

# ABORDAJES FISIOLÓGICOS PARA EL ESTUDIO DEL ESTRÉS ABIÓTICO EN CULTIVOS

Mariela Inés Monteoliva y  
Marianela Soledad Rodríguez  
(Comps. y eds.)



---

Abordajes fisiológicos para el estudio del estrés abiótico en cultivos / Mariela Ines Monteoliva ... [et al.]. - 1a ed. - Córdoba : EDUCC - Editorial de la Universidad Católica de Córdoba, 2025.  
Libro digital, PDF/A

Archivo Digital: descarga y online  
ISBN 978-987-626-639-0

1. Fisiología Vegetal. 2. Plantas. 3. Técnicas de Laboratorio.  
I. Monteoliva, Mariela Ines  
CDD 580

Copyright © 2025 by Editorial de la Universidad Católica de Córdoba.

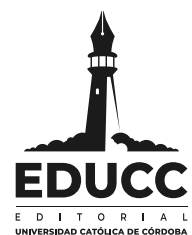
Maquetación interior y arte de tapa: Gabriela Callado.



La presente obra se publica bajo los términos y condiciones de la licencia. Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar.  
© EDUCC - Editorial de la Universidad Católica de Córdoba.

# ABORDAJES FISIOLÓGICOS PARA EL ESTUDIO DEL ESTRÉS ABIÓTICO EN CULTIVOS

Mariela Inés Monteoliva y  
Marianela Soledad Rodriguez  
(Comps. y eds.)



# ÍNDICE

<b>Agradecimientos</b> .....	4
<b>Contribuciones</b> .....	5
<b>Presentación</b> .....	6
<b>1. Estado hídrico</b> .....	7
1.1. Contenido relativo de agua (CRA) .....	7
<b>2. Especies activas del oxígeno (EAO)</b> .....	10
2.1. Peróxido de hidrogeno con 3,3´-diaminobenzidina (DAB) .....	12
2.2. Anión superóxido con azul de tetrazolio (NBT) .....	13
2.3. EAO con diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) .....	14
<b>3. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos</b> .....	18
3.1. Capacidad antioxidante no enzimática .....	18
3.1.1. FRAP (Ferric reducing ability of plasma) .....	19
3.1.2. Glutación total y reducido .....	20
3.1.3. Ascorbato total y reducido .....	22
3.2. Enzimas antioxidantes .....	25
3.2.1. Actividad ascorbato peroxidasa (APX) .....	25
3.2.2. Actividad catalasa (CAT) .....	29
3.2.3. Actividad glutación reductasa (GR) .....	31
3.2.4. Actividad guaiacol peroxidasa (POX) .....	32
3.2.5. Actividad superóxido dismutasa (SOD) .....	34
3.2.6. Proteínas totales .....	39
<b>4. Integridad de membranas</b> .....	44
4.1. Peroxidación de lípidos de membranas .....	44
4.2. Permeabilidad de membranas .....	46
<b>5. Deposición de calosa</b> .....	49
<b>6. Ajuste osmótico</b> .....	53
6.1. Prolina .....	53

6.2. Azúcares solubles totales por antrona .....	56
6.3. Oligosacáridos solubles por HPLC.....	58
6.4. Iones solubles por HPLC.....	60
<b>7. Pigmentos fotosintéticos .....</b>	<b>64</b>
7.1. Clorofilas y carotenoides por espectrofotometría.....	65
7.2. Verdor con medidores portátiles.....	68
<b>8. Fluorescencia de clorofilas .....</b>	<b>72</b>
8.1. Fluorescencia directa, rápida o transitoria.....	72
8.2. Fluorescencia por modulación de amplitud de pulsos (PAM) .....	74
<b>9. ANEXO I .....</b>	<b>79</b>
9.1. Buffer acetato de sodio 0,25 M pH 3,6 .....	79
9.2. Buffer fosfato de potasio 0,1 M.....	79
9.3. Buffer fosfato de sodio 0,1 M .....	80
9.4. Buffer HEPES-KOH 1 M pH 8,3.....	81
9.5. Buffer Tris-acetato 50 mM pH 5,0 .....	81
9.6. Buffer Tris-HCl 2 M pH 8,0 .....	81
9.7. EDTA 500 mM pH 8,0 .....	82
9.8. EGTA 500 mM pH 8,0 .....	82
<b>10. ANEXO II .....</b>	<b>83</b>
10.1. Titulación peróxido de hidrógeno .....	83
<b>11. ANEXO III .....</b>	<b>84</b>
11.1. Geles no desnaturizantes.....	84

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad Católica de Córdoba (UCC).

# CONTRIBUCIONES

## **Compilación y edición:**

Mariela Inés Monteoliva y María Soledad Rodríguez

## **Redacción de capítulos**

Estado hídrico: María de los Ángeles Espinosa Herlein (espinosa.maria@inta.gob.ar) y Mariela Inés Monteoliva (monteoliva.mariela@inta.gob.ar)\*

Especies activas del oxígeno: Rodrigo Parola (parola.rodrigo@inta.gob.ar), Leandro Ismael Ortega (ortega.leandro@inta.gob.ar), Mariela Inés Monteoliva

Antioxidantes no enzimáticos: Dolores Ángela Bustos (bustos.dolores@inta.gob.ar) y Marianela Soledad Rodríguez (rodriguez.marianela@inta.gob.ar)\*

Antioxidantes enzimáticos: Mariela Inés Monteoliva, Leandro Ismael Ortega y Rodrigo Parola\*

Integridad de membranas: Gabriela Pittaro (pittaro.gabriela@inta.gob.ar), María Inés Monteoliva, Dolores Ángela Bustos\*, María Carla Guzzo (guzzo.carla@inta.gob.ar)\*

Deposición de calosa: Leandro Ismael Ortega\*

Ajuste osmótico: Paula Catalina Maritano (maritano.paula@inta.gob.ar), María Carla Guzzo, Leandro Ismael Ortega, Dolores Ángela Bustos, Marianela Soledad Rodríguez\*

Pigmentos fotosintéticos: Mariela Inés Monteoliva\*

Fluorescencia de clorofilas: Giuliano Barbieri (barbieri.giuliano@inta.gob.ar), Oriana Micaela Bustamante (bustamante.orian@inta.gob.ar), Fernando Darío Luna (luna.fernado@inta.gob.ar)\*

\* Responsable del capítulo

## **Revisión técnica de protocolos:**

P. Suarez, D. Gomez y G. A. Posada

## PRESENTACIÓN

Somos un equipo de científicos y técnicos dedicados al estudio de las respuestas fisiológicas de las plantas a diversos tipos de estrés biótico y abiótico. En este libro, nos propusimos sistematizar y difundir las técnicas y métodos que utilizamos frecuentemente en nuestras líneas de investigación, con el propósito de que sean accesibles para estudiantes de postgrado e investigadores de toda Iberoamérica.

En este libro se detallan los fundamentos y limitaciones de las metodologías, así como recomendaciones para tener en cuenta y las variantes técnicas disponibles. El propósito no fue hacer una recopilación exhaustiva de los métodos disponibles o de vanguardia, sino de aquellos métodos que pueden implementarse en la mayor parte de los laboratorios, con reactivos y equipamientos básicos.

Los protocolos están agrupados por grandes temáticas abordando diversos aspectos de los procesos fisiológicos: estado hídrico, estado redox, ajuste osmótico y fotosíntesis.

Esperamos poder ayudarles cuando surjan inconvenientes o dudas, y también pueden contactarnos por sugerencias y comentarios sobre el libro.

# 1. ESTADO HÍDRICO

*María de los Ángeles Espinosa Herlein y María Inés Monteoliva\**

El agua es esencial para los seres vivos y las plantas no son la excepción. En las plantas, el agua provee un medio para las reacciones químicas, pero también sostén y transporte para solutos.

El volumen de agua que fluye a través de una planta depende de la disponibilidad de agua del suelo, de las características estructurales y funcionales de los tejidos vegetales y de las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, viento). El balance entre el agua que absorbe y que transpira, determinará el estado hídrico de la planta en esas condiciones. Un exceso de transpiración con respecto a la absorción resultará en un balance hídrico negativo, generándose una situación de déficit.

Las consecuencias fisiológicas de ese déficit pueden variar dependiendo de la intensidad y duración del estrés. Pero en líneas generales, el déficit hídrico inhibe el crecimiento y la acumulación de materia seca, pudiendo derivar en una reducción del rendimiento, en el caso de los cultivos.

El estado hídrico de una planta puede ser estudiado y caracterizado mediante diversos métodos e instrumentos. Por ejemplo, el potencial hídrico (o nivel energético del agua, que determina la capacidad de la planta de incorporar y retener el agua en sus tejidos) puede evaluarse utilizando la bomba de presión (o de Scholander), el psicrómetro y los métodos de Chardakov. Mientras, el contenido hídrico puede evaluarse mediante la relación peso fresco / peso seco y el contenido relativo de agua. Este último método es el que se describe en profundidad, a continuación.

## 1.1. CONTENIDO RELATIVO DE AGUA (CRA)

### Fundamento

El contenido relativo de agua (CRA) indica la cantidad porcentual de agua que contiene un tejido respecto del máximo que podría contener en condiciones de turgencia plena.

El CRA es un indicador robusto, confiable y simple del balance hídrico de la planta a las condiciones ambientales (Barr y Weatherley, 1962; Sade y col., 2009; 2012). Al tratarse de un método relativo, permite comparar la respuesta al estrés entre diferentes genotipos vegetales y puede evidenciar posibles respuestas de ajuste osmótico. Sin embargo, este parámetro no provee información sobre las causas que modulan ese balance: un CRA alto en condiciones de estrés puede deberse al cierre estomático, cambios en la densidad estomática y/o el ajuste osmótico.

Para entender las causas subyacentes a variaciones del CRA, puede ser necesario complementarla con la medición de la tasa de transpiración, el potencial hídrico del suelo y del tejido, entre otras.

## Consideraciones y limitantes

Entre los puntos críticos que deben tenerse en cuenta al momento de realizar esta técnica es importante:

- i) Utilizar un  $n \geq 6$  hojas por tratamiento para asegurar un resultado robusto, sobre todo en genotipos con variabilidad media a alta, como suele ocurrir en cultivos autógamos. En plantas silvestres, perennes, cultivos alogamos, etc., podría ser recomendable incrementar aún más este número.
- ii) Pesar el tejido inmediatamente luego de recolectado de la planta, para minimizar la pérdida de agua por transpiración (que subestimaría el valor real).
- iii) Ajustar el tiempo óptimo de saturación, asegurándose de que el peso no aumente si se extiende el tiempo de la incubación en la cámara húmeda. Esto es particularmente relevante para tejidos muy deshidratados que pueden requerir tiempos mayores que plantas con provisión hídrica óptima.
- iv) Para la saturación, incubar el tejido en oscuridad o cerca del punto de compensación de la luz para la especie en estudio (aprox.  $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ). De esta forma se busca que el tejido no pierda peso por respiración, ni gane por fotosíntesis.
- v) Como cámara húmeda se puede utilizar un recipiente hermético con papel absorbente saturado de agua destilada, y se colocan las hojas sobre el papel. También pueden colocarse las hojas de forma vertical en bolsas selladas, con el peciolo o la zona de corte sumergida en agua, o directamente flotando en agua en placas de Petri.

La medición del CRA puede realizarse en plantas u hojas completas, discos o segmentos de hojas, preferiblemente sin grandes nervaduras que aumenten la heterogeneidad entre muestras. Si fuera imposible evitar la nervadura central, homogeneizar la ubicación de la nervadura entre las diferentes muestras.

## Protocolo

1. Pesar muestras (Peso Fresco, PF).
2. Colocar las muestras en cámara húmeda en oscuridad 18 h a  $4^\circ\text{C}$ .
3. Pesar nuevamente el tejido previamente escurrido (Peso Saturado, PSAT). IMPORATNTE: Secar con papel absorbente toda el agua adherida a las superficies externas del tejido, sin presionar demasiado (sin romper los tejidos).
4. Incubar en estufa  $60\text{-}70^\circ\text{C}$  hasta que el peso sea constante 2-3 días (Peso Seco, PS).

## Cálculo:

$$CRA = 100 \times \frac{PF - PS}{PSAT - PS}$$

## Referencias

Barr, H.D.; Weatherley, P.E. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Aust. J Biol Sci* 15:413-428.

\*\*\* Guzzo, M. C.; Costamagna, C.; Salloum, M. S.; Rotundo, J. L.; Monteoliva, M. I.; Luna, C. M. 2020. Morpho-physiological traits associated with drought responses in soybean (*Glycine max* L.). *Crop Science*. doi: 10.1002/csc2.20314 <http://hdl.handle.net/20.500.12123/7945>

En este trabajo, se utilizó el CRA como marcador de selección para tolerancia a estrés por sequía en el cultivo de soja, en conjunto con la medición de prolina y clorofilas. Además, se estudió la respuesta antioxidante (enzimática y no enzimática) asociada con la tolerancia a sequía.

\*\*\* Paredes, J. A.; Guzzo, M. C.; Monguillot, J. H.; Asinari, F.; Posada, G. A.; Oddino, C. M.; Giordano, D. F.; Morichetti, S. A.; Torres, A. M.; Rago, A. M.; Monteoliva, M. I. 2024. Low water availability increases susceptibility to peanut smut (*Thecaphora frezii*) in peanut crop. *Plant Pathol*. doi: 10.1111/ppa.13810 <http://hdl.handle.net/20.500.12123/15670>

En este trabajo se evaluó el efecto de la sequía en la incidencia del carbón del maní, y se utilizó el CRA como herramienta de monitoreo de la intensidad de la sequía sufrida por la planta.

Sade, N.; Gebremedhin, A.; Moshelion, M. 2012. Risk-taking plants: anisohydric behavior as a stress-resistance trait. *Plant Signal Behav* 7: 767-770.

Sade, N.; Vinocur, B. J.; Diber, A.; Shatil, A.; Ronen, G.; Nissan, H.; Wallach, R.; Karchi, H.; Moshelion, M. 2009. Improving plant stress tolerance and yield production: is the tonoplast aquaporin SITIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? *New Phytol* 181: 651-661.

## 2. ESPECIES ACTIVAS DEL OXÍGENO (EAO)

Rodrigo Parola, Leandro Ismael Ortega\*, María Inés Monteoliva\*

El estado redox celular es producto de la suma e interacción de moléculas con capacidad de oxidación-reducción en sus estados oxidado y reducido. En los organismos vivos, la homeostasis redox es fundamental para el sustento de la vida, en particular, en procesos de señalización para prácticamente todas las funciones vitales.

Las especies activas del oxígeno (EAO) son moléculas altamente reactivas derivadas de la reducción del O<sub>2</sub> molecular. Usualmente, las EAO se encuentran a concentraciones muy bajas en las células (en el rango de pico- a nanomolar), y tienen vidas medias extremadamente cortas (nanosegundos a segundos). Estas cualidades hacen que su detección y cuantificación en sistemas biológicos sean sumamente desafiantes (Anjun y col., 2020).

Frecuentemente, las variaciones ambientales, así como enfermedades y el ataque de plagas, pueden generar condiciones de estrés en las plantas, provocando un desbalance temporal en ese equilibrio redox que genera “estrés oxidativo”. El estrés oxidativo se define como un desbalance entre la generación de EAO y especies activas del nitrógeno, y la capacidad antioxidante de los tejidos. La acumulación excesiva de EAO (cuando se sobrepasa la capacidad antioxidante) genera oxidación y daño de componentes celulares, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

En este capítulo nos enfocamos en la detección de las EAO. Existe un gran número de compuestos que reaccionan con las EAO y producen compuestos coloreados insolubles o fluorescentes que pueden ser medidos o visualizados por espectrofotómetros, fluorómetros, microscopía de epifluorescencia, confocal y electrónica.

En general, los métodos fluorescentes son más sensibles y específicos y permiten mediciones *in vivo*, pero son también costosos. Además, la presencia de compuestos fluorescentes propios de los tejidos vegetales (como clorofilas y compuestos fenólicos) pueden interferir en la detección de las sondas. En la Tabla 1, se enumeran algunos de los compuestos fluorescentes más utilizados según el tipo de EAO que detectan.

**Tabla 1.** Sondas fluorescentes para la detección de compuestos por microscopía de epifluorescencia y confocal.

EAO	Sonda	Especificidad	Referencia
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	<b>SOSG</b> (Singlet Oxygen Sensor Green)	Alta, no reacciona con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> or O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Alta fotosensibilidad.	Hideg 2008
	<b>DanePy</b> (dansil-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol)	Se “apaga” al reaccionar con <sup>1</sup> O <sub>2</sub> Reacción menor con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , ·OH y radicales lipídicos.	Kálai y col., 1998
	<b>DPAX</b> (9-[2-(3-carboxi-9,10-dimetil) antril]-6-hidroxi-3H-xanten-3-ona)	No reacciona con NO, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> o O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Mattila y col., 2015

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<b>DHR</b> (Dihidrorodamina 123)	Se oxida en presencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> catalizado por Fe (reacción de Fenton). Puede ser oxidado también por radical carbonato, ácido hipocloroso y peroxinitrito y otros radicales de nitrógeno.	Wardman 2007
	<b>DCF-DA</b> (Diclorofluoresceína-diacetato)	En ensayos <i>in vitro</i> en espectrofluorómetro, con peroxidasa exógena y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el rango micro a milimolar, muestra ser bastante específica. No así en cultivo líquido o tejidos <i>in vivo</i> , en donde no muestra especificidad para una EAO particular. También presenta riesgo de peroxidación. La variante cloro-metilada presenta más retención intracelular una vez oxidada, incrementando la ventana de análisis.	Rastogi y col., 2010
	<b>Amplex Red y Amplex red Ultra</b> (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina)	Muy específico, límite de detección de 50 nM. Son específicos para citosol y apoplasto, respectivamente. Detección mediada por peroxidasa.	Ashtamker y col., 2007
	Sensores <b>Peroxy</b> (peroxygreen, peroxyyellow, peroxyrimson)	Derivado de fluoresceína, con mayor especificidad, pero menor sensibilidad.	Chang y col., 2004
O <sub>2</sub> <sup>1*</sup>	<b>DHE</b> (Dihidroetidina)	Baja, reacciona con citocromos, grupos hemo, complejos Mn-porfirina, ácido hipocloroso, NO y ONOO <sup>-</sup> Riesgo de autooxidación y por luz Se recomienda uso cualitativo	Kalyanaraman y col., 2012, Benov y col., 1998
	<b>MitoSOX</b>	Variante del anterior, se acumula preferencialmente en la mitocondria. Permite detectar el superóxido mitocondrial	Zielonka y Kalyanaraman, 2010
HO*	Fluoroforenitróxido proxil fluorescamina	Reacciona también con O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Mattila y col., 2015
	Ácido tereftálico (benzeno-1,4-dicarboxílico)	Puede reaccionar con otros radicales, pero la señal es específica para ·OH*	Mattila y col., 2015

<https://www.thermofisher.com/ar/es/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-reactive-oxygen-species-including-nitric-oxide/generating-and-detecting-reactive-oxygen-species.html>

Además de los compuestos fluorescentes, existen sensores de estado redox basados en proteínas fluorescentes (como roGFP – “GFP sensible a estado redox”– y otras), que quedan fuera del alcance de este libro. Para conocer más sobre estas herramientas, recomendamos revisar los trabajos de Mattila y col., 2015; Ortega Villasante y col., 2020 y Wang y col., 2023.

Dentro de los compuestos no fluorescentes, los más utilizados son la diaminobencidina (DAB, Thordal y Christensen, 1997) para la detección de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y el azul de tetrazolio (NBT, Doke 1983) para la detección de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Ambos son económicos y accesibles pero baja especificidad.

En las secciones siguientes, se describen tres de los métodos más difundidos para la detección de peróxido de hidrógeno (tinción con DAB y sonda DCF-DA) y anión superóxido (tinción con NBT).

## 2.1. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO CON 3,3´ -DIAMINOBENZIDINA (DAB)

Mariela Inés Monteoliva

### Fundamento

La oxidación de diaminobencidina es dependiente de enzimas con grupo hemo (como las peroxidasa). Al oxidarse, produce un compuesto marrón insoluble.

Esta técnica permite analizar la presencia y distribución de  $H_2O_2$  en tejidos vivos. La tinción puede realizarse tanto en hojas como raíces (Alvarez y col., 1998).

### Consideraciones y limitantes

Para todas las técnicas de tinción de EAO una de las principales limitantes es la dificultad para que la solución de tinción alcance el interior de los tejidos a teñir en un tiempo suficientemente corto y sin generar más EAO durante el proceso de tinción, ya que se utilizan tejidos vivos. Por esto es necesario incluir testigos sin estrés para controlar la producción de EAO generada en el proceso de tinción. Ajustar los tiempos de tinción, la concentración de reactivo que se usa y la necesidad de hacer vacío según el tipo de muestra, que dependerán de la tasa de producción de EAO.

El DAB es fotosensible, se aconseja proteger de la luz durante todo el proceso y siempre preparar fresco antes de su uso. Además, la solubilidad del DAB en agua es muy baja, algunos autores lo disuelven en un volumen pequeño de ácido acético puro y luego lo neutralizan y diluyen en el buffer de tinción.

La tinción con DAB (así como la de NBT para superóxido) se pueden cuantificar a partir de imágenes obtenidas por escaneo o fotografía digital con magnificación según el tejido de que se trate. Luego la imagen puede ser analizada utilizando un programa el ImageJ o FIJI.

### Reactivos

- Buffer Tris-acetato 50 mM pH 5,0 (ver Anexo 9.5)
- Solución de DAB (3-3'-diamino benzidina, SIGMA D12384 o D8001) 0,1 mg/ml. Disolver en buffer Tris-acetato 50 mM pH 5,0
- Etanol 80% v/v
- Glicerol 10% v/v, para colocar las muestras en portaobjetos

### Protocolo

1. Sumergir el tejido vegetal en la solución de DAB y luego hacer tratamiento de vacío (opcional).
2. Incubar en oscuridad a una temperatura de 25 °C. El tiempo de tinción debe ser ajustado. Se sugiere no incubar más de 18 h.

3. Retirar y sumergir el tejido en una solución de etanol al 80% v/v e incubar a 50-80°C hasta que su completa decoloración. Se debe sustituir la solución de etanol las veces que sea necesario hasta que el tejido quede completamente decolorado.
4. Las muestras decoloradas se pueden conservar en etanol 80% v/v hasta su análisis.
5. La toma de imagen dependerá del tejido. Si se trata de plántulas o tejido frágil o sensible, previo al análisis, se recomienda hidratar progresivamente en solución de etanol cada vez más baja, hasta llegar al agua pura y luego transferir a glicerol 10% para su montado en portaobjetos. De otra forma, los tejidos acumulan burbujas que dificultan el análisis y pueden dañar el tejido.

