



Actividad nitrato reductasa en callos de caña de azúcar sometidos a estrés hídrico

Sergio González, Erik García y Alina González, Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana

RESUMEN

Se evalúa el comportamiento de la actividad nitrato reductasa en callos de caña de azúcar sometidos a un estrés hídrico provocado por el poliestileno glicol-4000. Se emplearon callos de seis variedades de caña de azúcar, los cuales fueron sometidos al estrés en diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) y dosis (-2, -4 y -8 bar). Se presentan diferencias en las respuestas de las distintas variedades. Para una misma variedad, no se detectan diferencias entre dos generaciones de callos. Se discuten los resultados.

ABSTRACT

Nitrate-reductase activity was evaluated in sugarcane callus treated with PEG-4000 for water stress induction. Different times (24, 48 and 72 hours) and PEG-4000 dosis (-2, -4 and -8 bars) were employed in water stress studied on six sugarcane varieties callus. Differences in varieties response is obtained. For two varieties no differences between two callus generations (R1 and R5) are detected. Results are discussed.

INTRODUCCION

Cada vez son más numerosas las investigaciones donde se vincula el estudio de determinado proceso fisiológico con los niveles de actividad de una o varias enzimas, detectadas por métodos colorimétricos, electroforéticos, etcétera.

La nitrato reductasa ha recibido especial interés por parte de los investigadores debido tanto a su función en el metabolismo celular, como a

sus variaciones ante condiciones de estrés a las que se encuentran sometidas las plantas en muchas ocasiones.

Algunos autores señalan la poca estabilidad de dicha enzima, la cual puede estar influida por factores de diversa índole como la edad de la planta y elementos ecológicos, entre ellos el estrés hídrico, ante el cual se plantea una tendencia a la disminución de la actividad (Bardzik y cols., 1971; Hageman y Reed, 1980).

En nuestro país se ha estudiado la actividad nitrato reductasa en numerosos experimentos con caña de azúcar, vinculados a las investigaciones de resistencia a la sequía de diferentes variedades (Viqueira y cols., 1981; Rivero, 1982; González y Ortega, 1985; Morales, 1985; Hernández, 1986; entre otros). En todos los casos han determinado la actividad en hojas, no así en callos de tejidos.

Por otra parte, en estudios donde se evalúa la respuesta ante el estrés, se ha encontrado que conjuntamente con la disminución de la actividad de esta enzima y de la concentración de las proteínas solubles se aprecia un marcado aumento del contenido de prolina libre en las hojas (Ortega y cols., 1984).

También se ha trabajado en los mecanismos vinculados con la diferenciación, encontrándose que los niveles de nitrato reductasa aumentan conjuntamente con otras enzimas mientras se está realizando este proceso (Dwivedi y cols., 1984).

En este trabajo nos proponemos hacer un análisis del comportamiento de la actividad nitrato reductasa en callos de distintas variedades de caña de azúcar sometidos a un estrés hídrico con PEG-4000.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal. Se emplearon callos de tejidos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) de seis variedades en estudio: Barbuños 63118; Cuba-18768; Cuba 37472; Cuba 8751; Jaronú-605; y POJ-2878; los cuales fueron obtenidos en cultivo *in vitro* a partir de las hojas enrolladas del cogollo (spindle).

Las diferentes generaciones de callos (Rn) se lograron por trasplantes sucesivos de 45-60 días en tubos de cultivo; en todos los casos bajo iluminación permanente.

Medios de cultivo. Los callos y plántulas de caña de azúcar se obtuvieron en un medio básico reportado por Murashige y Skoog (1942). Los callos fueron cultivados en medio suplementado con agua de coco al 10 % (v/v), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 2mg/mL y kinetina (6-furfuril amino purina) 0.1 mg/mL, (Heinz y Mee, 1969). Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 120 °C y 101 kPa.

