

Efecto de la salinidad en plantas del género Prunus: Función de los antioxidantes



Alumnas: Ana María Sánchez Matillas y Clara Pérez Zamora
Tutor IES Domingo Valdivieso: Francisco Javier López Torres



Investigadores CEBAS-CSIC: José A. Hernández, Pedro Díaz-Vivancos



Introducción

España es uno de los principales productores de frutales del género Prunus, especialmente melocotonero y albaricoquero, ocupando Murcia un lugar principal. La información acerca del efecto de la salinidad sobre el crecimiento y metabolismo de frutales del género Prunus es muy escasa. En lo referente a la función del metabolismo antioxidativo sobre la respuesta de los Prunus a salinidad, la información es inexistente. La mayor parte de la información en este sentido se ha realizado en cultivos *in vitro* mientras que la información en condiciones de campo o de invernadero es más escasa. Además de los componentes osmótico y tóxico, la salinidad también produce un estrés oxidativo a nivel subcelular mediado por especies reactivas del oxígeno (ROS) (Hernández et al 1993, 1995, 2001). Para defenderse de los daños derivados de las ROS las células aerobias han desarrollado un complejo sistema de defensa compuesto por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Noctor and Foyer, 1998).

La tolerancia de los frutales a la salinidad depende en gran medida al portainjertos sobre el cual se injerta la variedad en cuestión. Los frutales están considerados como sensibles a la salinidad. En este sentido, se ha descrito que la mayoría de árboles frutales son sensibles a niveles de salinidad por encima de 1,5-1,7 dS/m, que corresponde aproximadamente a niveles de 15-20 mM de NaCl. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es estudiar la respuesta de plantas de melocotonero GF-305 a la salinidad, estudiando el efecto de 2 g/l de NaCl (34 mM) sobre el crecimiento vegetal, el contenido de nutrientes en raíces y hojas, contenido y fluorescencia de clorofilas y el metabolismo antioxidativo.

Material y Métodos

Las plantas de melocotonero (4 semanas de edad después del invierno artificial) se trataron con 2g/l de NaCl durante 4 semanas. El análisis de macro y micronutrientes se llevó a cabo en hojas y raíces, previamente secadas en una estufa (70°C, 48 h) en el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC. El contenido de clorofilas en hojas se realizó mediante extracción con acetona al 80% en frío, según el método de Arnon (1949). La concentración de ácido ascórbico y glutatión se determinó según Díaz-Vivancos et al (2013). Para determinar las enzimas antioxidantes se siguieron protocolos descritos en Hernández et al (2001) y Acosta-Motos et al (2015). La concentración de proteínas en las muestras se realizó según el método de Bradford (1976). La separación de las isoenzimas de superóxido dismutasa (SOD) se llevó a cabo en geles nativos de poliacrilamida según se describe en Hernández et al (2001).

Resultados

Tabla 3.- Efecto de la salinidad sobre la actividad de diferentes enzimas antioxidantes en plantas de melocotonero GF-305. ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para las diferentes enzimas medidas. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 95% (*); 99% (**); 99,9% (***); ns, no significativo.

Tratamiento	APX	MDHAR	DHAR	GR	SOD	CAT	POX
	nmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹ prot				U mg ⁻¹ prot	μmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹ prot	nmol x min ⁻¹ x mg ⁻¹ prot
Control	361,3 ± 46,1	1166,2 ± 89,4	356,9 ± 43,9	140,0 ± 13,0	383,9 ± 68,1	45,9 ± 3,7	970,9 ± 156,6
34 mM NaCl	170,3 ± 16,7	785,6 ± 164,1	532,9 ± 32,0	138,5 ± 14,7	379,6 ± 23,1	58,2 ± 3,4	1205,6 ± 144,4
^a F	14,03***	3,72 ns	23,42***	0,05 ns	0,02 ns	12,49**	1,13 ns

Si bien las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas (n=3), sí que se pudo observar un efecto del NaCl en el crecimiento

Tabla 1.- Efecto de la salinidad en el crecimiento de plantas de melocotonero GF-305. ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para los diferentes parámetros estudiados.