## 2.2. ANIÓN SUPERÓXIDO CON AZUL DE TETRAZOLIO (NBT)

*Mariela Inés Monteoliva*

### Fundamento

El azul de tetrazolio (nitroblue tetrazolium, NBT) es un compuesto amarillo, soluble en agua que en presencia de anión superóxido, se reduce a formazán, de color azul oscuro, insoluble (Doke, 1983). Este producto puede ser observado por microscopia o re-solubilizado en solventes apropiados (como DMSO) y cuantificado por espectrofotometría.

#### Consideraciones y limitantes

Para realizar esta tinción se deben utilizar tejidos frescos e incluir testigos sin estrés/tratamiento para controlar la producción de EAO generada en el proceso de tinción.

Ajustar los tiempos de tinción, la concentración de reactivo que se usa y la necesidad de hacer vacío según el tipo de muestra, que dependerán de la tasa de producción de EAO.

El NBT es fotosensible, se aconseja proteger de la luz durante todo el proceso y siempre preparar fresco antes de su uso.

La tinción con NBT se puede cuantificar a partir de imágenes obtenidas por escaneo o fotografía digital con magnificación según el tejido de que se trate. Luego la imagen puede ser analizada utilizando un programa el ImageJ o FIJI. También puede ser re-solubilizado y cuantificado por espectrofotometría de forma semi-cuantitativa.

### Reactivos

- Solución de azul de tetrazolio (SIGMA N6639) 0,5 mg/ml  
Disolver en agua, preparar en el momento
- Buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 (ver Anexo 9.2)

- Etanol 80% v/v
- Glicerol 10% v/v, para montar las muestras en portaobjetos

## Protocolo

1. Preparar una solución 0,5 mg/ml de azul de tetrazolio (NBT) en buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0).
2. Sumergir el tejido en la solución e incubar a 25 °C en oscuridad.
3. Retirar de la solución de tinción.
4. Sumergir el tejido en una solución de etanol al 80% v/v e incubar a 50-80°C hasta que se clarifiquen completamente.  
NOTA: Se debe sustituir la solución hasta que el tejido quede completamente decolorado. Las muestras decoloradas se pueden conservar en etanol 80% v/v a 4°C hasta su observación.
5. La adquisición de la imagen dependerá del tejido. Si se trata de plántulas chicas o tejido frágil o sensible, previo al análisis se recomienda reemplazar el etanol progresivamente (con dos o tres diluciones cada vez menores de etanol), hasta tener agua destilada pura y luego reemplazar por glicerol 10% v/v. Si se hace en un solo paso, se pueden formar burbujas dentro del tejido dificultando su análisis.

## 2.3. EAO CON DICLOROFLUORESCÉINA DIACETATO (DCF-DA)

*Leandro Ismael Ortega y Mariela Inés Monteoliva*

### Fundamento

La 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA) es un fluorocromo que en su forma reducida ( $H_2$ DCF-DA) es permeable a la membrana plasmática y no presenta actividad fluorogénica. Una vez dentro de la célula, la hidrolización de los grupos acetato por acción de las esterasas intracelulares y su oxidación en presencia de EAO, provocan la conversión de la  $H_2$ DCF-DA no fluorescente, en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) altamente fluorescente con un pico de excitación en el rango azul (492–495 nm) y de emisión en el verde (517–527 nm). La deacetilación también reduce en gran medida su permeabilidad por membrana, por lo que esta forma fluorescente es mayormente retenida en el citosol.

## Consideraciones y limitantes

Las muestras vegetales deben ser manipuladas con cuidado para no generar daño mecánico, que hará aumentar la fluorescencia por causas externas al tratamiento.

Estas sondas son altamente sensibles a oxidaciones ambientales y la oxidación de DCF-DA a DCF retroalimenta su propia oxidación. Por ello, es importante proteger de la luz tanto la solución de tinción como las muestras, y mantener constantes los tiempos de tinción y registro de imágenes. De otra forma, se aumentan las probabilidades de distorsionar el resultado por la oxidación normal de la sonda.

Actualmente existen también versiones clorometiladas de la DCF, que presentan menor liberación al medio luego de ser oxidadas, permitiendo evaluaciones del estado redox intracelular con mayor discriminación espacial y duración.

## Reactivos

- Solución Stock 100X DCF-DA 2 mM (Invitrogen D399).  
Diluir en DMSO (Dimetil sulfóxido) puro.  
Conservar a -20°C, protegido de la luz.
- Bomba de vacío

## Protocolo

1. Preparar la solución de trabajo de DCF-DA (1X) diluyendo la solución stock a una concentración final de 20  $\mu$ M, (pH 7,0) en agua, según el volumen calculado para el número de muestras a incubar.
2. Colocar los tejidos en tubos plásticos de 1,5 ó 15 ml, con DCF-DA 1X, asegurándose que ésta cubra más de la mitad del volumen ocupado por las muestras. Proteger los tubos de la luz, cubriéndolos con papel de aluminio.
3. Infiltrar mediante una bomba de vacío con presión suave (15 a 20 Psi), durante 1-2 min (Este paso puede omitirse en tejidos permeables como raíces jóvenes o crecidas en hidroponía).
4. Interrumpir gradualmente el vacío y mantener las muestras inmersas en la solución por 10 minutos.
5. Lavar rápidamente en agua y montar las muestras entre porta y cubreobjetos con agua destilada (el glicerol puede alterar la fluorescencia normal de la sonda).
6. Observar en un microscopio de epifluorescencia con un filtro de excitación de  $\lambda=488$  nm y filtros de emisión BP de  $\lambda=505$  a 530 nm.
7. En el caso de observar en un microscopio confocal, es recomendable realizar la exploración rápida de la muestra para encontrar el plano de foco óptimo, en un tamaño de imagen chi-

co (512 ppp) con un láser de longitud de onda más larga que la del pico de excitación de la DCF. Puede ser un láser He/Ne ( $\lambda=543$  nm), o un láser rojo ( $\lambda=634$  nm) con el tiempo mínimo de residencia laser (dwelling time) que permita la configuración (por lo general cerca de 1,5 ms). Este paso sirve también para registrar la autofluorescencia de la clorofila, en aquellos tejidos que la tienen, tomando una imagen a través de un filtro de emisión LP de  $\lambda=650$  nm ó BP 675/45.

8. Una vez encontrado el plano focal óptimo, pasar al láser azul ( $\lambda=488$ ) a un 20% de potencia inicialmente y ajustar la sensibilidad del fotomultiplicador para evitar la saturación de señal. Cuando identifique una zona de interés para tomar la imagen definitiva, eleve el tiempo de residencia unas 6 a 8 veces y a un tamaño de imagen de 1024 ppp en un escaneo de barrido único.
9. Guarde las imágenes preferentemente en formato TIFF sin comprimir.

Los niveles de EAO, se pueden cuantificar a través de la densidad de fluorescencia (valor de gris de píxel/número de píxeles) de las zonas de interés delineadas a mano o a través de la función "Umbral" del programa FIJI, versión especializada para muestras biológicas del software de código libre ImageJ (Schindelin y col., 2012).

## Referencias

- Alvarez, M. E.; Pennell, R.; Meijer, P. J.; Atsushi, I.; Dixon, R.; Lamb, C. 1998. Reactive Oxygen Intermediates Mediate a Systemic Signal Network in the Establishment of Plant Immunity. *Plant Cell* 92: 773-784.
- \*\*\* **Arias, M. C.; Luna, C.; Rodriguez, M.; Lenardon, S.; Taleisnik, E. 2005. Sunflower chlorotic mottle virus in compatible interactions with sunflower: ROS generation and antioxidant response. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 223-232. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-7559-5>  
Se realizó la determinación histoquímica de anión superóxido con NBT en hojas de girasol infectadas o no con virus.**
- \*\*\* **Bustos, D.; Lascano, H. R.; Villasuso, A. L.; Machado, E.; Senn, M. E.; Córdoba, A.; Taleisnik, E. 2008. Reductions in maize root tip elongation by salt and osmotic stress do not correlate with apoplastic O<sub>2</sub>- levels. *Ann Bot* 102:551-559. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/6474>  
Este trabajo evalúa la relación entre el contenido de especies activas de oxígeno (tinciones con NBT y DCF-DA) y el crecimiento en elongación de raíces de maíz en presencia de NaCl o sorbitol.**
- Doke N. 1983. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol Plant Pathol* 23, 345-357.
- \*\*\* **García, M.; García, G.; Parola, R.; Maddela, N.R.; Pérez-Almeida, I.; Garcés-Fiallos, F.R. Root-shoot ratio and SOD activity are associated with the sensitivity of common bean seedlings to NaCl salinization. *Rhizosphere* 2024, 29, 100848. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100848>  
En este trabajo se evaluó la actividad de enzimas antioxidantes SOD y CAT y niveles de O<sub>2</sub>- y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante tinción en raíces y hojas, en relación con la tolerancia a la salinidad en dos variedades de poroto.**
- Liu, Y. H.; Offler, C. E.; Ruan, Y. L. 2014. A simple, rapid, and reliable protocol to localize hydrogen peroxide in large plant organs by DAB-mediated tissue printing. *Frontiers in Plant Science*, 5.

Mattila, H.; Khorobrykh, S.; Havurinne, V.; Tyystjärvi, E. 2015. Reactive oxygen species: Reactions and detection from photosynthetic tissues. *J Photochem Photobiol B* 152:176-214.

\*\*\* Monteoliva, M. I.; Rizzi, Y.S.; Cecchini, N. M.; Hajirezaei, M. R.; Alvarez, M. E. 2014. Context of action of Proline Dehydrogenase (ProDH) in the Hypersensitive Response of Arabidopsis. *BMC Plant Biology* 14(1):21.

Se utilizó la sonda fluorescente DFC-DA para evaluar la producción de especies activas del oxígeno relacionadas al metabolismo de prolina en la respuesta de defensa contra bacterias patógenas en arabidopsis.

\*\*\* Pereyra, C.; Parola, R.; Lando, A. P.; Rodriguez, M.; Martínez-Noël, G. M. A. 2023. High sugar concentration inhibits TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Growth Regul* 42:4309–4323

En este trabajo se evaluó el efecto de los azúcares en la vía de señalización de TOR y la participación de las ROS. Se realizaron determinaciones de actividades enzimáticas SOD y CAT, zimogramas de SOD, determinación de niveles de O<sub>2</sub>- y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante tinción en plántulas además de niveles de FRAP y MDA. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10894-w>

Rhee, S. G.; Chang, T-S.; Jeong, W.; Kang, D. 2010. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Mol Cells* 29: 539-49.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9, 676–682.

Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook. Disponible en: [www.piercenet.com/files/1602063\\_PAssayHB\\_122910.pdf](http://www.piercenet.com/files/1602063_PAssayHB_122910.pdf)

Thordal-Christensen, H.; Brandt, J.; Cho, B. H.; Gregersen, P. L.; Rasmussen, S. K.; Smedegaard-Petersen, V.; Collinge, D. B. 1992. cDNA cloning and characterization of two barley peroxidase transcripts induced differentially by the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 40:395-409.

### 3. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS Y NO ENZIMÁTICOS

Bustos D. A., Rodríguez M. S.\*, Monteoliva M. I., Ortega L.I., Parola R.\*

El balance redox es fundamental como fuente de señalización en procesos tan importantes como la diferenciación, la división, la elongación celular y las respuestas a los estreses bióticos y abióticos.

Como se mencionó en el capítulo anterior, en condiciones de estrés, el balance redox puede perderse. Para restaurar el equilibrio y mitigar el daño oxidativo, las plantas poseen un complejo sistema antioxidante, formado por compuestos no enzimáticos de bajo peso molecular (ácido ascórbico, glutatión, tocoferoles, prolina, etc.) y complejos enzimáticos (peroxidasas, catalasas, superóxido dismutasas, entre otras) que actúan en conjunto para mantener el balance de óxido-reducción. Un ejemplo de la compleja regulación del balance redox es el ciclo de “Foyer-Hasada-Halliwell” o “ascorbato -glutatiión” (Figura 1), que mantiene los niveles de glutatión reducido.

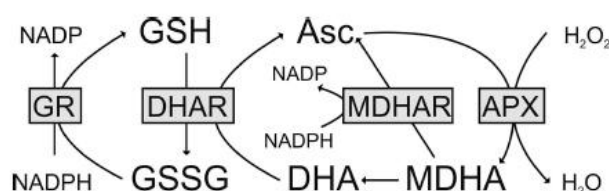


Figura 1. Esquema de la vía Foyer-Asada-Halliwell con las principales enzimas implicadas. GR, glutatión reductasa; DHAR, dehidroascorbato reductasa; MDGAR, monodeshidroascorbato reductasa; APX, asorbato peroxidasa, GSSG, glutatiión oxidado; GSH, glutatiión reducido; DHA, deshidroascorbato; MDHA, monodeshidroascorbato; NAD(P)(H), nucleótidos de piridina. Imagen extraída de Foyer y Noctor (2009).

Para evaluar alteraciones en el balance redox, existen aproximaciones experimentales que permiten detectar los niveles de las EAO, la actividad del sistema antioxidante y la oxidación de ciertos compuestos. Siempre teniendo en cuenta la complejidad de las interacciones entre componentes del sistema antioxidante.

Los metabolitos antioxidantes suelen cuantificarse en sus estados oxidado y reducido, como es el caso del asorbato y glutatiión o como una capacidad global de reducir compuestos oxidados del extracto vegetal, como el hierro, en el método de FRAP.

Las actividades enzimáticas se analizan por métodos espectrofotométricos, que determinan la actividad total de cada enzima, o mediante zimogramas (en geles no desnaturizantes), que permiten visualizar la actividad y diferenciar isoformas en función de su tamaño y su inhibición por compuestos específicos.

#### 3.1. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE NO ENZIMÁTICA

Como parte del metabolismo redox, las células producen compuestos de bajo peso molecular como glutatiión y asorbato (Figura 1), además de compuestos fenólicos como los tocoferoles. Estos compuestos en su estado reducido cumplen un papel fundamental en el balance redox, reduciendo a

las especies activas del oxígeno (y a otras moléculas oxidantes), cambiando a su estado oxidado. Luego, pueden ser reducidos nuevamente por enzimas específicas del sistema antioxidante, manteniendo así el balance redox en valores compatibles con la vida.

La capacidad de mantener el balance redox se puede estudiar mediante el análisis de cada uno de esos compuestos en sus distintos estados. Como primera aproximación, se puede determinar la capacidad antioxidante total del extracto vegetal de reducir iones metálicos (FRAP).

### 3.1.1. FRAP (*Ferric reducing ability of plasma*)

Bustos D. A.

#### Fundamento

El método de FRAP permite cuantificar la capacidad de reducir el hierro del extracto vegetal, es decir, su capacidad reductora o “antioxidante” no-enzimática total (Benzie y Strain, 1996).

El FRAP utiliza al hierro como agente reductor de una reacción de óxido-reducción asociada a una reacción colorimétrica. A pH bajos, los compuestos reductores del extracto vegetal reaccionan con el ion férrico ( $Fe^{+3}$ ) de la tripiridil-triacina férrica (TPTZ- $Fe^{+3}$ ) reduciéndolo a ion ferroso ( $Fe^{+2}$ ), y produciendo un compuesto de color azul oscuro con un máximo de absorción a 593 nm.

#### Consideraciones y limitantes

La técnica evalúa numerosos compuestos antioxidantes no enzimáticos, no un compuesto en particular.

Es muy importante que la reacción ocurra a pH ácido, para lo cual se utiliza el buffer acetato (pH 3,6).

Es una reacción a punto final, es decir se incuba la muestra hasta su punto de máxima absorbancia. Luego de los 40 min de incubación, no debería presentar variaciones en la DO.

#### Reactivos

- Buffer acetato de sodio 250 mM M pH 3,6 (ver Anexo 9.1)
- Stock de TROLOX 2 mM (ácido 6 hidroxil-2,5,7,8 tetrametilcromano-2-carboxílico, SIGMA 238813)  
Disolver en etanol 80% v/v  
Conservar a -20°C
- Sub-stock TROLOX 250 µM  
Diluir en etanol 80% v/v
- Stock de TPTZ 10 mM (2,4, 6 Tris (2 piridil) s-triazina)  
Disolver en HCl 40 mM
- $FeCl_3$  200 mM

## Mezcla de reacción

- Buffer acetato de sodio 250 mM pH 3,6 (ver Anexo 9.1)
- TPTZ 850  $\mu$ M
- FeCl<sub>3</sub> 17 mM

## Protocolo

1. Moler el material vegetal en mortero con nitrógeno líquido, adicionar etanol 80% frío en proporción 1:10 (100 mg de tejido vegetal: 1000  $\mu$ l de etanol).
2. Centrifugar el homogenato 15 min a 12000 rpm a 4 °C y recuperar el sobrenadante en tubos nuevos.
3. Realizar las diluciones de TROLOX para la curva de calibración según la Tabla 2.

**Tabla 2.** Concentraciones y volúmenes para preparar la curva de calibración

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

4. Colocar una placa multipocillo sobre hielo, agregar 20  $\mu$ l del sobrenadante (por triplicado) o de la curva patrón, y agregar 180  $\mu$ l de la mezcla de reacción.  
NOTA: si fuera necesario, diluir la muestra para que la lectura se encuentre dentro de los valores de la curva de calibración.
5. Incubar 40 min a 25 °C y medir la absorbancia a 593 nm.
6. Calcular los  $\mu$ moles de antioxidantes totales no enzimáticos (equivalentes en TROLOX) de cada muestra en base a los valores obtenidos en la curva de calibración.

### 3.1.2. Glutati3n total y reducido

Rodriguez, M. S.

## Fundamento

El glutati3n ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinglicina) es el tripéptido tiol no proteico más importante de las células vegetales (Figura 1, sección 3). En este método, se determina el contenido de glutati3n total y reducido. Para ello, la mitad de la muestra se incuba con glutati3n reductasa a los fines de reducir completamente el glutati3n oxidado de la muestra. La otra mitad del extracto permitirá determinar el glutati3n reducido. Esto permite calcular el contenido total de glutati3n, así como la proporción glutati3n oxidado / glutati3n reducido.

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

### Consideraciones y limitantes

Este método es más sensible y presenta menos interferentes que el monitoreo de la oxidación de NADPH (método tradicionalmente utilizado para determinar glutatión). Se debe tener en cuenta que la reacción es cíclica por lo que es clave inactivar la enzima glutatión reductasa (GR) con calor.

### Reactivos

- Buffer Tris-HCl 2 M pH 8,0 (ver Anexo 9.6)
- DTNB 5 mM (ácido 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)).  
Disolver en buffer Tris-HCl 1 M pH 8,0 (diluir el stock 2 M).
- GSH 0,1 mM.  
Disolver en TCA 3% (p/v)
- NADPH 1 mM.  
Disolver en Tris-Cl 25 mM pH 8,0
- GSH 100 mM.  
Disolver en TCA 3% p/v.
- MgCl<sub>2</sub> 60 mM.
- EDTA 20 mM (ver Anexo 9.7)
- TCA 3% (p/v)

### Mezcla de reacción de glutatión reductasa (GR)

- MgCl<sub>2</sub> 3 mM
- NADPH 150 μM
- EDTA 1 mM
- Buffer Tris-Cl 400 mM pH 8,0
- Enzima GR 0.045 U
- TCA 3%

### Protocolo

1. Moler el material vegetal en mortero con nitrógeno líquido, adicionar ácido tricloroacético (TCA) 3% en proporción 1:0,75 (100 mg de tejido vegetal: 750 μl de TCA).

- Centrifugar 10 min a 12000 g a 4 °C y recuperar el sobrenadante.
- Preparar la mezcla de reacción para la medición de glutatión total (GST) y de glutatión reducido (GSH) según la Tabla 3.

**Tabla 3.** Volúmenes para preparar los tubos de reacción para la determinación de GST y GSH.

	Para GST (μl)	Para GSH (μl)
Extracto	90	90
Mezcla de reacción GR	90	-
Buffer Tris 1M pH 8,0	-	120
Agua destilada	105	75

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

El contenido en glutatión se determina por medio de una curva con estándar de glutatión reducido para GST y otra para GSH. Para la construcción de dicha curva se utiliza GSH 0,1 mM preparado en TCA 3 % (p/v) y se reemplaza el volumen de muestra por 90 μl de las distintas diluciones de GSH en las mezclas de reacción. Para el blanco de muestra se utilizan 90 μl de TCA 3 % (p/v) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Concentración y volúmenes para preparar la curva de calibración

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

### 3.1.3. Ascorbato total y reducido

Rodriguez, M. S.

#### Fundamento

El ácido ascórbico es el antioxidante soluble más importante de los tejidos foliares de plantas (Arrigoni y De Tullio, 2000) (Figura 1, sección 3), detectado en la mayoría de los tipos celulares de plantas y en diferentes organelas (Smirnoff, 2000).

Este ensayo se basa en la reducción de ión férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) por el ascorbato en una solución ácida. El  $\text{Fe}^{+2}$  forma un complejo con el bipyridilo, dando un color rosa que tiene el pico máximo de absorción a 525 nm. El ascorbato total se determina por la reducción del dihidroascorbato a ascorbato por ditiotreitolo (DTT). Finalmente, se agrega de N-etilmaleimida (NEM) para remover el exceso de DTT.

### Consideraciones y limitantes

El ascorbato es altamente inestable en solución, oxidándose fácilmente a ácido deshidroascórbico (DHA) y, posteriormente, a otros productos de degradación, especialmente en presencia de oxígeno, calor, luz y ciertos metales. Esta inestabilidad puede llevar a una subestimación de los niveles reales de ascorbato.

Es crítico proteger tanto las muestras como las soluciones con ascorbato de su exposición al aire y la luz para minimizar la oxidación.

### Reactivos

- Ácido tricloroacético (TCA) 3 % (p/v)
- Ácido fosfórico 50% (v/v)
- Bipyridilo 4 % (p/v)  
Disolver en etanol 70 % v/v
- DTT 10 mM, conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$
- N-etilmaleimida (NEM) 0,5 % (p/v)
- Cloruro férrico 3 % (p/v)
- Ascorbato 100 mM  
Disolver en TCA 3 %
- Buffer fosfato de potasio 75 mM pH 7,0 (ver Anexo 9.2)

### Mezcla de reacción

- TCA 1% (p/v)
- Ácido fosfórico 17% (v/v)
- Bipyridilo 1,3% (p/v)

### Protocolo

1. Moler el material vegetal en mortero con nitrógeno líquido, adicionar ácido tricloroacético (TCA) 3% en proporción 1:7,5 (100 mg de tejido vegetal: 750  $\mu\text{l}$  de ácido).
2. Centrifugar a 12.000 g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y recuperar el sobrenadante.

- Preparar las mezclas de reacción para la medición de ascorbato total y ascorbato reducido, según la Tabla 5.