Estrés hídrico. Para provocar el estrés hídrico en callos y plántulas se prepararon soluciones de polietilén glicol (PEG 4000) con diferentes concentraciones, obteniéndose potenciales osmóticos de -2(S1), -04(S2), y -8(S3)bar. Todas las soluciones utilizadas, así como el control con agua destilada, se esterilizaron en autoclave, al igual que los medios de cultivo.

Determinación de la actividad nitrato reductasa (ANRasa)

Se empleó el método reportado por Canvin y Woo (1979), en hojas de espinaca y aplicado en hojas de caña de azúcar (González y Ortega, 1985).

Para las determinaciones, previamente se pasaron las muestras de callo, las cuales se infiltraron e incubaron en la oscuridad y anaerobiosis, a 35 °C, en 10 ml de buffer fosfato de potasio, Ph 7.5, durante 1 hora. Para la determinación colorimétrica de los niveles de nitrito se utilizó el

reactivo de Gries, compuesto por 0.6 ml de α -naftil-etilén diamida (0.02 % en agua destilada) y 0.6 ml de sulfanilamida (1 % en HCl 3 moles/litro), completando el volumen a 2 ml con agua destilada.

Estos reactivos se mezclaron con 2 ml de la muestra para un volumen final de 4 ml. Se desarrolló color a temperatura ambiente durante 20 minutos. La curva patrón (CP) se elaboró con 5, 10, 15 y 20 μ moles de nitrito. Las lecturas de densidad óptica (D.O) se efectuaron en un espectrofotómetro Spekol-11 a 540 nm. La ANRasa fue calculada según la relación:

$$\text{ANRasa} = \frac{\text{Absorbancia} \times \text{Factor}}{\frac{\text{Peso muestra (g)}}{10} \times 2/4 \times h} \quad \text{Factor} = \frac{\sum \text{Conc. (CP)}}{\sum \text{Abs. (CP)}}$$

Los resultados se ofrecen en μ moles de nitrito/g.h.

Análisis biométricos. Los valores paramétricos obtenidos de los análisis enzimáticos fueron comparados en cada caso a través de un análisis de varianza de clasificación simple y por la comparación múltiple de medias por el test de Rango Múltiple de Duncan.

En otros casos, se utilizó el test t-Student, para comparar pares de medias entre sí.

En todos los casos los análisis se efectuaron en una computadora LTEL/24. Los cálculos de la ANRasa también se realizaron mediante un programa elaborado al efecto.

RESULTADOS Y DISCUSION

ANRasa en callos de seis variedades de caña de azúcar.

En la Figura 1 se presentan los niveles de ANRasa detectados al someter los callos de seis variedades a estrés hídrico con PEG-4000 (S3) durante 24 y 48 horas, se emplearon 3 réplicas por tratamiento.

Si analizamos los datos en cada variedad podemos observar que en algunas de ellas se presenta una tendencia de incremento hacia las 24 horas (var. C-37472, C-18768, POJ-2878). mientras que en el resto se detecta una ligera tendencia de disminución durante todo el experimento (var. Ja-605, C-8751, B-63118). Sin embargo al estudiar los resultados del análisis de variante realizado para cada una de las variedades sólo se presentan diferencias significativas en dos de ellas, la Ja-605 y la B-63118.

Al comparar mediante el test t-Student los resultados obtenidos en control (sin tratamiento) con los tratamientos de 24 y 48 horas, sólo se presentan diferencias en el caso de las var. Ja-605 y B-63118. (Tabla 1)

Se ha reportado (Bardzik y cols., 1971; Hsiao y Acevedo, 1974; Sullivan y Eastin, 1974) que la tendencia general del comportamiento de la ANRasa, ante un estrés hídrico es de disminución.

En la caña de azúcar varios autores han señalado que la variedad Ja-605 se considera resistente a la sequía y que ante un estrés hídrico provocado por el PEG-4000 se produce la reducción de la ANRasa y de otros parámetros fisiológicos (Viqueira y cols., 1981; Ortega y cols., 1984; Hernández, 1986).