Parámetro	Control	34 mM NaCl	^a F
Peso Hojas	3,20 ± 0,24	2,59 ± 0,28	2,63 (ns)
Peso Tallos	4,53 ± 0,47	4,35 ± 0,40	0,85 (ns)
Peso Raíz	12,51 ± 1,02	10,53 ± 0,85	2,20 (ns)
Peso parte aérea	7,74 ± 0,71	6,95 ± 0,64	0,67 (ns)
Peso Total	20,24 ± 1,45	17,48 ± 1,40	1,86 (ns)
Parte aérea/raíz	0,623 ± 0,05	0,660 ± 0,04	0,38 (ns)

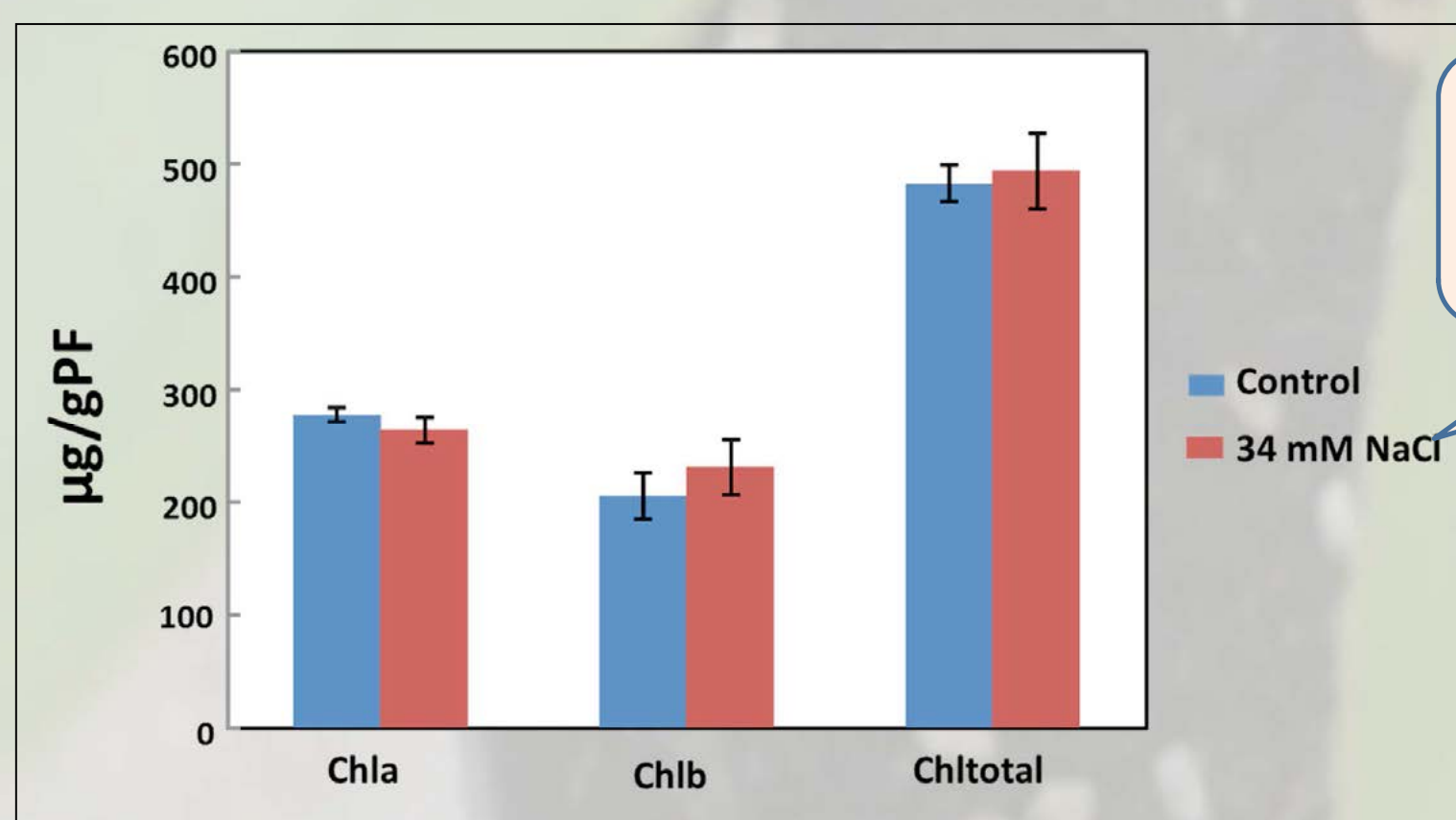
Tabla 4.- Efecto de la salinidad sobre los niveles de ascorbato y glutatión en plantas de melocotonero GF-305. ^aValores de F del análisis ANOVA de una vía para las diferentes enzimas no enzimáticas medidas. Los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 95% (*); ns, no significativo.

