

INVESTIGACION EN FACULTADES DE INGENIERIA DEL NOA



XIV

JORNADAS DE
CIENCIA Y
TECNOLOGÍA
DE FACULTADES
DE INGENIERÍA
DEL NOA

S. M. DE TUCUMÁN
5 y 6 DE SEPTIEMBRE 2019



Revista N° 5. Año 2019.
ISSN: 1853-6662



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología
Av. Independencia 1800, (4000) Tucumán

Revista: Investigaciones en Facultades de Ingeniería del NOA Número 5.

Trabajos sometidos a referato

<http://codinoa.facet.unt.edu.ar/index.php/revista-numero-5/>

ISSN: 1853-6662



Ajuste osmótico en plántulas de *Coursetia hassleri* en respuesta a estrés salino

Fuentes, Franco J.¹; Abdala Gabriela C.¹; Nazareno, Mónica A.^{2,3}; Toselli, María E.¹ y Meloni, Diego A.¹

(1). Facultad de Agronomía y Agroindustrias – INDEAS – UNSE, Argentina.
franco.fuentes1984@gmail.com; gabyabdala@hotmail.com ; mariaetoselli@gmail.com ; melonidiego@yahoo.com.ar

(2). Facultad de Agronomía y Agroindustrias – ICQ – UNSE, Argentina
manazar2004@yahoo.com

(3). CONICET, Argentina

RESUMEN: *Coursetia hassleri* es una leguminosa nativa promisorio como forrajera para zonas marginales del NOA donde la salinidad es una de las principales limitantes. El objetivo del trabajo fue poner a prueba la hipótesis que *C. hassleri* se ajusta osmóticamente, mediante la síntesis de azúcares solubles y prolina. Se cultivaron hidropónicamente plántulas de 10 días de edad, en solución nutritiva de Hoagland al 25%, en condiciones de campo. Luego de 50 días, se adicionaron pulsos salinos de 10 mM de Na₂SO₄, cada 48 h hasta lograr concentraciones de 20, 40 y 60 mM. Veinte días después de alcanzada la concentración final, se determinó el contenido relativo de agua (CRA) y se cuantificaron las concentraciones de azúcares solubles y prolina. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 4 repeticiones y los resultados se analizaron con ANOVA y test de Tukey. El CRA se mantuvo constante en todos los tratamientos salinos, indicando que la especie se ajusta osmóticamente. La concentración de azúcares solubles se mantuvo constante en todos los tratamientos, mientras que la de prolina se incrementó más de 300% con respecto al control para la mayor concentración salina. Se concluye que *C. hassleri* realiza ajuste osmótico, mediante la síntesis de prolina.

ABSTRACT: *Coursetia hassleri* is a native legume promising as a forage for marginal areas of the NOA where salinity is one of the main constraints. The objective of the work was to test the hypothesis that *C. hassleri* adjusts osmotically, through the synthesis of soluble sugars and proline. A series of 10-day-old seedlings were hydroponically grown in 25% Hoagland nutrient solution under field conditions. After 50 days, saline pulses of 10 mM Na₂SO₄ were added, every 48 hours until reaching concentrations of 20, 40 and 60 mM. Twenty days after the final concentration was reached, the relative water content (CRA) was determined and the concentrations of soluble sugars and proline were quantified. A completely randomized experimental design with 4 replicates was used, and the results were analyzed with ANOVA and Tukey test. The CRA remained constant in all saline treatments, indicating that this species was osmotically adjusted. The concentration of soluble sugars remained constant in all treatments, while the concentration of proline increased more than 300% with respect to the control, in the highest saline concentration. It is concluded that *C. hassleri* performs osmotic adjustment, through the synthesis of proline.

Palabras claves: Ajuste osmótico - *Coursetia hassleri* - estrés salino - forrajera.

Keywords: Osmotic adjustment - *Coursetia hassleri* - salt stress - forage.

1 INTRODUCCION

Las condiciones de estrés abiótico causan grandes pérdidas para la producción agrícola en todo el mundo (Bray *et al.*, 2000). La salinidad edáfica es

uno de los estreses más importantes a nivel mundial.

