

SIGUIENDO LA PISTA

Determinación de parámetros fisiológicos de guisante bajo estrés salino

Sonia Paredes Menéndez¹ y Jennifer Ramos Carro²

Facultad de C.C. Biológicas y Ambientales. Universidad de León. Alumnas de 5º curso de Biología (curso 2006-07).

¹(biospm00@estudiantes.unileon.es), ²(biojrc00@estudiantes.unileon.es).

Meditante la determinación de los parámetros fisiológicos de guisante bajo estrés salino se ha establecido una relación entre la concentración salina y la respuesta que manifiestan las plantas glucófitas. A través de un tratamiento inductor de salinidad se ha evidenciado que la longitud, la relación peso seco/peso fresco, la tasa de germinación, la evapotranspiración y la eficiencia fotosintética son clave para la detección de cultivos sometidos a niveles elevados de salinidad. Esta descripción es relevante puesto que diversos estudios muestran un aumento progresivo de la salinidad en los cultivos debido a la acción antrópica y es necesario establecer un marco biológico sobre el que se pueda actuar en un futuro próximo para evitar los efectos negativos que esta situación implica en la agricultura.

Palabras clave

Glucófitas, *Pisum sativum*, evapotranspiración, fotosistema II, método gravimétrico, osmómetro.

Introducción

La explotación agrícola, el empleo de fertilizantes minerales y la progresiva sequía, han ocasionado una pérdida en los niveles óptimos de materia orgánica del suelo (1) y un aumento de la salinidad en los mismos. La intrínseca relación entre el sistema planta-suelo ha llevado a muchos autores a la determinación de las consecuencias de la salinidad (2) sobre los cultivos. El efecto más sustancial es la inducción de estrés salino en la planta, con una connotación preocupante debido a diversos efectos negativos (3) que llevan a innumerables desórdenes fisiológicos.

No todas las plantas presentan la misma respuesta ante una determinada concentración de sales (4), por lo que nuestro estudio se centrará en plantas con respuesta glucófitas, aquellas que, para cualquier incremento de la concentración de sales, ven reducido su crecimiento.

El principal objetivo del estudio será concluir los parámetros que sean más indicativos de estrés salino en guisante (*Pisum sativum*) con objeto de que sirvan como referencia para la detección de suelos salinos o cultivos que se encuentran bajo condiciones significativas de salinidad. Asimismo, se pretende la continuidad de estudios similares en otras especies vegetales

de interés comercial así como la futura investigación para paliar su efecto, que actualmente presenta una gran amenaza de la agricultura a nivel mundial (5).

Materiales y métodos

Condiciones de cultivo

Se comenzó el experimento con la siembra de 40 semillas de guisante (*P. sativum* var. Lincoln) en dos macetas independientes (3 litros cada una). Una de ellas se empleó como control y la otra se sometió a condiciones de estrés salino. Ambas se rellenaron hasta la mitad de su volumen con un sustrato compuesto por turba y vermiculita (1:1 v/v), sobre el cual se depositaron las 20 semillas correspondientes cubriéndose, posteriormente, 2 cm. con el mismo sustrato. Se ajustó la dosis de riego al 60% de su capacidad de campo para cuyo cálculo se utilizó un método gravimétrico (6). Se establecieron dos tratamientos de riego a lo largo del experimento, con la finalidad de inducir estrés salino:

- Solución Hoagland + 0 g/L NaCl (control)
- Solución Hoagland + 4 g/L NaCl (tratamiento salino)

Parámetros de crecimiento

Durante un periodo de uno a dos meses se procedió a la determinación de los siguientes parámetros de crecimiento:

- Longitud de tallo: se midió la distancia existente entre la superficie del sustrato y la yema apical.
- Peso fresco (Pf) y seco (Ps): se pesaron las plantas en fresco (Pf), se secaron durante 48 horas y posteriormente se volvieron a pesar (Ps). Se tuvo en cuenta para su cálculo el total de plantas.
- Área foliar media (L_A): se dibujó la silueta de las hojas sobre un folio en blanco y se recortó dicha superficie. Se comparó el peso de dichas figuras con un patrón de superficie conocida.

