



Trabajo Fin de Grado

Grado en Biología

Curso 2021-2022

Efecto de la inoculación bacteriana en acelga bajo estrés con riego salino

Departamento de Biología Vegetal y Ecología

Facultad de Biología

Universidad de Sevilla

Autora: Cristina Sola Elías

Tutora: Jennifer Mesa Marín



AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mis padres y a mi hermano, por haberme transmitido el amor por la naturaleza, por su apoyo y paciencia durante estos cuatro años. Sin ellos no habría podido llegar hasta aquí.

A mi tutora, Jenny, por todo lo que me ha enseñado, por su disposición, amabilidad y alegría contagiosa desde el primer día. Ha sido un placer ser tu primera tutelada.

A Susana Redondo, por abrirme las puertas del grupo de investigación, permitirme ser parte de este trabajo y descubrirme una pequeña parte del mundo de la investigación.

A mis amigos de la carrera, por compartir conmigo tantos momentos estos cuatro años.

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1 Condiciones de crecimiento de las plantas y tratamientos	9
4.2 Selección de rizobacterias para el inóculo de la acelga.....	10
4.3 Preparación del extracto de acelga para los análisis bioquímicos	10
4.4 Determinación de flavonoides totales.....	11
4.5 Determinación de compuestos fenólicos totales.....	12
4.6 Medida de la actividad antioxidante	14
4.7 Medida del contenido en antocianinas.....	15
4.8 Análisis estadístico	15
5. RESULTADOS.....	16
5.1 Flavonoides.....	16
5.2 Polifenoles	17
5.3 Antocianinas	18
5.4 Actividad antioxidante.....	18
6. DISCUSIÓN	20
7. CONCLUSIÓN.....	23
8. BIBLIOGRAFÍA	24

1. RESUMEN

La salinización de los suelos, como consecuencia del cambio climático y de la actividad humana, es un problema que se debe abordar para poder sustentar y abastecer de alimento a la población mundial en continua expansión. La biofertilización con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) es una de las estrategias que se estudia para aumentar la tolerancia al estrés, el crecimiento y la producción de los cultivos. Entre los cultivos más extendidos, debido a sus propiedades nutricionales, se encuentra la acelga, una hortaliza que aporta grandes beneficios a la salud humana. Sin embargo, nunca se ha estudiado en ella la opción de la biofertilización bacteriana en condición de salinidad. Este Trabajo de Fin de Grado se centra en el estudio del efecto de la inoculación de bacterias PGPR aisladas de halófitas y de la presencia de sal en la producción de metabolitos secundarios y antioxidantes en acelga. Para ello se ha sometido a este vegetal a cuatro tratamientos distintos: dos tratamientos de biofertilización (consorcio de rizobacterias y control) y dos concentraciones de salinidad (0 y 85 mmol L⁻¹ NaCl); y se han determinado mediante pruebas colorimétricas la concentración de compuestos fenólicos totales, flavonoides, antocianinas y la actividad antioxidante. Los resultados obtenidos muestran que tanto la presencia de sal como la inoculación con las PGPR seleccionadas afectan a la producción de dichos compuestos. Por un lado, la inoculación con las PGPR seleccionadas produjo un aumento de la concentración de polifenoles y flavonoides en acelga sometida a estrés salino, aunque no de la capacidad antioxidante de la acelga a nivel bioquímico. Por el contrario, la concentración de antocianinas disminuyó en acelga crecida en condiciones de salinidad y aumentó en acelga inoculada crecida en ausencia de sal. Esto demuestra la potencial utilidad de los biofertilizantes bacterianos como estrategia para aumentar el crecimiento y la productividad de los cultivos agrícolas.

2. INTRODUCCIÓN

En un planeta cada vez más poblado, la demanda de alimento para sustentar a la población hace necesario un incremento de la producción. Algunos estudios han determinado que la producción mundial de alimentos deberá aumentar en un 70% para el año 2050 y que, para el año 2025, los requerimientos de agua duplicarían las necesidades actuales (Ocampo, 2011). Por tanto, mientras los recursos escasean, hay que tratar de mejorar la forma de producir y hacerla más eficiente. Además, a este reto debemos sumarle los efectos que el cambio climático tiene sobre la Tierra. Este cambio climático está provocado por el aumento de las temperaturas debido a la emisión y acumulación de gases de efecto invernadero. Durante la expansión de la era industrial, las actividades antropogénicas elevaron los niveles de estos gases, particularmente del CO₂, y, actualmente, esos niveles continúan aumentando, lo que conlleva un incremento de la temperatura superficial global (Renaut *et al.*, 2008).

El Panel Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC, del inglés *Intergovernmental Panel on Climate Change*) ha evaluado los impactos que el cambio climático puede tener sobre la agricultura. En un principio, el calentamiento moderado podría beneficiar al rendimiento de los cultivos en regiones frías y templadas, y perjudicaría a la producción de regiones semiáridas y tropicales. Sin embargo, si la temperatura del planeta continúa aumentando, se verían afectadas negativamente todas las regiones de la Tierra (López y Hernández, 2016). El calentamiento global causa disminución de la productividad y fertilidad del suelo, aumento de la degradación y la salinización del suelo, pérdidas por catástrofes naturales, incremento de la superficie de riego y modificación de la distribución y dinámica de plagas y enfermedades (Ocampo, 2011). De todas ellas, la salinización del suelo se concibe como una de las principales amenazas, creciente, para la viabilidad y el rendimiento de los cultivos en un mundo cada vez más cálido (Hassani *et al.*, 2021).

En los últimos años, la salinización se ha convertido en uno de los problemas ambientales más importantes a nivel mundial (Li *et al.*, 2018). Se ha estimado que alrededor del 20% de las tierras de regadío de nuestro planeta (45 millones de Ha) están afectadas por la salinidad. En la Unión Europea, el terreno afectado es de un millón de Ha, y se localiza principalmente en la región mediterránea; cerca del 3% de las hectáreas de regadío de España está gravemente afectado, y otro 15% está en grave peligro (Machado y Serralheiro, 2017).

Según la Soil Science Society of America (2022), un suelo salino es aquel suelo no sódico que contiene suficiente sal soluble para afectar negativamente al crecimiento de la

mayoría de las plantas de cultivo. Por tanto, la salinización del suelo es un proceso de degradación de la tierra debido a la acumulación de sales solubles en el suelo (Hassani *et al.*, 2021), que restringe o hace imposible su aprovechamiento (Iribarren, 2005). De manera natural, la salinización es propia de zonas áridas o semiáridas debido a la lluvia, los procesos eólicos, meteorización física o química del material rocoso original, el transporte de sales acumuladas en depósitos geológicos salinos por corrientes de agua poco profundas, baja conductividad hidráulica y condiciones de alta evaporación. No obstante, existe una salinización antropogénica o secundaria, causada por actividades realizadas por el hombre, como el sobrepastoreo, el uso excesivo de fertilizantes, el riego con agua de baja calidad, sin lixiviación ni drenaje adecuados, y el uso excesivo del agua subterránea en las zonas agrícolas y en las ciudades de verano, lo que provoca la intrusión de agua de mar en los acuíferos (Guida-Johnson *et al.*, 2017; Okur y Örcen, 2020; Stavi *et al.*, 2021).