En Argentina, hay aproximadamente 34 000 000 ha bajo condiciones de exceso de sal, teniendo en

cuenta sólo ambientes húmedos y zonas de regadío. Este problema es más relevante en las regiones áridas y semiáridas, donde las precipitaciones escasas y la alta demanda de evaporación causada por las altas temperaturas del aire y la baja humedad relativa, contribuyen intensamente a la salinización del suelo. Esta situación representa condiciones ecológicas extremas que reducen drásticamente la productividad de los cultivos (Viégas *et al.*, 2001; Reinoso *et al.*, 2004).

En Santiago del Estero, la salinización ha ocurrido no sólo en áreas bajo riego sino también en áreas no regadas donde se ha producido un proceso de acumulación de sales en el perfil (Prieto *et al.*, 2007).

Entre las leguminosas nativas promisorias como forrajeras para la región chaqueña se menciona a *Coursetia hassleri* (anteriormente *Coursetia caribaea*) (Burkart, 1943; Atala *et al.*, 2008; Frasinelli *et al.*, 2010). Se encuentra distribuida en zonas marginales donde la salinización de los suelos es frecuente, en el estrato arbustivo de los sistemas silvopastoriles, principalmente en los sitios más sombreados

El hecho de que, en condiciones salinas, la disponibilidad de agua para las plantas disminuye y éstas se vean obligadas a vivir en condiciones de sequía fisiológica, ha motivado el desarrollo de numerosas investigaciones encaminadas a dilucidar el efecto de la salinidad en sus relaciones hídricas (González, 2001).

Los efectos adversos de la salinidad sobre el crecimiento vegetal están asociados a la disminución del potencial hídrico del suelo, la toxicidad de los iones, el desbalance nutricional, o una combinación de estos factores (Munns y Tester, 2008).

Algunas plantas pueden mitigar estas condiciones desfavorables produciendo ajuste osmótico, que consiste en la acumulación de solutos osmocompatibles, que contribuyen a disminuir el potencial hídrico celular y mantener la turgencia. Estos solutos incluyen carbohidratos, ácidos orgánicos, aminoácidos, glicinabetaína, entre otros (Ashraf y Foolad, 2007); sin embargo, existe escasa información sobre el comportamiento fisiológico de esta especie.

El objetivo del trabajo fue poner a prueba la hipótesis que *C. hassleri* se ajusta osmóticamente,

mediante la síntesis de azúcares solubles y prolina.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Para obtener las plántulas que fueron colocadas en el sistema de hidroponía, se colocaron a germinar en rollos de papel semillas de *C. hassleri* previamente escarificadas con ácido sulfúrico concentrado 98% (Toselli *et al.*, 2017). Las mismas fueron colocadas en cámara de germinación a 25 °C durante 10 días.

Para los ensayos de hidroponía se acondicionaron macetas de 5 litros con tapas de telgopor perforadas, con solución de Hoagland al 50 % (Hoagland y Arnon, 1950), a las cuales se les colocó un sistema de aireación provisto por aireadores de pecera. En cada una de las macetas se colocaron entre 13 y 15 plántulas de 10 días de edad, las cuales fueron llevadas a umbráculo.

Se registró la temperatura del aire mediante el uso de datalogger y se corrigió diariamente el nivel del agua y el pH de la solución. La solución fue renovada cada 15 días.

El Na₂SO₄ se aplicó gradualmente, a partir de los 50 días de la siembra, para evitar un shock osmótico (pulsos de 10 mM de Na₂SO₄ cada 48 horas).

Los tratamientos fueron: control (solución de Hoagland al 50%) y tres concentraciones salinas: solución de Hoagland al 50%, suplementada con 20, 40 y 60 mM Na₂SO₄. El muestreo se realizó 20 días después del último pulso salino.

