

LOS NIVELES DE PROLINA REFLEJAN LA SITUACIÓN DE ESTRÉS HÍDRICO DE LA REMOLACHA DEL SUR

José Antonio Monreal¹, Eduardo T. Jiménez¹, Rodrigo Morillo-Velarde², Sofía García-Mauriño¹, Cristina Echevarría¹.

¹Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes nº 6, 41012 Sevilla, España.

²AIMCRA (Asociación de Investigación para la Mejora del Cultivo de la Remolacha Azucarera), Delegación Sur, c/ Metalurgia nº 36, 41080 Sevilla, España.

INTRODUCCIÓN

Muchas plantas sometidas a estrés hídrico ponen en marcha cambios fisiológicos que aumentan su tolerancia a dicho estrés. El **ajuste osmótico** en respuesta al estrés aumenta la capacidad de mantener la turgencia celular a potenciales hídricos bajos. Dicho ajuste implica un descenso del potencial hídrico celular mediante el acúmulo neto de solutos. La **prolina** es un osmolito compatible (es decir, que puede acumularse en el citosol sin perjuicios al metabolismo celular) que se sintetiza en plantas en respuesta al estrés osmótico (Yeo, 1998) y que es un buen indicador de déficit hídrico (Iannucci et al., 2000; Ain-Lhout et al., 2001). La cantidad neta de prolina en la planta en condiciones de estrés hídrico aumenta por la inducción y/o activación de enzimas implicadas en su biosíntesis, así como por disminución de la actividad de enzimas implicadas en su catabolismo (Delauney y Verma, 1993) (ver Fig. 1).

Por otro lado, la acumulación de prolina parece ser un factor común a muchos tipos de estrés: hídrico, térmico, causado por metales pesados o por aumento de acidez, y estrés oxidativo (Hare y Cress, 1997).

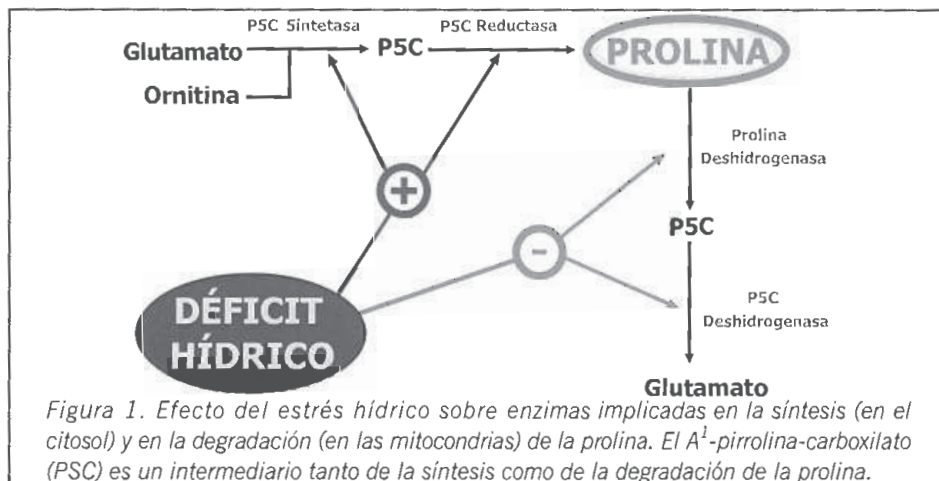


Figura 1. Efecto del estrés hídrico sobre enzimas implicadas en la síntesis (en el citosol) y en la degradación (en las mitocondrias) de la prolina. El A¹-pirrolina-carboxilato (PSC) es un intermediario tanto de la síntesis como de la degradación de la prolina.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

