

PAPEL DE LA PROLINA, BETAINA Y COLINA EN LA TOLERANCIA AL ESTRES SALINO EN LA CAÑA DE AZUCAR

M. Rodríguez; A. Ruíz y A. H. Mederos.

Grupo de Biopantas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN. La determinación del contenido de prolina, betaina y colina, en plantas de caña de azúcar, evidenció la regulación metabólica existente y el posible papel de estos compuestos en la tolerancia de esta planta a la salinidad. La betaina y la colina, no reportadas antes en esta gramínea, mostraron variaciones en hojas y raíces de las variedades estudiadas, tolerantes y susceptibles a la salinidad. Estas variaciones presentaron una relación directa con la acumulación de prolina en hojas y raíces de las variedades, acorde a su grado de tolerancia al estrés salino.

ABSTRACT. Proline, choline and betaine determination in sugar cane plants evidence the metabolic regulation and the possible role in salinity tolerance of these compounds. Betaine and choline, not before reported in this gramineae, showed variation in leaves and roots from tolerant and susceptible studied varieties to salinity stress. These variations presented a direct relationship with leaves and roots proline accumulation from varieties according to the salt degree tolerance.

INTRODUCCION

El empleo de marcadores bioquímicos y fisiológicos aumenta la eficiencia de los programas de mejoramiento para la obtención de variedades tolerantes al estrés salino. Estos permiten establecer de forma precoz las plantas que presentan un comportamiento de tolerancia a la salinidad, lo que agiliza y facilita el trabajo de selección.

Para diferentes gramíneas, existen reportes que demuestran que el aminoácido prolina y los derivados aminados, colina y betaina, presentan las mayores variaciones en sus niveles ante condiciones de estrés salino¹⁻³.

La acumulación de prolina ocurre en numerosas plantas sujetas a cualquier tipo de estrés que incrementen el déficit de agua como la salinidad, la sequía y el frío⁴. La prolina a altas concentraciones actúa como regulador osmótico⁵, como agente protector de enzimas y estructuras celulares⁶ y además como almacén de nitrógeno¹.

La prolina constituye una fuente de energía necesaria en el metabolismo inmediatamente después del estrés⁵. Splittstoesser en 1973⁷, señaló que la prolina, dada su solubilidad, su carácter neutro, su facilidad de transporte y el hecho de que a elevadas concentraciones tiene solo una pequeña influencia sobre la actividad enzimática celular, juega un papel importante frente al estrés salino ya que al acumularse en el protoplasma, las células alcanzan un potencial hídrico muy bajo impidiendo la pérdida de agua desde la célula⁵. La acumulación de prolina en las plantas es un proceso reversible, una vez cesado el efecto del estrés disminuye el contenido de prolina⁸.

En condiciones de estrés salino se acumulan compuestos cuaternarios como la betaina y la colina. En particular, la betaina es un compuesto que se localiza fundamentalmente en el citoplasma donde actúa como regulador osmótico⁹. Estudios radiactivos "in vivo" demostraron que la betaina se sintetiza en hojas a partir de la colina a través de dos pasos de oxidación mediados por deshidrogenasas¹⁰.

Trabajos realizados por Pan en 1981¹¹, demostraron que la velocidad de acumulación de betaina es similar a la de la prolina al eliminarse el estrés, la prolina es metabolizada rápidamente mientras que la betaina permanece en los tejidos. La prolina se acumula para combatir el estrés momentáneo y la betaina, además de actuar como regulador osmótico, aclimata la célula para un futuro estrés.

El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar el comportamiento de dichos compuestos en plantas de caña de azúcar sometidas o no a estrés salino y observar su posible relación con la tolerancia a la salinidad de esta gramínea.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron dos variedades de caña de azúcar que presentan diferentes grados de tolerancia a la salinidad según criterios y observaciones experimentales y de la producción. La variedad C 26670 se tomó como tolerante y la variedad C 8751 como susceptible¹².

Un grupo de yemas germinadas de ambas variedades se sembraron en bolsas de polietileno con suelo pardo normal y otro grupo fue sembrado en suelo pardo salino conteniendo 3 % de cloruro de

sodio, siendo después situados en condiciones controladas de invernadero.

Las determinaciones de prolina, betaina y colina se realizaron en hojas y raíces de las plantas a los tres meses de edad. La ruptura del material vegetal se realizó mediante maceración, luego de su congelación, con nitrógeno líquido y se procedió a la obtención del extracto vegetal para cada análisis.

Determinación del contenido de prolina.