**Tabla 5.** Volúmenes para preparar las mezclas de reacción

	Ascorbato total	Ascorbato reducido
Extracto vegetal	75 µl	75 µl
Buffer fosfato de potasio 75 mM pH 7,0 (3X)	25 µl	25 µl
DTT 10 mM	25 µl	-
Agua	-	50 µl

- Incubar 10 min a 25 °C.
- Agregar 25 µl de NEM 0,5 % p/v sólo a las reacciones para medir ascorbato total y 300 µl de mezcla de reacción a ambas reacciones.
- Incubar 60 min a 37°C.
- Finalizar la reacción agregando 50 µl de cloruro férrico 3 % (p/v) a todas las mezclas de reacción.
- Medir la absorbancia a 525 nm.

## Curva de calibración

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

Se recomienda preparar la curva de calibración como se indica en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Concentración y volúmenes para preparar la curva de calibración

Concentración de ácido ascórbico (nM)	Ácido ascórbico 1 mM (µl)	TCA 3% (p/v) (µl)
5	5	70
10	10	65
15	15	60
20	20	55
25	25	50

## 3.2. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

*Parola, R.*

Las enzimas antioxidantes mantienen el balance redox, participan de la señalización redox modulando los niveles de EAO, y protegen a los tejidos del estrés oxidativo.

Las principales enzimas representantes de este grupo son ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), peroxidasa (POX) y superóxido dismutasa (SOD). En el caso de APX, CAT, POX y SOD, actúan directamente sobre las EAOs reduciéndolas, mientras que GR intervienen en el llamado ciclo de Foyer-Asada-Halliwell (Figura 1, sección 3), manteniendo los niveles de glutatión reducido.

En el estudio del estado redox, parte del abordaje puede realizarse analizando la actividad de las enzimas antioxidantes. Para la determinación de la actividad de una enzima se utilizan técnicas espectrofotométricas ó electroforesis en geles de acrilamida no desnaturalizantes (zimogramas) (ver Anexo 11.1). Los zimogramas, además, permiten diferenciar la actividad de las isofomas de una misma enzima presentes en el extracto.

### ***Determinaciones espectrofotométricas y zimogramas***

Teniendo en cuenta que la espectrofotometría es una técnica analítica que determina la cantidad de luz absorbida por una sustancia cuando es atravesada por un haz de luz, debemos tener ciertas consideraciones que abarcan desde la obtención del extracto vegetal, pasando por la medición, hasta el análisis de los datos obtenidos.

Para las determinaciones de actividades enzimáticas antioxidantes, se recomienda trabajar con tejidos frescos, aunque también se pueden utilizar tejidos previamente almacenados y conservados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para la obtención de los extractos, la metodología general consiste en moler el material vegetal utilizando nitrógeno líquido en mortero previamente enfriado y mantener temperaturas iguales o menores a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante todo el proceso.

Es indispensable utilizar reactivos de calidad haciendo énfasis en la limpieza del material a utilizar.

Al realizar la cuantificación espectrofotométrica, se debe prestar atención a la selección de las longitudes de onda a utilizar, ya que son específicas de cada protocolo.

Una vez obtenidas los valores de la cuantificación, realizar los cálculos de actividad utilizando las curvas de calibración o coeficientes de extinción molar, según el caso.

### **3.2.1. Actividad ascorbato peroxidasa (APX)**

*Parola, R., Ortega L.*

Las enzimas ascorbato peroxidasa (APX; EC 1.11.1.11) son hemo-peroxidasa capaces de reducir el peróxido de hidrógeno a agua, disminuyendo de esta forma la capacidad oxidante de esta especie activa del oxígeno (EAO).

Existen cuatro isoformas conocidas de estas enzimas, dos de ubicación cloroplástica, una citosólica y una presente en los glioxisomas. La ubicación cloroplástica representa un importante mecanismo de protección para las reacciones fotosintéticas.

La APX utiliza al ascorbato como donante de electrones y participa en la Vía de Foyer-Asada-Halliwell (Figura 1, sección 3). Utiliza dos moléculas de ascorbato (AsA) como donador de electrones específico para reducir peróxido de hidrógeno a agua, con la generación concomitante de dos moléculas de monodeshidroascorbato (MDHA).

Existen numerosos reportes de aumentos marcados tanto en la expresión como en la actividad de estas enzimas como respuesta a diversas condiciones de estrés en plantas.

## Fundamento

El ascorbato tiene la capacidad de reducir el azul de tetrazolio (NBT) a formazán (compuesto insoluble azul) en presencia de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED). El fundamento de esta técnica se basa en la capacidad de la APX de prevenir la formación del formazán (en presencia de peróxido de hidrógeno) debido a su alta capacidad de oxidar el ascorbato formando monodeshidroascorbato (MDHA).

Para la determinación de actividad APX por espectrofotometría, se realizan mediciones de densidad óptica a 290 nm en la cual se cuantifica la disminución del ascorbato (Rodríguez -Ruiz y col., 2024; Nakano y Asada, 1981).

En los zimogramas, la actividad de APX se visualiza como bandas sin coloración, en base a la misma reacción colorimétrica en la cual la actividad APX no permite la deposición del formazán (Mittler y Zilinskas, 1993).

### Consideraciones y limitantes

Para las determinaciones de actividad de APX se puede trabajar tanto con tejidos frescos como con tejidos preservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para mantener la actividad de la enzima APX, es esencial adicionar ascorbato (2 mM) al buffer de extracción, tanto para mediciones espectrofotométricas como para zimogramas, y al buffer de corrida en los zimogramas.

Como se mide en el rango de luz UV, las mediciones espectrofotométricas deben realizarse con cubetas de cuarzo o en placas multipocillo de material apto para luz UV.

## Actividad por espectrofotometría

### Reactivos

- Buffer de extracción
- Buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 (ver Anexo 9.2)
- Ascorbato 2 mM

## Mezcla de reacción

- Buffer HEPES-KOH 100 mM pH 7,6 (ver Anexo 9.3)
- Ascorbato 2 mM
- Peróxido de hidrógeno 3 mM (titular según Anexo 10.1)

## Protocolo

1. Moler el material vegetal en mortero con nitrógeno líquido, adicionar buffer de extracción en proporción 1:4 (250 mg de tejido vegetal: 1000 µl de buffer)
2. Centrifugar el homogenato a 14000 g por 30 min a 4 °C. Utilizar inmediatamente, manteniendo a 4 °C.
3. Separar una alícuota de cada muestra para determinar el contenido de proteínas por Bradford (sección 3.2.6)
4. Antes de realizar las determinaciones, preparar los controles según se indica en la Tabla 7.

**Tabla 7. Soluciones y volúmenes para la determinación.** Volumen final 1000 µl. La reacción se inicia por adición del peróxido de hidrógeno.

	HEPES 100 mM	Extracto vegetal	Ascorbato 2 mM	Agua Milli-Q	Peróxido de hidrógeno 3 mM
Blanco	500 µl	-	-	500 µl	-
Control muestra	500 µl	5-150 µl	-	495-350 µl	-
Control Ascorbato	500 µl	-	100 µl	400 µl	-
Control peróxido de hidrogeno	500 µl	-	-	400 µl	100 µl
MUESTRA	500 µl	5-150 µl	100 µl	295-150 µl	100 µl

5. Iniciar la reacción por adición del peróxido de hidrógeno. Mezclar con pipeta y realizar la lectura inmediatamente a 290 nm durante 1 minuto.
6. Estimar la oxidación del ascorbato utilizando el coeficiente de extinción molar  $\epsilon =$  de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .
7. Expresar la actividad como nmoles de ascorbato consumido por minuto por mg proteína.

## Zimograma

### Reactivos

#### Buffer de extracción

- Buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,0 (ver Anexo 9.3)
- EDTA 1 mM (ver Anexo 9.7)
- Ascorbato 5 mM

### **Buffer de siembra (4X)**

- Buffer fosfato de sodio 500 mM pH 7,0
- Glicerol 10% (v/v)
- Azul de bromofenol 2% (p/v)

### **Solución de equilibrado**

- Pesar ascorbato para obtener una solución 2 mM
- Agregar:
- Buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 (ver Anexo 9.3)
  - EDTA 1 mM (ver Anexo 9.7)
- Enrasar con agua destilada

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

Pesar ácido ascórbico para obtener una solución 4 mM, y agregar:

- Buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 (ver Anexo 9.3)
  - EDTA 1 mM (ver Anexo 9.7)
  - Peróxido de hidrógeno 2 mM
- Enrasar con agua destilada

### **Solución de tinción**

Pesar NBT para obtener una concentración final de 2,45 mM

Agregar:

- Buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,8 (ver Anexo 9.2)
  - EDTA 1 mM (ver Anexo 9.7)
  - TEMED 28 mM
- Enrasar con agua destilada

## **Protocolo**

1. Preparar el buffer de extracción y añadir el ascorbato (2 mM concentración final) justo antes de empezar a procesar las muestras, para evitar la inactivación de la enzima.
2. Moler la muestra en mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
3. Agregar el buffer de extracción en proporción 1:10 (100 mg de muestra vegetal: 1000 µl buffer)
4. Centrifugar a 12000 g 10 min y recuperar el sobrenadante.
5. Armar un gel no-desnaturalizante de poliacrilamida 12 % (ver Anexo 11.1)
6. Preparar dos buffers de corrida. El interno (cátodo) con ascorbato 2 mM, el externo (ánodo) sin ascorbato. Iniciar una corrida sin muestras por 30 min a 120 mV para que el ascorbato entre al gel.
7. Sembrar las muestras (aprox. 30 µg por calle) con el agregado del buffer de carga.

8. Realizar la corrida electroforética seleccionando 15 mA hasta que ingresen al gel y luego a 25 mA hasta que el colorante del buffer de carga llegue al borde del gel.
9. Remover el gel de los vidrios, colocarlo en la solución de equilibrado por 30 min, cambiando el buffer cada 10 min.
10. Incubar 20 min en la solución con peróxido de hidrógeno.
11. Enjuagar y equilibrar el gel en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 por 1 min
12. Sumergirlo en la solución de tinción por 10 min.
13. Detener la reacción lavando el gel con agua destilada.
14. La actividad APX se observa como una banda sin color en un fondo azul.

### 3.2.2. Actividad catalasa (CAT)

Parola, R.

#### Fundamento

La enzima catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), localizada en peroxisomas y glioxisomas, cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Además, es capaz de oxidar dadores de H<sup>+</sup> como metanol, etanol y fenoles (Aebi,1984).

Para evaluar su actividad, se analiza la cinética de desaparición del peróxido de hidrógeno mediante espectrofotometría a 240 nm (luz UV). A mayor actividad CAT, mayor será la pendiente de la curva, indicando una mayor velocidad de reducción del peróxido de hidrógeno.

#### Consideraciones y limitantes

Se recomienda ajustar la concentración óptima del extracto vegetal, evaluando varios volúmenes de extracto (entre 5 a 50 µl) y verificar que las mediciones se encuentren dentro del rango de linealidad de la técnica.

La determinación espectrofotométrica de la actividad se realiza a 240 nm por lo que se debe utilizar una cubeta de cuarzo.

La actividad de la enzima catalasa presenta una fase inicial *lag* donde la tasa de dismutación del peróxido de hidrógeno es muy baja, influenciada directamente por la temperatura ambiente. Idealmente, la determinación debería realizarse con una temperatura ambiente cercana a los 25 °C.

Para evitar una disminución inicial muy rápida del peróxido de hidrogeno, se recomienda utilizar concentraciones relativamente bajas de peróxido de hidrógeno (~ 0,05 M).

Es necesario titular el peróxido de hidrógeno (el procedimiento se describe en el Anexo 10.1) y verificar la DO en un testigo con peróxido de hidrógeno y sin extracto vegetal. Este testigo debería tener una DO=0,5. Si fuera diferente, es necesario ajustar la concentración de peróxido de hidrógeno.

## Reactivos

### Buffer de extracción

- Buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,4 (ver Anexo 9.2)

### Mezcla de reacción

- Buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,0
- Peróxido de hidrógeno 50 mM (titular según Anexo 10.1)

Se agregará al final, para iniciar la reacción

Cubetas de cuarzo o placas multipocillos aptas para UV

## Protocolo

1. Moler el material vegetal en mortero con nitrógeno líquido, adicionar buffer de extracción en proporción 1:4 (250 mg de tejido vegetal: 1000 µl de buffer)
2. Centrifugar el extracto a 13000 g por 20 min a 4 °C. Si hace falta, volver a centrifugar para que no queden partículas de tejido en suspensión. Recuperar el sobrenadante y separar una alícuota de cada muestra para determinar el contenido de proteínas por Bradford (sección 3.2.6)
3. Preparar la mezcla de reacción para todas las muestras, e iniciar la reacción por adición del peróxido de hidrógeno 50 mM en cubeta de cuarzo a 240 nm.
4. Mezclar con pipeta e iniciar la medición de cinética durante 60 segundos con intervalos de 1 segundo.

NOTA: Se recomienda realizar la determinación de los primeros 3 minutos para luego definir la duración de la cinética.

## Mezcla de reacción

Preparar los tubos de reacción según se indica en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Mezcla de reacción para actividad catalasa.

Tratamientos	Agua (µl)	Buffer (µl)	Extracto (µl)	Peróxido de hidrógeno 50 mM (µl)
Blanco	900	100	-	-
Testigo	800	100	-	100
Problema	100	10–50	100	-

Para calcular la actividad de la enzima catalasa, se considera el coeficiente de extinción molar  $\epsilon=43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La actividad CAT se expresa como mmoles de peróxido de hidrógeno consumido por minuto por mg de proteína.

### 3.2.3. Actividad glutatión reductasa (GR)

*Parola, R.*

#### Fundamento

La enzima glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2) es una enzima antioxidante que transforma el glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), utilizando NADPH. El GSH es una molécula de bajo peso molecular que contiene un grupo tiol y reacciona con el peróxido de hidrógeno en el ciclo de Foyer-Asada-Halliwell (Mittler 2002) (sección 3 Figura 1). El GSH actúa como reductor y remueve compuestos tóxicos en este ciclo. La enzima GR es la principal enzima responsable de mantener al glutatión en estado reducido.

Para monitorear la actividad de GR, se observa la disminución de la absorbancia a 340 nm dependiente de NADPH (Schaedle and Bassham, 1977).

También existe la posibilidad de analizar la actividad GR mediante zimogramas (Madamanchi, 1992).

#### Actividad por espectrofotometría

##### Reactivos

###### Buffer de extracción

- Buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 (ver Anexo 9.2)
- EDTA 1 mM (ver Anexo 9.7)
- PVP 1% p/v
- Ditioneitol (DTT) 1 M  
Se agrega directo al sobrenadante

###### Mezcla de reacción

- Buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,8
- GSSG 0,5 mM
- $MgCl_2$  3 mM
- EDTA 2 mM
- NADPH 0,2 mM  
Se agrega NADPH 50 mM directo al tubo de reacción

##### Protocolo

1. Extraer las proteínas del homogenato vegetal en buffer de extracción en relación 1:4 (250 mg:1000  $\mu$ l buffer de extracción).
2. Centrifugar el homogenato a 14000 g por 15 min a 4 °C. Si hace falta, volver a centrifugar para que no queden partículas de tejido en suspensión.

3. Adicionar DTT al sobrenadante (concentración final 10 mM).
4. Separar una alícuota de cada muestra para determinar el contenido de proteínas por Bradford (sección 3.2.6).
5. En la cubeta de medición, realizar la mezcla correspondiente con el extracto vegetal, e iniciar la reacción con la adición de NADPH 50 mM (a concentración final 0,2 mM). Mezclar bien con pipeta e iniciar la medición cinética a 340 nm. Medir durante 60 segundos con intervalos de 1 segundo.  
NOTA: En una primera instancia, se recomienda realizar esta determinación por lo menos 3 minutos para definir cuanto tiempo monitorear la reacción.
6. La actividad GR se expresa como cantidad de NADPH oxidado por minuto en función del contenido de proteínas, utilizando para el cálculo el coeficiente de extinción molar del NADPH a 340 nm ( $\epsilon=6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 3.2.4. Actividad guaiacol peroxidasa (POX)

Monteoliva, M. I.

#### Fundamento

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son enzimas antioxidantes que tienen un grupo hemo en su sitio activo. Reducen peróxido de hidrógeno a agua y ocupan diversas localizaciones subcelulares como citosol y apoplasto. Estas actividades pueden ser distinguidas realizando fraccionamientos previos del extracto vegetal (ver, por ejemplo, MacAdam y col., 1992).

La actividad de peroxidasas puede ser evidenciadas con diversos compuestos reactivos como el guaiacol, pirogallol u o-dianisidina. En el caso de la determinación de la actividad peroxidasa con guaiacol, se forma un compuesto denominado tetraguaiacol que tiene su pico de absorción a 470 nm. La absorbancia en esta longitud de onda se incrementa al aumentar la actividad de las peroxidasas.

#### Consideraciones y limitantes

Es necesario ajustar previamente el volumen de peróxido de hidrógeno apropiado (entre 5 y 15  $\mu\text{l}$  del stock 1M).

Es recomendable el uso de inhibidores de proteasas. El PMSF es un inhibidor de serina-proteasas, pero pueden utilizarse otros (ver Yesavage, 2023; ThermoFisher Scientific inc., 2025).

Si se utiliza un extracto total, se estará evaluando la actividad de peroxidasas solubles totales, mayormente citosólicas, no asociadas a membrana plasmática.

Si se quiere evaluar el rol de peroxidasas apoplásticas en la elongación y el crecimiento celular, deberán realizarse fraccionamientos y solubilización de las peroxidasas asociadas a la pared y/o a membranas (ver Mika y Lüthje, 2003; Yemelyanov y col., 2022).

## Reactivos

### Buffer de extracción

- Buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 (ver Anexo 9.2)
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo 10 mM (PFSP, Sigma P7626, inhibidor de proteasas)

### Mezcla de reacción (5X)

- Buffer fosfato de potasio 250 mM pH 7,0 (ver Anexo 9.2)
- Guaiacol 125 mM (Sigma G5502)
- Agua destilada o Milli-Q
- Peróxido de hidrogeno 1M (titular según Anexo 10.1)  
Se agrega para iniciar la reacción

## Protocolo

1. Preparar el extracto con buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 en relación 1 ml/250 mg peso fresco. Es recomendable agregar inhibidor de proteasas (por ejemplo, PMSF a concentración final 1 mM) directamente en el mortero.
2. Centrifugar el homogenato a 14000 g por 15 min a 4 °C. Si hace falta, volver a centrifugar para que no queden partículas de tejido en suspensión. Utilizar el sobrenadante inmediatamente, no conservar para otro día.
3. Separar una alícuota de cada muestra para determinar el contenido de proteínas por Bradford (sección 3.2.6).
4. Prepara las muestras y blancos por triplicado (Tabla 9). Colocar el extracto (ajustar volumen con antelación 5-10 µl).
5. Agregar el buffer de reacción con el guaiacol. Encender el espectrofotómetro.
6. Iniciar la reacción adicionando el peróxido de hidrógeno (5- 15 µl del stock 1M) directamente al tubo de reacción. Mezclar con pipeta.
7. Medir a 470 nm por 3 minutos a 25 °C. Este tiempo se puede acortar en función de las cinéticas obtenidas. También se puede reducir la frecuencia y medir cada 10-20 s.
8. Utilizar el coeficiente de extinción para calcular la actividad enzimática ( $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Expresar la actividad como µmol de tetraguaiacol formado por minuto por mg proteína.

**Tabla 9.** Preparación de muestras para la determinación de actividad peroxidasa dependiendo de guaiacol. En negrita están resaltados los volúmenes que hay que ajustar. Volumen final 200 µl.

	Buffer de reacción (5X)	Extracto vegetal	Agua Milli-Q	Peróxido de hidrógeno 1M
Blanco	40 µl	0	155-150 µl	<b>5-15 µl</b>
Muestras	40 µl	5-10 µl	140-155 µl	<b>5-15 µl</b>

NOTA: Buffer de reacción 1X: buffer fosfato 50 mM, guaiacol 25 mM. El guaiacol es tóxico. Utilizar en lo posible dentro de la campana de extracción de gases.

### 3.2.5. Actividad superóxido dismutasa (SOD)

Parola, R.

Las enzimas superóxido dismutasas (SOD, E.C. 1.15.1.1) son metaloenzimas que catalizan la conversión de anión superóxido ( $O_2^-$ ) en oxígeno y peróxido de hidrógeno.

En plantas, las SOD representan la primera barrera del sistema antioxidante enzimático relacionado con la protección frente a los efectos nocivos de las EAO y, por lo tanto, tienen un impacto significativo en el crecimiento, desarrollo y respuesta de las plantas al estrés abiótico.

Según su cofactor metálico, se dividen en tres clases: cobre/zinc-SOD (Cu/ZnSOD), Manganeso-SOD (Mn-SOD) y hierro-SOD (Fe-SOD), con distribución intracelular característica, encontrándose las Cu/ZnSOD en el citosol, cloroplastos y mitocondrias (Feng y col., 2015; Verma y col., 2019), Mn-SOD en peroxisomas y mitocondrias, y Fe-SOD en peroxisomas, cloroplastos y mitocondrias (Verma y col., 2019).

Los zimogramas permiten diferenciarlas, utilizando diferentes quelantes e inhibidores durante la tinción (Beauchamp y Fridovich, 1971).

#### Fundamento

Para esta técnica se prepara un sistema que genera anión superóxido inducido por luz UV (riboflavina-metionina), y se detecta la producción de superóxido mediante el cambio en coloración del azul de formazán (que reacciona con el superóxido).

La luz UV oxida la riboflavina, reduciendo el oxígeno a anión superóxido. El superóxido (en presencia de metionina como catalizador) reduce el azul de tetrazolio (NBT) a formazán, generando un compuesto de color azul. Así la concentración del ión superóxido está directamente relacionada con el color (Figura 2).

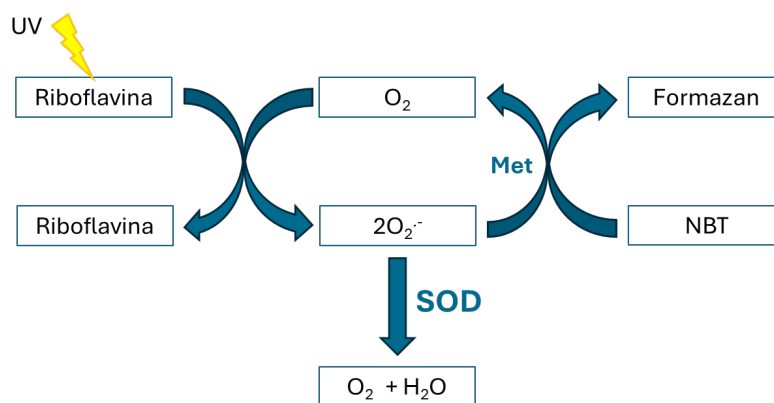


Figura 2. Esquema del sistema de medición de la actividad SOD en base a la reducción de NBT en presencia de riboflavina y metionina, inducido por luz UV. Basado en Saad, 2021.

La actividad de la enzima SOD presente en el extracto vegetal (que dismuta el ión superóxido), va a interferir en la formación de color azul al reducir el ion superóxido. Entonces, mientras mayor sea la actividad de SOD, menor será la reducción de NBT, obteniéndose una menor coloración.