La salinidad es un factor que contribuye a la pérdida de productividad de los cultivos agrícolas. Prácticamente, todos nuestros cultivos son de especies glicófitas, es decir, son sensibles a la presencia de sal. Según la tolerancia a la sal, las plantas se pueden clasificar como: sensibles, moderadamente sensibles, moderadamente tolerantes y tolerantes (**tabla 1**) (Machado y Serralheiro, 2017). La salinidad tiene tres efectos potenciales en las plantas sensibles a ella: disminución del potencial hídrico, toxicidad directa de los iones Na^+ y Cl^- absorbidos e interferencia con la absorción de nutrientes esenciales (Flowers y Flowers, 2005). En conclusión, se ve afectado el crecimiento de las plantas y, por ende, la productividad de los cultivos.

Existen dos fases en la respuesta del crecimiento de las plantas a la salinidad. La primera fase consiste en la reducción del crecimiento por el desarrollo de un déficit hídrico. La segunda fase se debe a la acumulación de sales a niveles tóxicos. Entre los efectos que la salinidad tiene sobre las especies vegetales encontramos una reducción del crecimiento, una disminución de la tasa fotosintética debido a la baja concentración de pigmentos fotosintéticos y al descenso de la conductancia estomática, la aparición de deficiencias y desequilibrios nutricionales, el efecto osmótico y el efecto ion-específico. El efecto osmótico se refiere a la disminución en la capacidad de absorber agua, y se produce por un aumento del potencial hídrico del suelo ante la acumulación de sales. Las partículas del suelo retienen el agua con más fuerza y la planta no es capaz de absorberla, lo cual lleva a una situación de estrés hídrico. Por otro lado, el efecto ion-específico hace referencia a la acumulación de iones en los tejidos vegetales por encima de

las concentraciones naturales (Martínez-Villavicencio *et al.*, 2011; Machado y Serralheiro, 2017).

Tabla 1. Tolerancia a la sal de los cultivos de hortalizas determinada por la salinidad del suelo (ECe) y la salinidad del agua de riego (ECw). ECe - conductividad eléctrica del extracto de pasta saturada del suelo. ECw - conductividad eléctrica del agua de riego. S = sensible, MS = moderadamente sensible, MT = moderadamente tolerante, T = tolerante (Machado y Serralheiro, 2017).

Especie vegetal	Suelo		Agua de riego	
	Umbral ¹ (dS. m ⁻¹)	Pendiente	Umbral ² (dS.m ⁻¹)	Calificación
	CEe	(% por dS.m ⁻¹)	CEw	
Espárragos	4,1	2	2,7	T
Frijol	1	19	0,7	S
Brócoli	2,8	9,2	1,9	MS
Zanahoria	1	14	0,7	S
Coliflor	-	-	1,9	MS
Apio	1,8	6,2	1,2	MS
Berenjena	1,1	6,9	0,7	MS
Lechuga	2	13	0,9	MS
Melón	1	1	-	MS
Okra	1,2	-	-	S
Cebolla	1,2	16	0,8	S
Guisante	1,5	14,6	-	MS
Pimienta	1,5	14	1	MS
Papa	1,7	12	1,1	MS
Verdolaga	6,3	9,6	-	MT
Remolacha roja	4	-	2,7	MT
Espinaca	2	7,6	1,3	S
Fresa	1	33	0,7	S
Tomate	2,5	9,9	1,7	MS

Una de las estrategias potenciales para disminuir el estrés por salinidad en plantas y aumentar el crecimiento vegetal es la inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, de las siglas en inglés *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Zafar-Ul-Hye *et al.*, 2020). Las PGPR usan diversos mecanismos para contrarrestar los efectos negativos del estrés, como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos para absorber hierro, la mejora de la absorción de otros nutrientes y la modulación de hormonas vegetales implicadas en el crecimiento de las plantas; además de la producción de biopelículas para mejorar la adhesión de las bacterias a las raíces (Redondo-Gómez *et al.*, 2022). Los inóculos de bacterias PGPR producidos *in vitro* o de forma natural tienen pues, diversos usos en ámbitos agrícolas y biotecnológicos.

Las rizobacterias PGPR se han empleado como estrategia para aumentar el crecimiento y la productividad en cultivos agrícolas tradicionales, como alfalfa, maíz, arroz, fresa, girasol o trigo, entre otros (Redondo-Gómez *et al.*, 2021); pero hay otros muchos cultivos de importancia económica en los que esta técnica no se ha probado, como es el caso de la acelga (*Beta vulgaris L.*). La acelga (**figura 1**) es una verdura de hoja, con un limbo foliar grande, peciolo grueso y

sin agrandamiento de la raíz. Esta verdura altamente nutritiva se utiliza para consumo humano y se considera una fuente importante de calcio, hierro, fósforo, magnesio y antioxidantes naturales, como flavonoides, carotenoides y otros fenoles dietéticos. Se ha demostrado que estos compuestos contribuyen al sistema de defensa antioxidante del organismo contra el estrés oxidativo y algunas enfermedades crónicas, como la diabetes (Redondo-Gómez *et al.*, 2022).



Figura 1. *Beta vulgaris L.* (Ecosostenible, 2019).

La acelga es moderadamente sensible a sal, y es por esta razón que se ha evaluado el efecto de la inoculación de un consorcio de bacterias PGPR, aislado de la rizosfera de halófitas, en un cultivo de esta verdura en medio salino. Es el primer estudio que evalúa el efecto de la salinidad e inoculación de bacterias PGPR en acelga. En él se han medido algunos de los metabolitos secundarios producidos por el vegetal (polifenoles, flavonoides, antocianinas y antioxidantes), que son indicadores de la calidad nutricional del cultivo.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es evaluar el efecto de la inoculación de un consorcio de bacterias PGPR y de la presencia de sal en la capacidad antioxidante y producción de metabolitos secundarios de acelga.

