

EFECTO DE LA 24-EPIBRASINÓLIDA EN EL CRECIMIENTO, LOS NIVELES DE PROLINA Y DE MALONDIALDEHIDO DE PLÁNTULAS DE ARROZ (*Oryza sativa L.*) SOMETIDAS A ESTRÉS SALINO

Yanelis Reyes Guerrero¹, Lisbel Martínez González¹, Lizzy Rosabal Ayan¹, Luis Miguel Mazorra Morales¹, Alejandro Pieters², Miriam Núñez Vázquez¹.

¹Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Email: yanelisrg@inca.edu.cu

²Laboratorio de Ecofisiología Vegetal. Centro de Ecología. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Venezuela.

Introducción

La salinidad de los suelos se ha convertido en uno de los problemas más alarmantes en la actualidad.. Existen reportes que demuestran que el área de nuestro planeta afectada por la salinización es de alrededor de 800 millones de hectáreas (FAO, 2008). En nuestro país, la superficie agrícola está afectada en un 14% y otro 15% más presenta peligros potenciales de salinización (Lau et al., 2005).

El arroz (*Oryza sativa L.*) es una de las especies más cultivadas en el planeta pues constituye la fuente principal de alimento de más de un tercio de la población mundial.

Los brasinoesteroides son potentes reguladores del crecimiento vegetal de naturaleza esteroidal. Estas hormonas tienen efectos pleiotrópicos como son: estimulación del alargamiento celular y de la desdiferenciación de protoplastos, la regeneración de la pared celular, la regulación de la diferenciación de elementos traquearios, el incremento de la biomasa y del rendimiento (Bajguz y Hayat, 2009).

Además, se ha informado ampliamente el efecto protector de los brasinoesteroides ante distintos tipos de estrés como altas y bajas temperaturas (Singh y Shono, 2005), sequía y salinidad (Kagale et al., 2007). En el caso particular del arroz sometido a estrés salino, la información que aparece en la literatura internacional acerca de la posible protección de los brasinoesteroides es algo limitada.

Por estas razones, se decidió acometer el siguiente trabajo, cuyo objetivo central fue evaluar el efecto de la 24-epibrasinólica (24-EBL) en el crecimiento, los niveles de prolina y la peroxidación lipídica en plántulas de arroz var. J-104 sometidas a un período corto de estrés por NaCl.

Materiales y Métodos

Para dar cumplimiento al objetivo propuesto, se utilizaron semillas de arroz (*Oryza sativa L.*) de la variedad Jucarito-104 (J-104) considerada como susceptible al estrés salino (Alfonso, 1998) y se sumergieron en agua destilada durante 24 horas. Posteriormente, se colocaron en placas Petri; y a las 48 horas, las semillas germinadas se trasplantaron a potes que contenían suelo Hidromórfico Gley Nodular Ferruginoso (Instituto de Suelos, 1999) y se introdujeron en cestas plásticas que contenían agua corriente. Las cestas se colocaron dentro de un umbráculo para evitar el efecto de las precipitaciones. En el momento de emergencia de la tercera hoja verdadera, se realizó la aspersión foliar con la 24-epibrasinólica (EBL). Las concentraciones utilizadas fueron 0.5, 1 y 2 μmolesL^{-1} . Las plantas se dividieron en dos grupos, uno se colocó en cestas con solución nutritiva Hoagland diluida y el otro se colocó en cestas que contenían solución nutritiva Hoagland diluida suplementada con 100 mmolesL^{-1} de NaCl. A los siete días, las plantas que estaban sometidas a tratamiento salino, se colocaron en solución nutritiva Hoagland diluida, durante 14 días, para evaluar la recuperación.

Las evaluaciones de crecimiento (altura, longitud de las raíces, masa seca de la parte aérea y de las raíces) se realizaron a 12 plantas por tratamiento, al iniciar y finalizar el tratamiento salino y a los siete y 14 días de recuperación. En el caso de las masas secas, con las medias de cada

tratamiento a los 0, 7 y 14 días de recuperación, se calcularon los porcentajes de variación que el tratamiento con NaCl provocó en estos indicadores utilizando la fórmula:

$$\% = -(1 - T_2/T_1) * 100 \quad T_2 = \text{Valor de masa seca de cada tratamiento en condiciones salinas}$$

$$T_1 = \text{Valor de masa seca de cada tratamiento en solución nutritiva}$$

Las concentraciones de prolina y de malondialdehído (MDA) en las hojas se determinaron al finalizar el período de recuperación. La prolina se realizó mediante el método de Bates *et al.* (Bates, 1973) y el contenido de MDA se determinó por el método del ácido tiobarbitúrico (Hodges *et al.*, 1999).