Se tomó una muestra compuesta, constituida por los folíolos de todas las plantas provenientes de una maceta. A partir de esta muestra se separó el material para analizar las siguientes variables:

-Contenido Relativo de Agua (CRA):

Se determinó mediante la ecuación propuesta por Silva *et al.* (2010),

$$CRA = [(PF - PS) / (P_{sat} - PS)] * 100$$

Donde:

PF: Peso fresco

PS: Peso del material seco en estufa, a 60°C

P_{sat}: Peso del material saturado de agua destilada durante 24 h

-Contenido de azúcares solubles

El contenido de azúcares solubles se determinó según Dubois *et al.* (1956). Se utilizaron 0,1 g de tejido fresco para realizar la extracción con un homogeneizador, agregando 2 alícuotas de 5 ml de agua destilada, y homogenizando 30 segundos a una velocidad de 5000-8000 rpm. Luego se llevó a centrifuga durante 10 minutos a 8000 rpm, el sobrenadante se enrazó a un volumen final de 50 ml, del cual se tomó una alícuota de 0,5 ml a la cual se le añadieron 0,5 ml de solución de fenol al 5% y 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Las muestras se llevaron a baño maría por 20 minutos y luego de enfriadas, se procedió a la lectura de su absorbancia a 490 nm.

-Contenido de prolina

El contenido de prolina se determinó según Bates *et al.* (1973), sobre muestras de 0,5 g de tejido fresco provenientes de cada tratamiento. Para realizar la extracción, se utilizó la misma metodología antes descripta para azúcares solubles, siendo el solvente de extracción el ácido sulfosalicílico al 3%, y el volumen final del extracto 5 ml. Luego, de cada extracto, se tomó una alícuota de 1,3 ml y se añadieron 1,3 ml de ninhidrina ácida y 1,3 ml de ácido acético glacial. Se calentó durante 30 min a 90 °C en un baño termostático, para luego enfriar en baño de hielo y leer la absorbancia a 520 nm.

-Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 4 tratamientos y 4 repeticiones, siendo la unidad experimental una maceta conteniendo 15 plantas. Los resultados se analizaron con ANOVA y test de Tukey.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El incremento en las dosis salinas con Na₂SO₄ no modificó el CRA con respecto al control en ninguno de los tratamientos evaluados (Fig.1), con valores entre un 83 y 87,5%. Estos resultados indicarían que los tejidos mantuvieron su turgencia, permitiendo reforzar la hipótesis que *C. hassleri* realiza ajuste osmótico.

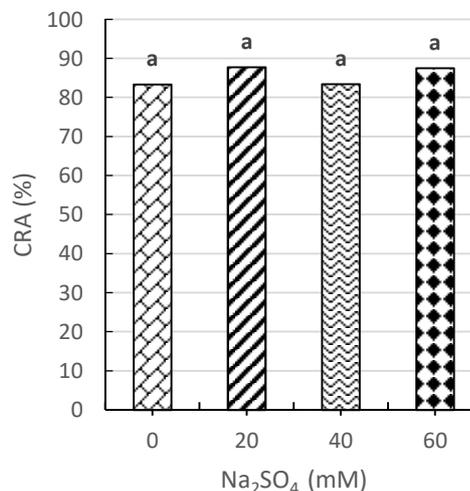


Figura 1. Contenido relativo de agua (CRA) en plantas de *C. hassleri* incubadas en solución Hoagland al 50 % y diferentes concentraciones de Na₂SO₄. Letras distintas indican diferencias significativas según el test de Tukey.

Las diferentes concentraciones salinas no generaron un incremento significativo en el contenido de azúcares solubles (Fig. 2). Estos resultados coinciden con lo encontrado en *Prosopis alba* cultivado en soluciones de NaCl (Meloni, 2017), indicando que no serían estos los metabolitos involucrados en mantener la turgencia celular para estas especies.

A diferencia de lo observado en estudios realizados en *Prosopis ruscifolia* en solución de NaCl (Meloni, 2012) y *Prosopis estrombulifera* en Na₂SO₄ (Llanes *et al.*, 2013) que demostraron un incremento en los niveles de azúcares, sugiriendo que este metabolito cumple un rol importante en el ajuste osmótico en dichas especies.