NaCl [mM]	ASC	GSH	GSSG	GSH/GSH+GSSG
	μmol/gPF	nmol/gPF		
0	33,84 ± 5,90	178,66 ± 13,76	72,91 ± 10,51	0,710
34	35,54 ± 4,54	144,70 ± 0,10	60,53 ± 2,36	0,705
^a F	0,048 ns	21,61*	1,31 ns	0,10 ns

La salinidad producía un descenso de las enzimas APX, pero aumentó la actividad de las enzimas DHAR, POX y Catalasa (Tabla 3). La salinidad no afectó a los niveles de ascorbato reducido, no detectando ascorbato oxidado (DHA) (Tabla 4). Sin embargo, la salinidad afectaba a los niveles de glutatión reducido (GSH), produciendo un descenso de casi un 20% del mismo, pero no se observó acumulación de glutatión oxidado (GSSG), lo que no modificó el estado redox celular del glutatión.



Figura 1.- A) Plantas de melocotonero GF-305 crecidas en ausencia y en presencia de 34 mM NaCl. B) Efecto de la salinidad en el crecimiento de raíces de plantas de melocotonero GF-305. Barra = 2 cm



La salinidad no afectó de forma significativa a los contenidos de clorofilas

Fig. 2.- Efecto de la salinidad sobre los contenidos de clorofilas en hojas de melocotonero GF-305

Las plantas de melocotonero acumulaban los iones fitotóxicos (Na y Cl) en raíces. La salinidad reducía los contenidos de Mn, Fe y Zn en hojas y de Mn y Cu en raíces, pero no afectó a los niveles de otros nutrientes importantes para las células vegetales, como el K, Ca, Mg, P y B.

Tabla 2.- Efecto de la salinidad sobre el contenido de macro y micronutrientes en hojas y raíces de plantas de melocotonero GF-305.

Tratamiento		K (%)	Na (ppm)	Cl (%)	Ca (%)	Mg (%)	P (%)	Fe (ppm)	B (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)
Control	Hoja	2,50	90,0	0,45	0,95	0,49	0,51	64,0	0,95	1,42	116,02	7,25
	Raíz	1,04	283,0	0,53	0,37	0,14	0,31	90,61	0,37	15,13	70,14	25,12
34 mM NaCl	Hoja	2,40	82,0	0,44	0,82	0,46	0,45	32,64	0,82	1,54	71,87	5,80
	Raíz	1,03	414,8	0,87	0,37	0,13	0,29	88,64	0,37	8,96	55,55	20,88

Agradecimientos: Proyecto financiado por la Fundación Séneca, Grontal, Abiopep, Proquilab



De acuerdo con la sensibilidad a diferentes inhibidores pudimos comprobar que el melocotonero GF-305 contiene una Mn-SOD (resistente a KCN y a H₂O₂) y dos Cu,Zn-SOD (sensibles a ambos inhibidores) que denominamos I y II en orden de movilidad creciente.

Conclusiones

El crecimiento de las plantas de melocotonero GF-305 no se vio afectado de forma significativa por el tratamiento con NaCl 34 mM durante un mes. Estas plantas ponen en marcha una serie de mecanismos adaptativos para hacer frente al estrés salino.

- En primer lugar, acumulan iones fitotóxicos en las raíces, lo que favorece la absorción de agua y evita acumulación de los mismos en la parte aérea.
- En segundo lugar, mantienen los niveles de clorofila, como mecanismo de defensa para proteger la fotosíntesis.
- En tercer lugar, se producen cambios a nivel bioquímico, tal y como el mantenimiento de los niveles de ASC, la ausencia de acumulación de las formas oxidadas del ascorbato (DHA) y del glutatión (GSSG), la inducción de las enzimas DHAR (encargada del reciclaje del ASC) y de la catalasa (enzima que elimina el H₂O₂ en los peroxisomas). El aumento de la actividad catalasa es indicativo del aumento de la fotorrespiración, lo que sugiere su implicación como mecanismo de defensa de las plantas de melocotonero en su respuesta a la salinidad.