### Consideraciones y limitantes

Al ser ésta una técnica dependiente de la luz se recomienda trabajar en condiciones de baja intensidad lumínica. También se recomienda preparar todos los tubos necesarios con la mezcla de reacción sin la riboflavina y adicionarla inmediatamente antes de la incubación con luz UV.

La implementación correcta de esta técnica implica un estricto control de los tiempos de exposición a la luz UV de la mezcla de reacción.

Verificar que al medir concentraciones crecientes de proteínas se observe mayor actividad SOD.

## Actividad por espectrofotométrica

### Reactivos

- Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,8 (ver Anexo 9.2)
- EDTA 1  $\mu$ M (ver Anexo 9.7)
- Metionina 130 mM
- NBT 750  $\mu$ M
- Riboflavina 40  $\mu$ M (preparar en el momento)
- PVPP (polivinilpirrolidona)

### Pre-mezcla de reacción

- Buffer fosfato de potasio 0,125 M pH 7,8
- EDTA 0,25  $\mu$ M (ver Anexo 9.7)
- Metionina 32,5 mM
- Azul de tetrazolio (NBT) 187,5  $\mu$ M\*

\*NOTA: Mantener en oscuridad a temperatura ambiente, a bajas temperatura se precipita

## Protocolo

### Extracción

1. Moler el tejido vegetal en mortero con nitrógeno líquido con 10 mg de PVPP (polivinilpirrolidona insoluble).
2. Transferir el polvo a un microtubo previamente enfriado y agregar buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,4 + 1 mM EDTA en relación 1:7,5 (100 mg tejido vegetal: 750  $\mu$ l de buffer), mezclar por agitación (vortex).
3. Centrifugar a 13000 g 20 min.
4. Reservar el sobrenadante para las mediciones en hielo.

NOTA: Este extracto vegetal puede ser utilizado tanto para la determinación espectrofotométrica como para realizar los zimogramas.

- Determinar proteínas solubles totales (sección 3.2.6)

### Determinación de la concentración óptima de riboflavina

- Realizar mediciones en tubos testigos (sin extracto vegetal) utilizando de 10 a 100  $\mu\text{l}$  de la solución stock (40  $\mu\text{M}$ ), según esquema de trabajo resumido en Tabla 10.
- Exponer a luz UV durante 8 min (mantener constante la distancia de la lámpara).
- Medir la absorbancia a 560 nm en cubetas de cuarzo utilizando como blanco mezcla de reacción conteniendo la misma cantidad de riboflavina, pero sin exposición a luz UV.
- Seleccionar aquella concentración de riboflavina a la cual la DO sea cercana a 0,8.  
PRECAUCIÓN: agregar la riboflavina justo antes de iniciar la exposición a la luz, mezclar bien e inmediatamente colocar debajo de la luz UV.

**Tabla 10.** Volúmenes de trabajo para las mediciones

Tratamiento	Pre-mezcla ( $\mu\text{l}$ )	Riboflavina ( $\mu\text{l}$ ) *	Extracto vegetal *	Agua Milli-Q
<b>Blanco</b>	400	10-100	-	500 $\mu\text{l}$
<b>Testigo</b>	400	10-100	-	500 $\mu\text{l}$
<b>Problema</b>	400	10-100	5 - 30 $\mu\text{l}$	470-495 $\mu\text{l}$

\* Según los volúmenes ajustados previamente. La diferencia en el volumen total se completa con agua Milli-Q.

### Determinación del volumen óptimo de extracto vegetal

- Ensayar distintas cantidades de extracto vegetal obtenido según las indicaciones de extracción (generalmente entre 5 y 30  $\mu\text{l}$ ), utilizar la cantidad de riboflavina seleccionada previamente y 400  $\mu\text{l}$  de pre-mezcla de reacción, completar el volumen total con agua Milli-Q, si es necesario. No olvidar hacer un testigo, reemplazando el volumen de extracto vegetal por agua.
- Exponer a la luz UV por 8 min y determinar la absorbancia a 560 nm.
- Seleccionar el volumen de extracto cuya absorbancia sea mayor a 0,03.
- Realizar las determinaciones sobre las muestras en estudio, teniendo en cuenta las concentraciones de riboflavina y el volumen de extracto vegetal previamente determinados como óptimos.

Los volúmenes y tratamientos del protocolo se resumen en las tablas 10 y 11.

**Tabla 11.** Esquema de exposición a luz UV

	Mezcla de reacción (con riboflavina)	Extracto vegetal	UV
<b>Blanco</b>	+	-	-
<b>Testigo</b>	+	-	+
<b>Problema</b>	+	+	+

NOTA: Para realizar un tratamiento controlado de exposición a la luz UV, se recomienda iniciar una reacción cada 30 segundos, y retirarla al concluir los 8 min, respetando el orden de inicio (Tabla 11). Incluir las reacciones testigo al iniciar y al finalizar una ronda de medición.

## Cálculos

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

$$\% \text{ de inhibición} = (\text{DO testigo} - \text{DO problema} / \text{DO testigo}) * 100$$

$$U_{SOD} = \% \text{ de inhibición} * (1/50)$$

La actividad SOD se expresa comúnmente en  $U_{SOD}/\text{mg}$  de proteínas (método de Bradford, sección 3.2.6).

## Zimogramas

Revisar consideraciones y limitaciones en Anexo III (sección 12).

## Reactivos

### Soluciones Stock

- Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,8 (ver Anexo 9.2)
- Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 7,4 (ver Anexo 9.2)

## Soluciones de uso

### Buffer de preincubación

- Buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,4 (ver Anexo 9.2)
  - EDTA 1 mM (ver Anexo 9.7)
  - Riboflavina 6,6 mM
- NOTA: No almacenar por más de 1 semana a 4°C, protegida de la luz

### Buffer de siembra (4X)

- Buffer Tris-HCl 500 mM pH 6,8 (ver Anexo 9.6)
- Glicerol 10% (v/v)
- Azul de bromofenol 2% (p/v)

### Solución de tinción

- Buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,8 (ver Anexo 9.2)
- NBT 2,5 mM
- Riboflavina 33  $\mu\text{M}$
- EDTA 1 mM
- TEMED 0,135% v/v

## Protocolo

1. Realizar la separación electroforética mediante geles ND (ver Anexo 11.1).
2. Retirar el gel de concentración y hacer un pequeño corte en una de las esquinas a fin identificar el origen y orden de las muestras.
3. Colocar el gel en una placa de Petri ó recipiente adecuado que no presente pliegues.

## Revelado del gel

1. Cubrir el gel con la solución de preincubación agitando suavemente durante 30 min, en **oscuridad**, cambiando la solución cada 15 min.
2. Retirar la solución de preincubación y colocar la solución de tinción manteniendo las condiciones de agitación y oscuridad durante 25 min.
3. Enjuagar con agua destilada y exponer a la luz hasta que aparezcan bandas claras (actividad SOD) sobre el fondo azul oscuro. Se recomienda exponer el gel a una fuente de luz homogénea para lograr una mayor calidad de revelado.
4. Detener la reacción sumergiendo el gel en agua destilada en oscuridad.

## Identificación de las isoenzimas

Para la identificación de las isoenzimas de SOD pueden realizarse tratamientos de inhibición diferencial previo al revelado de la actividad.

Para la caracterización de las diferentes isoformas tener en cuenta lo siguiente: las enzimas que contienen Cu/Zn son inhibidas por KCN e inactivadas por peróxido de hidrógeno, mientras que las enzimas Fe-SOD son resistentes a KCN e inhibidas por peróxido de hidrógeno. Las Mn-SOD son resistentes tanto a KCN como a peróxido de hidrógeno.

1. Luego del paso de preincubación del gel, se realiza una incubación durante 30 min en buffer fosfato 50 mM pH 7,8 con el agregado de:
  - a. Cianuro de potasio (**KCN\*\***) 2 mM
  - b. Peróxido de hidrógeno 5 mM
2. Luego de la incubación con los inhibidores, descartar las soluciones y revelar con la solución de tinción como se describió previamente.

**\*\*IMPORTANTE: el KCN puede producir ácido cianhídrico que es extremadamente tóxico.** Se debe manipular bajo campana de extracción de gases prestando debida atención al pH de trabajo, ya que las soluciones ácidas provocan formación de ácido cianhídrico gaseoso.

### 3.2.6. Proteínas totales

Monteoliva M. I.

Las proteínas de extractos vegetales pueden ser determinadas por algunos métodos tales como Biuret o Bradford (comúnmente denominadas según el apellido de sus creadores). Su utilización está ampliamente difundida para la determinación de proteínas.

En la Tabla 12 se comparan algunas características básicas entre los métodos más comunes. Ninguno de estos ensayos es totalmente específico para proteínas, ni son igual de sensibles para detectar distintos tipos de proteínas. Además, algunas modificaciones postraduccionales, como la metilación, pueden también interferir con la determinación.

Tabla 12. Métodos para la cuantificación de proteínas en extractos vegetales. Basado en Jonhson, M. 2012.

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

### Método de Bradford

#### Fundamento

Este método se basa en la reacción del colorante azul brillante de Coomasie con los residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina de péptidos y proteínas. Este método es ampliamente utilizado para la determinación del contenido “total” de proteínas en extractos vegetales.

El pico de absorción máximo del azul de Coomasie en solución es 465 nm, y cuando se acopla con proteínas, este pico de absorción se traslada a 595 nm. Existe una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteínas en la muestra (Bradford, 1976).

## Consideraciones y limitantes

Se suele usar albumina de suero bovino como estándar, porque reacciona dando un color intenso. Sin embargo, eso puede llevar a subestimar el contenido de proteínas que presenten una menor proporción de aminoácidos reactivos.

Este método presenta poca o nula interferencia de iones y carbohidratos. Los componentes que más interfieren son algunos detergentes como SDS y Tritón X-100 en concentraciones elevadas, que pueden estar presentes en los buffers de extracción. En caso de ser imprescindible utilizarlos en alta concentración, pueden ser removidos antes de realizar el análisis por cromatografía de exclusión molecular, diálisis o precipitación con fosfato de calcio o acetona.

Este protocolo permite cuantificar de 3 - 30 µg de proteínas por ml de reacción.

## Reactivos

### Reactivo de Coomasie

- Azul brillante de Coomasie 0,01 % p/v (Sigma G-250)
- Etanol 95 % v/v
- Ácido fosfórico 8,5% p/v
- Disolver en agua Milli-Q y filtrar con papel Whatman N°1.  
Almacenar en frasco color caramelo a temperatura ambiente.

## Protocolo

1. Tomar una alícuota de los extractos vegetales a analizar.
2. Preparar los tubos con la mezcla de reacción, los blancos y la curva de calibración con los testigos con 150 µl de agua (blanco), solución de patrón (según Tabla 13) o muestra de extracto vegetal y 150 µl de mezcla de reacción con azul de Coomasie.
3. Incubar 5 min a 25°C.
4. Medir la absorbancia a 595 nm en un lector de placas. Si la concentración de la muestra supera a la máxima concentración de la curva se debe hacer una dilución de la muestra y realizar una nueva medición.
5. De la curva con estándares se obtiene una función lineal que relaciona la absorbancia a 595 nm con la concentración de proteína en la mezcla de reacción. Esto permite calcular la concentración de proteína de la muestra, en relación con el peso fresco o peso seco de la muestra o relativizar otras determinaciones al contenido de proteínas.

Tabla 13. Curva patrón con albumina de suero bovino (BSA) para la determinación del contenido de proteínas.

Volumen final 1000 µl.

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

## Referencias

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126
- Arrigoni, O.; De Tullio, M.C. 2000. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *J Plant Physiol* 157(5), 481-488.
- Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power". *The FRAP Assay. Analytical Biochemistry* 239:70–76.
- Beauchamp, C.; Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276-287.
- Bonjoch, N. P.; Tamayo, P. R. 2001. Protein Content Quantification by Bradford Method. In: Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Reigosa, R. M. J. (eds) *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Springer, Dordrecht
- Davis, B. J. 1962. Disc electrophoresis II—Method and application to human serum proteins. *Annals New York Academy of Sciences* 121:404-427.
- Donahue, J. L.; Okpodu, C. M.; Cramer, C. L.; Grabau, E. A.; Alschler, R. G. 1997. Responses of Antioxidants to Paraquat in Pea Leaves (Relationships to Resistance). *Plant Physiol* 113:249-257.
- Feng, X.; Lai, Z.; Lin, Y.; Lai, G.; Lian, C. 2015. Genome-wide identification and characterization of the superoxide dismutase gene family in *Musa acuminata* cv. Tianbaojiao (AAA group). *BMC Genomics*. 16, 823. doi: 10.1186/s12864-015-2046-7
- Foyer, C. H.; Noctor, G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling*; 11: 861-905.
- \*\*\* **García, M.; García, G.; Parola, R.; Maddela, N.R.; Pérez-Almeida, I.; Garcés-Fiallos, F.R. Root-shoot ratio and SOD activity are associated with the sensitivity of common bean seedlings to NaCl salinization. *Rhizosphere* 2024, 29, 100848. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100848>**  
 En este trabajo se evaluó la actividad de enzimas antioxidantes SOD y CAT y niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante tinción en raíces y hojas, en relación con la tolerancia a la salinidad en dos variedades de poroto.
- \*\*\* **Guzzo, M. C.; Costamagna, C.; Salloum, M. S.; Rotundo, J. L.; Monteoliva, M. I.; Luna, C. M. 2020. Morpho-physiological traits associated with drought responses in soybean (*Glycine max* L.). *Crop Science*. doi: 10.1002/csc2.20314 <http://hdl.handle.net/20.500.12123/7945>**

**En este trabajo, se utilizó el CRA como marcador de selección para tolerancia a estrés por sequía en el cultivo de soja, en conjunto con la medición de prolina y clorofilas. Además, se estudió la respuesta antioxidante (enzimática y no enzimática) asociada con la tolerancia a sequía.**

Jonhson, M. (traducción Carbajal A). 2012. Cuantificación de proteínas. Mater Methods 2:115 [https://www-labome-com.translate.google.com/translate/g/method/Protein-Quantitation.html?\\_x\\_tr\\_sl=en&\\_x\\_tr\\_tl=es&\\_x\\_tr\\_hl=es&\\_x\\_tr\\_pto=tc](https://www-labome-com.translate.google.com/translate/g/method/Protein-Quantitation.html?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=tc)

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

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Madamanchi NR, Anderson JV, Alscher RG, Cramer CL, Hess JL. Purification of Multiple Forms of Glutathione Reductase from Pea (*Pisum sativum* L.) Seedlings and Enzyme Levels in Ozone-Fumigated Pea Leaves. *Plant Physiol.* 1992 100,138-145.

MacAdam, J. W.; Nelson, C. J.; Sharp, R. E. 1992. Peroxidase Activity in the Leaf Elongation Zone of Tall Fescue. *Plant Physiol* 99, 872-878.

Mika, A.; Lühthe, S. 2003. Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. *Plant Physiol* 132, 1489-1498.

Mittler, R.; Zilinskas, B.A. 1993. Detection of Ascorbate Peroxidase Activity in Native Gels by Inhibition of the Ascorbate-Dependent Reduction of Nitroblue Tetrazolium. *Analytical Biochemistry* 212, 540-546.

\*\*\* Paredes, J. A.; Guzzo, M. C.; Bernardi Lima, N.; Pérez, A.; González, N. R.; Monguillot, J. H.; Posada, G. A.; Monteoliva, M. I.; Rago, A.; Valetti, L. 2025. *Trichoderma atroviride* LR28 as a potential biocontrol agent against *Thecaphora frezzii* and inductor of biochemical responses in peanut. *Crop Protection* <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2025.107140>

Aquí se evaluó el efecto fisiológico de la aplicación del biocontrolador *Trichoderma atroviride* en plantas de maní. Se asoció la mayor eficiencia de control con cambios en el balance osmótico (prolina) y antioxidante (FRAP).

\*\*\* Paredes, J. A.; Guzzo, M. C.; Monguillot, J. H.; Asinari, F.; Posada, G. A.; Oddino, C. M.; Giordano, D. F.; Morichetti, S. A.; Torres, A. M.; Rago, A. M.; Monteoliva, M. I. 2024. Low water availability increases susceptibility to peanut smut (*Thecaphora frezzii*) in peanut crop. *Plant Pathol.* doi: 10.1111/ppa.13810 <http://hdl.handle.net/20.500.12123/15670>

En este trabajo se evaluó el efecto de la sequía en la incidencia del carbón del maní, y se utilizó el CRA como herramienta de monitoreo de la intensidad de la sequía sufrida por la planta.

\*\*\* Pereyra C, Parola R, Lando AP, Rodriguez M, Martínez-Noël GMA. 2023. High sugar concentration inhibits TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Growth Regul* 42:4309-4323. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10894-w>

En este trabajo se evaluó el efecto de los azúcares en la vía de señalización de TOR y la participación de las ROS. Se realizaron determinaciones de actividades enzimáticas SOD y CAT, zimogramas de SOD, determinación de niveles de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  mediante tinción en plántulas además de niveles de FRAP y MDA.

\*\*\* Rodríguez MS, Muñoz N, Lenardon S, Lascano HR. 2012. The chlorotic symptom induced by Sunflower chlorotic mottle virus is associated with changes in redox-related gene expression and metabolites. *Plant Sci* 196: 107-116. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/10790>

Se analizó el efecto de infecciones virales con SuCMoV en el balance redox de hojas de girasol

**mediendo el contenido de ascorbato reducido y oxidado, así como especies activas del oxígeno, NAD-NADP/H y enzimas y otros compuestos antioxidantes.**

- Saad, N. 2021. Phthalates and Non-Phthalates Plasticizers Disrupt Lipid Metabolism. Uppsala: Uppsala University.
- Sandalio, L. M.; Palma, J. M.; Rio, L. A. D. 1987. Localization Of Manganese Superoxide Dismutase In Peroxisomes Isolated From *Pisum sativum* L. *Plant Science* 51, 1-8.
- Sedmark, J.; Grossberg, J. E. 1977. A rapid, sensitive and versatile assay for proteins using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Anal Biochem* 79, 544-552.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goetze, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Smirnoff, N., Wheeler, G. L. 2000. Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 291–314.
- Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook. Disponible en: [www.piercenet.com/files/1602063\\_PAssayHB\\_122910.pdf](http://www.piercenet.com/files/1602063_PAssayHB_122910.pdf)
- ThermoFisher Scientific inc. 2025. Overview of Protease and Phosphatase Inhibition for Protein Preparation - AR. Available at: <https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/protease-phosphatase-inhibitors.html> (Accessed July 15, 2025).
- Thordal-Christensen, H.; Brandt, J.; Cho, B. H.; Gregersen, P. L.; Rasmussen, S. K.; Smedegaard-Petersen, V.; Collinge, D. B. 1992. cDNA cloning and characterization of two barley peroxidase transcripts induced differentially by the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis*. *Physiol Mol Plant Pathol* 40, 395-409.
- Verma, D., Lakhanpal, N., Singh, K. 2019. Genome-wide identification and characterization of abiotic-stress responsive SOD (superoxide dismutase) gene family in *Brassica juncea* and *B. rapa*. *BMC Genomics* 20, 1–18.
- Yesavage, T. 2023. How to Select the Right Protease Inhibitor. How to Select the Right Protease Inhibitor. Available at: <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/608636-How-to-Select-the-Right-Protease-Inhibitor/> (Accessed July 15, 2025).
- Yemelyanov, V. V.; Lastochkin, V. V.; Prikaziuk, E. G.; Chirkova, T. V. 2022. Activities of Catalase and Peroxidase in Wheat and Rice Plants under Conditions of Anoxia and Post-Anoxic Aeration. *Russian Journal of Plant Physiology* 69, 117.

## 4. INTEGRIDAD DE MEMBRANAS

*Gabriela Pittaro, Mariela Inés Monteoliva, Dolores Ángela Bustos\* y María Carla Guzzo\**

La membrana plasmática de las células vegetales está constituida por una bicapa lipídica y proteínas asociadas. Esta membrana es la barrera biológica entre los espacios intra y extracelular y se la considera el primer sensor de la planta frente a estreses abióticos, por lo cual mantener su integridad es vital. La alteración de la integridad de las membranas celulares puede resultar en perturbaciones e incluso la pérdida total de la función biológica y finalmente en la muerte de la célula.

En condiciones en que se genera estrés oxidativo, puede suceder la peroxidación de lípidos de membranas. Estos cambios pueden alterar la integridad y propiedades fisicoquímicas de la membrana, resultando en cambios en la capacidad de intercambiar solutos con el medio.

La generación de daño oxidativo de membranas puede detectarse por la cuantificación de malondialdehído (MDA), producto de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. El MDA es un marcador ampliamente utilizado y confiable para determinar el nivel de daño de membranas causado por diversos estreses bióticos y abióticos (Morales y Munné-Bosch, 2019).

A su vez, la pérdida de funcionalidad de las membranas biológicas causada por el estrés aumenta su permeabilidad e incrementa la liberación de iones al medio. El aumento de concentración de iones en el apoplasto (provenientes del simplasto), genera cambios en la conductividad que pueden ser cuantificados.

Si bien el análisis de la estabilidad de membranas es el principal marcador de la tolerancia a heladas, también puede ser usada como una medida de la tolerancia a otros estreses de las plantas, tales como sequía, alta temperatura, salinidad.

### 4.1. PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS DE MEMBRANAS

*Mariela Inés Monteoliva y María Carla Guzzo*

#### Fundamento

El malondialdehído (MDA) se forma por autooxidación y degradación enzimática de ácidos grasos poliinsaturados. Este producto secundario de la oxidación de lípidos reacciona con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) a través de una reacción de adición que produce un cromógeno de color rojo-rosado con una absorbancia máxima a 532 nm (Heath y Packer, 1968).

## Consideraciones y limitantes

Dado que se trata de una reacción colorimétrica, existen diversos interferentes para la determinación de MDA como azúcares, antocianinas, polifenoles, entre otros. Esta interferencia puede provenir tanto de compuestos que absorben a la misma longitud de onda de la medición, o de compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (Janero y col., 1999).

También es posible que al calentar la muestra se liberen lípidos que no se encontraban peroxidados inicialmente. Por lo cual es crítico no extender el tiempo de incubación en temperatura.

## Reactivos

- Etanol 80 % v/v o ácido tricloroacético (TCA) 0,1 % p/v

### Mezcla de reacción con TBA

- TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,65 % p/v  
Disolver en TCA 20 % p/v.