Una vez obtenidos los valores de los parámetros de crecimiento se calcularon las siguientes tasas:

- Tasa de crecimiento absoluta (G) [g día^{-1}]:

$$G = dP_s/dt = (P_{s2} - P_{s1}) / (t_2 - t_1)$$

- Tasa de asimilación neta (E) [$\text{mg cm}^{-1} \text{ día}^{-1}$]:

$$E = (1/L_A) \times G = (P_{s2} - P_{s1}) / (t_2 - t_1) \times (\ln L_{A2} - \ln L_{A1}) / (L_{A2} - L_{A1})$$

Parámetros hídricos

En dicho periodo se determinaron también distintos parámetros hídricos:

- Consumo de agua: se expresó dicho consumo mediante la evapotranspiración (ET). Para el cálculo del agua evapotranspirada se consideró la diferencia de pesadas entre días consecutivos (método gravimétrico) (6). Una vez determinada el agua evapotranspirada, al final del experimento, se procedió al cálculo de la eficiencia en el uso del agua (WUE) mediante la siguiente fórmula:

$$WUE = \text{Ps total de las plantas (g cm}^{-2}\text{)} / \text{agua evapotranspirada (g cm}^{-2}\text{)}$$

- Potencial osmótico (Ψ_s): se extrajo líquido intracelular de tres segmentos subapicales de tallo y se determinó la osmolaridad (M) de dicha solución mediante un osmómetro de presión a vapor (Wescor, Inc.) Para el cálculo del potencial osmótico se utilizó la siguiente relación:

$$\Psi_s = -C_i R T$$

- Potencial hídrico (Ψ_h): se midió en un tallo, para cada uno de los tratamientos, utilizando una cámara de Scholander (Pms instrument Co.) (7).

Parámetros fotosintéticos

Asimismo se completó el estudio con una medida de un parámetro bioquímico como es la concentración media de clorofila. Para ello se tomaron varias hojas de cada uno de los tratamientos y, realizando un homogeneizado con acetona, se procedió a la determinación de su D.O.₆₅₂ en un espectrofotómetro. Se tuvo en cuenta que el coeficiente de extinción en mg/ml (ϵ) para la clorofila extraída en acetona al 80% y a 652 nm es 5,8. Dicho parámetro bioquímico relacionado directamente con el potencial fotosintético de la planta se comparó con la medición de la eficiencia fotosintética del PSII (Φ_{II}) para lo que se utilizó un PAM- Fluorímetro (Walz, Inc.)

Tratamiento estadístico

Para la comparación de medias se utilizó el test “t de Student” ($p < 0,05$).

Resultados

Parámetros de crecimiento

En el primer muestreo realizado a los 7 días de post-emergencia se observa una reducción de un 15% de germinación en las plántulas sometidas a estrés salino (**Fig.1**).

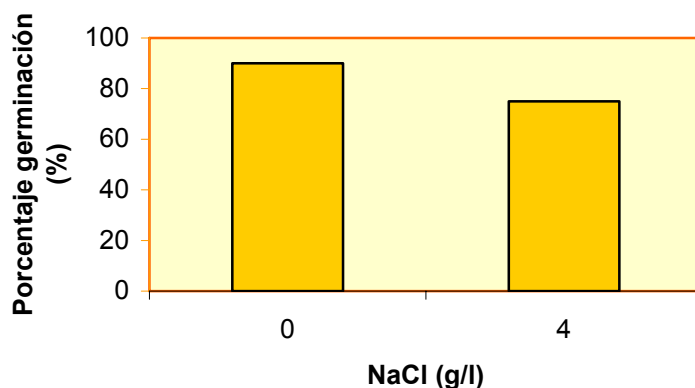


Fig. 1. Porcentaje de germinación a los 7 días de post-emergencia. Se sembraron 20 semillas por tratamiento.

Se observa que en los primeros 13 días no hay diferencias significativas en la longitud del tallo pero a partir de los 20 días de post-emergencia aumentan considerablemente dichas diferencias. El muestreo realizado el día 28 muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) (**Fig.2**).

