, acorde con el nuevo paradigma climático global.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adesemoye, A. O., & Kloepper, J. W.** 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85(1): 1–12.
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J.** 2012. The 2012 Revision World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. No. 12-03, p. 4. Rome, FAO: ESA Working paper.
- Ali, S. K., & Saleh, A. M.** 2012. Spirulina - An overview. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4: 9–15.
- Andersen, R. A.** 2005. Algal culturing techniques. Elsevier/Academic Press.
- Arnon, D. I.** 1949. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol.* 24(1): 1–15.
- Ashraf, M., & Foolad, M. R.** 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59(2): 206–216.
- Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., & Prithiviraj, B.** 2015. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196: 39–48.
- Becker, E. W.** 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25(2): 207–210.
- Beckles, D. M.** 2012. Factors affecting the postharvest soluble solids and sugar content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 63(1): 129–140.
- Bewley, J.** 1997. Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell.* 9(7): 1055–1066.
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N.** 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microb. Cell Fact.* 13(1): 66.
- Bhowmik, D., Dubey, J., & Mehra, S.** 2010. Evaluating Potential of Spirulina as Inoculant for Pulses. *Academic Journal of Plant Sciences*, 3(4): 161-164.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W.** 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil.* 383: 3–41.
- Camargo, J. a., & Alonso, Á.** 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Int.* 32(6):831–849.
- Campos, M. L., Carvalho, R. F., Benedito, V. A., & Pereira Peres, L. E.** 2010. Small and remarkable. *Plant Signal Behav.* 5(3): 267–270.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Jones, D. L., Nebbioso, A., Mazzei, P., & Piccolo, A.** 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196: 15–27.
- CCAP.** 2016. *Arthrospira maxima* CCAP 1475/9. <http://www.ccap.ac.uk/results2014.php>
- Cheng, J., Xia, A., Song, W., Su, H., Zhou, J., & Cen, K.** 2012. Comparison between heterofermentation and autofermentation in hydrogen production from *Arthrospira* (Spirulina) *platensis* wet biomass. *Int. J. Hydrogen.* 37(8): 6536–6544.
- Cho, H. T., & Cosgrove, D. J.** 2000. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(17): 9783–9788.

- Clément, G., Giddey, C., & Menzi, R.** 1967. Amino acid composition and nutritive value of the alga *Spirulina maxima*. *J. Sci. Food Agric.* 18(11): 497–501.
- Colla, G., & Roupshael, Y.** 2015a. Biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196: 1–2.
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., & Roupshael, Y.** 2015b. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196: 28–38.
- De Oliveira, M. A. C. L., Monteiro, M. P. C., Robbs, P. G., & Leite, S. G. F.** 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquac. Int.* 7(4): 261–275.
- du Jardin, P.** 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196: 3–14.
- EBIC.** 2016a. EBIC and biostimulants in brief. <http://www.biostimulants.eu/>
- EBIC.** 2016b. About biostimulants and the benefits of using them. <http://www.biostimulants.eu/about/what-are-biostimulants-benefits/>
- El-Khawaga, A. S.** 2011. Partial replacement of mineral N fertilizers by using humic acid and *Spirulina Platensis* algae biofertilizer in florida prince peach orchards. *Middle East J. Appl. Sci.* 1(1): 5–10.
- Emmanuel, E., & Levy, A. A.** 2002. Tomato mutants as tools for functional genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5(2): 112–117.
- Ertani, A., Cavani, L., Pizzeghello, D., Brandellero, E., Altissimo, A., Ciavatta, C., & Nardi, S.** 2009. Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172(2): 237–244.
- Ertani, A., Pizzeghello, D., Altissimo, A., & Nardi, S.** 2013a. Use of meat hydrolyzate derived from tanning residues as plant biostimulant for hydroponically grown maize. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 176(2): 287–295.
- Ertani, A., Schiavon, M., Muscolo, A., & Nardi, S.** 2013b. Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. *Plant Soil.* 364: 145–158.
- Escalona, V., Alvarado, P., Monardes, H., Urbina, C., & Martin, A.** 2009. Manual del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Nodo Hortícola VI Región.
- Falquet, J.** 2006. The nutritional aspects of Spirulina. *Antenna Technologies.* 1–24.
- FAO.** 2003. World agriculture: towards 2015 / 2030 World agriculture: towards 2015 / 2030: an FAO perspective. Earthscan.
- FAO.** 2007. Normas del CODEX para el tomate (CODEX STAN 293-2007).
- FAO.** 2015. World fertilizer trends and outlook to 2018. Food and Agriculture Organization of United Nations.
- Foley, J. a., Ramankutty, N., Brauman, K. a., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., Mueller, N. D., O'Connell, C., Ray, D. K., West, P. C., Balzer, P. C., Bennett, E. M., Carpenter, Hill, S. J., Monfreda, C., S. R., Polasky, S., Rockstro, J., Zaks, D. P. M.** 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature.* 478(7369): 337–342.
- García-Mina, J. M., & Hadavi, E.** 2016. Editorial: Organic-Based Foliar Biostimulation and Nutrition in Plants. *Front. Plant Sci.* 6: 2015–2016.