En nuestros resultados se manifiesta una disminución significativa en la ANRasa de los callos de dos de las variedades sometidas al estrés, la Ja-605 y la B-63118, lo cual coincide con lo reportado en la literatura, los niveles de la ANRasa obtenidos en este estudio son similares a los obtenidos en hojas.

Variedad	Tratamientos (horas)	
	24	48
C-37472	NS	NS
Ja-605	*	*
C-18768	NS	NS
POJ-2878	NS	NS
C-8751	NS	NS
B-63118	*	*

$P < 0.05$

Tabla 1. Comparación de la ANRasa de los callos sometidos a estrés durante 24 y 48 horas con el control (Test t-Student)

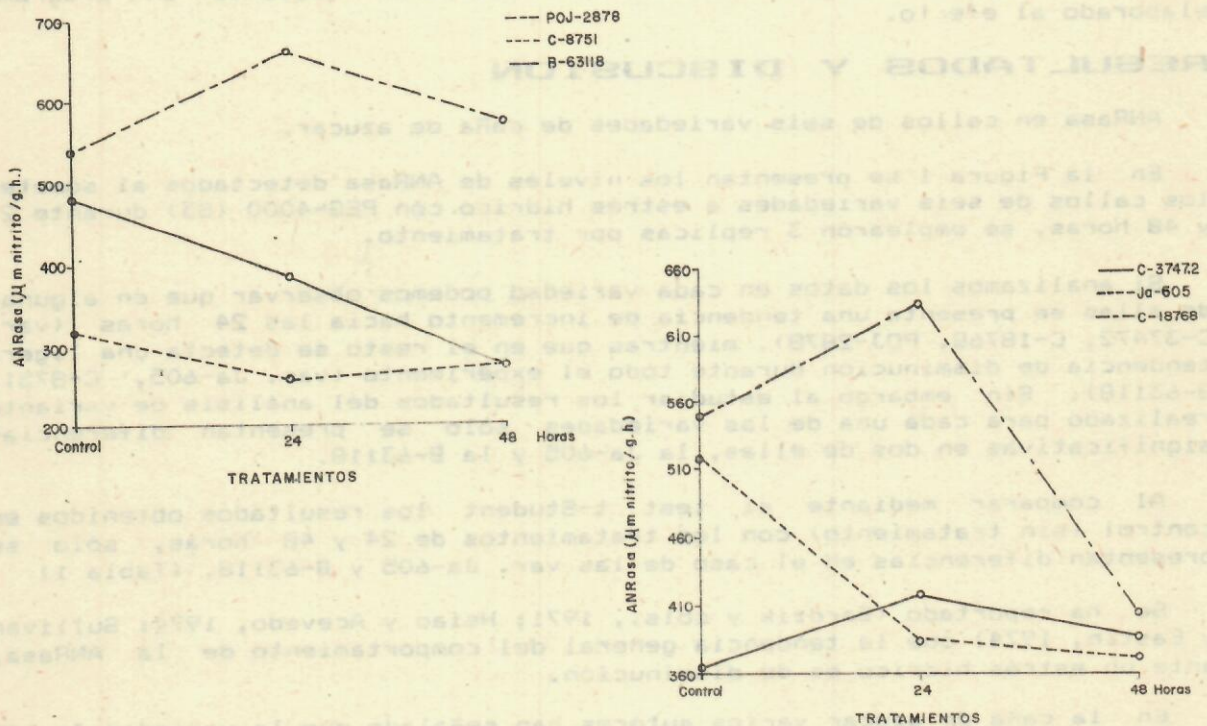


Figura 1. ANRasa en callos de seis variedades de caña de azúcar sometidos a estrés hídrico durante 24 y 48 horas.

El hecho de solo encontrar diferencias significativas en el comportamiento de la ANRasa de dos variedades, aún cuando se observan algunas tendencias, tanto de aumento como de disminución suponemos se deba a la variabilidad que se manifiesta en los resultados producto del número reducido de muestras.