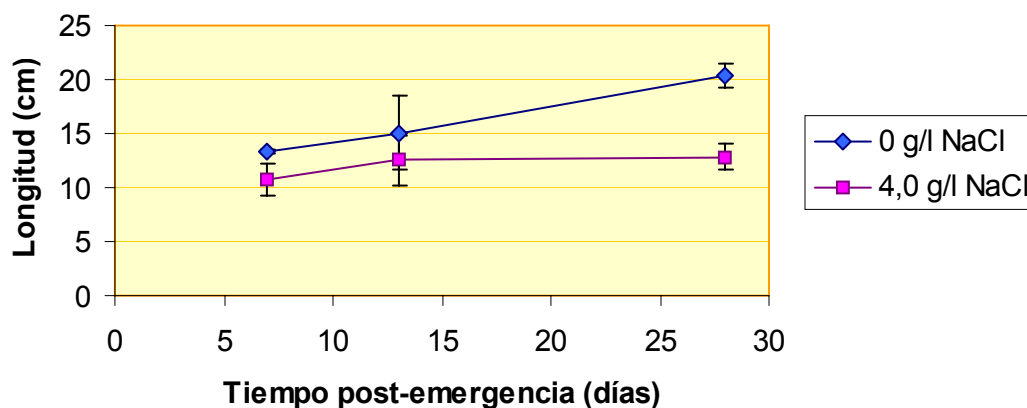


Fig. 2. Variación de la longitud de los tallos en plantas control y plantas sometidas a tratamiento salino. Se representa la media \pm desviación estándar ($n = 3$).

Al igual que en la **Figura 1.**, en los 15 primeros días de post-emergencia no hay diferencias apreciables observándose en el último muestreo que el valor para la relación peso seco/ peso fresco se incrementa un 25% en el tratamiento salino respecto al control (**Fig.3**), aunque el análisis estadístico no muestra diferencias significativas ($p>0.05$).

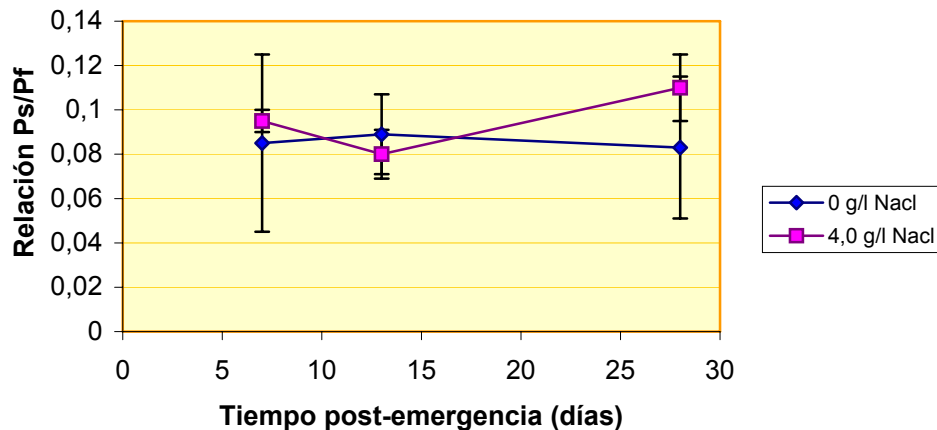


Fig. 3. Relación peso seco/peso fresco en plántulas con tratamiento control y tratamiento salino. Se representa la media \pm desviación estándar ($n= 3$).

Respecto a los valores de área foliar en los primeros días del experimento los más elevados se corresponden con el tratamiento salino, por el contrario, en los últimos días del periodo experimental los valores máximos están relacionados con las plantas control (**Fig.4**). En este caso, el análisis estadístico para el día 28 no refleja diferencias significativas ($p>0.05$) aunque se encuentra cerca del límite de significación.

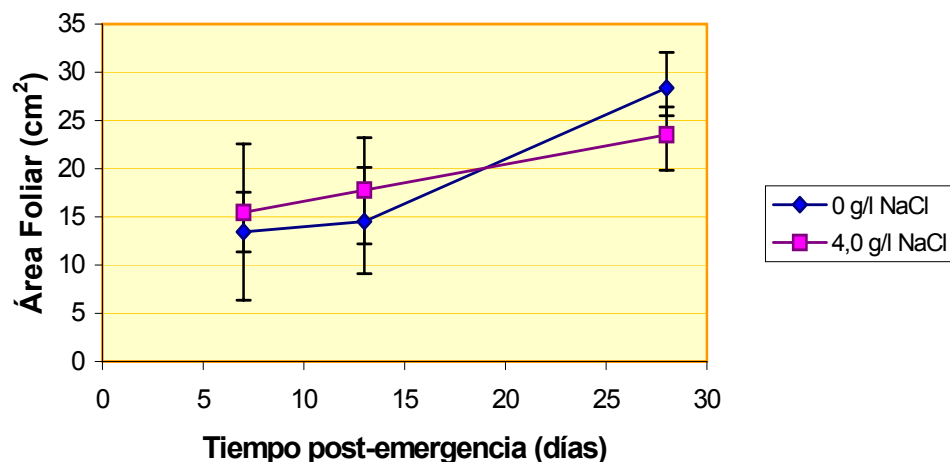


Fig 4. Área foliar obtenida con tratamiento control y tratamiento salino. Se representa la media \pm desviación estándar ($n= 3$).