Referencias

- Arnon (1949) Plant Physiol 24:1-15
- Bradford (1976) Ann Rev Biochem 45:239-254
- Díaz-Vivancos et al (2013) Plant Biotech J 11: 976-985
- Hernández et al (1993) Physiol Plant 89: 103-108
- Hernández et al (1995) Plant Sci 105: 151-167
- Hernández et al (2001) Plant Physiol 127: 817-831
- Noctor, G. and Foyer, C.H. (1998) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 249-279.

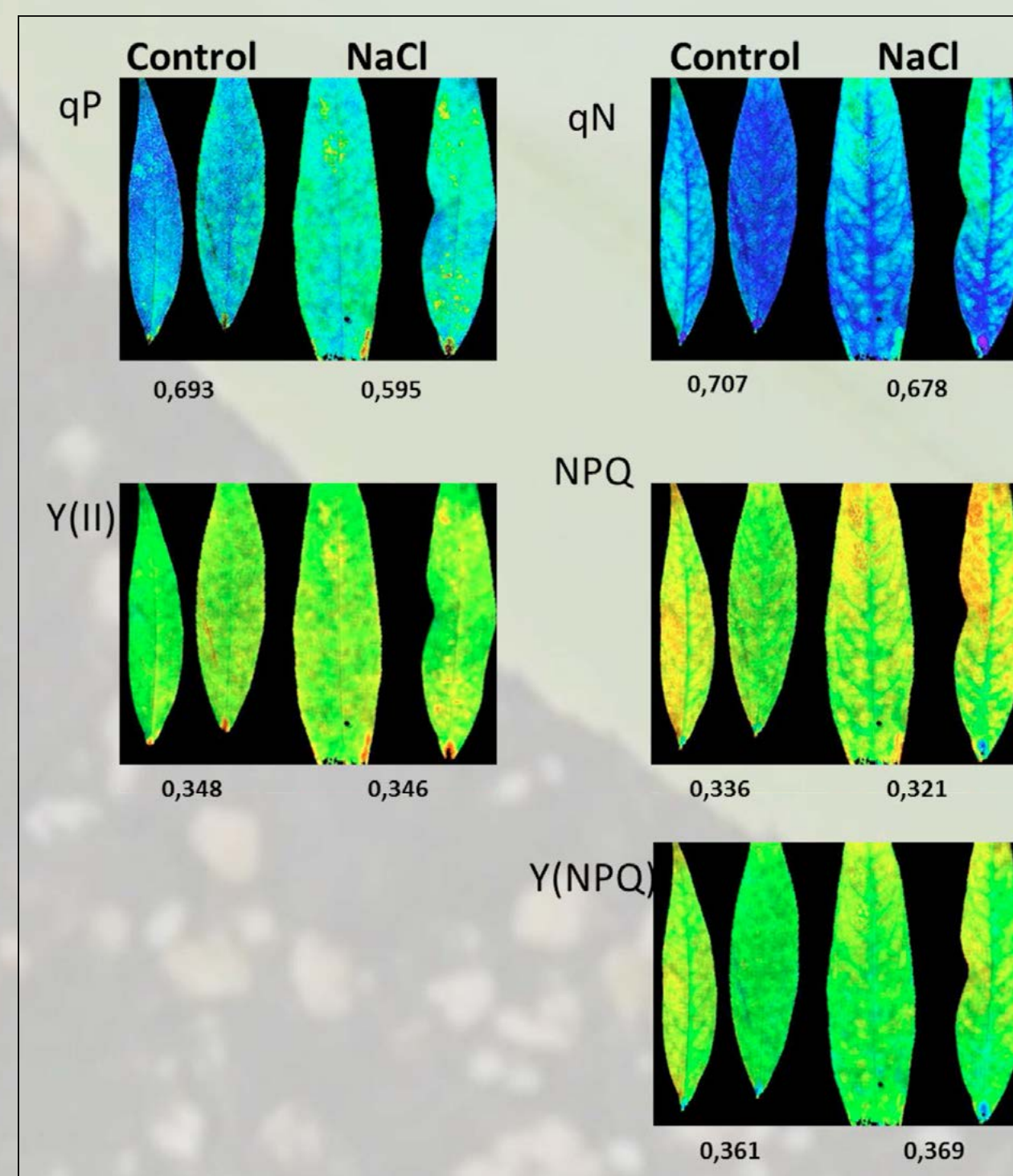


Figura 3. Efecto de la salinidad en la fluorescencia de clorofilas de hojas de melocotonero GF-305

El tratamiento salino provocaba un descenso sobre todo de los coeficientes de quenching fotoquímico (qP) y de quenching no fotoquímico (qN), y el parámetro NPQ (Figura 3). Sin embargo, otros parámetros, como Y(II) o Y(NPQ) no se vieron afectados.