ANRasa en callos de dos variedades sometidas al estrés hídrico

Siguiendo la metodología desarrollada en el experimento anterior realizamos otro experimento donde aumentamos el número de réplicas a 6 y ampliamos el tiempo de tratamiento a 72 horas en dos variedades C-8751 y C-18768.

Al realizar el análisis de clasificación simple se observó que existían diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) entre los valores de ANRasa de los diferentes tratamientos en la variedad C-8751 y muy significativas ($p < 0.01$) en la C-18768.

Al analizar los resultados del test de Duncan que se presentan en la Tabla 2 podemos plantear que en ambas variedades el control difiere del resto de los tratamientos, así como que entre tratamientos también existen diferencias. No obstante, de estos resultados extraemos una conclusión válida y es que los niveles de actividad de los controles en ambos casos son significativamente menores en comparación con los tres tiempos de tratamiento probados, es decir, que se observa una respuesta de aumento de la ANRasa, ante el estrés hídrico.

	Variedades	
Tratamientos	C-8751	C-18768
Control	166.8 c	77.5 c
24 h	1050.6 a	244.6 b
48 h	467.2 b	408.9 a
72 h	684.2 b	197.8 b

$$P < 0.05$$

Tabla 2. ANRasa en callos de dos variedades sometidas al estrés hídrico en tres tiempos. Letras iguales significa que no hay diferencias entre las medias (μ moles $\text{NO}_2/\text{g.h}$).

En general no se hace posible detectar una tendencia en la respuesta de la ANRasa, ante la prolongación del tiempo de exposición de los callos en la solución hiperosmótica.

ANRasa en callos de diferentes generaciones

Teniendo como premisa la variabilidad genética que induce el cultivo de tejidos y, como tal, en el funcionamiento metabólico, se procedió a determinar las posibles alteraciones en la ANRasa en dos generaciones de cultivos (R1 y R5) de las variedades. Ja-605 y B-63118, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.

Variedad	n	R1 (\bar{X})	R5 (\bar{X})	t	sig
Ja-605	8	834.45	832.78	.045	NS
B-63118	6	2809.63	2703.47	.229	NS

$P < 0.05$

Tabla 3. Comparación de la ANRasa en callos de dos generaciones (R_1 y R_5) en dos variedades (μ moles $NO_2/g.h.$)

Al comparar los datos por medio del test t-Student se evidencia que los valores de ANRasa no presentan diferencias significativas entre las generaciones estudiadas de ambas variedades.

En cada variedad, las dos generaciones distan en edad y subcultivo marcadamente por lo que podemos concluir que los niveles de actividad de esta enzima se mantienen estables, por lo tanto se puede plantear que es posible utilizar callos de distintos subcultivos, en este caso entre R_1 y R_5 , para realizar los estudios de la ANRasa.

ANRasa en callos de una variedad sometidos a estrés hídrico con tres soluciones de PEG-4000

La variedad B-63118 es una de las que mostró una tendencia de disminución en la ANRasa al ser sometida a estrés hídrico durante tres tiempos diferentes en el experimento inicial con las seis variedades. Como señalamos anteriormente, esta es la tendencia reportada por diferentes autores.

En correspondencia se continuó el estudio con esta variedad, en este caso utilizando las tres concentraciones de PEG-4000 (81, 82 y 83) y agua destilada, para conocer su efecto. El tiempo de tratamiento fue de 48 horas; en cada caso se utilizaron 8 réplicas excepto en el tratamiento con 83, que constó de 7.

Se realizó el análisis de varianza y se detectaron diferencias muy significativas entre los tratamientos. Al comparar los valores promedio por el test de Rango Múltiple de Duncan se obtuvo que el control defiere del resto de los tratamientos y que, a su vez, estos no poseen diferencias entre sí.