Los datos de la **tabla 1** muestran claramente que las plántulas no sometidas a estrés salino presentan valores más elevados en los parámetros de crecimiento.

La ganancia en peso respecto a los distintos tratamientos es 0,26 gramos por día mayor en las plántulas control que en las plántulas sometidas a estrés salino. En esta relación de la tasa de asimilación neta entre las plántulas con tratamiento control y salino se refleja una diferencia de 0,01 mg cm⁻¹día⁻¹ en las control.

Tabla 1. Efecto del NaCl sobre algunos parámetros de crecimiento. Tasa de crecimiento absoluta (G) y Tasa de asimilación neta (E) comprendida entre el primer y último muestreo del periodo experimental.

NaCl (g/l) *	G (g día ⁻¹)	E (mg cm ⁻¹ día ⁻¹)
0	1,55	0,077
4	1,29	0,067

(*) Concentración final de NaCl en la solución de riego.

Parámetros hídricos

La evapotranspiración es un 15% más elevada en las plántulas sometidas a tratamiento control que en las plántulas en medio salino (**Tabla 2**). Aunque la eficiencia en el uso del agua (WUE) se calcula a partir de los datos de la evapotranspiración, se aprecia nítidamente que hay diferencias, ya que aunque la ET es mayor en plántulas control, la WUE es casi un 30 % más elevada en las plántulas sometidas a estrés salino.

Tabla 2. Efecto del NaCl sobre algunos parámetros hídricos. Evapotranspiración (ET) total en el periodo experimental. Eficiencia en el consumo de agua (WUE) obtenida a través de los resultados de evapotranspiración.

NaCl (g/l) *	ET total (g cm ⁻²)	WUE
0	3,157	0,26
4	2,62	0,36

(*) Concentración final de NaCl en la solución de riego.

Los valores de Ψs muestran una gran diferencia entre el tratamiento control y el tratamiento salino (**Fig.5**), siendo menores en este último. No obstante no se encontraron

diferencias significativas entre las medias debidas, muy probablemente a la elevada dispersión de los datos.

Con la representación del Ψ_s se adjuntó también la representación del Ψ_h . Aunque las diferencias no son tan evidentes, en este caso también se corresponden los valores más bajos con las plántulas sometidas a estrés salino.

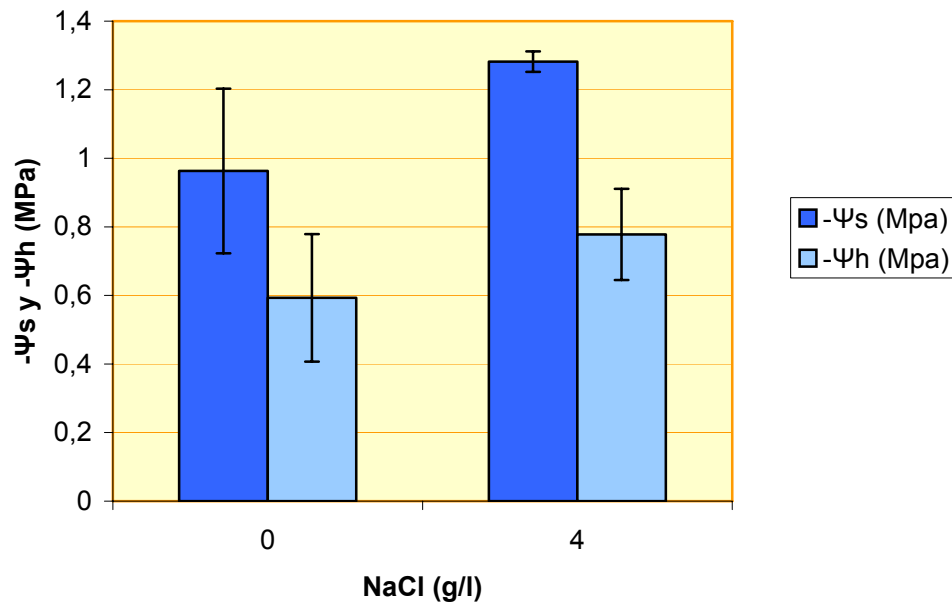


Fig 5. Potencial hídrico (Ψ_h) en xilema y potencial osmótico (Ψ_s) de células de guisante, considerándose los valores de tratamiento salino y control. Se representa la media \pm desviación estándar ($n= 6$).