Se ejecutaron dos repeticiones del experimento, una se inició el 8 de septiembre y la otra el 12 de octubre del 2009, respectivamente. Se registraron las temperaturas mínimas, medias y máximas durante la etapa de crecimiento inicial de las plántulas, durante el período de tratamiento con NaCl (siete días) y durante la fase de recuperación (14 días) en las dos repeticiones del experimento (Tabla 1).

Los datos de cada repetición se procesaron mediante el cálculo de las medias y los intervalos de confianza a $p \leq 0.05$.

Tabla 1. Datos de la temperatura máxima, media y mínima durante la fase de crecimiento, el período de tratamiento con NaCl y la fase de recuperación de las plantas de arroz correspondientes a las dos repeticiones del experimento.

Fases	Temp. máx		Temp. mín.		Temp. media	
	Primera Repetición	Segunda repetición	Primera Repetición	Segunda repetición	Primera Repetición	Segunda repetición
Etapa de crecimiento de las plántulas	32.2 ± 2.4	30.5 ± 1.2	22.2 ± 0.5	20.9 ± 1.1	26.5 ± 0.3	25.2 ± 0.7
Período de tratamiento con NaCl	31.8 ± 1.0	28.9 ± 1.5	19.8 ± 1.5	20.4 ± 1.6	25.1 ± 1.5	25.0 ± 2.0
Fase de recuperación de las plántulas	32.6 ± 1.2	27.4 ± 0.9	22.8 ± 0.8	17.2 ± 1.4	27.0 ± 0.8	21.6 ± 1.6

Resultados y discusión

En la figura 1 se muestran los resultados de la longitud de la parte aérea de ambas repeticiones

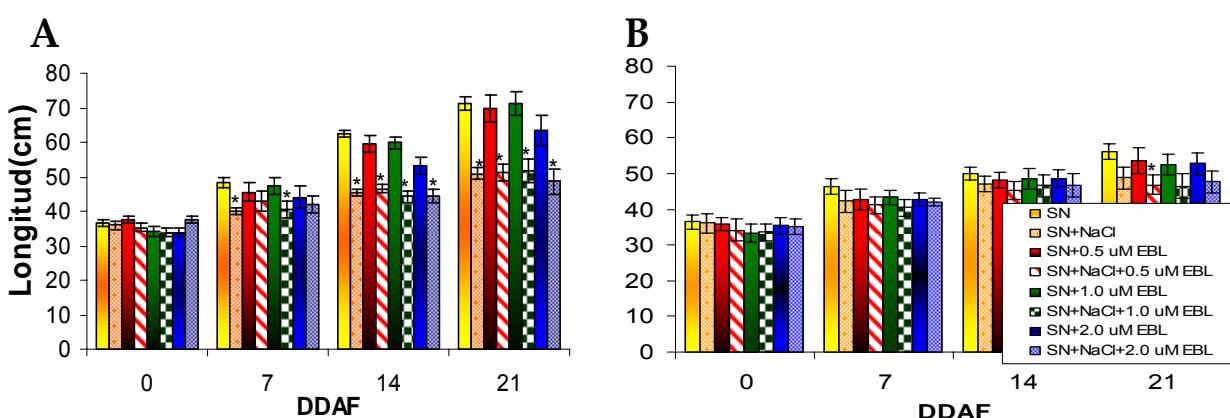


Figura 1. Efecto de la aspersión foliar de EBL en la longitud de la parte aérea de plántulas de arroz de la variedad J-104 sometidas a 100mM de NaCl **A.** Primera Repetición. **B** Segunda Repetición. **DDAF:** Días después de la aspersión foliar. En todos los casos las barras indican los intervalos de confianza ($p \leq 0.05$) y los asteriscos los tratamientos que difieren significativamente de sus controles respectivos sin NaCl.

Como se puede apreciar en la primera repetición del experimento, el tratamiento con NaCl afectó la longitud de la parte aérea; aunque la 24-epibrasinolida (EBL), a las concentraciones de 0,5 y 2 μmolesL^{-1} , tuvo un efecto protector durante el período de estrés. Este efecto del estrés salino en el crecimiento es ampliamente conocido ya que tanto el estrés hídrico como la acumulación de iones retrasan los procesos de división y diferenciación celular (Duan *et al.*, 2007). Además se observa que en la recuperación en solución nutritiva sin NaCl todavía las plantas mostraban afectaciones en el crecimiento, las cuales no pudo revertir la EBL. Algunos autores han señalado el hecho de que una vez concluido el período de estrés y sometidas las plantas durante siete días al tratamiento control, estas no lograron recuperarse, lo que demuestra el carácter irreversible de los daños ocasionados (Morales *et al.*, 2006).