Se utilizó el método reportado por Torrecillas y col.¹³. El extracto vegetal se trató con ácido sulfosalicílico al 3 % durante 20 h. El sobrenadante, obtenido mediante una centrifugación a 500 x g, se incubó con 2.5 % ninhidrina, H₂PO₄ 6 mol/L y 60 % ácido acético, 1 h a 100°C. La absorbancia del producto coloreado obtenido se determinó a 520 nm.

Extracción de betaina y colina.

Se empleó el método de Pearce¹⁴, modificado. Un gramo de muestra que tratado con 20 mL de metanol con agitación constante. Después de una hora se centrifugó 5 min a 500 x g. El sobrenadante se evaporó a sequedad a 65 °C. El residuo fue disuelto en 20 mL de éter: HCl 0,1 mol/L (1:1). La fase etérea fue eliminada y a la fase acuosa se le añadió 10 mL de éter etílico. La fase acuosa fue colectada y evaporada a sequedad. El residuo final se disolvió en agua destilada.

Determinación del contenido de betaina y colina

Se realizó por el método de Wall y col.¹⁵, el extracto se diluyó 1:1 con KH₂PO₄ 0,2 mol/L, pH 7 y se centrifugó a 700 x g. El precipitado se disolvió en 0,5 mL de agua destilada para la determinación de colina. La betaina fue determinada a partir del sobrenadante. Se incubaron 0,2 mL de muestra con KI/I₂ a 0 °C durante 80 min. El precipitado periodado se disolvió en 1,2 dicloroetano y se determinó la absorbancia a 365 nm.

Los experimentos se realizaron en tres ocasiones y cada uno se llevó a cabo con tres réplicas. Se confeccionaron curvas patrones a partir de concentraciones conocidas de los compuestos estudiados y la densidad óptica correspondiente a cada valor de concentración. Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico empleando el test de Anova de clasificación simple y el de comparación de medias Duncan para p < 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como resultado del estrés salino se observó una disminución significativa del nivel de betaina de las hojas y de las raíces. En la Figura 1 se muestra la determinación del contenido de betaina a partir de hojas y raíces de 3 meses de edad de las variedades C 8751, susceptible, y C 26670, tolerante a la salinidad. Las plantas fueron sembradas en suelo normal y suelo salino conteniendo 3 % de NaCl. En las tres figuras, las letras diferentes indican diferencias significativas según el análisis de varianza del test de comparación de medias Duncan (p < 0,05).

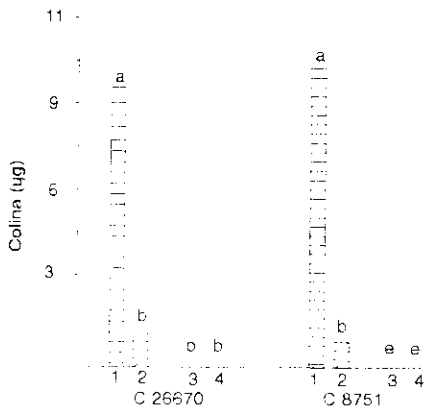


Fig.1. Determinación de betaina (1) Hoja, suelo normal; (2) Hoja, suelo salino. (3) Raíz, suelo normal. (4) Raíz, suelo salino. Las letras indican diferencias significativas según el test de comparación de medias Duncan ($p < 0,05$).

Esto evidenció que el metabolismo de la betaína se deriva hacia la formación de prolina, que se acumula como regulador osmótico. En la variedad susceptible (C 8751), frente al estrés salino, se observó un aumento significativo en el nivel de betaína en las hojas y no se produjo variación significativa del contenido de betaína en las raíces. Esto pudiera ser provocado por la acumulación de betaína como soluto osmótico para contrarrestar el desbalance producido por el estrés salino.

En la Figura 2 se muestra determinación del contenido de colina a partir de hojas y raíces de 3 meses de edad de las variedades C 8751 y C 26670. El contenido de colina en las hojas de ambas variedades disminuyó significativamente, siendo mayor en la variedad susceptible. Esto pudo ser provocado por la formación de betaína a partir de la colina, ya que en esta variedad es donde se produce un aumento mayor en el contenido de betaína.

En las raíces de ambas variedades no se observó presencia de colina. De forma general, se aprecian bajos niveles de colina en las variedades de la caña de azúcar. Es de suponer que estos bajos niveles están asociados a los incrementos de betaína y más específicamente de prolina, por la interrelación metabólica existente entre estos compuestos.