Para ello, se han establecido los siguientes objetivos específicos: determinación de compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y actividad antioxidante, en acelgas sometidas a inoculación con PGPR y a salinidad.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Condiciones de crecimiento de las plantas y tratamientos

Las semillas de acelgas (*B. vulgaris* var. Bressane) se compraron en una semillera, se prehidrataron durante 24 horas, se sembraron en bandejas cubiertas con perlita y se incubaron a 21/25 °C, 40-60% humedad relativa y luz natural 250–1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante una semana en un invernadero (Servicio General de Invernadero, del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla, CITIUS II, Campus Reina Mercedes). Las plántulas se transfirieron a macetas de plástico (15 cm de alto \times 18 cm de diámetro; 1 planta por maceta; 48 macetas en total (**figura 2**)) con sustrato orgánico y perlita (3:1), y se cultivaron en las mismas condiciones. Se regaron diariamente con 100 mL de agua corriente. A los 30 días se establecieron los distintos tratamientos.

Se aplicaron 4 tratamientos diferentes (n=12 por tratamiento): dos tratamientos de biofertilización (consorcio de rizobacterias y control) y dos concentraciones de salinidad (0 y 85 mmol L^{-1} NaCl). En primer lugar, se establecieron los tratamientos de salinidad y, al día siguiente, se realizó la inoculación. Una vez tratadas, las plantas se regaron diariamente con 100 mL de agua corriente o agua corriente 85 mmol L^{-1} de NaCl, dependiendo del tratamiento.



Figura 2. Macetas de acelgas con los distintos tratamientos en el invernadero del CITIUS II, campus Reina Mercedes, Universidad de Sevilla.

4.2 Selección de rizobacterias para el inóculo de la acelga

Para el inóculo de bacterias se utilizaron dos cepas: *Pseudarthrobacter oxydans* SRT15 (GenBank ID MH304399, NCBI Taxonomy ID 1671) y *Bacillus zhangzhouensis* HPJ40 (GenBank ID MH304389, NCBI Taxonomy ID 1178540), aisladas en marismas de Huelva de la rizosfera de las halófitas *Salicornia ramosissima* J. Woods y *Atriplex portulacoides* L., respectivamente, como se detalla en Mesa-Marín *et al.* (2019). Estas cepas fueron seleccionadas debido a sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal (**tabla 2**). Además, no mostraron antagonismo entre ellas al crecer juntas.

Tabla 2. Cepas de rizobacterias seleccionadas para el inóculo de la acelga y sus propiedades promotoras del crecimiento. (+) actividad detectada, (-) actividad no detectada.

Cepa	Fijación de nitrógeno	Solubilización de fosfatos (mm halo)	Producción de sideróforos (mm halo)	Producción de IAA ($\mu\text{g/mL}$)	Producción de biofilm	Producción de ACC desaminasa ($\mu\text{moles } \alpha\text{-cetog/h mg prot}$)
<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> SRT15	+	9	-	20,99	-	-
<i>Bacillus zhangzhouensis</i> HPJ40	+	11	15	-	++	-

Las cepas se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL por separado. Cada matraz contenía 50 mL de medio TSB (*Tryptone Soya Broth*), se incubaron durante 18-24h a 28°C en un agitador rotatorio. A continuación, los cultivos se centrifugaron durante 10 minutos en tubos Falcon de 50 mL a 7000 rpm. Se descartó el sobrenadante y los sedimentos bacterianos se resuspendieron con agua de grifo hasta obtener un volumen final de 600 mL. Cada maceta a inocular se regó con 25 mL de la suspensión. De esta forma se inocularon la mitad de las macetas con la suspensión de rizobacterias (24 macetas x 25 mL = 600 mL). Las 24 macetas restantes se regaron con 25 mL de agua corriente. Las inoculaciones se realizaron al principio del experimento y a los 15 días de la primera inoculación.

4.3 Preparación del extracto de acelga para los análisis bioquímicos

Tanto la preparación del extracto como los análisis bioquímicos se llevaron a cabo en el Servicio de Herbario del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS II, Campus Reina Mercedes) y en los laboratorios del Departamento de Biología Vegetal y Ecología (Facultad de Biología, Campus Reina Mercedes).

Las muestras se recolectaron 30 días después de la primera inoculación. Para el análisis de flavonoides, compuestos fenólicos, antocianinas y actividad antioxidante se recolectaron la totalidad de las hojas de 3 plantas de cada tratamiento (3 macetas x 4 tratamientos = 12 muestras en total). Estas se colectaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. Se liofilizaron durante 72h y se molieron, primero con un molinillo de café y luego con un *TissueLyser* (Qiagen, Hilden, Alemania) hasta polvo fino. El material triturado se guardó en tubos Falcon de 15 mL sellados con Parafilm, y estos en una bolsa “zip” con sílica gel, para proteger las muestras de la humedad.

Para la obtención del extracto vegetal se pesaron 10 mg de polvo de hoja, con una balanza de precisión, de cada una de las 12 muestras, se añadieron 10 mL de metanol y se agitó con vórtex. Las muestras se almacenaron en tubos Falcon de 15 mL a -20 °C durante 24h en oscuridad. Pasado ese tiempo, los extractos se centrifugaron a 4000 rpm y 4°C durante 15 minutos, y el sobrenadante se almacenó en tubos Falcon limpios a -20 °C hasta su utilización. Para el análisis de antocianinas, la extracción se realizó en metanol acidificado al 1% con HCl (37%).

Para el análisis de flavonoides, fenoles y capacidad antioxidante, las determinaciones se realizaron por duplicado (n=6, 2 réplicas x 3 plantas) y, para la cuantificación de antocianinas, las determinaciones se hicieron por triplicado (n=9, 3 replicaciones x 3 plantas).

4.4 Determinación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides se utilizó una técnica colorimétrica basada en la formación de complejos entre el cloruro de aluminio (AlCl_3) y los grupos hidroxilo de los flavonoides en etanol. La reacción hace que la solución adquiera una coloración amarilla, con un máximo de absorción a 415 nm. Los flavonoides son cuantificados mediante espectrofotometría en base a una recta patrón que utiliza como estándar la quercetina en un rango de 0,01 a 0,08 mg mL⁻¹ en metanol, por su analogía estructural con la forma básica de los flavonoides (**figura 3**). Mientras más intenso sea el tono amarillo, mayor cantidad de flavonoides hay en los extractos de hojas de acelga.