Parámetros bioquímicos

El posible efecto del tratamiento salino sobre la fotosíntesis se puede reflejar en determinados parámetros como el contenido de clorofila o el rendimiento cuántico efectivo del PSII (**Tabla 3**). Comparadas con los controles, las plantas sometidas a estrés salino muestran una reducción del 21% y del 17% en el contenido en clorofila y rendimiento cuántico efectivo del PSII respectivamente (**Tabla 3**).

Tabla 3. Efecto del NaCl sobre algunos parámetros bioquímicos contenido en clorofila y rendimiento cuántico efectivo de plantas control y plantas sometidas a estrés salino a los 21 días de post-emergencia.

NaCl (g/l) *	Contenido en clorofila ($\mu\text{g chl mg Pf}^{-1}$)**	Rendimiento cuántico efectivo**
0	0,491 \pm 0,109	0,331 \pm 0,089
4	0,387 \pm 0,703	0,274 \pm 0,05

(*) Concentración final de NaCl en la solución de riego. (**) Se expresa la media \pm desviación estándar (n=6).

Discusión

Son evidentes las diferencias obtenidas para los distintos parámetros fisiológicos entre el tratamiento salino y el tratamiento control. Estas diferencias realmente se ajustan a los esperado, ya que *Pisum sativum* es una planta glucófito, es decir, se ve afectada por la salinidad (4).

Los parámetros de crecimiento proporcionan una visión directa del efecto del estrés salino inducido sobre las plántulas. La respuesta de la planta al estrés hídrico supone una inversión de energía en contrarrestar los efectos de la salinidad en detrimento del crecimiento en longitud (**Fig. 2**). A pesar de ser el parámetro que muestra diferencias más significativas, también se ha observado que el tratamiento salino disminuye la capacidad de emergencia de las plántulas (**Fig. 1**) y alarga su período de germinación.

A los 28 días de post-emergencia se observa un mayor valor para la relación peso seco/peso fresco en el tratamiento salino (**Fig. 3**), y aunque no se obtienen diferencias significativas, es posible que alargando el periodo de muestreo se encuentren dichas diferencias. La elevada relación peso seco/peso fresco encontrada en tratamiento salino se debe a la existencia de un peso seco mayor en las plántulas y a una disminución de peso fresco.

Esto puede ser debido a que dichas plantas acumulan más cantidad de sal en sus células incrementando su peso ya que, cuando se induce estrés salino, los iones Na^+ se introducen en el citoplasma (8) gracias a la presencia de canales y transportadores catiónicos en la membrana plasmática, los cuales son bastante inespecíficos frente a un aumento en la relación Na^+/K^+ en el medio. La disminución en el contenido de iones K^+ en el citoplasma trae como consecuencia una desestabilización en el potencial de membrana, la inactivación de enzimas y un efecto perjudicial sobre una serie de procesos fisiológicos (8). Para restablecer la homeostasis iónica,

ya que carecen de transportadores de Na^+ , tienen que recurrir a la acumulación de Na^+ en el interior de la vacuola y es lo que se detecta en el incremento de peso seco.

La estimación del área foliar media (**Fig. 4**) muestra que los valores más elevados se corresponden con el tratamiento control mientras se ven disminuidos en el salino. Diversos estudios han demostrado que esta disminución no es debida a una inhibición de la mitosis (ciclo celular), sino que se ve inhibida la expansión celular, es decir, crecimiento de las células (9).

Un estrés salino conlleva un estrés hídrico ya que se reduce la cantidad disponible para la planta y sus necesidades de agua no son correspondidas. Esto implica una reducción del área foliar (10) y el cierre de los estomas para evitar la evapotranspiración (**Tabla 2**). La raíz, al detectar una reducción en la absorción de agua, a través de la síntesis de ácido abscísico (ABA), es capaz de producir cambios fisiológicos como el cierre de los estomas (11). Como consecuencia de esta disminución de la evapotranspiración, se reduce el crecimiento neto de la planta, y la asimilación neta (**Tabla 1**).