- Gofii, O., Fort, A., Quille, P., McKeown, P. C., Spillane, C., & O'Connell, S.** 2016. Comparative Transcriptome Analysis of Two *Ascophyllum nodosum* Extract Biostimulants: Same Seaweed but Different. *J. Agric. Food Chem.* 64(14): 2980-2989.
- Good, A. G., & Beatty, P. H.** 2011. Fertilizing nature: A tragedy of excess in the commons. *PLoS Biol.* 9(8): 1-9.
- Imanishi, S., & Iwao, H.** 1974. Relationship between Fruit Weight and Seed Content in the tomato. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 44(1): 33-40.
- Inglesby, A. E., & Fisher, A. C.** 2012. Enhanced methane yields from anaerobic digestion of *Arthrospira maxima* biomass in an advanced flow-through reactor with an integrated recirculation loop microbial fuel cell. *Energy Environ. Sci.* 5(7): 7996.
- Kamal, A., & Ahmad, I. Z.** 2014. Cyanobacteria "the blue green algae" and its novel applications: A brief review. *IJIAS.* 7(1): 251-261.
- Khan, W., Hiltz, D., Critchley, A. T., & Prithviraj, B.** 2011. Bioassay to detect *Ascophyllum nodosum* extract-induced cytokinin-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *J. Appl. Phycol.* 23(3): 409-414.
- Koukounaras, A., Tsouvaltzis, P., & Siomos, A. S.** 2013. Effect of root and foliar application of amino acids on the growth and yield of greenhouse tomato in different fertilization levels. *Int. J. Food Agric. and Environ.* 11(2): 644-648.
- Liu, C., Li, L.-J., Wu, C.-Y., Guo, K.-N., & Li, J.-H.** 2016. Growth and antioxidant production of *Spirulina* in different NaCl concentrations. *Biotechnol. Lett.* 38(7):1089-1096.
- Lonhienne, T. G. A., Trusov, Y., Young, A., Rentsch, D., Näsholm, T., Schmidt, S., & Paungfoo-Lonhienne, C.** 2014a. Effects of externally supplied protein on root morphology and biomass allocation in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* 4: 5055.
- Lonhienne, T. G. A., Trusov, Y., Young, A., Schmidt, S., & Paungfoo-Lonhienne, C.** 2014b. The effect of protein supplied in the growth medium on plant pathogen resistance. *Plant Signal Behav.* 9(10): e976159.
- Lucini, L., Roupheal, Y., Cardarelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., & Colla, G.** 2015. The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Sci. Hortic.* 182: 124-133.
- Macouzet, M.** 2016. Critical aspects in the conception and production of microbial plant biostimulants. *Probiotic Intelligentsia. Instituto de desarrollo de alimentos probióticos.* 5(2): 29-38.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A.** 2014. Brock biology of microorganisms. K. Churchman, N. McFadden, & A. Williams (Eds) .14th ed. Peason.
- Mariotti, F., Tomé, D., & Mirand, P.** 2008. Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48(2): 177-184.
- Martí, E., Gisbert, C., Bishop, G. J., Dixon, M. S., & García-Martínez, J. L.** 2006. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *J. Exp. Bot.* 57(9): 2037-2047.
- Martinez, M. M., Ortega, R., & Valdés, S.** 2016. Bioproductos en Chile: un nuevo e interesante mercado, pp. 59-60.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y., Levy, A.** 1997. A new model system for tomato genetics. *Plant J.* 12(6): 1465-1472.