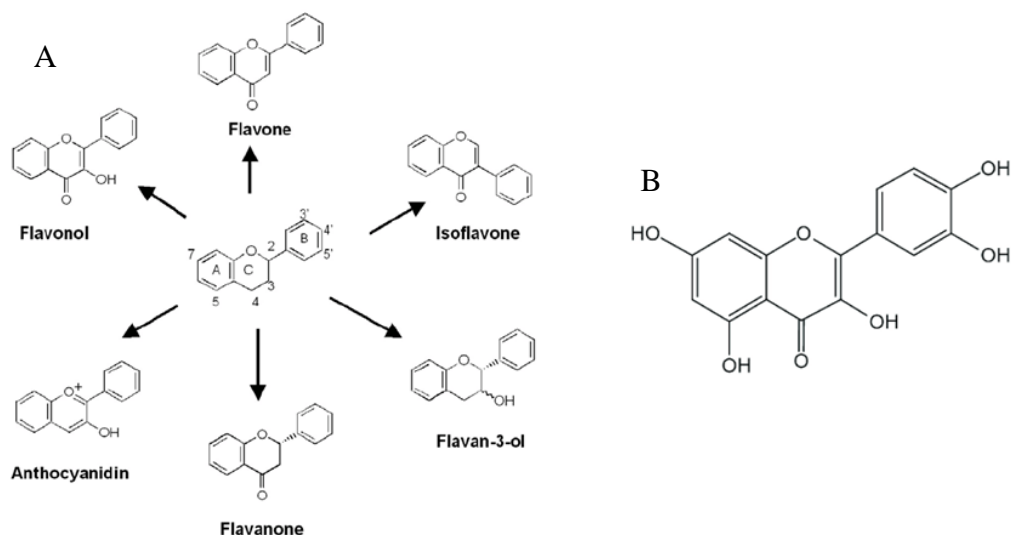


Figura 3. (A) Estructura básica de los flavonoides (Nishiumi *et al.*, 2011) y (B) de la quercetina (Zhang *et al.* 2020).

Además de la curva de calibración estándar de quercetina (**figura 4**), se preparó una solución etanólica de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2% (p/v) en etanol al 80%, y se añadió 1 mL a 1mL de los extractos y 1mL de los estándares. Las mezclas se mantuvieron 1h a temperatura ambiente en oscuridad y, a continuación, se midió la absorbancia a 420 nm y se comparó con la curva de calibración para quercetina. El contenido de flavonoides se expresó en miliequivalentes de quercetina por gramo de peso seco de hoja de acelga.



Figura 4. Curva de calibración estándar de quercetina para la determinación de flavonoides totales de hojas de acelga mediante el uso de cloruro de aluminio.

4.5 Determinación de compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos se cuantificaron utilizando el método de Folin y Ciocalteu (Folin y Ciocalteu, 1927), con algunas modificaciones. Se trata de una técnica colorimétrica

basada en una reacción a pH básico de los polifenoles del extracto vegetal con el reactivo de Folin-Ciocalteu, una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. El reactivo de color amarillo da lugar a una coloración azul cuando es reducido por los compuestos fenólicos. Esta coloración tiene un máximo de absorción 765 nm. La intensidad del color azul es proporcional al número de grupos hidroxilo de la molécula, pudiendo así cuantificar los fenoles totales a partir de los extractos de las plantas. Los polifenoles se cuantifican por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico, empleado por ser un polifenol de estructura química simple (**figura 5**).

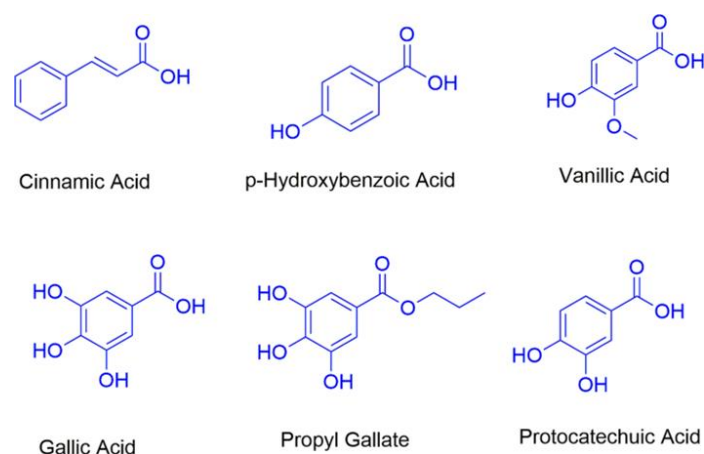


Figura 5. Estructura química de algunos polifenoles presentes en plantas (García-Pérez *et al.*, 2019).

Para seguir este método se realizó una curva de calibración estándar con ácido gálico en metanol (**figura 6**), que osciló entre 10 y 80 mg L⁻¹. A continuación, se diluyó reactivo fenol de Folin-Ciocalteu 10 veces en agua destilada, y se añadieron 2,5 mL a 500 µL de los estándares y a 500 µL de los extractos. Las mezclas se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y, posteriormente, de una disolución de Na₂CO₃ 7,5% (p/v en agua destilada) se añadieron 2,5 mL a las soluciones de la recta patrón y a los extractos. Se dejó incubar 1h a temperatura ambiente en oscuridad, se leyó la absorbancia a 750 nm y se extrapolaron los resultados de las muestras con ayuda de la recta patrón de ácido gálico. El contenido de polifenoles se expresó en miliequivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco de hoja de acelga.

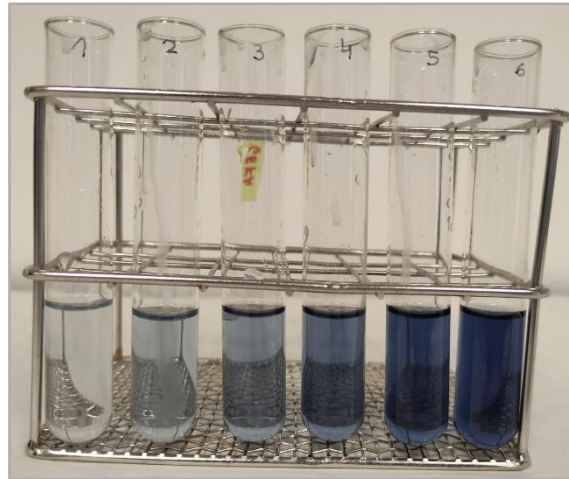


Figura 6. Curva de calibración estándar de ácido gálico para la determinación de compuestos fenólicos totales de hojas de acelga siguiendo el método de Folin-Ciocalteu.

4.6 Medida de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó mediante la capacidad de los extractos de reaccionar con el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y extinguir los radicales libres. El DPPH es un radical libre que, al unirse a una sustancia que le puede donar un átomo de hidrógeno, se reduce y provoca un cambio en la coloración de la solución, de morado a amarillo (**figura 7**). Con esta técnica se puede conocer el porcentaje de inhibición de los radicales libres.