En este trabajo se ha determinado el contenido en prolina en raíces de remolacha como índice del grado de estrés al que estaban sometidas las plantas en las distintas situaciones correspondientes a los ensayos de campo, prestando especial atención a las condiciones hídricas del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Material vegetal:** Se han empleado variedades comerciales de remolacha (Claudia y Ramona), suministradas por AIMCRA y procedentes de ensayos de campo, durante cuatro campañas sucesivas: 1999/2000, 2000/2001, 2001/2002 y 2002/2003.
- **Preparación de las muestras:** Cada muestra estaba formada por una mezcla de al menos tres raíces distintas para cada ensayo y para cada fecha de muestreo.
- **Determinación de prolina:** La prolina se cuantificó empleando ninhidrina según el método de Bates et al. (1973).
- **Determinación de glucosa:** La concentración de glucosa se determinó con el Glc test de Sigma (ST. Louis, Mo., USA)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados presentados corresponden al conjunto de las cuatro campañas estudiadas. En la Fig. 2 se muestra la acumulación de prolina en las variedades Claudia y Ramona en condiciones de riego a demanda y déficit hídrico.

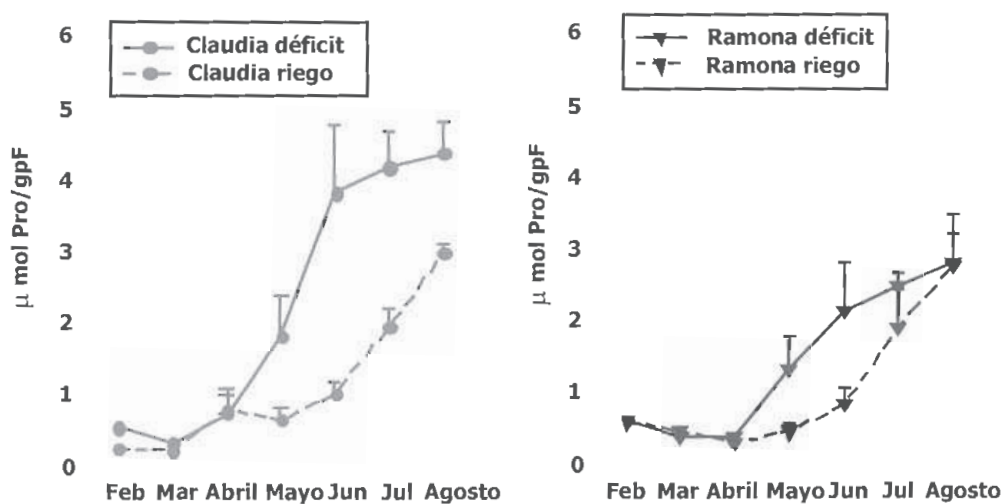


Figura 2. Evolución de los niveles medios de prolina en condiciones de déficit hídrico y riego a demanda. Se muestran los valores medios \pm ES (cuatro campañas) de prolina en las variedades Claudia y Ramona durante el desarrollo de las raíces de reserva.

A partir de Mayo, cuando empieza a subir la temperatura y disminuye el aporte hídrico por precipitación, se produjo un aumento considerable de prolina en las raíces. Dicho aumento fue mayor en déficit hídrico que en riego a demanda.

También se observaron notables diferencias en la respuesta de las dos variedades estudiadas, en general, el contenido en prolina de la variedad Ramona fue siempre inferior al de la variedad Claudia. En la Tabla 1 se muestra el análisis estadístico (t test) de las diferencias en el contenido en prolina debidas al régimen hídrico para cada una de las variedades. Se observó que la variedad Claudia acumulaba significativamente más prolina en respuesta al déficit hídrico a partir del mes de Mayo. Por el contrario, las diferencias relacionadas con el régimen hídrico no eran significativas en la variedad Ramona.

Tabla 1: Comparación de la respuesta al déficit hídrico en Claudia y Ramona. En cada variedad, se contrastó el contenido en prolina en déficit hídrico con el existente en riego a demanda.

	Mayo	Junio	Julio	Agosto
Claudia	NS	$P = 0,005$	$P < 0,001$	$P = 0,009$
Ramona	NS	NS	NS	NS

En la Fig. 3 se compara (ANOVA) la prolina, en las dos variedades y en los dos regímenes hídricos, como media de las cuatro campañas en el mes de Julio. La variedad Claudia acumuló significativamente más prolina en condiciones de déficit hídrico, mientras que la cantidad era inferior en riego a demanda, y similar a la encontrada en Ramona en ambas condiciones.