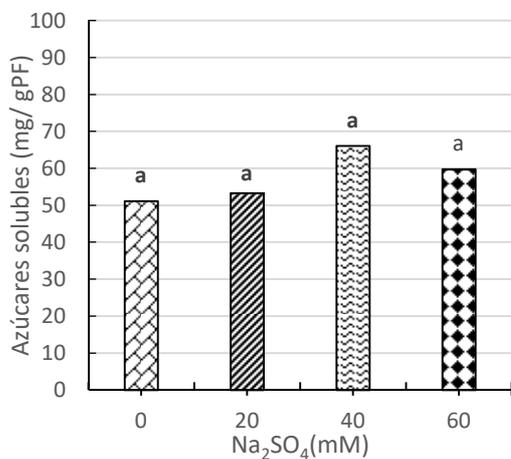


Figura 2. Contenido de azúcares solubles en plantas de *C. hassleri* incubadas en solución Hoagland al 50 % y diferentes concentraciones de Na₂SO₄. Letras distintas indican diferencias significativas según el test de Tukey.

En cuanto al contenido de prolina, éste se mantuvo constante cuando las plantas estuvieron sometidas a concentraciones salinas hasta 40 mM de Na₂SO₄, mientras que, en la mayor concentración se incrementó más de 300% con respecto al control (Fig. 3).

Bray *et al.* (2000) mostraron resultados similares, sugiriendo que las especies sintetizan prolina como mecanismo de tolerancia al estrés, permitiendo a la especie realizar ajuste osmótico. Además se demostró que niveles elevados de prolina (aproximadamente 1 M) podrían cumplir un rol importante como protector de macromoléculas y membranas celulares protegiendo su desnaturalización.

En las plantas superiores la acumulación de prolina es una respuesta metabólica común, al déficit hídrico y estrés por salinidad y ha sido objeto de numerosas revisiones (Stewart y Larher, 1980; Thompson, 1980; Stewart, 1981)

El ajuste osmótico ha sido considerado una importante adaptación fisiológica asociada con la tolerancia al estrés salino (Guo *et al.*, 2013) y los resultados encontrados en *C. hassleri* permitirían inferir que sería prolina uno de los solutos sintetizado para realizar ajuste osmótico.

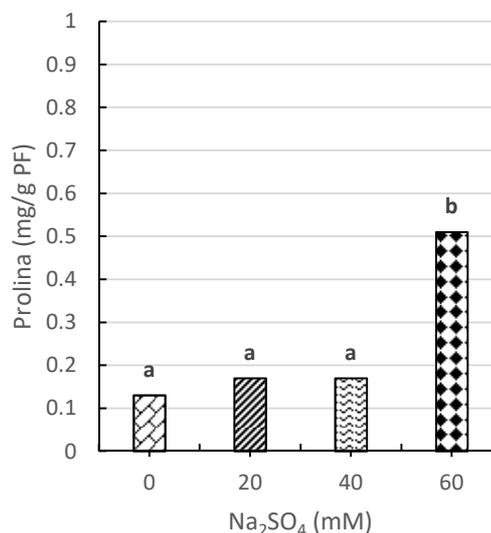


Figura 3. Contenido prolina en plantas de *C. hassleri* incubadas en solución Hoagland al 50 % y diferentes concentraciones de Na₂SO₄. Letras distintas indican diferencias significativas según el test de Tukey.

4 CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que *C. hassleri* realiza ajuste osmótico acumulando prolina, con altos CRA, lo que le permitiría mantener la turgencia celular y de este modo mitigar efectos del estrés salino sobre el crecimiento

5 REFERENCIAS

- Ashraf, M. and M.R. Foolad, Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59:206-216, 2007.
- Atala, D; F. Baudo, M. A. Álvarez Igarzabal, F. Fernández y A. Medina, *Proceso y Programa de Ordenamiento Territorial de los Bosques Nativos de la Provincia de Córdoba*. Secretaría de Ambiente de la Provincia de Córdoba. Córdoba, Argentina. 168 p. 2008.
- Bates, L.S; R.P. Waldren and I.D. Tear, Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205-207, 1973, 1973.