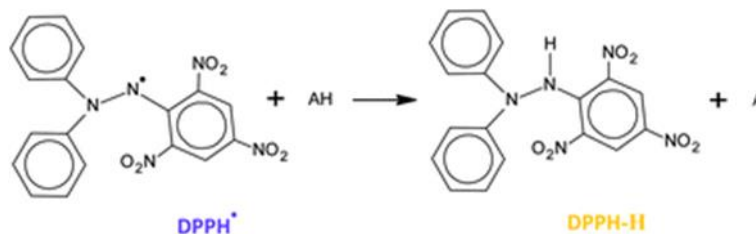


Figura 7. Estructura del DPPH y mecanismo de reducción por un antioxidante (AH) (Pyrzyska y Pękala, 2013).

Se preparó una solución de DPPH (0,05 mg/mL en metanol) y se añadió 1 mL de esta solución a los extractos y a 1 mL de metanol. Se incubó durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 515 nm. Por último, se calculó el porcentaje de inhibición siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{inhibición (\%)} = [(A_R - A_S) / A_R] \times 100$$

donde A_R representa la absorbancia de referencia (metanol + DPPH) y A_S la absorbancia de la muestra (extracto con metanol + DPPH).

4.7 Medida del contenido en antocianinas

Para la cuantificación de antocianinas (**figura 8**), los extractos en metanol acidificado se centrifugaron a 4000 rpm y 4 °C durante 15 minutos. Se leyó la absorbancia del sobrenadante a 530 nm y, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar de la antocianina mayoritaria presente, se calculó el contenido en antocianina total con la fórmula $Abs\ 530nm/98,2$, en microgramos de antocianinas por gramo de peso seco de hoja de acelga.

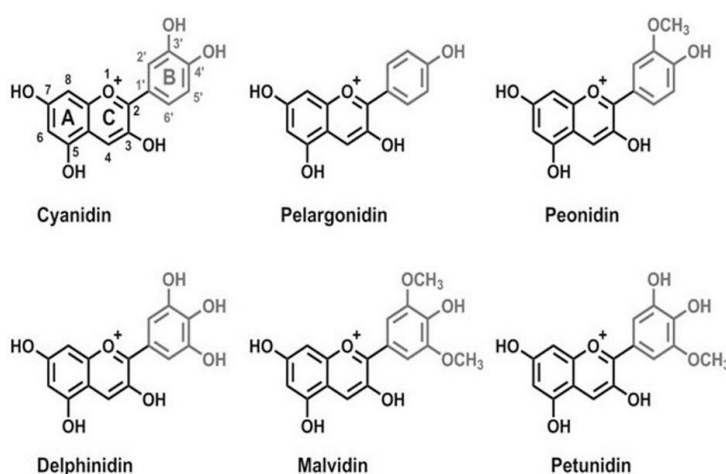


Figura 8. Estructura química de las principales antocianinas (Salehi *et al.*, 2020).

4.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el programa Excel 18.0 (Microsoft). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) con una significancia $p < 0,05$. Posteriormente, se elaboraron gráficas con los valores de la media de 6 repeticiones (9 en el caso de las antocianinas) \pm error estándar (ES).

5. RESULTADOS

La **figura 9** muestra el aspecto de las plantas crecidas, sometidas a los distintos tratamientos, después de 30 días de experimento.



Figura 9. Aspecto de las plantas una vez finalizados los 30 días de tratamientos. El tratamiento sin sal se indica con el 0 y el de salinidad con 85 (85 mmol L⁻¹ NaCl). La inoculación se indica con el + y el control con -.

5.1 Flavonoides

El análisis de varianza ($p < 0,05$) empleado mostró que existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados. Como se puede observar en la **figura 10**, la salinidad (85-) redujo la cantidad de flavonoides en acelga, pero el inóculo de bacterias (85+) la aumentó hasta casi igualar el valor del tratamiento sin sal. En ausencia de sal, el inóculo mostró el efecto contrario, disminuyendo la cantidad de flavonoides en acelga.

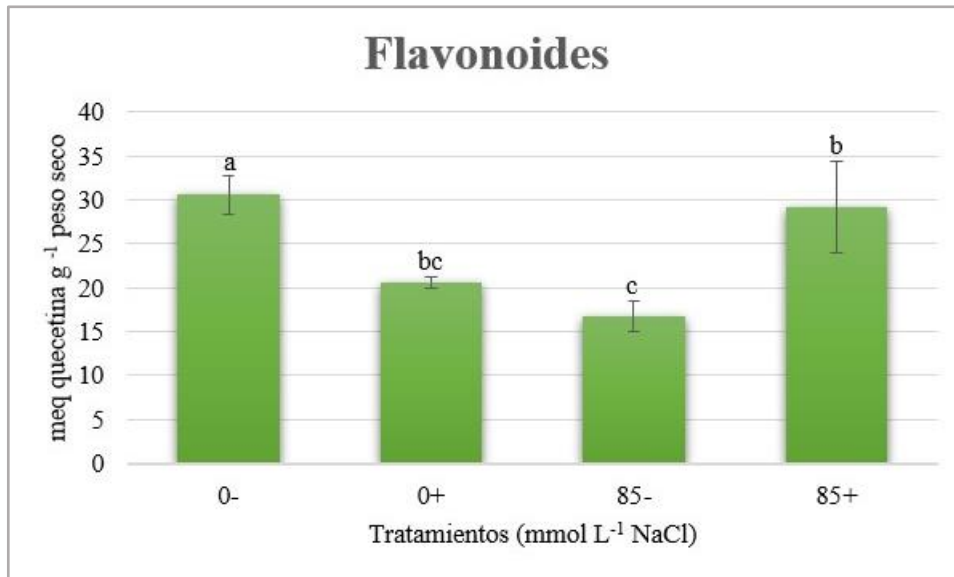


Figura 10. Concentración de flavonoides de acelga después de 30 días de tratamiento con 0 y 85 mmol L⁻¹ NaCl, sin inocular (-) e inoculados (+). Letras diferentes indican que las medias son significativamente diferentes entre sí (ANOVA, $p < 0,05$).

5.2 Polifenoles

En el caso de los polifenoles (**figura 11**), no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$), aunque las plantas inoculadas presentaron mayor cantidad de estos.