Aunque la evapotranspiración es un 15% más elevada en plantas control, al calcular la WUE (**Tabla 2**) se observan valores más elevados en plantas con tratamiento salino. El elevado peso seco en plántulas salinas frente a las plántulas control implica que se observe mayor eficiencia en el consumo de agua en las plántulas salinas. Aunque puede que este hecho resulte un beneficio para las plantas sometidas a estrés salino sería interesante comprobar si se mantiene esta eficiencia considerando el peso fresco de las plántulas.

Los efectos de la salinidad en las plantas se deben al exceso de partículas disueltas que causan un aumento en el potencial osmótico del suelo, con lo cual se reduce el potencial hídrico de éste. Esto mismo sucede cuando se concentran los solutos en la célula provocando una disminución en el potencial osmótico de la célula (**Fig. 5**). Diversos estudios han concluido que el NaCl afecta a la funcionalidad de las acuaporinas (transportadores de agua en la célula). Esto supone que las células que concentran sales en su citoplasma no son capaces de transportar mas agua al interior celular y por tanto, aumenta el potencial osmótico celular (1). Asimismo, se observa un incremento del potencial hídrico (**Fig. 5**) en el xilema debido a una mayor concentración de sales, aunque el tratamiento salino ha afectado en mayor medida al potencial osmótico.

Respecto a la eficiencia fotosintética se ha observado (**Tabla 3**) que el tratamiento salino afecta más al contenido en clorofila (21%) que al rendimiento cuántico efectivo (17%). Esto indica que en las plantas sometidas a estrés salino se observa una reducción de la actividad del fotosistema II, lo que implica una disminución (12) en la captación de energía de excitación por

un probable daño en el complejo antena debido a la salinidad. Hay otros estudios que también reflejan esta disminución de la eficiencia fotosintética en diversas plantas glucófitas (13) a consecuencia de una elevada salinidad en el medio de cultivo.

Aproximadamente el 20% de la superficie dedicada a la agricultura se encuentra afectada por niveles de salinidad que superan la tolerancia de las especies en los cultivos tradicionales. Este porcentaje va en aumento con una tasa del 0,5% anual (8), debido fundamentalmente a bajas precipitaciones, alta superficie de evaporación, irrigación con aguas salinas y por las prácticas tradicionales de cultivo que favorecen el incremento de la concentración de sales en el suelo.

El estrés salino afecta directamente al rendimiento en los cultivos, inhibe su desarrollo óptimo y, en algunos casos, puede conducir a la muerte de la planta. Como se ha observado, los parámetros fisiológicos sirven para detectar si un determinado cultivo se encuentra en un medio con exceso de sales y una ampliación en estas investigaciones puede suministrar claves para combatir los efectos negativos que se producen en estas plantas que tanto beneficio proporcionan a la especie humana.

Bibliografía

- 1) http://www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_AGRARIAS/QUIMICA_AGRICOLA/1
- 2) http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/salinidad.htm
<http://www2.udec.cl/~lebravo/Ejercicios/Guias/practico7.doc>
<http://www.elergonomista.com/fisiologiavegetal/salino.htm>
- 3) http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/006/X8234S/x8234s08.htm
- 4) **Hillel, D.** 1980 b. Applications of Soil Physics. Academic Press, New York.
- 5) **Taiz L, Zeiger E** (eds). 1991. Plant Physiology. The Benjamin /Cummings Publishing Company Inc. Redwood City, California.
- 6) http://www.bioplanet.net/magazine/bio_marabr_2004/bio_2004_marabr_reportaje.htm
- 7) <http://www.elergonomista.com/fisiologiavegetal/factor.htm>
<http://www2.udec.cl/~lebravo/Ejercicios/Guias/practico7.doc>
http://www.cuencarural.com/agricultura/tolerancia_de_los_cultivos_al_estres_salino_que_hay_de_nuevo/
- 8) <http://www.iztacala.unam.mx/temas/foropaea/18TB11Ia.htm>
- 9) http://www.cibernetia.com/tesis_es/QUIMICA/BIOQUIMICA/FOTOSINTESIS/1