

Mecanismos de tolerancia desarrollados por plantas de *Myrtus communis* L. y *Eugenia myrtifolia* L. a distintos niveles de salinidad

JR. Acosta-Motos¹, P. Díaz-Vivancos², S. Álvarez¹, N. Fernández³, MJ. Sánchez-Blanco¹, JA. Hernández²

¹Dpto. Riego, CEBAS-CSIC, 30100, Campus de Espinardo (Murcia), jacosta@cebas.csic.es

²Grupo de Biotecnología de Frutales, CEBAS-CSIC, 30100, Campus de Espinardo (Murcia).

³Grupo de Estrés Abiótico, CEBAS-CSIC, 30100, Campus de Espinardo (Murcia).

Resumen

La salinidad es uno de los estreses abióticos que más afecta al crecimiento y a la productividad vegetal. Los principales efectos negativos que la salinidad produce en las plantas incluyen el estrés osmótico y la toxicidad iónica. Además, el estrés salino también produce un estrés oxidativo a nivel subcelular, contribuyendo a la aparición de síntomas en las hojas. Sin embargo, la respuesta de las plantas a la salinidad es diferente dependiendo de la especie vegetal y de las condiciones experimentales. En este caso se estudian dos especies ornamentales *M. communis* y *E. myrtifolia*, las cuales presentan diferentes mecanismos de respuesta al estrés salino. Una de las diferencias radica en la respuesta en cuanto a la absorción y translocación de los iones Na⁺ y Cl⁻. En este sentido, las plantas de mirto acumulan el Na⁺ en la raíz, restringiendo su translocación a la parte aérea. Además, estas plantas limitan la absorción de Cl⁻ pero no su transporte a las hojas. En contraste, las plantas de eugenia tienden a acumular más el Cl⁻ en la raíz y a limitar su transporte a la parte aérea. Otra de las diferencias observada se debe a los cambios anatómicos que se producen en las plantas de eugenia, y que consisten en un aumento del porcentaje de parénquima en empalizada (zona que contiene la mayor cantidad de cloroplastos). Este cambio, junto con una reducción del parénquima esponjoso y un aumento de los espacios intercelulares (cambios observados en las dos especies), facilitaría una menor resistencia para la llegada del CO₂ a los cloroplastos, en una situación en que su entrada a la hoja se encuentra limitada debido al cierre estomático que se produce como consecuencia del estrés debido a la salinidad. También el comportamiento de los parámetros de fluorescencia de clorofilas varía en función de la especie. Después de un mes de tratamiento, las plantas de eugenia aumentan los parámetros de *quenching* fotoquímico y disminuyen los de *quenching* no fotoquímico, siendo la respuesta inversa en mirto. En el caso de eugenia hace referencia a una mayor eficiencia fotosintética, mientras que en el del mirto indica un mecanismo seguro de eliminación del exceso de energía luminosa en forma de calor. Por último, otra de las diferencias encontradas está relacionada con el comportamiento de su sistema de defensa antioxidante. Las plantas de mirto presentan mayores niveles de actividad catalasa, mientras que las de eugenia muestran mayores niveles constitutivos de las actividades SOD, POX y MDHAR.

Palabras clave: Anatomía Foliar, Estrés Salino, Fluorescencia de Clorofilas, Metabolismo Antioxidativo, Plantas Ornamentales.

INTRODUCCIÓN

Las plantas desarrollan diferentes mecanismos en respuesta a la salinidad para mejorar la eficiencia en el uso del agua. Estos cambios van encaminados a restituir el equilibrio iónico (Rejili et al., 2007), lo que producirá cambios en los parámetros relacionados con el estado hídrico (Álvarez y Sanchez-Blanco, 2014). Dichos cambios se producen como consecuencia de distintas respuestas fisiológicas, así como por una alteración de las cadenas de transporte electrónico, principalmente en la fotosíntesis y la respiración, dando lugar a una elevada producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en todos los órganos de la planta (Hernández et al., 1995). Los mecanismos de adaptación están controlados por señales moleculares que regulan una interacción correcta de las plantas con el medio que las rodea. Entre los distintos cambios se aprecian diferencias en la actividad de los canales y transportadores localizados en las membranas Munns y Tester (2008), además de la activación y transcripción de genes, que controlan determinadas rutas biosintéticas encargadas del ajuste osmótico y de la protección de las estructuras celulares (Rejili et al., 2007). Sin embargo, es difícil establecer si todos estos cambios son producidos por el efecto osmótico o por el efecto iónico debido a las sales o si son consecuencia de un estrés oxidativo Munns (2012). Además, estos efectos se desarrollarán en diferentes momentos de la aplicación del estrés, y también dependerán de la especie vegetal objeto de estudio. Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos de respuesta a salinidad en plantas de *M. communis* y en *E. myrtifolia* y los cambios que dicho estrés producía sobre la nutrición, la anatomía de la hoja, los parámetros de fluorescencia de clorofilas y el metabolismo antioxidativo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones experimentales