### Mezcla de reacción sin TBA

- TCA 20 % p/v

## Protocolo

1. Moler el material vegetal en mortero con nitrógeno líquido, adicionar etanol 80% o TCA 0,1% p/v en proporción (100 mg de tejido fresco: 1000 µl de solvente).
2. Centrifugar el homogenato a 12000 g 15 min a 4 °C y recuperar el sobrenadante.
3. Tomar 200 µl de sobrenadante y agregar 400 µl de la mezcla de reacción con TBA
4. Tomar otros 200 µl de sobrenadante y agregarle 400 µl de la mezcla de reacción sin TBA
5. Incubar ambas mezclas 25 min a 95 °C. Frenar la reacción poniendo los tubos en hielo. En lo posible hacer cada muestra por triplicado.
6. Mezclar con vórtex, hacer un spin (12000 g 1 min) con precaución ya que, si los tubos están muy llenos, al agitarlos vigorosamente, acumulan presión y se abren.
7. Leer la absorbancia a 440, 532 y 660 nm.

## Cálculos

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

$$MDA \text{ [nmoles/ ml]} = \frac{(A - B)}{156000} \times 10^6$$

Los términos A y B se calculan según los siguientes cálculos:

$$A = (A_{532+TBA} - A_{600+TBA}) - (A_{532-TBA} - A_{600-TBA})$$

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

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

El resultado obtenido de los cálculos previos está expresado en nmoles/ ml. A partir de esos valores, calcular los mg de peso fresco o seco que hay en 1 ml de extracto para expresar como nmoles o μmoles /g o mg de peso fresco. También puede expresarse de forma relativa peso seco o contenido de proteínas de la muestra.

Haciendo una curva de calibración de sacarosa con TBA y midiendo a 440 nm se puede obtener una aproximación del contenido de azúcares solubles de las muestras (Hodges y col., 1999; Assaker y Rima, 2018).

## 4.2. PERMEABILIDAD DE MEMBRANAS

Gabriela Pittaro y Dolores Ángela Bustos

### Fundamento

La pérdida de funcionalidad de las membranas biológicas debido al estrés oxidativo aumenta su permeabilidad a diversas moléculas, incrementando la liberación de iones al medio extracelular. Al incrementarse la concentración de iones en el medio, aumenta la conductividad.

Así puede evaluarse la pérdida de funcionalidad de las membranas biológicas como cambios relativos en la conductividad del medio en presencia de la muestra vegetal. Este valor se expresa en relación con la máxima conductividad obtenida con un daño de membrana totalmente dañadas. Este máximo se obtiene experimentalmente exponiendo a la muestra a altas temperaturas (Dexter, 1956).

### Consideraciones y limitantes

Al poner a punto la técnica, es necesario determinar la relación óptima de tejido y de volumen de agua que permita realizar las mediciones. Esto dependerá del calibre del electrodo que posea el instrumento a utilizar y del recipiente en donde se realizará el ensayo.

Por otra parte, es importante medir la conductividad siempre a la misma temperatura para evitar sesgos en las mediciones.

## Protocolo

1. Cortar las hojas o discos de hoja (área foliar entre 15 y 25 cm<sup>2</sup>).
2. Lavar 3 veces con agua Milli-Q o desionizada para eliminar los electrolitos liberados debido al corte del tejido. No dejar que se deshidraten antes de sumergir en el líquido del ensayo.
3. Colocar cada hoja en un tubo de Khan con 10-20 ml de agua Milli-Q.
4. Incubar 24 h a temperatura ambiente (25 °C) en oscuridad.
5. Medir la conductividad eléctrica (Ci).
6. Calentar 100 °C durante 30 min en un baño termostatzado (o autoclavar 121 °C por 15 min).
7. Enrasar nuevamente con agua Milli-Q en caso de que haya disminuido el volumen inicial.
8. Esperar que la temperatura se establezca nuevamente en 25 °C. Medir la conductividad eléctrica (Cf).

## Cálculos

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

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

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

Donde T y C son los valores de conductividad inicial (i) y final (f) de los materiales en los tratamientos (T) y en control (C).

La relación (Tf-Ti) / Tf indica la proporción de retención de electrolitos en el tejido.

## Referencias

- Assaker, K.; Rima, J. 2018. A New Spectrophometric Method for the Analysis of Fructose, Glucose and Sucrose, Using 2-Thiobarbituric Acid and Zero-Valent Iron Powder (ZVIP). *Journal of Food Research* 8, 2.
- Bajji, M.; Kinet, J. M.; Lutts, S. 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant growth regulation* 36, 61-70.
- Blokhina, O. B.; Fagerstedt, K. V.; Chirkova, T. V. 1999. Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxic reaeration. *Physiol Plant* 105, 625-632.
- Blum, A.; Ebercon, A. 1981. Cell Membrane Stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci* 21, 43-47.
- Dexter, S T. 1956 Evaluation of crop plants for winter hardiness. *Adv Agron* 8:203 – 209.
- Du, Z.; Bramlage, W. J. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J Agric Food Chem* 40, 1566-1570.

- \*\*\* Guzzo, M. C.; Costamagna, C.; Salloum, M. S.; Rotundo, J. L.; Monteoliva, M. I.; Luna, C. M. 2020. Morpho-physiological traits associated with drought responses in soybean (*Glycine max* L.). *Crop Science*. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/7945>  
Se caracterizó la respuesta antioxidante en sequía de dos materiales de soja contrastantes en su tolerancia. Se observaron diferencias significativas en capacidad antioxidante no enzimática (FRAP), en actividades de APX, SOD y CAT y en daño de membranas, asociados a la tolerancia.
- Heath, R. L.; Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125, 189-198.
- Hodges, D. M.; DeLong, J. M.; Forney, C. F.; Prange, R. K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604-611.
- Janero DR. 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9, 515-540.
- \*\*\* Luna, F.; Aguirre, A.; Pittaro, G.; Bustos, D.; Ciacci, B.; Taleisnik, E. 2016. Nutrient deficiency and hypoxia as constraints to *Panicum coloratum* growth in alkaline soils. *Grass and Forage Science* 4, 640-653.  
Se evalúa el MDA en *Panicum coloratum* en condiciones de estrés alcalino, sin diferencias entre las hojas de plantas cultivadas a pH 9 que a pH 7, excepto en anegamiento.
- Mansour, M. M.; Salama, K. H. 2004. Cellular Basis of Salinity Tolerance in Plants. *Environ Exp Bot* 52, 113-122.
- Morales, M.; Munné-Bosch, S. 2019. Malondialdehyde: Facts and Artifacts. *Plant Physiol* 180, 246-1250.
- \*\*\* Perez-Borroto, L. S.; Guzzo, M. C.; Posada, G. y col., 2022. A brassinosteroid functional analogue increases soybean drought resilience. *Sci Rep* 12, 11294. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/12288>  
Se analizó el contenido de MDA y capacidad antioxidante en plantas de soja a las cuales se les aplicaron brasinosteroides como inductor de protección contra la sequía.
- \*\*\* Pittaro, G.; Cáceres, L.; Bruno, C.; Tomás, A.; Bustos, D.; Monteoliva, M.; Ortega, L.; Taleisnik, E. 2016. Salt tolerance variability among stress-selected *Panicum coloratum* cv. Klein plants. *Grass and Forage Science*, 71: 683-698. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/4694>  
Este trabajo evalúa la tolerancia a salinidad de cultivares de *P. coloratum* mediante parámetros fisiológicos potencialmente asociados a dicha tolerancia (fijación de C, fluorescencia de clorofilas, sacarosa, prolina y glicina betaína, concentración de Na y K).

## 5. DEPOSICIÓN DE CALOSA

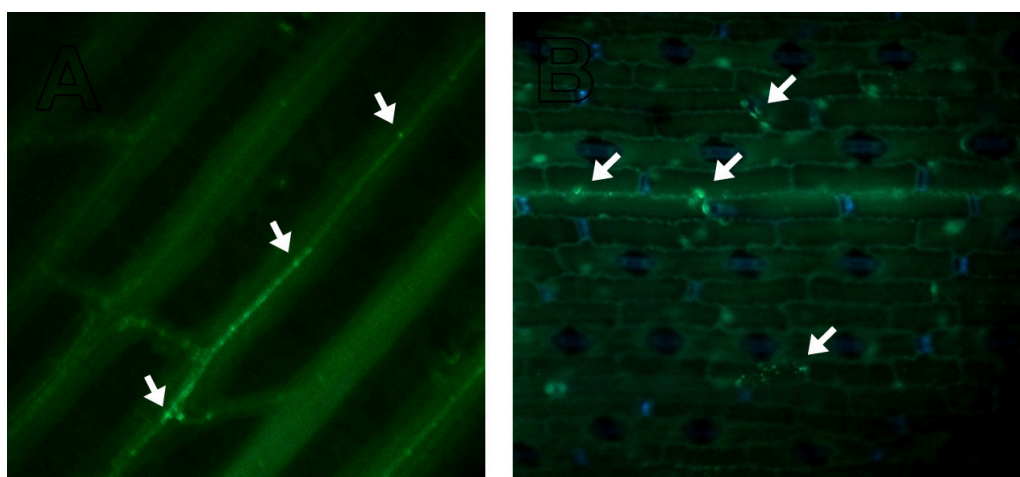
*Leandro Ismael Ortega*

### Fundamento

La callosa o calosa ( $\beta$ -1,3-glucano) es un componente tanto estructural como funcional de la pared celular de plasmodesmos y vasos de floema (Amsbury y col., 2017). Su acumulación en estas estructuras regula la difusión de moléculas entre órganos y células vegetales y sirve como respuesta de defensa primaria contra la invasión de patógenos, especialmente fúngicos.

Desde su descubrimiento, el método de tinción fundamental para calosa ha sido el de la anilina azul, empleada para visualizarla en la pared de tubos polínicos, microsporocitos, placa celular, elementos de tubos cribosos, papilas típicas de patrones moleculares asociados a patógenos y plasmodesmos (Keinath y col., 2010, Figura 3).

La anilina comercial es una mezcla heterogénea de varios componentes, pero lo que le da su especificidad es un fluorocromo, el sirofluor, cuyo máximo de excitación está alrededor de 380 nm y la emisión máxima se sitúa alrededor de los 495 nm. La interacción de éste con los  $\beta$ -1,3-glucanos, amplía su espectro de emisión hacia los 550nm lo que se puede observar como una fluorescencia turquesa o hasta amarilla en algunos casos. El protocolo aquí descrito es una adaptación del desarrollado por Zavaliev y Epel (2014).



**Figura 3.** Depósitos de calosa en mesófilo (A) y epidermis (B) de hojas de trigo infectadas con Mal de Río Cuarto. Imágenes propias L. O.

## Consideraciones y limitantes

El material puede ser fresco, pero lo ideal es recolectarlo y fijarlo con anterioridad, teniendo la precaución de no provocar heridas o un estrés extra que pueda generar artefactos. Para una fijación rápida y efectiva, siempre conviene usar recipientes que permitan usar un volumen de fijador correspondiente al doble o triple de lo que ocupa el material a sumergir. La solución fijadora puede ser tanto etanol 96°, como FAA (formaldehído: etanol: ácido acético: agua en proporción 10:50:5:35 v/v) o solución de Carnoy. Dependiendo de la dureza y cantidad de material, se deja incubando a temperatura ambiente o a 5°C, durante dos días como máximo. Luego se recomienda pasar a EtOH 70% para conservar hasta el momento de la tinción.

La automatización del análisis de imágenes con ImageJ, dependerá en gran medida del tipo de material y la forma de los depósitos de calosa que se observen. Puede ser engorrosa en el caso de que los depósitos tengan formas irregulares o sean muy tenues. En ese caso habrá que realizar los análisis imagen por imagen, pero se puede estar seguro de que la tinción es específica.

## Reactivos y materiales

NOTA: Agua Milli-Q o bidestilada para todos los lavados

### Solución de clarificado

- SDS 1 % p/v
- NaOH 0,83 % p/v.
- Hipoclorito de sodio, 25% v/v (2,5% Cl<sup>-</sup> activo).
- Tween-20 0,01% (v/v).

### Solución de tinción

- Anilina Azul (Methyl Blue; Sigma 95290) 0,01% (p/v)  
Disolver en fosfato de sodio 0,01 M pH 12,0 (ver Anexo 9.3).  
Disolver y filtrar con Millipore 0.45 mm.  
Guardar a temperatura ambiente protegido de la luz.

NOTA: Dejar reposar por un mínimo de 48 h antes de usar: la solución pasa de un color azul violáceo a amarillo brillante, que es la apta para tinción de calosa.

## Protocolo

### Tinción de la muestra

1. Enjuagar las muestras brevemente con agua Milli-Q o bidestilada y pasar a tubos de ensayo con la solución de clarificado.
2. Dejar incubando toda la noche, a temperatura ambiente.

3. Enjuagar con agua Milli-Q. Incubar en solución de hipoclorito de sodio, hasta que el material quede completamente transparente. Dependiendo del grosor del material, esto puede llevar entre media o cuatro horas.  
 NOTA: si la fuente de hipoclorito es lavandina comercial con algunos meses de uso, el % de Cl<sup>-</sup> activo seguramente será menor al 2,5 %. En este caso conviene usarla más concentrada.
4. Colocar los especímenes en una superficie bien plana y cortar segmentos de 5 mm de lado aprox.  
 NOTA: Es importante comparar las mismas zonas (de la hoja, la misma hoja, etc.) entre plantas control y tratadas.
5. Incubar las muestras en solución de Tween-20 0,01% entre 30 min y 1 h con agitación lenta (o hasta que todos los segmentos estén bien sumergidos, esto es indicador de una buena saturación).
6. Remover los segmentos con ansa o espátula. Transferir las muestras a tubos con la solución de tinción. Envolver en papel de aluminio para proteger de la luz.
7. Infiltrar con vacío por 10 min, seguido de una lenta liberación de la presión.
8. Mantener las muestras en la solución de tinción por 1 h a temperatura ambiente con agitación.
9. Enjuagar brevemente con agua bidestilada para remover el exceso de anilina.
10. Montar las muestras con glicerol al 50% v/v para su análisis y registro de imágenes. En el caso de tejido foliar, es mejor montar las muestras entre dos cubreobjetos grandes (en lugar de porta y cubreobjetos). Esto permite rotar la muestra y observar ambas epidermis en el mismo preparado.

### **Observación al microscopio de epifluorescencia o confocal**

1. En un microscopio confocal Nikon Eclipse Csi en modo estándar, excitando con un láser diodo 405 nm al 20 % de potencia, se registran las señales de los canales azul y verde (filtros de emisión BP 450/35 y 515/30, respectivamente).
2. Ajustar la ganancia de los fotomultiplicadores para evitar la sobresaturación de señal, solo en los depósitos de calosa. Ignorar estructuras como estomas o tricomas que tienden a saturar la señal en estos canales.
3. Ajustar los parámetros de escaneo de la imagen definitiva como sigue: tamaño de marco 1024 × 1024 dpi ó ppp (puntos por pulgada); tiempo de residencia láser 8 ms; profundidad de pixel de 8 bit.  
 OPCIONAL: promedio de escaneo 3 (*scanning averaging*); zoom 1X.
4. Ajustar la apertura del *pinhole* entre 10-12 unidades de Airy (las unidades en mm reales dependerán del microscopio y el objetivo que use, pero puede estar entre 100 y 150 mm).
5. Tomar demasiadas imágenes de un mismo espécimen, es innecesario y erróneo. Se recomienda recolectar muchas muestras y registrar pocas imágenes representativas de cada una para una mayor robustez estadística.
6. Guardar o exportar las imágenes en un formato que no pierda la información de pixeles, tal como TIFF, formato RGB.

## Análisis de imágenes

Se requiere un software de análisis de imágenes como el FIJI (versión 1.47a en adelante) el cual es una versión del programa de código abierto, ImageJ para datos de imágenes multidimensionales (<https://imagej.net/software/fiji/downloads>).

1. Abrir el programa FIJI, ir a *File>Open* y elegir la imagen de interés. En la ventana de *Bio-formats Import*, elegir el modo Color: “Custom” y activar la opción “Split channels”.
2. En la ventana de colorización, controlar que las configuraciones RGB coincidan con los canales que se están abriendo. En nuestro caso son: Channel 0 (Blue), Channel 1 (Green), Channel 2 (Red), Channel 3 (Gray).
3. En la imagen del canal verde, ir a *Process > Subtract Background*. En el menú emergente ingresar un valor para *Rolling ball radius* (30 por ejemplo). Elegir *Preview* para ver el resultado. Asegurarse de que todas las otras opciones NO estén seleccionadas y hacer clic en OK.
4. Duplicar la imagen: ir a *Image > Duplicate*. El programa asigna automáticamente un nuevo nombre al duplicado. Seleccionar “OK”. Se abrirá la imagen duplicada que se usará para reducir de ruido y ajustar del umbral, que definirán las regiones de interés (ROI). Dejar la imagen original abierta.
5. Reducción de ruido: ir a *Process > Filters > Mean*. En el menú emergente ingresar un valor de radio (3, por ejemplo). Seleccionar *Preview* para ver el resultado y luego OK.
6. Umbral de imagen: Ir a *Image > Adjust > Auto Local Threshold*. En el menú emergente elegir el método “Bernsen,” e ingresar un valor de radio (10, por ejemplo). Dejar los *Parameter 1* y *2* con valor cero.
7. Activar la opción *White objects on black background*. Seleccionar OK.
8. Usando el comando deshacer (Ctrl + Z) redefinir el radio del umbral hasta obtener una representación satisfactoria de los depósitos de calosa. La imagen “umbralizada” ahora es binaria y consiste solamente de los ROI (tanto relevantes como irrelevantes), apareciendo como objetos blancos (valor de gris de píxel = 255) sobre el fondo negro (0).

## Referencias

- Amsbury, S.; Kirk, P.; Benitez-alfonso, Y. 2017. *Emerging models on the regulation of intercellular transport by plasmodesmata-associated callose*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx337>
- Keinath, N. F.; Kierszniowska, S.; Lorek, J.; Bourdais, G.; Kessler, S. A.; Shimamoto-Asano, H.; Grossniklaus, U.; Schulze, W. X.; Robatzek, S.; Panstruga, R. 2010. PAMP (Pathogen-associated Molecular Pattern)-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity. *Journal of Biological Chemistry* 285, 39140–39149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.160531>
- Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J. Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Zavaliev, R.; Epel, B. L. 2014. Imaging Callose at Plasmodesmata Using Aniline Blue: Quantitative Confocal Microscopy. In M. Heinlein (Ed.), *Plasmodesmata: Methods and Protocols* 1217, 1–346). Springer Science+Business Media. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1523-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1523-1_7)

## 6. AJUSTE OSMÓTICO

*Paula Catalina Maritano, Leandro Ismael Ortega, María Carla Guzzo, Marianela Soledad Rodriguez\**

El ajuste osmótico es un mecanismo de acumulación de compuestos osmóticamente activos en el simplasto que permite disminuir el potencial osmótico y mantener la turgencia celular en condiciones de estrés abiótico.

Este mecanismo consiste fundamentalmente en ajustar los equilibrios iónicos y osmóticos para mantener la turgencia celular mediante la síntesis de osmoprotectores, osmolitos o solutos compatibles, permitiendo mantener la capacidad metabólica, crecimiento y la supervivencia. Sin embargo, tanto la síntesis como la acumulación activa de osmolitos, tiene un costo energético alto que puede resultar perjudicial a largo plazo.

El ajuste osmótico ocurre mediante la biosíntesis de osmolitos, compuestos orgánicos solubles de bajo peso molecular, y la acumulación de iones, principalmente  $K^+$ .

Debido a la sensibilidad de las enzimas a altas concentraciones de ciertos iones, como el  $Na^+$ , su almacenamiento durante el ajuste osmótico se produce mayormente en la vacuola. En cambio, en el citoplasma se acumulan solutos osmocompatibles que no afectan la funcionalidad de macromoléculas celulares. Entre estos osmolitos compatibles se encuentran polialcoholes (azúcares), metilaminas, aminoácidos libres y sus derivados.

A continuación, presentamos algunos métodos para la determinación de algunos compuestos osmocompatibles: prolina, azúcares, e iones.

### 6.1. PROLINA

*Paula Catalina Maritano, María Carla Guzzo, Marianela Soledad Rodriguez*

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

La acumulación citosólica de prolina reduce el potencial hídrico intracelular y se ha propuesto que también protege a las proteínas del daño que ocurre en condiciones que generan deshidratación. Además, se ha propuesto que la acumulación de prolina, y la consecuente alteración de su metabolismo durante el estrés, podría afectar la provisión de energía, la redistribución de compuestos reducidos entre distintas localizaciones subcelulares alterando el estado redox y afectando la supervivencia de la planta.

Por otra parte, durante la recuperación del estrés, la prolina acumulada sufre de potencial reductor y electrones para generar energía y esqueletos carbonados, contribuyendo a restablecer el funcionamiento celular y promover el crecimiento del organismo.

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

## Fundamento

Bates y col. (1973) describieron una técnica colorimétrica relativamente simple para medir prolina libre en tejidos vegetales. El método se basa en la reacción entre la ninhidrina y los aminoácidos. La ninhidrina es un potente oxidante que produce la desaminación oxidativa del grupo, liberando amonio, el aldehído correspondiente y ninhidrina en forma reducida. El amonio liberado reacciona con un mol adicional de ninhidrina y con la ninhidrina reducida, formando así un complejo coloreado.

Para la mayoría de los aminoácidos, este complejo tiene un color púrpura con un máximo de absorción a 570 nm, siendo dicha absorción casi una función lineal de la cantidad de grupos amino presentes en la solución. Por lo tanto, esta reacción es muy conveniente para la determinación colorimétrica cuantitativa de aminoácidos. Sin embargo, la prolina es un iminoácido (grupo amino parcialmente sustituido), por lo cual la reacción con la ninhidrina produce un complejo coloreado amarillo cuyo máximo de absorción está próximo a los 440 nm (Maler y Cordes, 1971), o rojo a pH bajo. El rango de detección del método se considera entre 0,1 y 36 moles (prolina libre) por g de peso fresco de tejido vegetal (Bates y col., 1973).

### Consideraciones y limitantes

Siguiendo la base de esta reacción colorimétrica, varios autores han realizado diferentes modificaciones en función del tipo de estrés, material utilizado (especie y tejido), posible interferencia de varios reactivos o considerando la necesidad de pretratamientos.

La cantidad mínima de tejido necesaria para la detección de prolina en condiciones control debe ser ajustada, dado que en numerosas especies el contenido basal en tejidos no estresados es muy bajo. Además, varía con la edad del tejido.

Algunos amino- e imino-ácidos pueden interferir en la cuantificación de prolina (ornitina, ácido pipercolico, hidroxiprolina), pero usualmente en plantas estresadas la concentración de estos interferentes es mucho menor que la prolina, por lo que la interferencia se considera despreciable.

Por otro lado, algunos compuestos, como las antocianinas, pueden interferir directamente en la medición, sin embargo, muchos de estos compuestos pueden ser removidos por la extracción con tolueno (Bates y col., 1973) o benceno (Troll y Lindsey, 1955).

Excepcionalmente (por ejemplo, en la mutantes o transgénicas del metabolismo de prolina), el intermediario de la síntesis y degradación de prolina pirrolina-5-carboxilato (P5C) puede reaccionar con ninhidrina distorsionando la medición. Miller y col. (2009) realizan un exhaustivo análisis de esta interferencia.