- Bray, E. A.; Bailey-Serres, J. and E. Werwilnyk, Responses to abiotic stresses. Buchanan, W.; Grisse, W. and Jones, R. (Eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Am. Soc. of Plant Physiol. MD.USA,: 1158-1249. 2000.
- Burkart, A., Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. ACME Agency. Buenos Aires. Argentina, 1943.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-356, 1956.
- Frasinelli, C.; H. Petrucci, J. Meyer y J. Veneciano, Leguminosas con valor forrajero en la región extra-pampeana. Informe visita Estaciones Experimentales del Centro Regional. INTA. Argentina, 2010.
- González, L.M., Apuntes sobre la fisiología de las plantas cultivadas en condiciones salinas. Cultivos Tropicales 23 (4):47-57, 2001.
- Guo, R., J. Zhou, G. Ren y V. Han, Physiological responses of linseed seedlings to iso osmotic polyethylene glycol, salt, and alkali stresses. Agronomy Journal. 105 (3), 764-772, 2013.
- Hoagland, D.R. and D.I. Arnon, The water culture method for growing plants without soils. Cal. Agric. Exp. Stat. Circ. 374. 32 p, 1950.
- Llanes, A., G. Bertazza, G. Palacio y V. Luna, Different sodium salts cause different solute accumulation in the halophyte *Prosopis strombulifera*. Plant Biology. 15 (sup. 1), 2013.
- Meloni, D. Respuestas fisiológicas a la suplementación con calcio de plántulas de vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) estresadas con NaCl. Revista de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo. 44 (2) 79-88, 2012.
- Meloni, D., D. González, D. Moura Silva y G. Bolzon, Relaciones hídricas. En Fisiología vegetal: Respuestas de especies leñosas al estrés salino. (Ed. Meloni D.) pp 52-82. 1a. ed. EDUNSE, 2017.
- Munns, R., and M. Tester. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology 58:651-681, 2008.
- Prieto D., G. Angella, y C. Angueira, Un enfoque al problema de la salinidad en el área de riego del Río Dulce, Santiago del Estero. En “La salinización de los suelos en la Argentina: su impacto en la producción agropecuaria”. Taleisnik, E.; Grunberg, K. y Santa María, G. (eds.). 1ª ed. Córdoba: EDUCC - Editorial de la Universidad Católica de Córdoba, 2007.
- Reinoso, H., L. Sosa, L. Ramírez, and V. Luna, Salt-induced changes in the vegetative anatomy of *Prosopis strombulifera* (Leguminosae). Can. J. Bot. 82: 618-628, 2004.
- Silva, E.N.; S.L. Silva and R.A. Viégas, The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. Environmental and Experimental Botany 69:279-295, 2010.
- Stewart, C.R, Proline accumulation: Biochemical aspects. In: Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants, Paleg, L.G. and Aspinall, D. (eds.) Academic Press, Sydney, pp. 243-259, 1981.
- Stewart G.R. and F. Larher, Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. In: The Biochemistry of Plants. Mifflin, B.J. (eds), vol. 5, Academic Press, New York, pp. 609-635, 1980.
- Thompson, J.F, Arginine synthesis, proline synthesis, and related processes. In: The Biochemistry of Plants, Mifflin, B.J. (eds.), vol. 5, Academic Press, New York, pp. 375-403, 1980.
- Toselli, M.E., R.F. Renolfi, F. Fuentes y N. Arcos, *Coursetia caribaea*, una leguminosa forrajera nativa del monte semiárido: germinación y producción de semillas. En: Aportes de la FAyA para el desarrollo agropecuario y agroindustrial del NOA. II. Cadenas de valor en sistemas pecuarios y otros trabajos. Albanesi A., Dominguez Nuñez J., Helman S., Nazareno M., Rodriguez S. (Eds). Primera Edición, UNSE, Santiago del Estero, 2017.
- Viégas, R.A., J.A.G. Silveira, A.R. Lima Júnior, J.E. Queiroz and M.J.M. Fausto, Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants, Rev. Bras. Eng. Agríc. Amb. 5 216-222. 2001