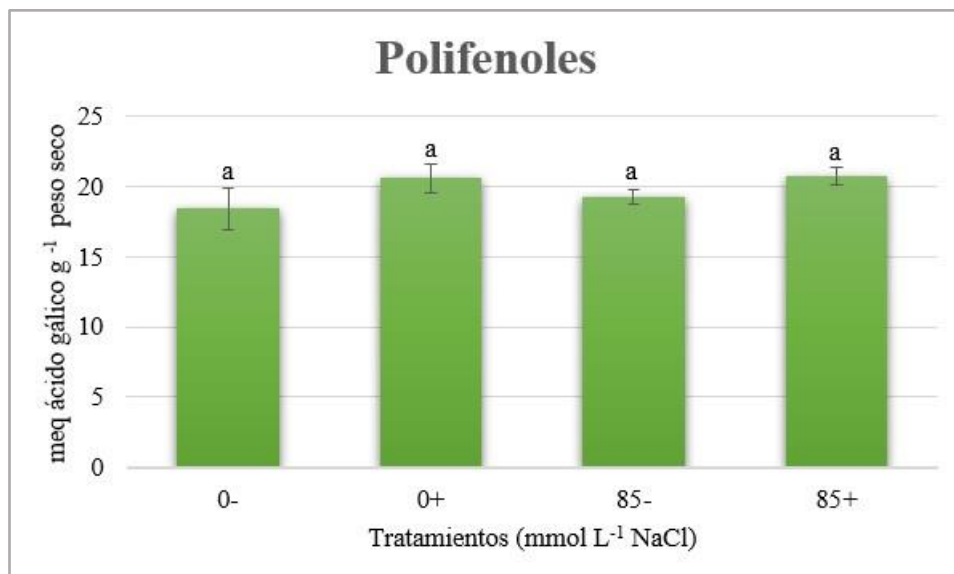


Figura 11. Concentración de polifenoles de acelga después de 30 días de tratamiento con 0 y 85 mmol L⁻¹ NaCl, sin inocular (-) e inoculados (+). Letras diferentes indican que las medias son significativamente diferentes entre sí (ANOVA, $p < 0,05$).

5.3 Antocianinas

En cuanto a la concentración de antocianinas, la prueba ANOVA ($p < 0,05$) señaló la existencia de diferencias entre los tratamientos. La **figura 12** muestra que la concentración de antocianinas se vio claramente disminuida por la salinidad. Sin embargo, tratamiento con inóculo de bacterias solo provocó un aumento de estas en ausencia de sal.

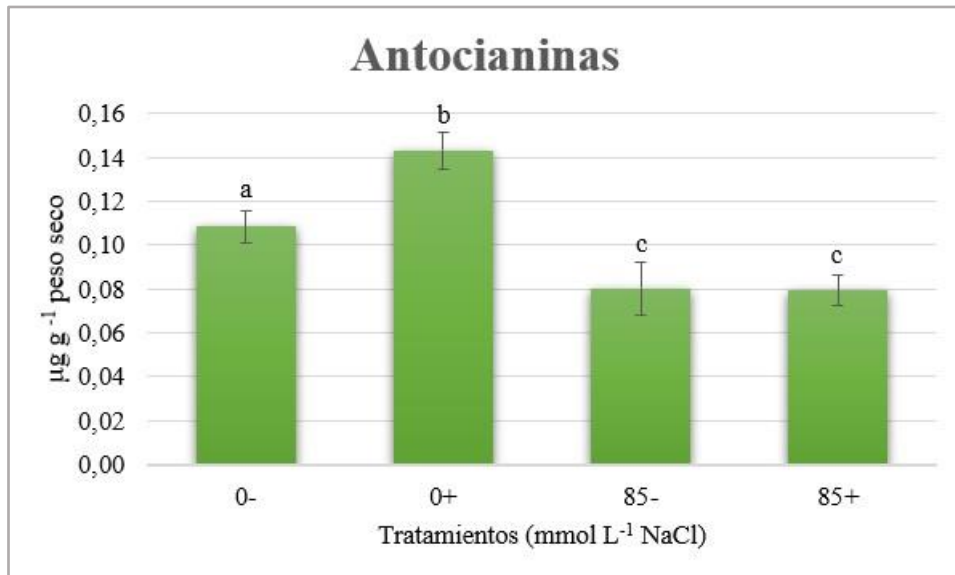


Figura 12. Concentración de antocianinas de acelga después de 30 días de tratamiento con 0 y 85 mmol L⁻¹ NaCl, sin inocular (-) e inoculados (+). Letras diferentes indican que las medias son significativamente diferentes entre sí (ANOVA, $p < 0,05$).

5.4 Actividad antioxidante

La prueba ANOVA de la capacidad antioxidante determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. La **figura 13** muestra que los inóculos disminuyeron esta actividad, independientemente de la concentración de sales.

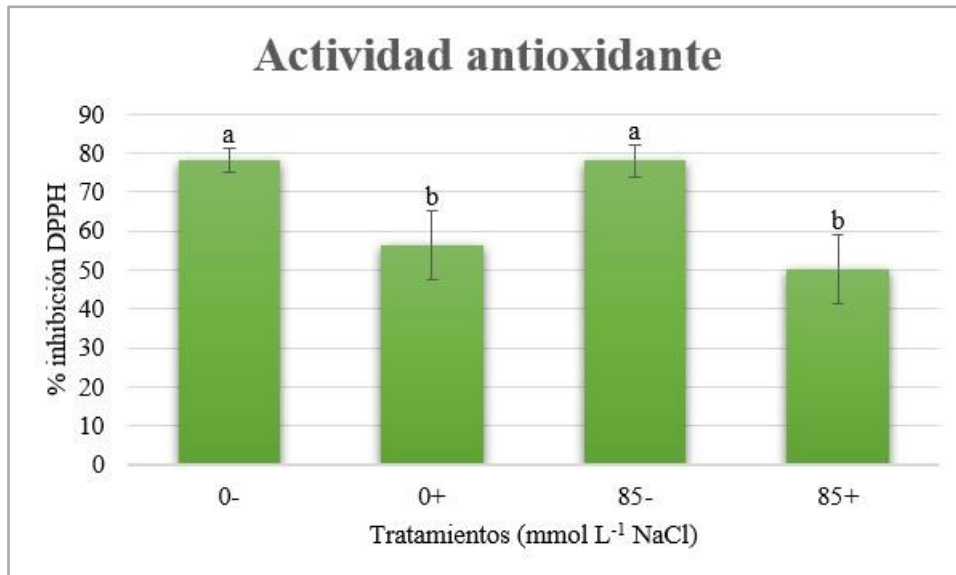


Figura 13. Capacidad antioxidante de acelga después de 30 días de tratamiento con 0 y 85 mmol L⁻¹ NaCl, sin inocular (-) e inoculados (+). Letras diferentes indican que las medias son significativamente diferentes entre sí (ANOVA, p<0,05).

6. DISCUSIÓN

La acelga es una hortaliza con un alto valor nutricional, rica en vitaminas A, K y C; minerales, como el calcio, magnesio, hierro y fósforo; fibra, proteínas y es una fuente importante de antioxidantes naturales. Además, su bajo precio en el mercado y su facilidad para cultivarla, junto con lo mencionado anteriormente hacen que sea un cultivo muy extendido (Miceli y Miceli, 2014).