Se emplearon 120 plántulas de *M. communis* y de *E. myrtifolia* que crecieron en macetas de 1,2 l, usando como sustrato una mezcla de fibra de coco, turba y perlita en proporción (8:7:1) y abonadas con Osmocote Plus (2 g l⁻¹ de sustrato) (14:13:13 N, P, K + microelementos). El ensayo se realizó en condiciones controladas, con una temperatura de 23°C/18°C (día/noche), una intensidad luminosa de 350 μmol m⁻² s⁻¹ y 55%-70% de humedad relativa. Una vez que las plantas tenían un mes de edad se regaron con agua de buena calidad, de una CE de 0,4 dS/m en el caso de las plantas control (C) y con concentraciones de NaCl con una CE de 4dS/m (S4) y de 8 dS/m (S8), equivalente a 44 y 88 mM NaCl, respectivamente. Los tratamientos se prolongaron durante 30 días hasta finalizar el ensayo.

Contenido mineral

La concentración de Cl⁻ se analizó mediante el uso de un analizador de cloruros (Model 926 Chloride Analyser, Sherwood Scientific Ltd.) en el extracto acuoso obtenido mediante la mezcla de 100 mg de polvo vegetal seco con 40 ml de agua destilada después de 30 minutos de agitación y filtrado. La concentración de Na⁺ se determinó en un extracto de digestión con HNO₃/HClO₄ (2:1, v/v) mediante el uso de un espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES IRIS INTREPID II XDL).

Estudio de cambios estructurales en las hojas por microscopía óptica de campo claro.

Las secciones de hoja se fijaron en una disolución de glutaraldehído al 2,5% y paraformaldehído al 4% en tampón fosfato sódico (TPNa) 0,1M a pH 7,2 durante dos

horas y media, a 4°C. Después se realizaron tres lavados con el mismo tampón utilizado para la fijación. Las muestras se postfijaron con tetróxido de osmio al 1% preparado en TPNa durante dos horas, a 4°C y en oscuridad. Posteriormente se realizaron tres lavados con TPNa. A continuación se realizó una deshidratación de las muestras empleando concentraciones crecientes de etanol (35%, 50%, 70%, 96% y absoluto), permaneciendo las muestras en cada una de ellas durante 30 minutos. Finalmente, las muestras se incluyeron en resina Spurr (1969) solidificándose a 68°C durante un mínimo de 16 horas. Los cortes semifinos (0,5-0,7 micras) se montaron en un portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina al 0,5%. Las imágenes se obtuvieron con la ayuda de una lupa Olympus SZX PT en campo claro.

Parámetros relacionados con la fluorescencia de clorofilas

La fluorescencia de clorofilas se analizó en hojas con un fluorímetro (IMAGIM-PAM M-series, Heinz Walz, Effeltrich, Alemania). Después de una adaptación a oscuridad (10 minutos) se registraron los valores de fluorescencia máxima y mínima. Se realizó un análisis cinético en presencia de luz actínica (PAR 81 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con pulsos repetidos de 0,8 s de luz saturante (PAR 2700 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a intervalos de 20 s. Se midieron parámetros relacionados con procesos fotoquímicos, como Y(II), qP y Fv/Fm, y parámetros relacionados con procesos no fotoquímicos, tales como qN, NPQ y Y(NPQ) (Maxwell y Johnson 2000).