En conjunto, estos resultados muestran la existencia de condiciones de estrés hídrico en la fase de cultivo anterior a la cosecha. Aunque el estrés es menor en condiciones de riego a demanda, incluso en este último caso se observa incremento de prolina en las raíces. Las dos variedades estudiadas muestran distintos grados de estrés en las mismas condiciones, siendo Ramona mucho más tolerante al déficit hídrico que Claudia. La variedad Ramona también se caracteriza por un menor contenido en azúcares reductores (entre los que está la glucosa).

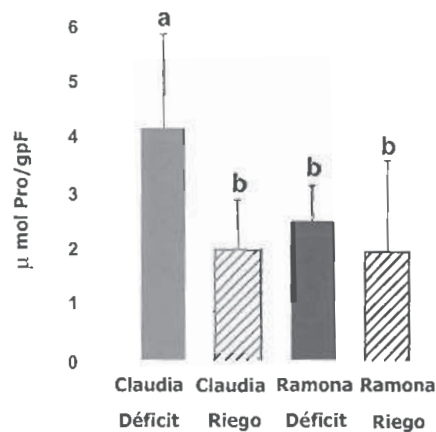


Figura 3. Comparación de la acumulación de prolina en déficit hídrico y riego a demanda en las variedades Claudia y Ramona. Se muestran los valores medios:ES (cuatro campañas) de prolina en las raíces de las dos variedades durante el mes de Julio. Las medias señaladas con la misma letra no difieren para $P < 0.05$

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

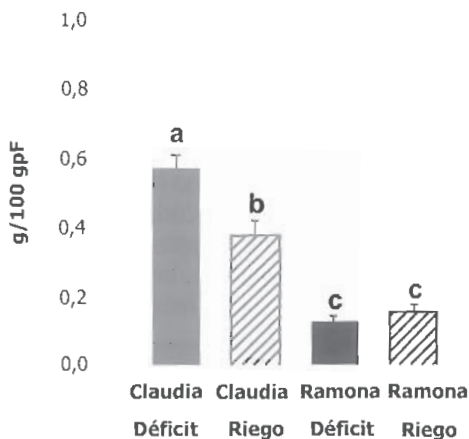


Figura 4. Comparación de la acumulación de glucosa en déficit hídrico y riego a demanda en las variedades Claudia y Ramona. Se muestran los valores medios \pm ES (cuatro campañas) de glucosa en las raíces de las dos variedades durante el mes de Julio. Las medias señaladas con la misma letra no difieren para $P < 0.05$

En la Fig. 4 se compara la glucosa, en las dos variedades y en los dos regímenes hídricos, encontrada como media de las cuatro campañas en el mes de Julio. Las condiciones que favorecen la acumulación de azúcares reductores son en muchos casos las mismas que inducen la de prolina. En efecto, la glucosa en las raíces fue significativamente mayor en Claudia que en Ramona y, en el caso de Claudia, mayor en déficit hídrico que en riego a demanda.