Al igual que muchos otros, su producción podría verse afectada como consecuencia de la salinización del suelo, causada por los efectos de cambio climático y la actividad antropogénica. Es por ello por lo que se están buscando medidas que mitiguen los efectos negativos del aumento de la salinidad del suelo, para así mantener los niveles de producción e incluso incrementarlos, de manera que se pueda abastecer a la población mundial.

Una de las estrategias potenciales conocidas para disminuir el estrés salino en plantas es la biofertilización con inóculos de bacterias. En este trabajo se ha estudiado por primera vez el efecto de la biofertilización con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en acelga. Las bacterias PGPR empleadas fueron aisladas de ecosistemas de marismas, por lo que son tolerantes a la sal. Además, estas bacterias promueven el crecimiento vegetal mediante la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la producción de sideróforos, ácido indol acético (IAA), ACC desaminasa y biopelículas.

Para ello, se ha diseñado un experimento en el que se ha sometido a plantas de acelga a distintos tratamientos de salinidad e inoculación y se ha medido la cantidad de algunos metabolitos secundarios con valor nutricional (flavonoides, polifenoles y antocianinas) y la actividad antioxidante en hojas, que es la parte que se consume. Al ser la primera vez que se miden estos parámetros bioquímicos en acelga, la metodología tuvo que ser reajustada y optimizada a partir de la empleada en trabajos realizados en otras especies vegetales (cantidad de material vegetal de partida, disolventes y tiempo de extracción para la preparación de extractos, concentración de las disoluciones necesarias, tiempos de incubación, etc.). De esta forma, conseguimos los protocolos adecuados para acelga, los cuales se describen en el apartado de metodología de esta memoria.

Los fenoles son metabolitos secundarios que no tienen un papel fundamental en el mantenimiento de los procesos vitales de la planta, pero son importantes en la interacción de esta con su entorno, en su adaptación al medio y para defenderse de las infecciones producidas

por microorganismo, por lo que confieren una clara ventaja de supervivencia (López, 2017). Además, presentan actividad antioxidante, ya que eliminan los radicales libres altamente oxidativos (Corradini *et al.*, 2011). Según los resultados obtenidos, pudimos determinar que la inoculación con bacterias PGPR aumentó la concentración de los polifenoles totales en plantas sometidas a un aumento de la salinidad, lo que en la planta supone una mejora de las funciones en las que estos compuestos intervienen en situación de estrés salino.

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios de los vegetales, pertenecientes al grupo de los fenoles, formado por más de 10.000 compuestos diferentes. Entre sus funciones en plantas se encuentra la regulación del transporte de auxinas, la modulación de las especies reactivas de oxígeno, la protección contra la luz UV, la coloración de las flores y participan en las comunicaciones biológicas en la rizosfera (Sugiyama y Yakazi, 2014). Las pruebas bioquímicas muestran un aumento en la concentración de flavonoides en plantas sometidas a tratamiento salino e inoculación bacteriana. Esto se traduce en que las acelgas ven potenciadas las funciones de estos compuestos para luchar contra el estrés provocado por la salinidad.

Las antocianinas son flavonoides pigmentados, almacenados en las vacuolas de las células, responsables de dar color a flores y frutos principalmente, aunque también se encuentran en tallos, hojas y raíces. Entre sus funciones en las plantas se encuentran la atracción de los polinizadores y la protección contra la luz UV y contra las infecciones microbianas (Garzón, 2008). Los resultados del experimento determinan que la concentración de antocianinas en acelga sometida a estrés por salinidad e inoculadas disminuyó, aunque se vio aumentada en plantas de acelga crecidas en ausencia de sal e inoculadas. En este caso, la inoculación bacteriana no amortiguó el efecto negativo sobre la producción de antocianinas que provoca la presencia de sal.

Por último, en relación con la actividad antioxidante, representada mediante el porcentaje de inhibición de DPPH, se observa que el inóculo de bacterias no tuvo un efecto positivo sobre ella y no la aumentó. Sin embargo, en plantas sin inocular sí se observa una actividad antioxidante destacable, independientemente de que se les haya aplicado en tratamiento salino o no. Contrariamente, en otros estudios realizados en trigo y tomate para conocer la potencialidad de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en estrés salino, se vio que las PGPR potencian la actividad de las enzimas antioxidantes y disminuyen la producción de especies reactivas de oxígeno (Khan *et al.*, 2019).

Cabe mencionar que el método colorimétrico empleado para llevar a cabo las determinaciones descritas tiene una finalidad meramente comparativa, no se trata de un método de determinación cuantitativa precisa. Para conocer la cantidad exacta de metabolitos presente en las plantas de acelga con cada uno de los tratamientos habría que emplear otras técnicas que determinen la concentración de forma más exacta, como técnicas de cromatografía.

Paralelamente a las mediciones de estos metabolitos secundarios realizadas para este Trabajo de Fin de Grado, se han medido otros parámetros como parte de un estudio más extenso que ha sido publicado recientemente (Redondo-Gómez *et al.*, 2022). En este estudio se determinó que, de manera general, el consorcio de PGPR de halófitas empleado tuvo, además, un efecto positivo sobre el crecimiento de acelga bajo estrés salino, ya que mejoraron la adquisición de nutrientes, las concentraciones de clorofilas y carotenoides, la capacidad fotosintética y redujeron la toxicidad iónica. La mejora de estos procesos resulta en la mejora indirecta de la capacidad antioxidante, lo cual podría explicar por qué la inoculación bacteriana no mostró un aumento de efecto antioxidante en base al porcentaje de inhibición de DPPH.

7. CONCLUSIÓN

Conociendo estos datos, podemos determinar que la inoculación bacteriana con el consorcio propuesto provocó un aumento de la concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides, y una disminución de la concentración de antocianinas y actividad antioxidante en hojas de acelga en medio salino.

A nivel bioquímico, la biofertilización con las rizobacterias seleccionadas no mejoró la capacidad antioxidante en acelga sometida a estrés salino. No obstante, el aumento en la concentración de polifenoles y flavonoides sugiere que las bacterias potencian otras funciones realizadas por estos metabolitos secundarios, como la reducción de parte de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno generadas como consecuencia del estrés salino y mejorar la protección frente a infecciones microbianas y frente a la luz UV.