- Mohan, A., Misra, N., Srivastav, D., Umapathy, D., & Kumar, S.** 2014. Spirulina- The Nature's Wonder: A Review. *SJAMS*. 2: 1334–1339.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., & Ertani, A.** 2016. Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Sci. Agric.* 73(1): 18–23.
- Nie, Z., Xia, J., & Levert, J. M.** 2002. Fractionation and characterization of polysaccharides from cyanobacterium *Spirulina (Arthrospira) maxima* in nitrogen-limited batch culture. *J. Cent. South Univ. T.* 9(2): 81–86.
- Norrie, J., & Keathley, J. P.** 2006. Benefits of *Ascophyllum nodosum* marine-plant extract applications to "Thompson seedless" grape production. *Acta Hort.* 727: 243–247.
- Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I.** 2012. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects, *Int. J. Mol. Sci.* 13(11): 14002-14015.
- ODEPA.** 2002. Descripción del mercado de las lechugas. <http://www.odepa.cl/articulo/descripcion-del-mercado-de-las-lechugas-2/>
- ODEPA.** 2009. Fertilizantes en Chile: Coyuntura y Perspectivas, pp. 1–16.
- ODEPA.** 2015. Agricultura sostenible: antecedentes e iniciativas, pp. 1–7.
- Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T. G. A., Rentsch, D., Robinson, N., Christie, M., Webb, R. I., Gamage, H. K., Carroll, B. J., Schenk, P. M., Schmidt, S.** 2008. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(11): 4524–9.
- Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis, R., Tamagnini, P.** 2009. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: Composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiol. Rev.* 33(5): 917–941.
- Périlleux, C., Lobet, G., & Tocquin, P.** 2014. Inflorescence development in tomato: gene functions within a zigzag model. *Front. Plant Sci.* 5: 121.
- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M.** 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28(1): 489–521.
- Povero, G., Mejia, J. F., Di Tommaso, D., Piaggese, A., & Warrior, P.** 2016. A Systematic Approach to Discover and Characterize Natural Plant Biostimulants. *Front. Plant Sci.* 7: 435.
- Prasad, S. M. & Mishra P.** 2015. Evaluation of Anticandidal activities of *Spirulina* metabolites against *Candida albicans*. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 6(3): 1241–1247.
- Rao, S., Sarada, R., & Ravishankar, G. A.** 1996. Phycocyanin, a new elicitor for capsaicin and anthocyanin accumulation in plant cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 619–621.
- Rao, S., Tripathi, U., Suresh, B., & Ravishankar, G. A.** 2001. Enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* and *Tagetes patula* under the influence of microalgal elicitors. *Food Biotechnol.* 15(1): 35–46.
- Rayorath, P., Jithesh, M. N., Farid, A., Khan, W., Palanisamy, R., Hankins, S. D., Critchley A. T., Prithiviraj, B.** 2008. Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J. Appl. Phycol.* 20(4): 423–429.
- Reichert, C. C., Reinehr, C. O., & Costa, J. A. V.** 2006. Semicontinuous cultivation of the

cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Braz. J. Chem. Eng.* 23(1): 23–28.

**Rodríguez, A. A., Stella, A. M., Storni, M. M., Zulpa, G., & Zaccaro, M. C.** 2006. Effects of cyanobacterial extracellular products and gibberellic acid on salinity tolerance in *Oryza sativa* L. *Saline Systems*, 2(1), 1.

**Rossi, F., & De Philippis, R.** 2015. Role of Cyanobacterial Exopolysaccharides in Phototrophic Biofilms and in Complex Microbial Mats. *Life*. 5: 1218–1238.

**Ruzzi, M., & Aroca, R.** 2015. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Sci. Hortic.* 196: 124–134.

**Sangha, J. S., Khan, W., Ji, X., Zhang, J., Mills, A. A. S., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B.** 2011. Carrageenans, sulphated polysaccharides of red seaweeds, differentially affect *Arabidopsis thaliana* resistance to *Trichoplusia ni* (Cabbage Looper). *PLoS ONE*. 6(10): e26834

**Schiavon, M., Ertani, A., & Nardi, S.** 2008. Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. *J. Agric. Food Chem.* 56(24): 11800–11808.

**Schmidt, S., Raven, J. A., & Paungfoo-Lonhienne, C.** 2013. The mixotrophic nature of photosynthetic plants. *Funct. Plant Biol.* 40(5): 425–438.

**Sharma, H. S. S., Selby, C., Carmichael, E., McRoberts, C., Rao, J. R., Ambrosino, P., Chiurazzi, M., Pucci, M., Martin, T.** 2016. Physicochemical analyses of plant biostimulant formulations and characterisation of commercial products by instrumental techniques. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 3(1): 1-17.