Al analizar los resultados expuestos en la Figura 2 vemos que la ANRasa de esta variedad vuelve a mostrar una disminución al ser sometida a condiciones de déficit de agua. Por otra parte, aunque los valores para las distintas concentraciones de PEG-4000 empleadas no difieren entre sí en este caso, se puede observar una tendencia de incremento de la actividad hacia la solución 83 que provoca un estrés hídrico más drástico. Es válido señalar que los callos sometidos al tratamiento con agua destilada mostraron los menores niveles de ANRasa.

En general, la disminución que se observa con respecto al control puede deberse a que la deshidratación progresiva del tejido reduce la síntesis de

la enzima (Bardzik y cols., 1971), lo cual consideramos válido para los resultados obtenidos en esta variedad y en el resto de las variedades donde hemos observado tal comportamiento.

El aumento en los niveles de ANRasa en algunos casos, puede estar dado por la estimulación del metabolismo del nitrógeno con la consecuente síntesis de compuestos nitrogenados que son osmóticamente activos, los cuales permiten establecer el equilibrio osmótico entre la célula y la solución; sobre todo ante los estréss menos severos.

Aunque los valores obtenidos para las condiciones más drásticas fueron elevados, los mismos no tienen a nuestro entender una justificación válida, por las razones antes mencionadas.

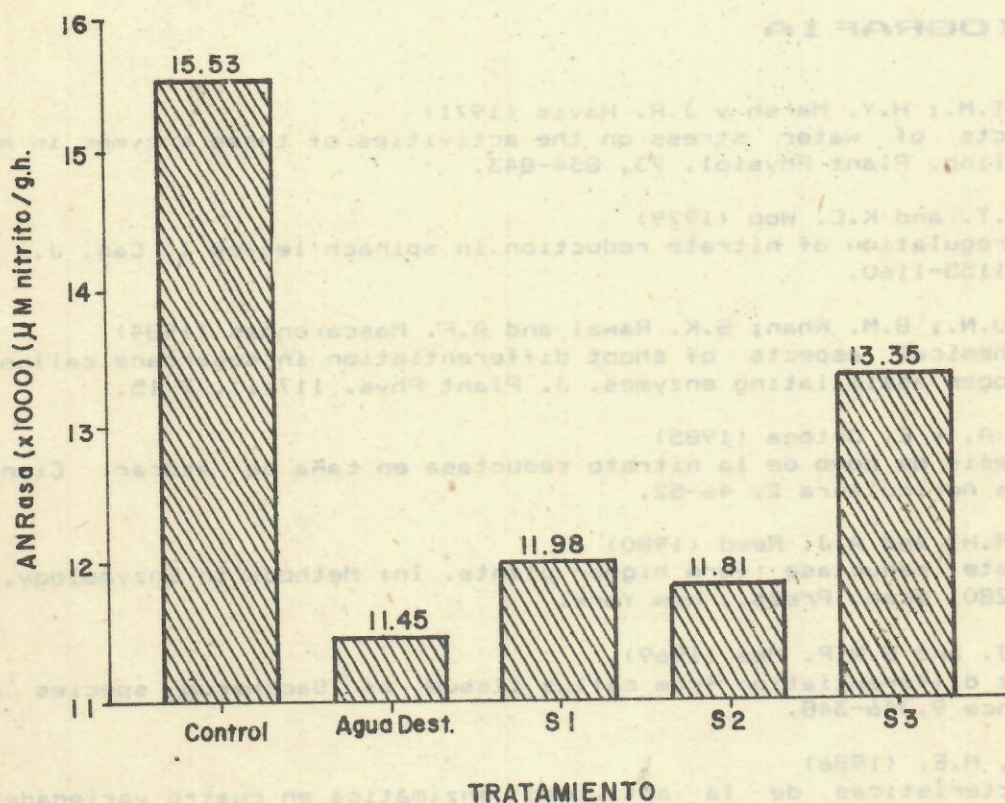


Figura 2. ANRasa en callos de la variedad B-63118 sometidos a estrés hídrico: S1 (-2bar), S2(-4bar) y S3(-8bar).