Enzimas antioxidantes

Todos los protocolos se llevaron a cabo a 4°C. Las hojas (1 g) se homogeneizaron con 3 ml de tampón 50 mM Tris-Acetato (pH 6), conteniendo EDTA 0.1 mM, cisteína 2 mM, Triton X-100 0.2% (v/v), y PVPP (polivinilpolipirrolidona) 2% (p/v). Para la determinación de la actividad APX se adicionó ascorbato 20 mM al medio de extracción. El extracto se filtró a través de dos capas de malla de nylon y se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes se filtraron usando columnas de Sephadex G-25 NAP (GE Healthcare) equilibradas con el tampón de extracción en ausencia o presencia de ascorbato 2 mM. Todas las determinaciones enzimáticas se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-1603. Las actividades catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), monodehidro ascorbato reductasa (MDAHR), glutation reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa (POX) se analizaron siguiendo los protocolos descritos en (Barba-Espín et al., 2011).

Análisis estadístico

Las medias de los tratamientos fueron separadas en grupos homogéneos con la Prueba de Rango Múltiple de Duncan ($P < 0.05$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. La significación de los efectos de los distintos tratamientos salinos reflejada por el valor de F se llevó a cabo mediante un análisis de varianza simple (ANOVA), por medio del programa estadístico SPSS para Windows en donde los valores de F eran significativos con los siguientes niveles de probabilidad: 99.9% (***), 99% (**) y 95% (*). Cuando no hay diferencias significativas se representa como n.s.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ambas especies acumulaban elevadas concentraciones de iones Cl^- y Na^+ en la raíz, comparadas con las que se acumulaban en las hojas y en los tallos. Este comportamiento también se ha observado en otras especies ornamentales como *Cestrum fasciculatum*, *Ruttya fruticosa* o *Viburnum lucidum*, con tratamientos de NaCl de hasta 70 mM durante dos meses (Cassaniti et al., 2009). En mirto se observó un menor

transporte del ión Na^+ a las partes aéreas en comparación con el Cl^- , mientras que en las plantas de eugenia ocurría lo contrario (Figura 1). La retención de iones Na^+ y Cl^- en raíces se ha propuesto como una característica relacionada con la tolerancia de las plantas al estrés salino (Boursier y Läuchli 1990), aunque también se pueden acumular en todas las partes de la planta como ocurre en madroño y callistemon (Navarro et al., 2007; Álvarez et al., 2014).

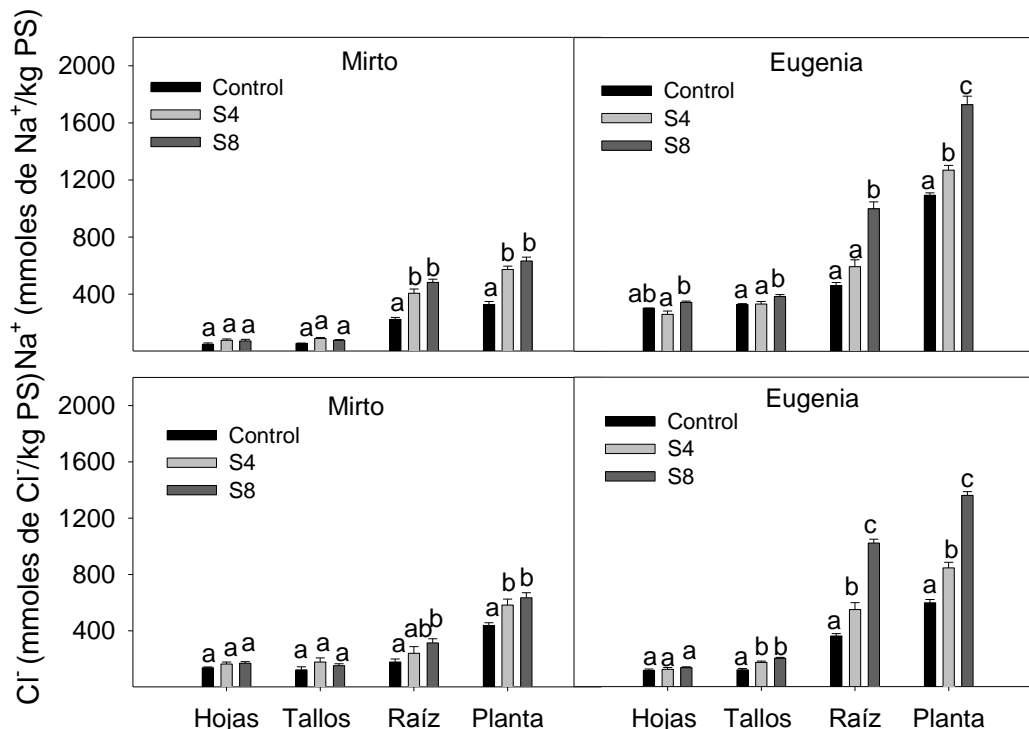


Figura 1. Estudio comparativo de la distribución de los iones Na^+ y Cl^- en los diferentes órganos de la planta y a nivel de planta completa en las dos especies estudiadas (mirto y eugenia) al final del ensayo (30 días).