**Sialve, B., Bernet, N., & Bernard, O.** 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol. Adv.* 29(1): 409–416.

**Singh, S.** 2014. A review on possible elicitor molecules of cyanobacteria: their role in improving plant growth and providing tolerance against biotic or abiotic stress. *J. Appl. Microbiol.* 117(5): 1221-1244

**Somerville, C., & Koornneef, M.** 2002. A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat. Rev. Genet.* 3(11): 883–889.

**Stadnik, M. J., & De Freitas, M. B.** 2014. Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. *Trop. Plant Pathol.* 39(2): 111–118.

**Subramanian, S., Sangha, J. S., Gray, B. A., Singh, R. P., Hiltz, D., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B.** 2011. Extracts of the marine brown macroalga, *Ascophyllum nodosum*, induce jasmonic acid dependent systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 131(2): 237–248.

**Cantwell, M. and T. Suslow.** 1997. *Tomato: Recommendations for Maintaining Postharvest Quality*.  
[http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity\\_Resources/Fact\\_Sheets/Datastores/Vegetables\\_English/?uid=36&ds=799](http://postharvest.ucdavis.edu/Commodity_Resources/Fact_Sheets/Datastores/Vegetables_English/?uid=36&ds=799).

**Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M., & Murphy, A.** 2015. *Plant Physiol.* Sinauer Associates.

**ThermoScientific.** 2011. NanoDrop: Assessment of Nucleic Acid Purity. *Protocols and Product Manuals*, 1–2.

**Trabelsi, L., Ben Ouada, H., Bacha, H., & Ghouli, M.** 2009. Combined effect of temperature and

light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Appl. Phycol.* 21(4): 405–412.

**Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., Combier, M., Trdá, L., Daire X., Adrian, M.** 2014. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Front. Plant Sci.* 5: 592.

**Usharani, G., Saranraj, P., & Kanchana, D.** 2012. Spirulina Cultivation: A Review. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.* 3(6): 1327–1341.

**Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7): 1

**Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A., & Moenne, A.** 2011. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Mar. Drugs.* 9(12): 2514–2525.

**Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K.** 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* 45(4): 523–539.

**Vonshak, A.** 2002. *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology.* Taylor & Francis.

**Wajahatullah, K., Rayirath, U. P., Sowmyalakshmi, S., Mundaya, N. J., Prasanth, R., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J., Balakrishnan, P.** 2009. Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *J. Plant Growth Regul.* 28: 386–399.

**Wally, O. S. D., Critchley, A. T., Hiltz, D., Craigie, J. S., Han, X., Zaharia, L. I., Abrams, S. R., Prithiviraj, B.** 2013. Regulation of Phytohormone Biosynthesis and Accumulation in *Arabidopsis* Following Treatment with Commercial Extract from the Marine Macroalga *Ascophyllum nodosum*. *J. Plant Growth Regul.* 32(2): 324–339.

**Whapham, C. A., Blunden, G., Jenkins, T., & Hankins, S. D.** 1993. Significance of betaines in the increased chlorophyll content of plants treated with seaweed extract. *J. Appl. Phycol.* 5(2): 231–234.

**Zodape, S. T., Gupta, A., Bhandari, S. C., Rawat, U. S., Chaudhary, D. R., Eswaran, K., & Chikara, J.** 2011. Foliar application of seaweed sap as biostimulant for enhancement of yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. Sci. Ind. Res.* 70(3): 215–219.

## ANEXO

**Anexo 1:** Composición del medio de cultivo Schlösser modificado para el crecimiento de *Arthrospira maxima*.

Componente (g/L dH <sub>2</sub> O)	Solución Stock	Cantidad usada para 1 L de solución	Concentración final en el medio (M)
<b>Solución I</b>	500 mL	-	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	13,61 g	1,62·10 <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	4,03 g	3,8·10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	0,5 g	2,87·10 <sup>-3</sup>
<b>Solución II</b>	500 mL	-	-
NaNO <sub>3</sub>	-	2,5 g	2,94·10 <sup>-2</sup>
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	1 g	5,74·10 <sup>-3</sup>
NaCl	-	1 g	1,71·10 <sup>-2</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	-	0,2 g	8,11·10 <sup>-4</sup>
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	-	0,04 g	2,72·10 <sup>-4</sup>
<b>Solución de metales PIV</b>		6 mL	
<b>Solución de micronutrientes CHUS 10</b>		1 mL	

\*Las soluciones I y II se deben autoclavar por separado para evitar la formación de precipitados y luego se deben mezclar asépticamente.