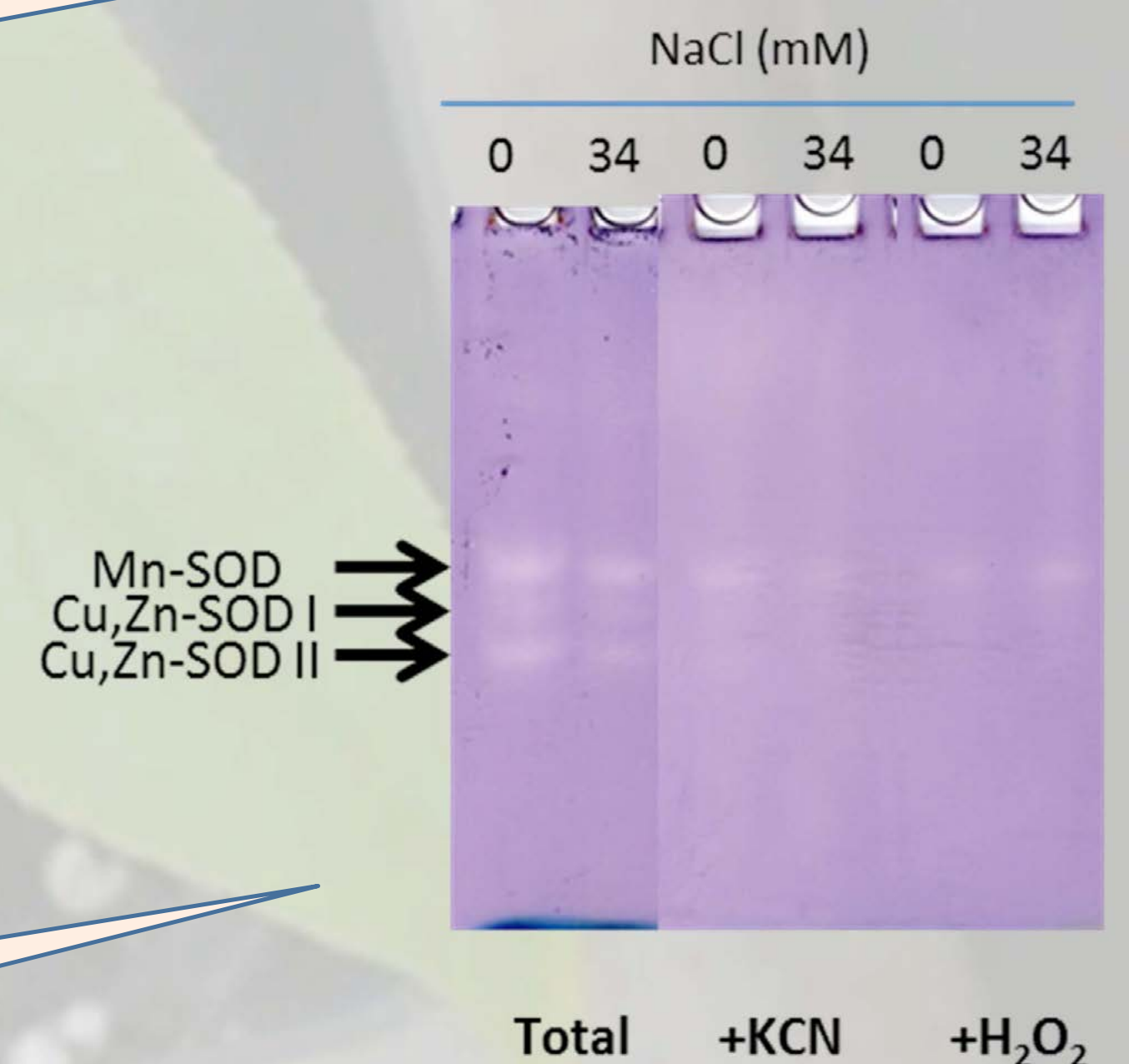


Figura 4.- Patrón de isoenzimas de SOD en hojas de plantas melocotonero GF-305 crecidas en ausencia y en presencia de NaCl 34 mM durante 30 días. Las muestras se concentraron con concentradores Ultrafree-MC (Millipore) y se depositaron 80 μg de proteína en cada calle del gel.