Si buscamos información sobre otros trabajos realizados sobre la biofertilización llegamos a la conclusión de que esta es una buena estrategia para aumentar el crecimiento y la producción de los cultivos. Esto se ha convertido en una necesidad en un planeta cada vez más poblado y que sufre las consecuencias de degradación de suelos debido a las actividades humanas y al cambio climático.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Laganà, A. (2011). Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research*, 25(5), 469–495. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.482054>
- Ecosostenible. “Beta vulgaris” [en línea]. Enero 2019. *Un mondo ecosostenibile dentro i codici della Natura*. Recuperado de <https://antropocene.it/es/2019/01/19/beta-vulgaris/>
- Flowers, T., & Flowers, S. (2005). Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? *Agricultural Water Management*, 78(1–2), 15–24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2005.04.015>
- Folín, O., & Ciocalteu, V. (1927). Sobre determinaciones de tirosina y triptófano en proteínas. *The Journal of Biological Chemistry*, 73, 627–650.
- García-Pérez, P., Losada-Barreiro, S., Gallego, P.P., & Bravo-Díaz, C. (2019). Adsorption of gallic acid, propyl gallate and polyphenols from Bryophyllum extracts on activated carbon. *Scientific Reports*, 9, 14830. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51322-6>
- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 27-36.
- Guida-Johnson, B., Abraham, E. M., & Cony, M. A. (2017). Soil salinization in irrigated drylands: prospects for restoration in Cuyo. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 49, 205-215.
- Hassani, A., Azapagic, A., & Shokri, N. (2021). Global predictions of primary soil salinization underchanging climate in the 21st century. *Nature Communications*, 12:6663. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26907-3>
- Iribarren, I., P. F.C. A. A. C. (2005). *Protección del suelo y el desarrollo sostenible*. Instituto Geológico y Minero de España.
- Khan, F., Ahmed, K. B. M., Shariq, M., & Siddiqui, M. A. (2019). Potentiality of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Easing of Soil Salinity and Environmental Sustainability. *Salt Stress, Microbes, and Plant Interactions: Causes and Solution*, 21–58. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-8801-9_2
- Pyrzyska, K., & Pękala, A. (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical. Methods*, 5, 4288-4295. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3AY40367J>
- Li, Q., Xi, M., Wang, Q., Kong, F., & Li, Y. (2018). Characterization of soil salinization in typical estuarine area of the Jiaozhou Bay, China. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 103, 51–61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pce.2017.06.010>
- López, A. J., & Hernández, D. (2016). Cambio climático y agricultura: una revisión de la literatura con énfasis en América Latina. *El Trimestre Económico*, 83(332), 459. DOI: <https://doi.org/10.20430/ete.v83i332.231>

- López Mendoza, S. (2017). *El frijol como fuente de compuestos fenólicos con actividad biológica y antioxidante y su variación por la inoculación con *Arthrobacter agilis* UMCV2* [Tesis de maestría, Instituto de Investigaciones Quimicobiológicas].
- Machado, R., & Serralheiro, R. (2017). Soil Salinity: Effect on Vegetable Crop Growth. Management Practices to Prevent and Mitigate Soil Salinization. *Horticulturae*, 3(2), 30. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae3020030>
- Martínez-Villavicencio, N., López-Alonzo, C. V., Pérez-Leal, R., & Basurto-Sotelo, M. (2011). Effects of salinity on vegetative growth. *TECNOCENCIA Chihuahua*, 5(3), 156-161.
- Mesa-Marín, J., Pérez-Romero, J. A., Mateos-Naranjo, E., Bernabeu-Meana, M., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I. D., & Redondo-Gómez, S. (2019). Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on *Salicornia ramosissima* Seed Germination under Salinity, CO₂ and Temperature Stress. *Agronomy*, 9(10), 655. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy9100655>
- Miceli, A., & Miceli, C. (2014). Effect of Nitrogen Fertilization on the Quality of Swiss Chard at Harvest and during Storage as Minimally Processed Produce. *Journal of Food Quality*, 37(2), 125–134. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfq.12073>
- Nishiumi, S., Miyamoto, S., Kawabata, K., Ohnishi, K., Mukai, R., Murakami, A., Ashida, H., & Terao, J. (2011). Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Frontiers in bioscience*, 3, 1332-62
- Ocampo, O. (2011) Climate Change and its Impact on the Agriculture. *Revista de Ingeniería*, 115-123.
- Okur, B., & Örcen, N. (2020). Soil salinization and climate change. *Climate Change and Soil Interactions*, 331–350. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818032-7.00012-6>
- Redondo-Gómez, S., Mesa-Marín, J., Pérez-Romero, J. A., López-Jurado, J., García-López, J. V., Mariscal, V., Molina-Heredia, F. P., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I. D., Flowers, T. J., & Mateos-Naranjo, E. (2021). Consortia of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated from Halophytes Improve Response of Eight Crops to Soil Salinization and Climate Change Conditions. *Agronomy*, 11(8), 1609. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy11081609>
- Redondo-Gómez, S., Romano-Rodríguez, E., Mesa-Marín, J., Sola-Elías, C., & Mateos-Naranjo, E. (2022). Consortia of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated from Halophytes Improve the Response of Swiss Chard to Soil Salinization. *Agronomy*, 12(2), 468. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy12020468>
- Renaut, J., Bohler S., Hausman J. F., Hoffmann L., Sergeant K., Ahsan N., Jolivet Y., & Dizengremel, P. (2008) The impact of atmospheric composition on plants: A case study of ozone and poplar. *Mass Spectrometry Reviews*, 28, 495-516. DOI: <https://doi.org/10.1002/mas.20202>
- Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Cappellini, F., Reiner, Ž., Zorzan, D., Imran, M., Sener, B., Kilic, M., El-Shazly, M., Fahmy, N.M., Al-Sayed, E., Martorell, M., Tonelli, C., Petroni, K., Docea, A.O., Calina, D., & Maroyi, A. (2020). The Therapeutic Potential of

- Anthocyanins: Current Approaches Based on Their Molecular Mechanism of Action. *Frontiers in Pharmacology*. 11:1300. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01300>
- Soil Science Society of America. *Glossary of Soil Science Terms*. Consultada en abril 2022. <https://www.soils.org/publications/soils-glossary>
- Stavi, I., Thevs, N., & Priori, S. (2021). Soil Salinity and Sodicity in Drylands: A Review of Causes, Effects, Monitoring, and Restoration Measures. *Frontiers in Environmental Science*, 9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.712831>
- Sugiyama, A., & Yazaki, K. (2014). Flavonoids in plant rhizospheres: secretion, fate and their effects on biological communication. *Plant Biotechnology*, 31(5), 431–443. DOI: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.0917a>
- Zafar-Ul-Hye, M., Mahmood, F., Danish, S., Hussain, S., Gul, M., Yaseen, R., & Shaaban, M. (2020). Evaluating efficacy of plant growth promoting rhizobacteria and potassium fertilizer on spinach growth under salt stress. *Pakistan Journal of Botany*, 52(4). DOI: [https://doi.org/10.30848/pjb2020-4\(7\)](https://doi.org/10.30848/pjb2020-4(7))
- Zhang, Y., Zhang, Z., & Wang, R. (2020). Protective Mechanisms of Quercetin Against Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. *Frontiers in Physiology*, 11. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00956>