Componente	Concentración (g/L dH <sub>2</sub> O)	Concentración final en el medio (M)
<b>Solución de metales PIV</b>		
Na <sub>2</sub> EDTA	0,75	1,529·10 <sup>-5</sup>
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,097	2,153·10 <sup>-6</sup>
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,041	1,242·10 <sup>-6</sup>
ZnCl <sub>2</sub>	0,005	2,200·10 <sup>-7</sup>
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,002	5,043·10 <sup>-8</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,004	9,919·10 <sup>-8</sup>
<b>Solución de micronutrientes CHUS 10</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,4	3,881·10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,4	7,073·10 <sup>-5</sup>
ZnCl <sub>2</sub>	0,4	2,934·10 <sup>-6</sup>
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02	8,405·10 <sup>-8</sup>
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1	5,865·10 <sup>-7</sup>

Adaptada de (Andersen, 2005).

## Anexo 2: Composición de la solución nutritiva de Hoagland modificada<sup>1</sup>.

Compuesto	Concentración de solución stock	Concentración de solución stock	Volumen de solución stock por litro de solución final	Elemento	Concentración final del elemento
	mM	g/L	mL		$\mu\text{M}$ ppm
<b>Macronutrientes</b>					
KNO <sub>3</sub>	1000	101,10	6	N	16000 224
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1000	236,16	4	K	6000 235
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1000	115,08	2	Ca	4000 160
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1000	246,48	1	P	2000 62
				S	1000 32
				Mg	1000 24
<b>Micronutrientes</b>					
KCl	25	1,864		Cl	50 1,77
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12,5	0,773		B	25 0,27
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,0	0,169	2	Mn	2,0 0,11
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0	0,288		Zn	2,0 0,13
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,25	0,062		Cu	0,5 0,03
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (85% MoO <sub>3</sub> )	0,25	0,040		Mo	0,5 0,05
Fe-EDDHA (6,5% Fe)	ND	46,15	1	Fe	53,7 3,00

<sup>1</sup>Adaptada de (Taiz y col., 2015). ND: No disponible.

**Anexo 3:** Composición de los productos a base de Spirulina producidos a escala industrial: Spirulina nature (Aeon Biogroup, Chile) y Spirulina del Consorcio Algaefuels S.A., (Chile) utilizados en este seminario de título.

Muestra	Spirulina nature (Aeon Biogroup, Chile)	Spirulina (Consorcio Algaefuels S.A.)
Nitrógeno (g/100g)	8,6 <sup>2</sup>	5,3 <sup>2</sup>
Fósforo (mg/100g)	1114,4 <sup>2</sup>	805,5 <sup>2</sup>
Potasio(g/100g)	1,5 <sup>2</sup>	2,3 <sup>2</sup>
Calcio (mg/100g)	81,7 <sup>2</sup>	162,5 <sup>2</sup>
Magnesio(mg/100g)	258,8 <sup>2</sup>	155,9 <sup>2</sup>
Sodio(mg/100g)	582 <sup>2</sup>	9300 <sup>2</sup>
Manganeso (mg/100g)	2 <sup>2</sup>	13,1 <sup>2</sup>
Zinc (mg/100g)	1,8 <sup>2</sup>	18,4 <sup>2</sup>
Boro (mg/100g)	1,3 <sup>2</sup>	5,6 <sup>2</sup>
Proteínas (g/100g)	60 <sup>3</sup>	-
Grasa total (g/100g)	8,2 <sup>3</sup>	-
H. de carbono disponibles (g/100g)	15,1 <sup>3</sup>	-
Vitamina A (µg ER <sup>1</sup> /100g)	27500 <sup>3</sup>	-
Vitamina B1 (mg/100g)	4,4 <sup>3</sup>	-
Vitamina B2 (mg/100g)	6,9 <sup>3</sup>	-
Vitamina B6 (mg/100g)	18,4 <sup>3</sup>	-
Vitamina B12(µg/100g)	32 <sup>3</sup>	-
Vitamina K (µg/100g)	1300 <sup>3</sup>	-
Cromo (µg/100g)	280 <sup>3</sup>	-
Yodo (µg/100g)	1800 <sup>3</sup>	-
Hierro (mg/100g)	83 <sup>3</sup>	-
Selenio (µg/100g)	700	-

<sup>1</sup>ER= Equivalentes de retinol.

<sup>2</sup>Datos obtenidos del análisis realizado en el Instituto de agroindustria en el laboratorio de análisis foliar y de suelos.

<sup>3</sup>Datos obtenidos a partir de la información nutricional del etiquetado del producto.