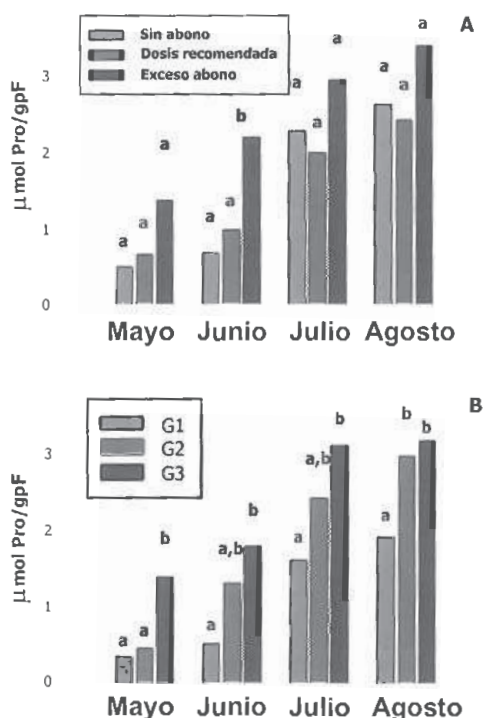


Figura 5. Variaciones en el contenido en prolina según el abonado nitrogenado. Acumulación de prolina, desde mayo hasta agosto, en las raíces de Claudia en riego a demanda y con distinto aporte de nitrógeno. En la parte superior (A), los datos se refieren al N suministrado al cultivo: sin abonado (SN), dosis recomendada (RN) y exceso de abonado (dosis recomendada + 300 UF, EN). En la parte inferior (B), los datos se refieren al contenido de N en las plantas: 277 kg ha⁻¹ (G1), 300 kg ha⁻¹ (G2) y 515 kg ha⁻¹ (G3). Se compararon los grupos correspondientes a cada mes (ANOVA), y las medias significativamente diferentes se han marcado con letras distintas.

En la Fig. 5 se muestra el efecto del aporte nitrogenado sobre la acumulación de prolina en las raíces. El aporte nitrogenado aumentó el contenido en prolina, sobre todo cuando éste era menor (Mayo y Junio, Fig 5A). Cuando se analiza el nivel de prolina en relación con el contenido en N de la planta (Fig 5B) se hace patente y estadísticamente significativo el aumento de prolina consecuencia del sobreabonado. No obstante, la fecha de muestreo, y, por tanto, las condiciones de estrés del cultivo, tiene efectos mayores sobre la acumulación de prolina que el abonado nitrogenado.

Para determinar si la acumulación de prolina estaba ligada a una etapa determinada del desarrollo de la raíz de reserva, se cultivó Ramona en siembra otoñal y en siembra primaveral (Fig 6). En el momento de la cosecha, el contenido en prolina en la remolacha otoñal (que se cosecha en verano) era más del doble del de la remolacha primaveral (se cosecha en otoño). En la parte inferior de la Fig. 6 se muestra la variación del contenido en prolina en relación con el tiempo de cultivo; se observa que remolachas otoñales con aproximadamente el mismo tiempo de desarrollo que las primaverales tienen mayor contenido en prolina que éstas. Es, por tanto, la estación de cosecha, y no el tiempo de desarrollo, el factor determinante de la prolina acumulada.

Diversos resultados experimentales sugerían la posibilidad de que en la respuesta a estrés ocurriese la siguiente secuencia de acontecimientos: situación de estrés, movilización de carbohidratos con hidrólisis de sacarosa realizada por la invertasa ácida, utilización de la energía y de los esqueletos carbonados obtenidos en la respiración de los carbohidratos para la síntesis de prolina, y acúmulo de glucosa en las raíces como remanente de la movilización de reservas de la raíz. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en una aproximación experimental encaminada a actuar sobre dichos acontecimientos y obtener cambios en la respuesta de la planta. El tratamiento con antitranspirantes iba encaminado a disminuir el estrés hídrico al reducir las pérdidas de agua por transpiración, se observa que el efecto de dicho tratamiento es distinto en situación de riego (causa un aumento de prolina) que en situación de déficit hídrico (causa una disminución). Presumiblemente, sólo en esta última situación disminuye el estrés sufrido por la planta al mejorar su estado hídrico, mientras que en el primero se originan otro tipo de situaciones estresantes (estrés térmico por disminución de refrigeración, estrés causado por déficit de CO₂ debido al cierre estomático, etc). El tratamiento con AMP, dirigido a cambiar los niveles de adenilatos en la planta y de esa forma incidir sobre la respiración, no tuvo efectos sobre la prolina acumulada. Por último, se apreció una notable disminución en el contenido en prolina en el tratamiento encaminado a disminuir la actividad de la invertasa ácida, enzima que parece estar implicada en las respuestas a estrés de la remolacha en siembra otoñal en el periodo precosecha, y que son causa de