En ambas variedades se produjo un aumento significativo en el nivel de prolina en las hojas. En la Figura 3 se muestra la determinación del contenido de prolina a partir de hojas y raíces de 3 meses de edad de ambas variedades. Las plantas fueron sembradas en las mismas condiciones. Las letras diferentes indican diferencias signifi-

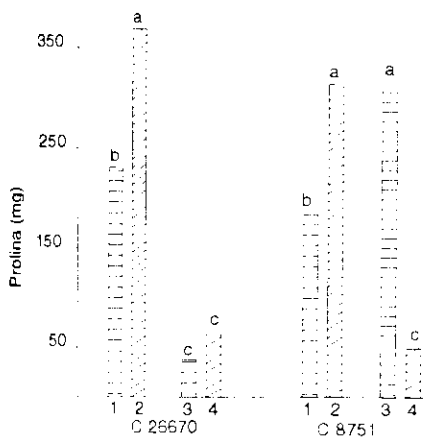


Fig.3. Determinación de prolina (1) Hoja, suelo normal; (2) Hoja, suelo salino. (3) Raíz, suelo normal. (4) Raíz, suelo salino. Las letras indican diferencias significativas según el test de comparación de medias Duncan ($p < 0,05$).

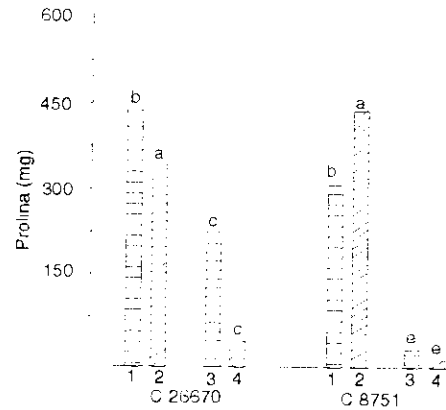


Fig.2. Determinación de colina (1) Hoja, suelo normal; (2) Hoja, suelo salino. (3) Raíz, suelo normal. (4) Raíz, suelo salino. Las letras indican diferencias significativas según el test de comparación de medias Duncan ($p < 0,05$).

cativas. Como se observa en (Fig 3), tal y como observó Jerez³ frente al estrés hídrico. En la variedad susceptible, se observó una disminución significativa del contenido de prolina en las raíces, mientras que en la variedad tolerante no se apreciaron cambios significativos.

Este comportamiento pudiera encontrar su explicación en una translocación de prolina de la raíz hacia las hojas, con el objetivo de regular el desbalance osmótico producido en éstas y mantener eficiente el metabolismo de la planta.

CONCLUSIONES

Se demostró la existencia de diferentes niveles de los metabolitos estudiados como respuesta al estrés salino en las variedades tolerantes y susceptibles a la salinidad.

Las variaciones de los niveles de prolina y betaína mostraron una relación directa diferencial como respuesta al estrés salino en las variedades de la caña de azúcar estudiadas y abren nuevas posibilidades en la búsqueda de marcadores bioquímicos asociados a la tolerancia al estrés salino en la caña de azúcar.

BIBLIOGRAFIA

- Barnett N.M. and Naylor A.W. *Plant Physiol.* 41, 1222, 1966.
- Hanson A.D., Nelsen C.E., Pederson A.R. and Averson E.H. *Crop Science* 19, 489, 1979.
- Jerez E. *Cultivos Tropicales*. INCA. Reseña, 24p. 1987.
- Steward G.R. and Larher F. *The biochemistry of plants* 5, 609, 1980.
- Steward G.R. and Lee J.A. *Planta* 120, 279, 1974.
- Schobert B.P. and Tchesche T., *Bloch. Biophysica Acta* 541, 270, 1978.
- Splitstoeser S.A. *Phytochemistry* 12, 1565, 1973.
- Steward G.R. *Plant Physiology* 61, 775, 1978.
- Wyn Jones R.G. *Acad. Press Sydney* 171, 1981.
- Weigel P. *Plant Physiology* 82, 753, 1986.
- Pan S.M. *Plant Physiology* 67, 1105, 1981.
- Díaz P., Ruiz A. y Maribona R.H. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 22, 38, 1991.
- Torrecillas A., Leon A., F. del Amor y Ruiz M.C. *Agrochimica* 28, 371, 1984.
- Pearce R.B., Strange R.N. and Smith H. *Phytochemistry* 15, 953, 1976.
- Wall J.S., Christianson D.D., Dimler R.J. and Senti F.R. *Analytical Chemistry* 32, 870, 1960.