Debido a los riesgos asociados al uso de tolueno, Shabnam y col., (2016) ajustó un protocolo para evitar su uso, en una medición directa del cromóforo de prolina-ninhidrina. Se recomienda validar el método comparando la cuantificación con y sin tolueno en el sistema experimental que se trabaje y así validar la ausencia de interferentes que alteren la cuantificación.

## Reactivos

- Ninhidrina ácida 2,5 % p/v.  
Diluir en ácido acético glacial: ácido ortofosfórico 6 M, 3:2 v/v.  
Calentar hasta disolver. Conservar a 4 °C, por hasta dos semanas.
- Ácido sulfosalicílico 3% (p/v)
- Ácido orto-fosfórico 6 M
- Ácido acético glacial (96% v/v)
- Prolina 100 mM.  
Conservar a -20°C, en alícuotas (no congelar y descongelar repetidamente).

## Protocolo

1. Moler el material vegetal en mortero con nitrógeno líquido, fraccionar en un microtubo y adicionar el ácido sulfosalicílico en proporción 1:5 (20 mg de tejido fresco: 100 µl de ácido sulfosalicílico). Se recomienda utilizar entre 50 y 100 mg de tejido fresco.  
NOTA: El ácido sulfosalicílico contribuye a la precipitación de las proteínas del extracto vegetal.
2. Agitar vigorosamente (con vórtex).
3. Centrifugar 10 min a 13000 g a 4 °C.
4. Recuperar 100 µl de sobrenadante en un tubo nuevo y agregar 100 µl de ácido sulfosalicílico 3 % (p/v), 200 µl de ninhidrina ácida 2,5 % (p/v) y 200 µl de ácido acético glacial. En paralelo, preparar la curva de calibración de prolina (según Tabla 14) y el blanco con ácido sulfosalicílico. Se recomienda hacer las mediciones por triplicado.  
PRECAUCION: No las proporciones entre extracto: ácido sulfosalicílico: ninhidrina: ácido acético.
5. Agitar bien e incubar 1 hora a 95 °C. Hacer orificios muy pequeños para que no se abran los tubos y no se evapore la solución.
6. Enfriar en hielo.  
NOTA: Si se desea realizar la determinación con el agregado de tolueno, continuar el protocolo (pasos 7 a 9). Para realizar las determinaciones sin tolueno, continuar directamente en el paso 9.
7. Agregar 600 µl de tolueno (o volumen proporcional, 1:1 mezcla de reacción: tolueno).
8. Agitar vigorosamente y dejar que las fases se separen (esperar aproximadamente 1 min, o dar un spin en la centrífuga).
9. Tomar la fase superior (fase de tolueno rojo-rojizo) y colocar en tubos nuevos. Se puede diluir con tolueno si está fuera del rango de linealidad.
10. Medir en cubetas de cuarzo a 520 nm.

## Curva de calibración

En cada medición preparar diluciones por duplicado desde 0,01 mM hasta 1 mM (dependiendo del rango de medición del espectro), según la Tabla 14.

**Tabla 14.** Concentración y volúmenes para preparar la curva patrón de prolina.

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

## 6.2. AZÚCARES SOLUBLES TOTALES POR ANTRONA

*Paula Catalina Maritano, Marianela Soledad Rodríguez*

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

### Fundamento

Entre los métodos más utilizados para la determinación del contenido de azúcares en tejidos vegetales se encuentra la reacción con antrona. En esta reacción, el ácido sulfúrico concentrado hidroliza enlaces glucosídicos para producir monosacáridos que pueden ser luego deshidratados produciendo furfural y sus derivados. Estos productos reaccionan luego con antrona (9,10 dihidro-9-oxoantraceno) dando un complejo azul-verdoso. El resultado refleja los azúcares solubles totales.

Esta es una prueba general para hidratos de carbono, con una sensibilidad de 3  $\mu\text{g/ml}$ .

### Consideraciones y limitantes

En el ensayo de antrona no se diferencian azúcares monoméricos reductores de no reductores.

La reacción puede realizarse en un extracto con buffer HEPES, pero también a partir de una extracción alcohólica (etanol 80%; 80°C) o con metanol/clorofor-mo/agua.

## Reactivos

### Buffer de extracción

- Buffer HEPES–KOH 50 mM pH 8,3 (diluir del stock, ver Anexo 9.4)
- EDTA 2 mM (ver Anexo 9.7)
- EGTA 2 mM (ver Anexo 9.8)
- $MgCl_2$  1 mM
- DTT 2 mM

### Reactivo de antrona

- Antrona 0,1% p/v.  
Disolver en ácido sulfúrico 72% v/v.  
Conservar protegido de la luz a 4°C, para mantener su estabilidad por hasta 3-4 días.

Se recomienda preparar soluciones de stock para el buffer de extracción, a las concentraciones siguientes:

- HEPES–KOH 500 mM pH 8,3 (ver Anexo 9.4)
- Cloruro de magnesio 10 mM (10X)  
Conservar a -20°C

## Protocolo

1. Moler el material vegetal en mortero con nitrógeno líquido, adicionar buffer de extracción en proporción 1:10 (50 mg de tejido fresco: 500 µl de buffer de extracción).  
NOTA: La extracción se puede realizar directamente con etanol 80% en la misma proporción que el buffer de extracción (1:10) y calentar 20 min a 80°C.
2. Centrifugar 30 min a 13.000 g a 4°C.
3. En paralelo, preparar la curva de calibración con glucosa (10-100 µg/ml), según la Tabla 15. No olvidar el blanco con buffer de extracción o el solvente utilizado.
4. Recuperar el sobrenadante para determinar el contenido de azúcares. El pellet puede usarse para determinar el contenido de almidón.
5. Tomar 0,5 ml de sobrenadante y agregar 1 ml de solución de antrona 0,1 % p/v\*\*. Mantener en hielo.  
**\*\*PRECAUCIÓN:** la reacción del reactivo de antrona con la muestra es exérgica por lo que se debe agregar el reactivo lentamente y con cuidado. Además, el reactivo de antrona es muy viscoso, especialmente cuando está frío.
6. Mezclar y calentar por 5 min a 100°C y enfriar rápidamente en hielo.
7. Leer la absorbancia a 620 nm por triplicado, contra el blanco, dentro de la hora siguiente. Los volúmenes pueden variar dependiendo el volumen final de la reacción.

**Tabla 15.** Concentración y volúmenes para preparar la curva de calibración

Concentración de glucosa ( $\mu\text{g/ml}$ )	Glucosa 1 mg/ml ( $\mu\text{l}$ )	Buffer de extracción ( $\mu\text{l}$ )
Blanco	0	500
20	10	490
40	20	480
60	30	470
80	40	460

### 6.3. OLIGOSACÁRIDOS SOLUBLES POR HPLC

*Leandro Ismal Ortega*

#### Fundamento

El desarrollo de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés), significó un importante avance a las técnicas colorimétricas clásicas que sólo permitían estimar cantidades “a granel” de azúcares totales o reductores que necesitaban volúmenes de extracciones alcohólicas de varios mililitros. En general, esos resultados son expresados como equivalentes de algún azúcar estándar puro, como glucosa o sacarosa. Si había algún cambio en la concentración de un azúcar puntual entre tratamientos dentro de la gran familia de polisacáridos extraídos, éste podía pasar totalmente desapercibido.

El HPLC permite separar cada azúcar individual por el principio de afinidad selectiva entre sustrato (llamado fase estacionaria) y solvente (la fase móvil). Esto permite analizar apenas unos microlitros de extracto e identificar diversos azúcares en una sola corrida.

Una vez inyectada la muestra en el equipo, pasa a alta presión a través de una resina que retiene los distintos tipos de azúcares con diferente grado de afinidad, provocando su separación y posterior detección conforme son arrastrados por el solvente. Esto hace posible la identificación y cuantificación secuencial de varios azúcares, a partir de un mismo extracto y con una sensibilidad en el rango nanomolar.

Esto la convierte en una técnica sumamente valiosa tanto para estudios fisiológicos como para programas de mejoramiento a gran escala que precisan evaluar un gran número de plantas, en un corto período de tiempo.

Numerosos protocolos se han desarrollado para determinar azúcares en distintos tipos de extractos vegetales. El que aquí presentamos está basado en el de Giannoccaro y col., (2006) quienes investigaron las condiciones óptimas de temperatura, tiempo de extracción, relación solvente a muestra, y tamaño de muestra, para determinar la cantidad y tipo de oligosacáridos en harina de soja sin desgrasar. Posteriormente Hou y col., (2009) adaptaron el método para volúmenes menores y en el CIAP la ajustamos con éxito para determinar oligosacáridos solubles a partir de extractos alcohólicos de material foliar.

## Consideraciones y limitantes

Utilizar agua de extrema pureza. Se recomienda usar agua Milli-Q para todas las soluciones.

Si las muestras a extraer no son procesadas de inmediato, deben conservarse a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## Reactivos

- Acetonitrilo puro y al 75 % (grado de pureza 99 %)
- Etanol 10 % y 80 % v/v (grado de pureza 98 %)
- Filtros de Nylon 0,2  $\mu\text{m}$
- Estándar mezcla de sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa, trealosa, rafinosa y estaquiosa (cada una en concentración 10 mg/mL)
- Agua Milli-Q

## Protocolo

### Pasos iniciales para harinas de grano

1. Moler aprox. 40 g de granos en un molinillo para café o dispositivo similar (molinillo comercial: 4 pulsos de 15s).
2. Pesar 200 mg del pulverizado por duplicado. Disolver uno de los duplicados en 2 ml de etanol 10 % y continuar con el paso 3. Llevar el otro duplicado a estufa de secado para deshidratar toda la noche. El peso de este se usará para referir el contenido al peso seco del material.

### Pasos iniciales para tejido foliar

1. Moler 200 mg del material congelado por duplicado con un poco de etanol 80 %.
2. Trasvasar a un tubo de microcentrífuga de 2 ml y terminar de disolver y enrasar con etanol 80 %.
3. Incubar a  $30^{\circ}\text{C}$  con agitación durante 30 min.
4. Centrifugar 10 min a 20.000 g y rescatar 500  $\mu\text{l}$  de sobrenadante en tubos de microcentrífuga de 2 ml.
5. Agregar lentamente 1 ml de acetonitrilo 100% y dejar 30 min a  $25^{\circ}\text{C}$ .
6. Centrifugar 15 min a 20000 g.
7. Recuperar 500  $\mu\text{l}$  y evaporar en bloque térmico a  $80^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Puede ser menos tiempo. El objetivo es obtener un residuo apenas húmedo, no calcinado.
8. Resuspender en 250-500  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo 75%.  
El volumen dependerá de la comodidad para filtrar en el paso siguiente y/o la concentración de los azúcares de interés.
9. Filtrar con filtro de Nylon 0,2  $\mu\text{m}$ , transferir a los viales de HPLC y llevar al equipo. Se puede congelar si no se va a medir en el día.

## Condiciones de corrida

El protocolo fue ajustado para un HPLC Shimadzu A20 con horno e inyector automático de capacidad máxima de 100 µl y un detector de índice de refracción RID A10.

La columna usada al momento de ajustar la técnica fue una Luna NH<sub>2</sub> Phenomenex (25 x 4 cm, 5 µm) pero cualquiera de resina amino como fase estacionaria servirá.

La fase móvil es acetonitrilo:agua (80:20 v/v) a una tasa de flujo isocrático de 3 ml/min.

Temperatura: 40 °C

Tiempo de corrida de referencia: 25 min.

NOTA: Este tiempo puede variar dependiendo de los azúcares presentes en la muestra. Esto debe determinarse en ajustes previos. Es importante tener en cuenta que la columna separará todos los oligosacáridos presentes en la muestra hasta el último que pueda retener, más allá de que nos interese o no analizarlos. Entonces puede ocurrir que, si la muestra posee un pentasacárido como verbascosa, ésta saldrá a tiempos cercanos a los 30 minutos. Si el cromatograma se finaliza antes de que este azúcar haya eluído completamente y se empieza otro cromatograma, entonces esa cantidad remanente del cromatograma anterior puede aparecer, o provocar "picos fantasmas" al comienzo o la mitad del cromatograma que acaba de iniciar. De ahí la importancia de hacer pruebas preliminares para registrar todos los picos de oligosacáridos que aparecen en corridas a tiempos largos, de no más 35 minutos por lo general y realizar fases de lavado de la columna entre distintas muestras.

## 6.4. IONES SOLUBLES POR HPLC

*Leandro Ismael Ortega*

El mantenimiento de la homeostasis iónica es crucial para el normal crecimiento de las plantas. Así es como en condiciones de estrés salino, una de las primeras alteraciones más evidentes a nivel celular, se observa en la proporción entre los iones Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Este último catión es esencial para el crecimiento y el desarrollo, y la inhibición de su absorción puede conducir a una menor productividad e incluso a la muerte de la planta. La selectividad de K<sup>+</sup>, el intercambio K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> y la reabsorción de Na<sup>+</sup> en tejidos, también han sido extensamente estudiados en numerosas especies para evaluar su tolerancia a la salinidad.

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

### Fundamento

Como con los azúcares, este es otro ejemplo del avance en versatilidad y sensibilidad que significó el HPLC, en este caso frente a las técnicas analíticas clásicas de fotometría de llama o bulbos de conductimetría, que necesitaban varios mililitros de extracto acuoso.

En el HPLC iónico, se utilizan columnas empaquetadas con resinas de intercambio iónico, catiónicas o aniónicas dependiendo del tipo de ion a analizar, que solo precisan unos microlitros de extracto. Al interactuar con la resina, los iones se separan de acuerdo con su llamado “tamaño de solvatación” con el solvente que provoca que los iones de mayor peso molecular presenten una mayor superficie de interacción con las cargas de la resina, siendo retenidos con más fuerza por ésta y saliendo más tarde en la corrida como consecuencia.

### Consideraciones y limitantes

Debe utilizarse agua deionizada de extrema pureza, por eso se recomienda usar agua tipo Milli-Q para todas las soluciones.

Si las muestras a extraer no son procesadas de inmediato, se pueden conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$  o menor temperatura.

### Reactivos

- Agua Milli-Q.
- Filtros de Nylon  $0,2\ \mu\text{m}$
- Acido oxálico  $3\ \text{mM}$   
Filtrado y desgasificado en el momento.
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$   $3,6\ \text{mM}$
- Filtrado y desgasificado en el momento
- Estándares de iones recomendados:
  - Multielement Ion Chromatography Cation Standard Solution (TraceCERT, Supelco 89316)
  - Multielement Ion Chromatography Anion Standard Solution (TraceCERT, Supelco 89886)

### Protocolo

1. Moler el material vegetal en mortero con nitrógeno líquido, adicionar agua Milli-Q en proporción 1:20 (100 mg de tejido vegetal: 2000  $\mu\text{l}$  de buffer). Se recomienda usar entre 10 y 100 mg de tejido. En paralelo, procesar un tubo con agua Milli-Q sola como blanco y control de niveles de traza de iones.
2. Agitar en vórtex por 15 min.
3. Centrifugar a  $>3000\ \text{rpm}$  por 10 min para obtener un buen pelet.
4. Separar el sobrenadante y filtrar (filtro de Nylon  $0,22\ \mu\text{m}$  de diámetro de poro) directamente en los viales de HPLC si va a realizar la corrida en el momento. En caso contrario, coleccionar el filtrado en viales y conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$  (si no hay cambios de temperatura accidentales se puede guardar indefinidamente). El día de la medición, descongelar en la mesada a temperatura ambiente y pasar luego directamente a los viales del HPLC.

## Condiciones de corrida

El equipo es un HPLC Shimadzu A20 con horno e inyector automático de capacidad máxima 100ul.  
Detector: Conductímetro.

### Cationes

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

Fase móvil: Acido oxálico 3 mM filtrado y desgasificado en el momento (15 min en sonicador de baño, modo "degassing").

Temperatura: 40°C

Tiempo de corrida: 20 min.

Supresión: no.

### Aniones

Columna: Shim-pack IC-SA3 con precolumna.

Fase móvil: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3,6 mM filtrado y desgasificado en el momento (15 min en sonicador de baño, modo "degassing").

Temperatura: 45 °C

Tiempo de corrida: 25 min.

Supresión: Sí.

## Referencias

- Bates, L. S.; Waldren, R. P.; Teare, I. D. 1973. Rapid determination of proline for water- stress studies. *Plant & soil* 39: 205-207.
- Cataldi, T. R.; Margiotta, G.; Del Fiore, A.; Bufo, S. A. 2003. Ionic Content in Plant Extracts Determined by Ion Chromatography with Conductivity Detection. *Phytochem Anal.* 14:176-183.
- Fales, F. W. 1951. The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. *J Biol Chem* 193:113-24.
- Giannoccaro, E.; Wang, Y.-J.; Chen, P. 2006. Effects of solvent, temperature, time, solvent- to-sample ratio, sample size, and defatting on the extraction of soluble sugars in soybean. *Food Chemistry and Toxicology*, 71(1), 59–64.
- \*\*\* Guzzo, M. C.; Costamagna, C.; Salloum, M. S.; Rotundo, J. L.; Monteoliva, M. I.; Luna, C. M. 2020. **Morpho-physiological traits associated with drought responses in soybean (*Glycine max* L.). *Crop Science*. doi: 10.1002/csc2.20314 <http://hdl.handle.net/20.500.12123/7945>  
En este trabajo, se utilizó el CRA como marcador de selección para tolerancia a estrés por sequía en el cultivo de soja, en conjunto con la medición de prolina y clorofilas. Además, se estudió la respuesta antioxidante (enzimática y no enzimática) asociada con la tolerancia a sequía.**
- Hou, A.; Chen, P.; Shi, A.; Zhang, B.; Wang, Y.-J. 2009. Sugar Variation in Soybean Seed Assessed with a Rapid Extraction and Quantification Method. *International Journal of Agronomy*, 2009, 1–8.
- Miller G.; Honig, A.; Stein, H.; Suzuki, N.; Mittler, R.; Zilberstein, A. 2009. Unraveling  $\Delta$ 1-Pyrroline-5-Carboxylate-Proline Cycle in Plants by Uncoupled Expression of Proline Oxidation Enzymes. *J Biol Chem* 284, 26482-26492.

- \*\*\* **Monteoliva, M. I. 2012. Contribución del catabolismo de L-prolina a la Respuesta Hipersensible en Arabidopsis. Tesis Doctoral, UNC.**  
**Se evaluó el contenido de prolina en plantas mutantes deficientes en las enzimas de degradación de prolina en condiciones de infección con bacterias patógenicas.**
- Moreno, L. P. 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión Agron. colomb. 27, 179-191.
- Morris, D. L. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. Science 107, 254-255.
- Munns, R.; James, R. A.; Sirault, X. R. R.; Furbank, R. T.; Jones, H. G. 2010. New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. J Exp Bot 61, 3499-3507.
- \*\*\* **Rizzi, Y. S.; Monteoliva, M. I.; Fabro, G.; Grosso, C. L.; Laróvere, L. E.; Alvarez, M. E. 2015. P5CDH affects the pathways contributing to Pro synthesis after ProDH activation by biotic and abiotic stress conditions. Front Plant Sci 6, 572. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00572>**  
**Se midió la desaparición de prolina en hojas de arabidopsis en infecciones con bacterias patógenicas y en hojas con provisión exógena de prolina.**
- \*\*\* **Rodríguez, M.; Taleisnik, E. L.; Lenardon, S.; Lascano, H. R. 2010. Are Sunflower chlorotic mottle virus infection symptoms modulated by early increases in leaf sugar concentration? J Plant Physiol 166, 1123-1140 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.03.004>**  
**En este trabajo se midió el contenido de azúcares solubles por el método de HPLC identificando cualitativa y cuantitativamente los azúcares que se encontraban alterados durante la infección viral compatible en plantas de girasol.**
- Shabnam, N.; Tripathi, I.; Sharmila, P.; Pardha-Saradhi P. 2016. A rapid, ideal, and eco-friendlier protocol for quantifying proline. Protoplasma. 253, 1577-1582.
- Sunkar R. (ed.), Plant Stress Tolerance, Methods in Molecular Biology 639, Springer Science+Business Media, LLC 2010.
- Troll W, Lindsey J. 1955. A photometric method for the determination of proline. Journal of Biological Chemistry 215, 655-660.
- \*\*\* **Zanini, A. A.; Dominguez, M. C.; Rodríguez, M. S. 2025. Exploring sugar allocation and metabolic shifts in cassava plants infected with Cassava common mosaic virus (CsCMV) under long-day photoperiod: diel changes in source and sink leaves. J Plant Res 138, 131-145. <https://doi.org/10.1007/s10265-024-01595-4>**  
**Se evaluó el contenido de azúcares en tejidos fuente y sumidero en plantas de mandioca infectadas con el virus CvCMV.**

## 7. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

Mariela Inés Monteoliva

Los pigmentos fotosintéticos más abundantes son las clorofilas, seguidas de los carotenos. Las clorofilas son porfirinas reducidas (dihidroporfirinas) que contienen un ion  $Mg^{2+}$  central, con una cadena fitol larga e hidrofóbica, que se ancla a la membrana tilacoidal. Por su parte, los carotenoides son tetra-terpenos, compuestos hidrofóbicos constituidos por cadenas de 40 carbonos con un número variable de dobles enlaces (e hidrógenos). Se subdividen en xantofilas y carotenos según si tengan oxígeno o no en su composición.

En la fotosíntesis, los pigmentos de los complejos antena (tanto clorofilas como carotenos) absorben la radiación solar y conducen la energía por resonancia hasta las clorofilas especializadas del centro de reacción, que liberan electrones e inician el proceso fotoquímico (Kalaji y col., 2017).

Para evaluar el contenido de clorofilas, la mayoría de los métodos se basan en la capacidad de las clorofilas de reflejar o absorber la luz en determinados rangos del espectro. Las clorofilas absorben fuertemente en las regiones del rojo (650–700 nm) y azul (400–500 nm). Mientras los carotenoides absorben la luz UV, violeta y azul (entre los 400 y 550 nm), y dispersan la luz naranja, roja, y amarilla.

Los métodos más accesibles para estudiar el contenido de clorofilas se basan en el análisis espectrofotométrico de los extractos vegetales o en la medición *in situ* (sobre el tejido vivo) utilizando medidores portátiles. En el caso de los carotenoides, son usualmente cuantificados por espectrofotometría. En la Tabla 16 se comparan ambas aproximaciones.

**Tabla 16. Los dos métodos más accesibles para determinar el contenido de clorofilas y verdor en cultivos.**

Modificada de Monteoliva y col., 2021.