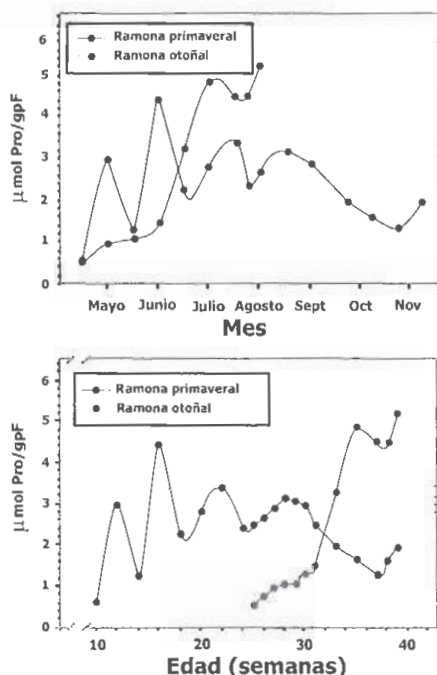


Figura 6. Prolina en las raíces de la variedad Ramona en siembra otoñal y siembra primaveral. Los dos tipos de siembra se realizaron en la misma finca, bajo régimen de riego a demanda y abonado nitrogenado recomendado. En la gráfica superior los datos se presentan según la fecha de muestreo; en la gráfica inferior, según el número de semanas transcurridas desde la siembra hasta la recolección de la raíz.

Aspectos fisiológicos de la remolacha azucarera de siembra otoñal

la disminución de la calidad de la raíz. Aunque preliminares, estos resultados abren una vía hacia la modificación del metabolismo de la remolacha en vías de una mejor calidad del producto cosechado.

Tabla 2. Repercusión sobre el contenido en prolina de varios tratamientos encaminados a cambiar la situación de estrés o la actividad metabólica de la remolacha. Se realizaron tratamientos con antitranspirantes (tratamientos en Mayo y Junio, y muestreo en Julio) en dos fincas distintas, y se muestra la media de las dos determinaciones. Los tratamientos con AMP y DMDP se realizaron dos semanas, una semana y unas horas antes de la cosecha (0.25 l en cada aplicación). El adenosín-monofosfato (AMP, Sigma) se aplicó por pulverización a una concentración 120 mM (muestreo en Agosto) El inhibidor de invertasa (DMDP, Calbiochem) se aplicó por pulverización a una concentración 33µM (muestreo en Agosto).

Ensayo	Tratamiento	Control (mol prolina g ⁻¹ pf)	Tratamiento (mol prolina g ⁻¹ pf)
Claudia (riego a demanda)	Antitranspirantes	1,620±0,640	2,625±0,485
Claudia (déficit hídrico)	Antitranspirantes	2,790±0,690	1,405±0,335
Ramona (riego a demanda)	AMP	2,83	2,55
Claudia (déficit hídrico)	DMDP	4,28	1,41

CONCLUSIONES

- El principal factor que determina la acumulación de prolina es el estrés hídrico, aunque el exceso de nitrógeno también aumenta la cantidad de prolina en las raíces.
- Los niveles de prolina inferiores que se detectan en la variedad Ramona indican que ésta tiene mayor resistencia a estrés hídrico que la variedad Claudia.
- La selección de la variedad, el régimen hídrico y el aporte de nitrógeno van a determinar cambios en la calidad de la raíz cosechada.

BIBLIOGRAFÍA

Ain-Lhout F, Zunzunegui M, Diaz-Barradas MC, Tirado R, Clavijo A and García-Novo F (2001). Comparison of proline accumulation in two Mediterranean shrubs subjected to natural and experimental water deficit. *Plant Soil* 230, 175-183.

Bates IS, Waldren RP and Teare JD (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39, 205-207.

Delauny AJ and Verma DPS (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4, 215-223.

Hare PD and Cress WA (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21, 79-102.

Cap IX. Niveles de Prolina

Iannuci A, Rascio A, Russo M, Di Fonzo N and Martiniello P (2000). Physiological responses in water stress following a conditioning period in berseem clover. *Plant Soil* 203, 217-227.

Yeo A (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exp. Bot.* 49, 915-929.