La salinidad producía un aumento en el porcentaje de parénquima en empalizada en las plantas de eugenia, pero no en plantas de mirto. Las plantas de eugenia presentaron también los porcentajes más bajos de parénquima esponjoso, siendo las diferencias mayores conforme aumenta la severidad de los tratamientos. La proporción de espacios intercelulares fue mayor en plantas de mirto si bien su porcentaje aumentaba en ambas plantas conforme se aplicaban tratamientos más salinos. Todos los cambios anatómicos observados facilitarían la llegada del CO_2 a las células del parénquima en empalizada (células con un mayor número de cloroplastos) para mantener unas mayores tasas fotosintéticas que harían más eficiente el uso del agua por parte de las plantas. La entrada de CO_2 se encuentra limitada debido al cierre estomático que se produce como consecuencia del estrés (Olmos et al., 2007), (Tabla 1).

En relación a los parámetros de fluorescencia al final de los 30 días, las plantas de eugenia aumentaban los parámetros de *quenching* fotoquímico y disminuían los de *quenching* no fotoquímico, siendo la respuesta inversa en mirto. El primer caso hace referencia a una mayor eficiencia fotosintética, mientras que el segundo caso indica un mecanismo seguro de eliminación del exceso de energía luminosa en forma de calor (Maxwell y Johnson 2000), (Tabla 2).

Las diferencias encontradas en la actividad de las distintas enzimas antioxidantes medidas establecían que las plantas de mirto presentaban mayores niveles de actividad CAT, mientras que las plantas de eugenia mostraban mayores niveles constitutivos de las actividades SOD, POX y MDHAR. No se apreciaron diferencias significativas con respecto a la actividad de las enzimas GR y APX en ambas especies, si bien parece que la salinidad en el primer caso estimula su síntesis y en el segundo la inhibe (Díaz-Vivancos et al., 2013), (Tabla 3).

Tabla 1. Respuesta a la salinidad estimada sobre distintos parámetros relacionados con la anatomía de las hojas en plantas de mirto y de Eugenia después de 30 días de aplicación de los tratamientos.

Microscopía	Parénquima en empalizada (%)	Parénquima esponjoso (%)	Espacio intercelular (%)
Mirto			
Control	22,51±0,83	49,57±1,38b	27,92±0,58a
S4	22,40±0,80	48,62±1,22b	28,99±0,89a
S8	24,36±0,48	42,35±1,29a	33,28±1,51b
F	1,88n.s	7,96**	7,06**
Eugenia			
Control	36,92±0,68a	46,57±0,70b	16,34±0,83a
S4	36,16±1,08a	40,93±1,80b	21,94±0,97b
S8	45,71±0,74b	31,41±1,91a	22,89±1,55b
F	19,01***	12,44***	8,38**

Tabla 2. Efecto de la salinidad en los distintos parámetros de fluorescencia de hojas de mirto y eugenia después de 30 días de aplicación de los tratamientos.

Fluorescencia	qP	Y(II)	Fv/Fm	qN	NPQ	Y(NPQ)
Mirto						
Control	0,712b	0,372b	0,683a	0,649a	0,268a	0,318a
S4	0,636a	0,344b	0,706a	0,658a	0,282a	0,342a
S8	0,643a	0,279a	0,692a	0,815b	0,505b	0,472b
F	4,69*	11,87***	0,97n.s	58,87***	69,47***	44,66***
Eugenia						
Control	0,754a	0,401a	0,744b	0,743b	0,396b	0,365b
S4	0,829c	0,453b	0,705a	0,644a	0,260a	0,276a
S8	0,769b	0,470c	0,764c	0,633a	0,272a	0,275a
F	84,38***	56,49***	110,78***	69,95***	92,68***	78,04***

Tabla 3. Efecto de la salinidad en la actividad de las enzimas antioxidantes estudiadas en hojas de mirto y eugenia después 30 días de aplicación de los tratamientos.