Método	Espectrofotométrico	Medidores portátiles de verdor
Principio	Absorbancia	Absorbancia
Precisión	Alta	Baja, posible correlación no lineal con el contenido de clorofilas
Escala	Desde fracción de hoja hasta múltiples individuos	Hoja o porción de hoja
Tiempo y costo por muestra	Alto	Bajo
Método de muestreo	Destructivo	No-destructivo: requiere el tejido intacto
Desventajas	Mayor inversión de tiempo, posibilidad de interferentes	Posibles distorsiones debido a la anatomía foliar

El contenido total de clorofila de las hojas se correlaciona positivamente con la cantidad de radiación solar absorbida en estos órganos y también con la tasa fotosintética. Además, dado que alrededor del 75% del nitrógeno total se encuentra en los cloroplastos, el contenido de clorofilas también correlaciona bien con el contenido de nitrógeno en una amplia gama de especies vegetales y condiciones

ambientales. Estas correlaciones refuerzan la idea de que las plantas más verdes tendrán mayores tasas de fotosíntesis (Kaler y col., 2020) y, en consecuencia, un mayor rendimiento. En contrapartida, en condiciones de estrés como la sequía, el contenido de clorofilas se reduce por degradación, pero genotipos tolerantes mantienen un contenido de los pigmentos más elevado que genotipos sensibles. Para un análisis de esta temática, ver Monteoliva y col., 2021.

## 7.1. CLOROFILAS Y CAROTENOIDES POR ESPECTROFOTOMETRÍA

*Mariela Inés Monteoliva*

### Fundamento

Las clorofilas más abundantes son las de tipo a y b, que absorben la mayor parte de la luz en las dos bandas del espectro visible de forma complementaria: la presencia de un grupo metilo en la clorofila a y de un grupo aldehído en la clorofila b, separa los picos de absorción en el rojo (de 669 nm en la clorofila a, a 644 nm en la clorofila b) y el azul (432 nm frente a 455 nm) (Liew y col., 2008). Esta variación en el espectro de absorción permite discernir entre estos dos tipos de clorofilas. Por su parte, los carotenoides, son un grupo de compuestos que se estiman midiendo la absorbancia a 470 nm y restando la absorbancia estimada de las clorofilas en esa longitud de onda.

La medición por espectrofotometría se basa en la medición directa a las longitudes de onda absorbidas por los pigmentos (sin reactivos de color). Los pigmentos se extraen en un solvente como etanol, metanol o acetona. La concentración de los compuestos se estima mediante los coeficientes de absorción para el solvente utilizado. El aumento de la polaridad y/o el contenido de agua del solvente desplazará los picos de absorción a longitudes de onda más largas (Lichtenthaler, 1987).

## Consideraciones y limitantes

La dilución del extracto que se medirá en el espectrofotómetro debe ser ajustada. Para ello, realizar diluciones seriadas y verificar que las concentraciones de pigmentos en las muestras se encuentran dentro del rango de linealidad.

Se recomienda medir cada muestra por triplicado (replicas técnicas), y realizar también triplicados biológicos (hojas o combinaciones de hojas, de al menos 3 plantas independientes de cada tratamiento), priorizando que sean hojas del mismo nudo.

Proteger los extractos de la luz para evitar la degradación de clorofilas a feofitinas. La tasa de degradación durante el protocolo se puede verificar comparando muestras procesadas con precauciones o sin ellas.

Los resultados se generan como un valor relativo a la biomasa fresca. En caso de analizar tratamientos que generan deshidratación en los tejidos (sequía, salinidad, temperatura), pueden producirse distorsiones en la medición de esas muestras debidas a las diferencias en el contenido hídrico de los tejidos en estrés. Para ello, se pueden expresar las mediciones relativas al contenido de proteínas (sección 3.2.6) o a la biomasa seca. Para verificar si el tratamiento estudiado genera estrés hídrico, se puede medir el contenido relativo de agua del tejido (sección 1.1) o la relación peso fresco/peso seco.

Al tratarse de un método destructivo, limita la posibilidad de hacer un seguimiento temporal de un mismo tejido u órgano. Además, si se realizan ensayos a campo, es importante refrigerar las muestras y preservarlas de la exposición a la luz para evitar la degradación de los pigmentos. Por otra parte, la eliminación o el daño a una hoja puede afectar sustancialmente el rendimiento de la planta, especialmente en plántulas, o plantas bajo estrés severo.

## Reactivos

- Etanol 95%, acetona 80% o metanol 90%.

## Protocolo

1. Moler el material vegetal en mortero con nitrógeno líquido, adicionar el solvente en proporción 1:50 (10 mg de tejido fresco: 5000 µl de solvente).  
NOTA: Dada la dilución, es conveniente realizar la extracción en dos o tres etapas y luego combinar los sobrenadantes.
2. Calentar 20 min a 80 °C, centrifugar 5 min a 5000 rpm a 4 °C.
3. Colectar el sobrenadante en un tubo nuevo.
4. Resuspender el pelet en el mismo volumen, y centrifugar nuevamente 5 min a 12000 g a 4 °C.
5. Colectar el sobrenadante, combinar con el anterior.

6. Diluir con el solvente y medir en espectrofotómetro a las longitudes de onda recomendadas según el solvente utilizado (Tabla 17). Medir los carotenoides a 470 nm con todos los solventes típicos.

**Tabla 17. Longitudes de onda a las cuales medir absorbancia según el solvente de extracción.** Medir carotenoides a 470 nm en todos los solventes. Basado en Lichtenthaler, 1987.

	Clorofila a	Clorofila b
Etanol 95% (v/v)	664 nm	649 nm
Acetona 80% (v/v)	663 nm	647 nm
Metanol 90% (v/v)	665 nm	652 nm

Calcular la concentración de clorofilas con las fórmulas presentadas a continuación. La última permite el cálculo para carotenoides. Las concentraciones obtenidas son en  $\mu\text{g}$  de clorofilas o carotenoides / ml de extracto. Hacer los cálculos para relativizarlo a peso fresco, según como se haya hecho la extracción (o a peso seco en caso de tratamientos con deficiencia hídrica).

## Cálculos

### Etanol (95%)

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

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

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

### Acetona (80%)

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

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

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

### Metanol (90%)

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

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

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

## 7.2. VERDOR CON MEDIDORES PORTÁTILES

Mariela Inés Monteoliva

### Fundamento

Los medidores portátiles registran *in situ* la absorbancia de las clorofilas (pero no carotenoides). Son ejemplos de medidores portátiles el SPAD-501/2 (Minolta), CL-01 (Hansatech), CCM-200 (Optiscience) y Dualex (Force-A). Estos instrumentos miden la absorbancia de la clorofila en el rango del rojo (~620-650 nm), en donde hay un mayor aporte de la clorofila a, y utilizan una segunda longitud de onda de referencia en el rango del infrarrojo (~760 nm o ~940-950 nm, según el instrumento). Esta referencia permite corregir algunas distorsiones causada por estructuras de las hojas, como las paredes celulares.

### Consideraciones y limitantes

Los medidores portátiles permiten mediciones no destructivas, rápidas y pueden utilizarse en entornos controlados o a campo, pero requieren una hoja intacta y que ocupe toda el área del instrumento dedicada a la medición. Al requerir que el tejido se encuentre intacto, la posibilidad de agrupar las muestras (distintas hojas de una misma planta u hojas de distintas plantas), es limitada, pero la medición es tan rápida, que puede compensar esa limitación.

Se recomienda seleccionar hojas y sectores de la hoja equivalentes (por ejemplo, del mismo nudo, misma parte de la hoja), y evitar las nervaduras. En monocotiledóneas, se suele utilizar el tercio medio de hojas completamente expandidas, evitando la nervadura central o dejándola exactamente en el medio del área de medición.

Si la finalidad de uso del medidor portátil es la estimación de clorofilas, contenido de N o Fe foliar, la medición de verdor debe validarse con un método analítico directo ya que algunos componentes de la hoja no se escalan linealmente junto al verdor. Además, en condiciones de deshidratación, los valores de verdor pueden estar distorsionados por diversos factores, como el espesor, la densidad del tejido, el contenido de agua y la acumulación diferencial de otros pigmentos. En muchos de cultivos, se han demostrado correlaciones no lineales entre ambos tipos de mediciones (Tabla 18).

**Tabla 18. Correlaciones entre el verdor medido con medidores portátiles y el contenido de clorofilas determinado por métodos espectrofotométricos.** Las mediciones portátiles corresponden a SPAD (Minolta), a menos que se especifique lo contrario.

Familia	Especie vegetal	Condición experimental	Método de medición	Tipo de correlación	Ref.
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> cv. <i>Lores</i>	Invernadero		Lineal, $r^2 = 0.92$	León y col., 2007
	<i>Lactuca sativa</i> L. var. <i>longifolia</i>	Campo, en túneles		Lineal, $r^2 = 0.97$	Mendoza-Tafolla y col., 2019
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i>	Invernadero	CL-1	Lineal, $r^2 = 0.65$	Cassol y col., 2008
Cucurbitaceae <i>Cucumis sativus</i> Invernadero			CL-1	Lineal, $r^2 = 0.64$	
Fabaceae	<i>Arachis hypogaea</i>	A campo, irrigación limitada		Lineal, $r^2 = 0.76 - 0.96$ (a 20 - 60 días post emergencia)	Arunyanarky col., 2009
	<i>Glycine max</i> Merr.	A campo		Lineal / potencial, $r^2 = 0.36 / 0.93$	Fritschi and Ray, 2007
		A campo / etapas del desarrollo y estratos del canopeo		Lineal, $r^2 = 0.57 - 0.87$	Wang y col., 2020
Poaceae	<i>Oryza sativa</i> / <i>Triticum aestivum</i>	n.r.		Potencial / lineal $r^2 = 0.97 / 0.93$	Monje and Bugbee, 1992
Poaceae / Fabaceae	<i>Sorghum bicolor</i>	A campo / riego limitado		Lineal, $r^2 = 0.91$	Xu y col., 2000
	<i>Triticum aestivum</i> L. cv. <i>Isengrain</i>	A campo / fertilización con N		Potencial, $r^2 = 0.91$	Cartelat y col., 2005
	<i>Triticum aestivum</i> / <i>Zea mays</i>	Invernadero / a campo e invernadero	SPAD-CCR-Duallex	Homográfica / exponencial / lineal, $r^2 = 0.94 / 0.91 / 0.96$ respectivamente	Cerovic y col., 2012
	<i>Zea mays</i>	Invernadero	CL-1	Lineal, $r^2 = 0.74$	Cassol y col., 2008
	<i>Zea mays</i> / <i>Glycine max</i> Merr.	A campo		Exponencial, $r^2 = 0.94$	Markwell y col., 1995
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Invernadero		Exponencial / lineal, $r^2 = 0.75 / 0.74$	Jiang y col., 2017
	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. <i>Samsun</i>	Cámara de crecimiento con luz azul (inducción de movimientos cloroplásticos)		Cúbica, $r^2 = 0.86$	Nauš y col., 2010
	<i>Solanum tuberosum</i> cv. <i>Bintje</i>	A campo / alto CO <sub>2</sub>		Cuadrática, $r^2 = 0.95$	Bindi y col., 2002
A campo			Exponencial, $r^2 = 0.58$	Uddling y col., 2007	
Theaceae	<i>Camellia sinensis</i> L. cv. <i>Jiukeng</i>	A campo		Exponencial, $r^2 = 0.84 - 0.88$	Liu y col., 2012
Rosaceae	<i>Fragaria</i> sp.	n.r.		Lineal, $r^2 = 0.92$	Wood y col., 1993

\*n.r. no reportado.

## Protocolo

1. Encender el medidor portátil, verificar que tenga carga y espacio para realizar las mediciones.
2. Colocar la hoja dentro de la pinza.
3. Verificar que la cámara quede completamente ocupada por tejido foliar.
4. Realizar la medición, registrar el valor y continuar con la siguiente hoja.

## Referencias

- Arunyanark, A., Jogloy, S., Vorasoot, N., Akkasaeng, C., Kesmala, T., Patanothai, A. 2009. Stability of Relationship Between Chlorophyll Density and Soil Plant Analysis Development Chlorophyll Meter Readings in Peanut Across Different Drought Stress Conditions. *Asian Journal of Plant Sciences*, 8, 102–110.
- Bindi, M., Hacour, A., Vandermeiren, K., Craigan, J., Ojanperä, K., Selldén, G., Högy, P., Finnan, J., Fibbi, L. 002). Chlorophyll concentration of potatoes grown under elevated carbon dioxide and/or ozone concentrations. *European Journal of Agronomy*, 17, 319–335.
- Bruinsma, J. 1963. The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. *Photochem and Photobiol (Chlor. Metabol. Sym.)* 2, 241-249.
- Cartelat, A., Cerovic, Z. G., Goulas, Y., Meyer, S., Lelarge, C., Prioul, J.-L., Barbottin, A., Jeuffroy, M.-H., Gate, P., Agati, G., Moya, I. 2005. Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research* 91, 35–49.
- Cassol, D., De Silva, F. S. P., Falqueto, A. R., Bacarin, M. A. 2008. An evaluation of non-destructive methods to estimate total chlorophyll content. *Photosynthetica* 46, 634.
- Cerovic, Z. G., Masdoumier, G., Chozlen, N. B., Latouche, G. 2012. A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiologia Plantarum*, 146, 251–260.
- Fritschi, F. B., Ray, J. D. 2007. Soybean leaf nitrogen, chlorophyll content, and chlorophyll a/b ratio. *Photosynthetica* 45, 92–98.
- \*\*\* Guzzo, M. C.; Costamagna, C.; Salloum, M. S.; Rotundo, J. L.; Monteoliva, M. I.; Luna, C. M. 2020. **Morpho-physiological traits associated with drought responses in soybean (*Glycine max* L.). *Crop Science*. doi: 10.1002/csc2.20314 <http://hdl.handle.net/20.500.12123/7945>  
En este trabajo, se utilizó el CRA como marcador de selección para tolerancia a estrés por sequía en el cultivo de soja, en conjunto con la medición de prolina y clorofilas. Además, se estudió la respuesta antioxidante (enzimática y no enzimática) asociada con la tolerancia a sequía.**
- Jiang C., Johkan M., Hohjo M., Tsukagoshi S., Maruo T. 2017. A correlation analysis on chlorophyll content and SPAD value in tomato leaves. *Horticulture Research* 71, 37–42.
- León, A. P., Viña, S. Z., Frezza, D., Chaves, A., Chiesa, A. 2007. Estimation of Chlorophyll Contents by Correlations between SPAD-502 Meter and Chroma Meter in Butterhead Lettuce. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 38, 2877–2885.
- Liu, Z. A., Yang, J. P., Yang, Z. C. 2012. Using a chlorophyll meter to estimate tea leaf chlorophyll and nitrogen contents. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 12, 339–348.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology* 148, 350-382.

- Markwell, J., Osterman, J. C., Mitchell, J. L. 1995. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynthesis Research* 46, 467–472.
- Mendoza-Tafolla, R., Juárez-López, P., Ontiveros-Capurata, R. E., Sandoval-Villa, M., Alía Tejacal, I., Alejo, G. 2019. Estimating nitrogen and chlorophyll status of romaine lettuce using SPAD and at LEAF readings. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 47, 1–6.
- Monje, O., Bugbee, B. 1992. Inherent Limitations of Nondestructive Chlorophyll Meters: A Comparison of Two Types of Meters. *HortScience : A Publication of the American Society for Horticultural Science* 27, 69–71.
- \*\*\* **Monteoliva, M. I.; Guzzo, M. C.; Posada, G. A. Breeding for drought tolerance by monitoring chlorophyll content. 2021. *Gene Technology* 10, 1-11. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/9833>  
Se realizó una revisión de los métodos para el análisis del verdor y contenido de clorofilas disponibles y se propone el monitoreo de los mismo como una herramienta accesible para el mejoramiento de la tolerancia a la sequía en cultivos**
- Nauš, J., Prokopová, J., Řebíček, J., Špundová, M. 2010. SPAD chlorophyll meter reading can be pronouncedly affected by chloroplast movement. *Photosynthesis Research* 105, 265–271.
- \*\*\* **Rodríguez, M. R.; Muñoz, N.; Lenardon, S.; Lascano R. 2012. The chlorotic symptom induced by Sunflower chlorotic mottle virus is associated with changes in redox-related gene expression and metabolites. *Plant Science* 196, 107-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.08.008>  
Se analiza la progresión del síntoma viral clorótico en diferentes partes de la hoja de girasol infectada con SuCMoV.**
- Uddling, J., Gelang-Alfredsson, J., Piikki, K., Pleijel, H. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research* 91, 37–46.
- Wang, L., Conteh, B., Fang, L., Xia, Q., Nian, H. 2020. QTL mapping for soybean (*Glycine max* L.) leaf chlorophyll-content traits in a genotyped RIL population by using RAD-seq based high-density linkage map. *BMC Genomics* 21, 739.
- Wood, C. W., Reeves, D. W., Himelrick, D. G. 1993. Relationships between chlorophyll meter readings and leaf chlorophyll concentration, N status, and crop yield: A review. *Proceedings Agronomy Society of N. Z.* 23, 9.
- Xu, W., Rosenow, D. T., Nguyen, H. T. 2000. Stay green trait in grain sorghum: Relationship between visual rating and leaf chlorophyll concentration. *Plant Breeding* 119, 365–367.
- Wickliff, J. L.; Arnoff, S. 1962. Quantitative measurement of leaf chlorophylls by spectrophotometry of their pheophytins in aqueous alcoholic extracts. *Plant Physiology* 37:584-589.

## 8. FLUORESCENCIA DE CLOROFILAS

Giuliano Barbieri, Oriana Micaela y Fernando Darío Luna\*

El monitoreo de la fluorescencia de las clorofilas es una de las técnicas más robustas y populares para evaluar las alteraciones de los eventos fotoquímicos llevados a cabo en las membranas de los tilacoides, durante la fase lumínica de la fotosíntesis (Maxwell y Johnson 2000). Esta herramienta eleva considerablemente su potencia si se la combina con otras técnicas de medición no invasivas, tales como la espectroscopía de absorción, análisis de gases y termometría infrarroja.

La fluorescencia de las clorofilas se evalúa utilizando fluorómetros portátiles que miden la luz reemitida por las moléculas de clorofila a, cuya longitud de onda se encuentra entre los 680 y los 720 nm del espectro. Esta emisión de luz es una forma de disipación energética, la cual compite con otras vías como la desactivación térmica o la energía utilizada para producir fotoquímica (inducción de una separación de carga estable) (Baker, 2008). Dado que estos procesos de desexcitación compiten entre ellos, la medición de la fluorescencia permite dilucidar el equilibrio entre la extinción o *quenching* fotoquímico y la extinción no fotoquímica de la luz absorbida en diferentes condiciones ambientales.

El estudio de la fluorescencia de las clorofilas comprende diversos tipos de técnicas. Entre las más difundidas se encuentran la fluorescencia transitoria, rápida o directa y la fluorescencia por modulación por amplitud de pulsos (*PAM, en inglés*). Ambas brindan información complementaria sobre el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones de los fotosistemas 1 y 2, difiriendo principalmente en la resolución de adquisición de datos de los instrumentos de medición.

### 8.1. FLUORESCENCIA DIRECTA, RÁPIDA O TRANSITORIA

#### Fundamento

Esta técnica utiliza una prueba conocida como OJIP (Strasser y col., 2004), sigla que deriva de los puntos específicos dentro de curva de inducción de Kaustky: desde un valor inicial mínimo (O) hasta un valor máximo (P), pasando por dos puntos intermedios (J e I). La prueba OJIP se basa en la teoría del “Flujo Energético en Biomembranas” basado en modelos matemáticos, que brinda información sobre la estructura y funcionamiento del aparato fotosintético (Kalaji y col., 2014).

Algunos de los equipos que permiten realizar esta prueba son el Handy PEA y el Pocket PEA; ambos con la capacidad de medir la fluorescencia cada 10 milisegundos. Una porción de la hoja se adapta a oscuridad (al menos 30 minutos), utilizando clips específicos, para lograr la oxidación completa (apertura) del pool de aceptores de electrones del fotosistema 2. Esto permitirá determinar la fluorescencia mínima ( $F_0$ ). Luego se aplica un destello de luz actínica saturante (que puede durar de 1 a 10 segundos), a una intensidad de  $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y pico de emisión de 627 nm que permite obtener la fluorescencia máxima ( $F_m$ ). Los datos de fluorescencia obtenidos entre estos extremos, luego de ser graficados en escala logarítmica permiten diferenciar algunos puntos intermedios como el punto J e I, que son el valor de fluorescencia a los 2 y a los 30 milisegundos, respectivamente. También, se observó que, bajo ciertos

tipos de estrés, puede visualizarse un incremento de la fluorescencia a los 300 microsegundos conocido como punto K.

### Consideraciones y limitantes

Es muy importante que, al momento de realizar la medición, el clip no se deslice o cambie de posición. También es conveniente evitar colocar el clip sobre la nervadura central de la hoja.

Esta técnica no permite la obtención de parámetros de extinción o *quenching* fotoquímico y no fotoquímico, tales como NPQ, qE y qI.

**Tabla 19. Parámetros obtenidos a partir de la evaluación de fluorescencia directa de clorofilas con Pocket PEA.**

CR, centro de reacción; ST, sección transversal. En base a González Moreno y col., 2008.

Parámetro	Abreviatura	Fórmula
Fluorescencia mínima (50 $\mu$ s)	Fo	
Fluorescencia máxima	Fm	
Fluorescencia variable	Fv	= Fm-Fo
Pendiente desde el origen de la fluorescencia	Mo	= (F300ms-Fo)/(Fm-Fo)
Fluorescencia variable a 2 ms	Vj	= (F2ms-Fo)/(Fm-Fo)
<b>Flujos específicos expresados por centros de reacción</b>		
Absorción por centro de reacción (CR)	ABS/CR	= (Mo/Vj)/(1-Fo/Fm)
Captura por CR a tiempo cero	TRO/CR	= Mo/Vj = (ABS/RC) j <sub>po</sub>
Disipación por CR a tiempo cero	DIo/CR	= (ABS/RC) - (TRO/CR)
Transporte electrónico a tiempo cero	ETo/CR	= (TRO/CR) y <sub>o</sub>
<b>Flujos específicos expresados por área</b>		
Absorción por ST	ABS/ST	= Fo o Fm
Captura a tiempo o por ST	TRO/ST	= (TRO/ABS)/(ABS/ST)
Disipación a tiempo o por ST	DIo/ST	= (ABS/ST) - (TRO/ST)
Transporte electrónico a tiempo o por ST	ETo/ST	= (ETo/ST)(RC/ABS)
Densidad de CR por ST	CR/ST	= (ABS/ST)(RC/ABS)
<b>Eficiencias cuánticas (o relaciones de flujo)</b>		
Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria	j <sub>po</sub>	= TRO/ABS = (Fm-Fo)/(Fm) = (1-(Fo/Fm)) = Fv/Fm
Producto cuántico máximo de disminución de excitación fotoquímica	j <sub>do</sub>	= DIo/ABS = 1-j <sub>po</sub> = Fo/Fm
Eficiencia con la que un excitón atrapado puede mover un electrón después de la QA <sup>-</sup>	y <sub>o</sub>	ETo/TRO = 1 - Vj
Probabilidad de que un excitón absorbido mueva un electrón después de la QA <sup>-</sup>	j <sub>eo</sub>	= j <sub>po</sub> - y <sub>o</sub> = (TRO/ABS)/(ETo/TRO) = ETo/ABS = (1-Fo/Fm)(1-Vj)
<b>Indices de vitalidad</b>		
Índice de funcionamiento	PI <sub>ABS</sub>	= [RC/ABS][1-j <sub>po</sub> /(1-j <sub>po</sub> )] [y <sub>o</sub> /1-y <sub>o</sub> ]
Fuerza impulsora de fotosíntesis	DF <sub>ABS</sub>	= Log [PI <sub>ABS</sub> ]

## Protocolo

### Medición con el Pocket PEA

1. Colocar el clip en la hoja asegurándose de que el orificio central del mismo se encuentre completamente cerrado. El tiempo mínimo de adaptación a la oscuridad es de 30 minutos.
2. Encender el medidor Pocket PEA y encastrar el conjunto óptico al anillo del clip.
3. Deslizar la hoja metálica del obturador del clip para exponer la muestra al conjunto óptico.
4. Presionar el botón “*Measure*” y registrar en planilla los datos que se muestran en el display del equipo.