En resumen, al analizar los distintos experimentos donde se evaluó la ANRasa podemos plantear que se detecta una respuesta diferente entre las variedades al tratar los callos con distintas concentraciones de PEG-4000 durante varios tiempos, lo cual no permite establecer una tendencia general de respuesta a los tratamientos de estrés hídrico. Otro resultado interesante es no haber obtenido diferencias en la ANRasa entre las diferentes generaciones de callos de una misma variedad, lo cual permite la posibilidad de emplear distinto material para evaluar esta actividad enzimática. Es necesario hacer un estudio más profundo en los mecanismos de detección de la actividad de esta enzima ya que no es lógica la variación tan marcada que se presenta en algunos resultados obtenidos para las mismas variedades en distintos experimentos.

CONCLUSIONES

De nuestros resultados podemos plantear las siguientes conclusiones:

- Se reporta la ANRasa en callos de seis variedades de caña de azúcar cuyos niveles son similares a los valores reportados para las hojas.
- Un estrés hídrico provocado con PEG-4000 sobre callos de seis variedades produjo una disminución significativa en dos variedades: Ja-605 y B-63118.
- No se detectan diferencias al evaluar la ANRasa en callos de dos generaciones (R1 y R5) de dos variedades (Ja-605 y B-63118).
- Hasta el momento no es posible plantear una tendencia en la respuesta de la ANRasa en callos sometidos al estrés hídrico con PEG-4000 en distintas variedades.

BIBLIOGRAFIA

- Bardzik, T.M.; H.Y. Marsh y J.R. Havis (1971)
Effects of water stress on the activities of three enzymes in maize seedling. *Plant Physiol.* 73, 834-843.
- Canvin, D.T. and K.C. Woo (1979)
The regulation of nitrate reduction in spinach leaves I. *Can. J. Bot.* 57, 1155-1160.
- Dwivedi, U.N.; B.M. Khan; S.K. Rawal and A.F. Mascarenhas (1984)
Biochemical aspects of shoot differentiation in sugarcane callus. I. Nitrogen assimilating enzymes. *J. Plant Phys.* 117(1), 7-15.
- González, A. y E. Ortega (1985)
Síntesis de novo de la nitrato reductasa en caña de azúcar. *Ciencias de la Agricultura* 2, 46-52.
- Hageman, R.H. and A.J. Reed (1980)
Nitrate reductase from higher plants. In: *Methods in Enzymology*, 69, 270-280, Acad. Press., New York.
- Heinz, D.J. and G.W.P. Mee (1969)
Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species crop *Science* 9.346-348.
- Hernández, M.E. (1986)
Características de la actividad enzimática en cuatro variedades de caña de azúcar sometidas a déficit hídrico. Tesis de Diploma, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 31 p.
- Hsiao, T.C. and E. Acevedo (1974)
Plant response to water deficits, water-use efficiency and drought resistance. *Agricultural Meteorology* 14, 59-84.
- Morales, A. (1985)
Actividad de la nitrato reductasa en seis variedades de caña de azúcar sometidas a déficit hídrico. Tesis de Diploma, Fac. Biología, Universidad de La Habana, 30 p.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962)
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Phys. Plantarum* 15, 473-497.
- Ortega, E.; J. Pardo y A. González (1984)
Cambios metabólicos en plantas de caña de azúcar bajo estrés hídrico. *Ciencias de la Agricultura* 21, 37-43.

Rivero, J. (1982)

Algunas consideraciones sobre la enzima nitrato reductasa en caña de azúcar. Tesis de Diploma, Fac. Biología, Universidad de La Habana, 32 p.

Sullivan, C.V. and J.D. Eastin (1974)

Plant physiological response to water stress. Agricultural Meteorology 14, 113-127.

Viqueira, L.; L. Gómez y C.R. Rodríguez (1981)

Efecto de la sequía simulada mediante PEG-4000 en la variedad de caña de azúcar Ja-60-5. Ciencias de la Agricultura. 9. 51-59.

Recibido: 11 de agosto de 1988.