Enzimas Antioxidantes	CAT $\mu\text{mol min}^{-1}/\text{gPF}$	APX $\text{nmol min}^{-1}/\text{gPF}$	MDHAR $\text{nmol min}^{-1}/\text{gPF}$	GR $\text{nmol min}^{-1}/\text{gPF}$	SOD U/gPF	POX $\mu\text{mol min}^{-1}/\text{gPF}$
Mirto						
Control	306,4±10,5a	29,8±2,4b	171,2±22,0a	20,7±3,4a	25,5±1,8b	n.d
S4	628,6±14,5b	11,4±0,7a	186,9±9,3a	29,0±6,1a	25,3±2,2b	n.d
S8	321,2±24,5a	11,3±1,4a	239,9±6,2b	31,9±3,6a	17,9±1,0a	n.d
F	81,01***	36,24***	7,22**	1,65n.s	6,53*	
Eugenia						
Control	83,8±7,2ab	39,6±3,2b	274,9±15,9a	23,1±2,4a	100,9±2,8a	159,0±15,9b
S4	109,1±14,8b	21,2±2,9a	283,0±19,5a	39,6±2,3b	119,0±6,2b	153,1±4,6b
S8	69,9±2,7a	11,0±2,1a	402,0±20,5b	26,7±1,3a	127,3±8,3b	45,6±4,6a
F	4,1*	20,3***	18,2***	16,2**	5,6*	30,9***

CONCLUSIONES

Las dos especies estudiadas *M communis* y *E. myrtifolia* responden de manera distinta a los niveles de salinidad aplicados. Las respuestas que ponen en funcionamiento las plantas de eugenia (mayor acumulación de Na⁺ en las raíces, cambios anatómicos en las hojas, cambios en los parámetros fluorescencia y mayor nivel basal de SOD, POX y MDHAR) llevan a una mejor tolerancia a la salinidad que las plantas de mirto.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2008-05258-CO2-01 (CICYT) y los 15356/PI/10 y 11883/PI/09 de la Fundación Séneca (Región de Murcia).

Referencias

- Álvarez, S., Sánchez-Blanco, M.J. (2014). Long-term effect of salinity on plant quality, water relations, photosynthetic parameters and ion distribution in *Callistemon citrinus*. *Plant Biology*, 16, 757-764.
- Barba-Espín, G., Clemente-Moreno, M.J., Álvarez S., García-Legaz, M.F., Hernández, J.A., Díaz-Vivancos, P. (2011). Salicylic acid negatively affects the response to salt stress in pea plants: effects on PR1b and MAPK expression. *Plant Biology*, 13, 909–917.
- Boursier, P., Läuchli, A. (1990). Growth responses and mineral nutrient relations of salt-stressed sorghum. *Crop Science*, 30, p.1226.
- Cassaniti, C., Leonardi, C., Flowers, T. (2009). The effects of sodium chloride on ornamental shrubs. *Scientia Horticulturae*, 122, 586–593.
- Díaz-Vivancos, P., Faize, M., Barba-Espin, G., Faize, L., Petri, C., Hernández, J.A., Burgos, L. (2013). Ectopic expression of cytosolic superoxide dismutase and ascorbate peroxidase leads to salt stress tolerance in transgenic plums. *Plant Biotechnology Journal*, 11, 976–985.
- Hernández, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F., Del Río, L.A. (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. *Plant Science*, 105, 151-167.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659-668.
- Munns, R., Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *The Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Munns, R., James, R.A., Xu, B., Athman, A., Conn, S.J., Jordans, C., Byrt, C.S., Hare, R.A., Tyerman, S.D., Tester, M., Plett, D., Gilliam, M. (2012). Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nature Biotechnology*, 30, 360–364.
- Navarro, A., Bañón, S., Olmos, E., Sánchez-Blanco, M.J. (2007). Effects of sodium chloride on water potential components, hydraulic conductivity, gas exchange and leaf ultrastructure of *Arbutus unedo* plants. *Plant Science*, 72, 473–480.
- Olmos, E., Sánchez-Blanco, M.J., Ferrández, T., Alarcón, J.J. (2007). Subcellular Effects of Drought Stress in *Rosmarinus officinalis*. *Plant Biology*, 9, 77–84.
- Rejili, M., Vadel, A.M., Guetet, A., Neffatti, M. (2007). Effect of NaCl on the growth and the ionic balance K⁺/Na⁺ of two populations of *Lotus creticus* (L.) (Papilionaceae). *South African Journal of Botany*, 73, 623–631.
- Spurr, A.R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26,31–43.