### Descarga de datos

1. Instalar el software “PEA Plus”, incluido con el equipo.
2. Conectar el medidor Pocket PEA vía bluetooth con la notebook. La primera vez que se realiza la conexión puedo solicitar un código, digitar 0000.
3. Abrir el software PEA Plus y en el menú seleccionar Pocket PEA, luego “*Download All Recordings*”.
4. Para guardar los datos en un archivo con extensión “.pcs”, seleccionar la opción “*Save*” en el menú “*File*”. Este archivo solo puede visualizarse desde el software PEA Plus.
5. Para descargar los datos en formato .csv (admitidos en Excel), dentro del menú “*File*”, utilizar la opción “*Exportar*”.
6. Para eliminar los datos, con el equipo conectado a la PC, ir al menú “*Pocket PEA*” y seleccionar “*Erase All Recordings*”.

## 8.2. FLUORESCENCIA POR MODULACIÓN DE AMPLITUD DE PULSOS (PAM)

### Fundamento

La fluorescencia por modulación de amplitud de pulsos (PAM) utiliza pulsos de luz de diferente intensidad para estimular la fluorescencia y obtener información sobre el estado funcional del fotosistema II. A diferencia de las técnicas que necesariamente requieren adaptación previa de la muestra a la oscuridad (como la fluorescencia directa), los dispositivos de fluorescencia PAM permiten también medir en condiciones de luz ambiental, volviéndolos significativamente más versátiles. Estos equipos constan básicamente de distintas fuentes de luz (diodos que emiten en distintas bandas del espectro), una lente, detectores, filtros de luz y un microprocesador.

Según el objetivo del estudio, la fluorescencia puede ser medida con o sin adaptación previa a la oscuridad. Se enciende la luz modulada a una intensidad muy baja (aproximadamente  $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), permitiendo la apertura de los centros de reacción. En este punto la intensidad de fluorescencia es mínima ( $F_0$  o fluorescencia mínima). Luego se aplica un pulso corto (1 s) de alta intensidad (aprox.  $10.000 \text{ mmoles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) alcanzando el máximo valor de fluorescencia ( $F_m$ ). Luego, se enciende la luz actínica alcanzando su máximo valor de fluorescencia ( $F_m$ ), repitiendo estos destellos por unos cuantos minutos hasta alcanzar el valor de fluorescencia estacionaria ( $F_s$ ). Posteriormente se apaga la luz actínica, y se continúa emitiendo pulsos que la  $F_m$  no aumenta más. Con tales valores de fluorescencia,

se pueden calcular las variables de extinción (“*quenching*”) fotoquímica y no fotoquímica, y sus variantes (Baker 2008).

Se detalla a continuación el procedimiento de uso del medidor portátil MultispeQ de la marca PhotosynQ.

### Consideraciones y limitantes

Es importante asegurarse de que la hoja cubra completamente la guía de luz del instrumento. Si las hojas son muy pequeñas, puede que las mediciones no sean precisas y reproducibles. Evitar que el instrumento quede a la sombra de la persona que lo está utilizando. No mover la hoja, cambiar su ángulo o cambiar la incidencia de la luz (de luz a sombra o viceversa). Para mediciones precisas con la brújula, sujetar la hoja del lado izquierdo mirando hacia el tallo.

## Protocolo

### Crear una cuenta

Para utilizar MultispeQ es necesario crear una cuenta en PhotosynQ:

1. Crear una cuenta en el sitio web [photosynq.org/user](https://photosynq.org/user).
2. Hacer clic en “*sign up*” en la esquina superior derecha.
3. Ingresar un nombre de usuario y una contraseña.
4. Confirmar la cuenta mediante el correo electrónico que enviar a la página de registro.
5. Volver al sitio web o a la app e iniciar sesión.

### Conectar un Instrumento

1. En la app, seleccionar el ícono del instrumento en la esquina superior derecha. Aparecerá una lista de dispositivos Bluetooth disponibles.
2. Verificar que el nombre del instrumento y su ID coinciden con la dirección MAC del dispositivo utilizado.
3. Si no aparece, seleccionar “*Scan Devices*” hasta que se visualice el instrumento en uso.
4. Seleccionar el dispositivo y aparecerá una ventana emergente solicitando emparejarlo ingresando el PIN, que es 1234 para todos los MultispeQ.
5. Una vez emparejado, seleccionar el instrumento MultispeQ de la lista.

### Crear un Proyecto

1. Iniciar Sesión en la aplicación PhotosynQ
2. Para crear un proyecto, seleccionar el menú en la esquina superior izquierda, hacer clic en “Mis Proyectos” y la opción “Crear Proyecto” (*New Project*).
3. Configurar Detalles:
  - Ingresar el nombre y descripción del proyecto.
  - Agregar ubicación y métodos de medición, si es necesario.
4. Guardar Proyecto

## Visualización de datos

1. Una vez que los datos estén cargados en la aplicación móvil o de escritorio, podrás revisarlos en el visor de datos.
2. Acceder a la página de tu proyecto: en la página principal del proyecto, seleccionar la opción “Ver Datos” en el menú lateral izquierdo.
3. Esperar la carga de los datos: pueden demorar en cargarse entre unos pocos segundos y un par de minutos, dependiendo de la cantidad de datos y de la velocidad de tu conexión a internet.
4. Acceder al panel de control para visualizar los datos.

Los datos se pueden visualizar como hoja de cálculo, gráficos y en un mapa geográfico. También pueden realizarse algunas pruebas estadísticas sencillas.

**Tabla 20.** Parámetros de fluorescencia de MultispeQ

Parámetro	Abreviatura	Definición	Rango típico
Phiz	$\Phi_{II}$	Representa la eficiencia cuántica del Fotosistema II (PSII) en condiciones de luz. Es la fracción de la energía lumínica capturada por el PSII que se utiliza en la fotoquímica para producir ATP y NADPH, fundamentales para el crecimiento y la fotosíntesis.	0-0,82
Tasa de Transporte de Electrones, <i>Electron Transport Rate</i>	LEF	Refleja la velocidad a la que los electrones son transportados a lo largo de la cadena de transporte de electrones en el PSII. Este parámetro se relaciona con la eficiencia fotosintética y la capacidad de la planta para convertir luz en energía química.	
Extinción no fotoquímica, <i>Non-Photochemical Quenching</i>	NPQ	Mide la disipación de energía lumínica como calor en la hoja para proteger al PSII de posibles daños por exceso de luz. Es un mecanismo de defensa que previene el daño por exceso de luz.	
	PhiNPQ	Fracción de la energía lumínica captada por el Fotosistema II que se disipa como calor dentro de la hoja mediante el apagamiento no fotoquímico para evitar el fotodaño.	0-0,85
	PhiNO	Fracción de la energía lumínica captada por el Fotosistema II pero dirigida a procesos no regulados, lo que puede llevar a daños fotoquímicos.	0,15 -0,55

Extinción Energética	qE	Subcomponente del NPQ, representa la disipación rápida de energía lumínica como calor en respuesta a la sobreexcitación del PSII. Está asociado con mecanismos rápidos y reversibles de protección contra la luz excesiva.
Extinción por Inactivación	qI	Refleja una disipación más lenta de energía que está relacionada con la inactivación del PSII. Está asociada con daños o estrés que requieren tiempo para la recuperación.
Extinción Regulada por Apertura del Centro de Reacción	qL	Indica el apagamiento fotoquímico basado en la fracción de centros de reacción abiertos del PSII, que aún pueden aceptar electrones. Ayuda a medir el equilibrio entre centros abiertos y cerrados.
Extinción Fotoquímica	qP	Es una medida de la fracción de centros de reacción del PSII que están abiertos y disponibles para la fotoquímica. Indica la capacidad de las plantas para utilizar eficientemente la luz captada para la fotosíntesis.
	vH+, gH+	Describen la acumulación de protones en el tilacoide (vH+ y gH+) y su flujo a través de la ATP sintasa, la enzima responsable de convertir ADP en ATP, la principal fuente de energía celular.
Energía de Cambio de Estado	ECSt	Refleja la acumulación de protones en respuesta a la energía lumínica y la eficiencia en la producción de energía dentro de las células.

## Referencias

- Baker, N. R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Ann Rv P Biol* 59, 89-113.
- Kalaji, H. M., Schansker, G., Ladle, R. J., Goltsev, V., Bosa, K., Allakhverdiev, S. I. 2014. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynth Res* 122, 121–158.
- González MS, Perales VH, Salcedo AMO. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev Educ Bioquímica* 27, 119-129.
- \*\*\* Luna, D. F., Aguirre, A., Pittaro, G., Bustos D., Ciacci, B., Taleisnik, E. 2017. Nutrient deficiency and hypoxia as constraints to *Panicum coloratum* growth in alkaline soils. *Grass and Forage Science* 72, 640-653 <http://hdl.handle.net/20.500.12123/4692>

\*\*\* Luna D.F., Saavedra Pons A.B., Bustos D., Taleisnik E. 2018. Early responses to Fe-deficiency distinguish *Sorghum bicolor* genotypes with contrasting alkalinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* <http://hdl.handle.net/20.500.12123/3661>

En este trabajo, se utilizó la técnica de la fluorescencia directa (OJIP) para evaluar el daño al aparato fotosintético provocado por la alcalinidad y la deficiencia de hierro en tres genotipos de sorgos, con tolerancia contrastante a suelos alcalinos.

Maxwell K, Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide, *Journal of Experimental Botany* 51, 659–668.

Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. 2004. Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (eds) *Chlorophyll a Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer, Dordrecht.

\*\*\* Zanini, A. A.; Di Feo, L.; Luna, D. F.; Paccioretti, P.; Collavino, A.; Rodriguez, M. S. 2021. Cassava common mosaic virus infection causes alterations in chloroplast ultrastructure, function, and carbohydrate metabolism of cassava plants. *Plant Pathol* 70, 195–205. <https://doi.org/10.1111/ppa.13272>

En este trabajo se evalúan los daños provocados por virus Cassava common mosaic virus (CsC-MV) sobre el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones del PSII, en plantas de mandioca.

## 9. ANEXO I

### 9.1. BUFFER ACETATO DE SODIO 0,25 M PH 3,6

Acetato de sodio (Sigma S8750), PM: 82,03 g; ácido acético glacial puro

1. Disolver el acetato de sodio en un volumen menor de agua.
2. Ajustar el pH en 3,6 con ácido acético
3. Enrasar al volumen final con agua destilada o Milli-Q.

Recomendación: disolver el acetato en el mínimo volumen posible, dejando un amplio margen con el volumen final y utilizar ácido acético glacial puro, para poder alcanzar el pH deseado.

**NOTA:** El rango de pH óptimo para el buffer acetato de sodio es 3,7 a 5,7 (pKa del ácido  $\pm 1$ ).

### 9.2. BUFFER FOSFATO DE POTASIO 0,1 M

*Solución fosfato monopotásico 1M*

1. Pesar  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
2. Disolver y enrasar con agua

*Solución fosfato dipotásico 1M*

1. Pesar el  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
2. Disolver y enrasar con agua

Según indica la Tabla A1, seleccionar el pH deseado, mezclar los volúmenes indicados de las soluciones de fosfato, verificar el pH y enrasar con agua destilada hasta 1000 ml (concentración final 0,1M).

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

**Tabla A1.** Proporciones de fosfatos de potasio para preparación de buffer fosfato 0,1 M.

pH (25°C)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1M (ml)	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1M (ml)
5,8	91,5	8,5
6,0	86,8	13,2
6,2	80,8	19,2
6,4	72,2	27,8
6,6	61,9	38,1

6,8	50,3	49,7
7,0	38,5	61,5
7,2	28,3	71,7
7,4	19,8	80,2
7,6	13,4	86,6
7,8	9,2	90,8
8,0	6,0	94,0

### 9.3. BUFFER FOSFATO DE SODIO 0,1 M

*Solución fosfato monosódico 1M*

1. Pesar  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
2. Disolver y enrasar con agua

*Solución fosfato disódico 1M*

1. Pesar el  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
2. Disolver y enrasar con agua

Según indica la Tabla A2, seleccionar el pH deseado, mezclar los volúmenes indicados de las soluciones de fosfatos, verificar el pH y enrasar con agua destilada hasta 1000 ml (concentración final 0,1 M).

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

**Tabla A2.** Proporciones de fosfatos de sodio para preparación de buffer fosfato 0,1 M.

pH (25°C)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1M (ml)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1M (ml)
5,8	92,0	8,0
6,0	87,7	12,3
6,2	81,5	18,5
6,4	73,5	26,5
6,6	62,5	37,5
6,8	51,0	49,0
7,0	39,0	61,0
7,2	28,0	72,0
7,4	19,0	81,0

7,6	13,0	87,0
7,8	8,5	91,5
8,0	5,3	94,7

#### 9.4. BUFFER HEPES-KOH 1 M PH 8,3

Ácido N-(2-Hidroxiethyl)-piperazina-N'-etanosulfónico (Sigma H3375), PM: 238,30 g

1. Pesar el HEPES
2. Disolver en una parte del agua destilada necesaria
3. Ajustar el pH con NaOH ó KOH
4. Enrasar con agua destilada
5. Filtrar si es necesario y conservar a -20°C

**NOTA:** El buffer HEPES-KOH funciona en un rango de pH óptimo de 6,8 - 8,2.

#### 9.5. BUFFER TRIS-ACETATO 50 mM PH 5,0

- 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol o Tris-base (Sigma T6791), PM: 121,14 g
  - Acetato de sodio (Sigma S8750), PM: 82,03
  - Ácido acético glacial
1. Disolver el Tris y el acetato de sodio para que ambos tengan una concentración final de 2 M.
  2. Ajustar el pH con HCl para la solución de Tris (pH 7,0 – 8,0) y con ácido acético para la solución de acetato de sodio (pH 3,0).
  3. Combinar volúmenes iguales de ambas soluciones y ajustar el pH con ácido acético glacial
- Enrasar con agua destilada

#### 9.6. BUFFER TRIS-HCL 2 M PH 8,0

2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol o Tris-base (Sigma T6791), PM: 121,14 g

1. Pesar el Tris Base
2. Ajustar el pH con HCl
3. Enrasar con agua destilada

**NOTA:** El buffer Tris-HCl funciona óptimamente en un rango de pH de 7,0 - 9,0.

## 9.7. EDTA 500 MM PH 8,0

Acido etilendiaminotetraacético (Sigma E9884), PM: 292,24 g

1. Pesar el EDTA
2. Disolver en una fracción del volumen final de agua destilada
3. Agregar NaOH hasta que se disuelva completamente (alrededor de pH 7,5 - 8,0)
4. Enrasar con agua destilada

## 9.8. EGTA 500 mM PH 8,0

Ácido etilenglicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (Sigma E3889), PM: 380,35 g/l.

1. Pesar el EDTA
2. Disolver en una fracción pequeña del volumen final de agua destilada
3. Agregar NaOH hasta que se disuelva completamente (alrededor de pH 7,5 - 8,0)
4. Enrasar con agua destilada

## Referencias

Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. A1.5

<http://biologicalworld.com/hepes.htm>

Sambrook, J.; Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 edn. Cold Spring.

## 10. ANEXO II

### 10.1. TITULACIÓN PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

1. Colocar 1 ml de peróxido de hidrogeno puro en una cubeta de cuarzo
2. Leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 240 nm.
3. Calcular su molaridad con el siguiente coeficiente de extinción molar:  $38 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

$$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{titulado}} = \frac{38}{A_{240 \text{ nm}}}$$

$$\text{Volumen a extraer} = \frac{\text{Volumen final} \times [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{final}}}{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{puro}}}$$

$$= \frac{10 \text{ ml} \times 0,050 \text{ M}}{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{titulado}}}$$

### Referencias

Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. A1.5 <http://biologicalworld.com/hepes.htm>  
Sambrook, J.; Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 edn. Cold Spring.

## 11. ANEXO III

### 11.1. GELES NO DESNATURALIZANTES

Rodrigo Parola

#### Fundamento

Este método consiste en la separación electroforética de proteínas en geles de poliacrilamida, con la particularidad de que la técnica se realiza en condiciones en las que las proteínas no se desnaturalizan (Davis, 1964), lo cual permite conservar su actividad. Para ello no se utiliza SDS u otros detergentes fuertes, ni en la preparación del extracto ni en los buffers de corrida.

Una vez separadas las proteínas por electroforesis, se procede al revelado particular para cada enzima, con el sustrato específico y reactivos de color.

#### Consideraciones y limitantes

Se pueden utilizar diferentes concentraciones de acrilamida en el gel de separación dependiendo del peso molecular de las enzimas a estudiar y del zimograma que se desee obtener. Se debería observar mayor actividad enzimática al sembrar concentraciones crecientes de proteína total.

Se recomienda una exhaustiva limpieza de los dispositivos para el armado de los geles como así también la pureza de las soluciones a utilizar.

La polimerización de la acrilamida es dependiente de la temperatura ambiente, tener en cuenta que en días de baja temperatura puede demorar más tiempo.

Es recomendable utilizar solución de persulfato de amonio fraccionada y preservada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y no exponer a repetidos ciclos de descongelamiento.

Se recomienda realizar una *pre-corrida* del gel durante 15 minutos sin muestras para permitir la migración de posibles inhibidores.

#### Preparación de soluciones stock

- Acrilamida / bisacrilamida 30:0,8% para el gel de separación
- Acrilamida / bisacrilamida 10:2% para el gel de concentración
- APS 10% (p/v). Conservar fraccionado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Buffer Tris-HCl 1,3 M pH 8,8 para gel separador (ver Anexo 9.6)
- Buffer Tris-HCl 0,22 M pH 7,0 para gel concentrador
- Buffer de carga 4X (para muestras de proteínas)

- 2 ml del buffer Tris-HCl 0,22 M pH 7,0 (concentrador)
- 2 ml de glicerol puro
- 2 ml de solución de azul de bromofenol 0,05% p/v
- Mezclar y conservar a temperatura ambiente, protegido de la luz
- **Buffer de corrida 10X** (Tris base 2,5 M; glicina 1,25 M)

## Reactivos de uso directo

### Gel de separación 11%

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

En el momento de preparar el gel agregar:

- 12 µl de TEMED
- 120 µl de persulfato de amonio (APS) 10 % (p/v)

### Gel de concentración

- 0,556 ml de agua
- 2 ml de mezcla acrilamida/bisacrilamida 10:2%
- 1 ml de buffer de concentración
- 0,4 ml de glicerol puro

En el momento de preparar el gel agregar:

- 8 µl de TEMED
- 80 µl de persulfato de amonio (APS) 10 % (p/v)

### Buffer de corrida 1X

- 50 ml de buffer de corrida 10X
- Ascorbato 2 mM

Enrasar con agua destilada hasta 500 ml

## Protocolo

**IMPORTANTE:** Los volúmenes de las soluciones expresadas en el protocolo corresponden a un gel de 1,5 mm de espesor para los sistemas “Miniprotean II” en adelante.

1. Ensamblar los vidrios con los separadores de 1,5 mm.

2. Marcar el límite hasta donde la matriz de acrilamida será vertida, trazando una línea horizontal en el vidrio con un marcador indeleble. Para saber la ubicación exacta de la línea, colocar el peine entre ambos vidrios y medir 1 centímetro por debajo de los dientes del peine.
3. Realizar la mezcla del gel de separación a una concentración que permita separar las proteínas en estudio. Para los geles de SOD y APX se puede utilizar una concentración de 11%. Añadir todos los componentes, mezclando bien después de añadir cada uno, dejando para el final los catalizadores APS y TEMED. La polimerización de la solución se desencadena al agregar ambos catalizadores y demora entre 5 y 15 min dependiendo de la temperatura ambiente.
4. Inmediatamente luego de adicionar el APS y TEMED, mezclar bien y colocar la mezcla entre los vidrios con una pipeta.
5. Añadir 1 ml de isobutanol, aproximadamente, para evitar el ingreso de oxígeno y generar una superficie de unión de los geles uniforme.
6. Dejar polimerizar a temperatura ambiente por 5-15 min, usando como control de polimerización la solución de poliacrilamida remanente.
7. Una vez polimerizado el gel, descartar el solvente y lavar con agua destilada.
8. Secar el exceso de agua con papel absorbente, inclinando el gel para que el agua se acumule de un lado.
9. Preparar la mezcla del gel concentrador, repitiendo el proceso. En este caso, la concentración es fija.
10. Agregar la solución entre los vidrios de la cámara y sobre el gel de separación ya polimerizado. Inmediatamente colocar el peine entre ambos vidrios.
11. Una vez polimerizado, colocar los vidrios en la cuba, agregar 150 ml de buffer de corrida 1X en el espacio entre los geles y retirar los peines cuidadosamente.  
NOTA: adicionar ascorbato 2 mM al buffer de corrida para APX
12. Lavar todos los pocillos ya formados con el mismo buffer.
13. Colocar 200 ml de buffer corrida 1X en el exterior de los geles.
14. Preparar las muestras con 1 volumen de buffer de carga y 3 volúmenes de extracto. Sembrar entre 40 y 70 µg de proteínas totales por pocillo.
15. Depositar cuidadosamente una muestra en cada pocillo, evitando la contaminación del pocillo contiguo.
16. En la fuente de poder, seleccionar amperaje constante. En esta condición el voltaje aumenta durante la corrida. El valor del amperaje o corriente eléctrica (medida en amperios o miliamperios) dependerá de la fuerza iónica del buffer. En el caso de trabajar con buffer Tris-glicina 1X el valor recomendado es de  $I=12,5$  mA por gel. Se realiza la electroforesis hasta que el frente de corrida (visualizado como una línea azul por el colorante del buffer) llega al límite inferior del gel.
17. Retirar el gel de la cuba. Separar los vidrios con una espátula, suavemente.
18. Implementar la tinción correspondiente.

## Referencias

- Davis B.J. 1964. Disc electrophoresis. li. Method and application to human serum proteins. Ann NY Acad Sci. 121, 404-27. doi: 10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 ed. Cold Spring.