No obstante, en la segunda repetición del experimento (Figura 1B), el tratamiento con NaCl no afectó significativamente la longitud de la parte aérea de las plántulas hasta el final de la etapa de recuperación, donde se observa un efecto de protección de la EBL a las concentraciones de 1 y 2 μmolesL^{-1} .

Esta diferencia en la respuesta de las plantas ante el tratamiento con NaCl en ambas repeticiones, puede estar relacionada con las condiciones meteorológicas imperantes durante la ejecución de las mismas. Como se puede observar en la Tabla 1, en la segunda repetición, tanto la temperatura máxima, como la mínima y la media durante la etapa de recuperación de las plántulas fue aproximadamente 5 grados más baja que en la primera repetición y es bien conocido, el efecto que la temperatura ejerce en el crecimiento del arroz, pues la temperatura óptima para la fase vegetativa de este cultivo es de 25-30°C y temperaturas menores ocasionan un retraso en el crecimiento (Yoshida, 1981). Es de destacar, que en la etapa de 4-5 hojas, que es en la que se realiza el experimento, el arroz es muy sensible a las variaciones de temperatura, ya sea disminución o aumento de su temperatura óptima (Sánchez y Socorro, 2008).

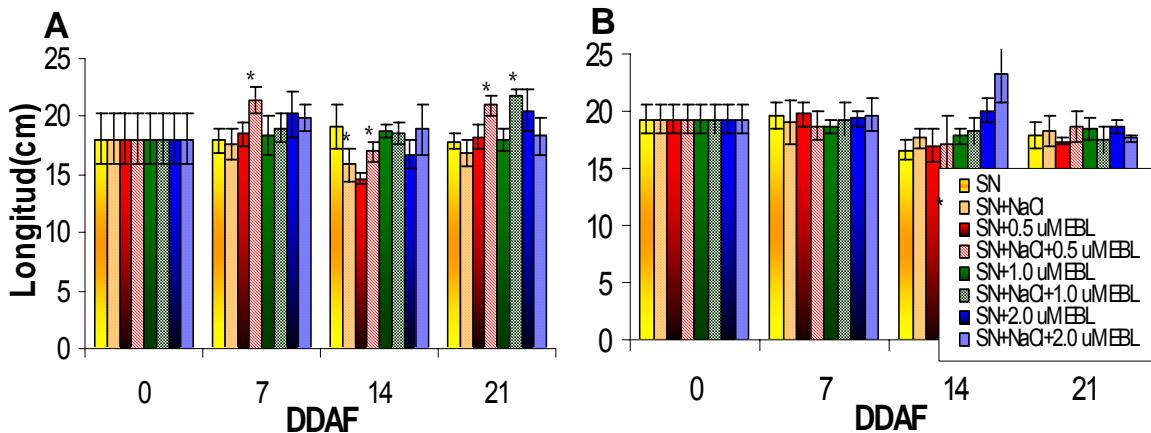


Figura 2. Efecto de la aspersión foliar de EBL en la longitud de la raíz de plántulas de arroz de la variedad J-104 sometidas a 100mM de NaCl **A.** Primera Repetición. **B** Segunda Repetición. **DDAF:** Días después de la aspersión foliar. En todos los casos las barras indican los intervalos de confianza y los asteriscos, las diferencias significativas con relación a sus respectivos controles.

En cuanto a la longitud de la raíz en la primera repetición se observa un incremento significativo con la concentración de 0,5 μmolesL^{-1} de EBL tanto en el período de estrés como en la recuperación. Al final de este período se observa que la concentración de 1 μmoll^{-1} también logra aumentar la longitud de la raíz. (Figura 2A)

Sin embargo, en la segunda repetición del experimento (Figura 2B) no se observa este efecto, tan sólo se evidencia una disminución significativa de la longitud radical en las plántulas tratadas con 2 μmolesL^{-1} de EBL y sometidas a 100mM de NaCl. Estas diferencias entre las dos

repeticiones del experimento también pueden obedecer a las diferencias en las temperaturas registradas entre ambas repeticiones.

Como se puede observar en la tabla 2, el tratamiento con NaCl provocó, al final del período de estrés, un incremento en la biomasa seca de las raíces que se hizo más evidente en la segunda repetición y muy poca variación en la biomasa de la parte aérea. Se debe destacar, como en este momento, sobre todo en la segunda repetición la aspersión foliar con 2 μmolesL^{-1} de EBL estimuló la formación de biomasa seca de las plántulas en condiciones salinas. Sin embargo, en las evaluaciones realizadas a los 7 y 14 días de la recuperación, se puede observar, como el tratamiento con NaCl indujo, de forma general, en ambas repeticiones, una reducción en la acumulación de biomasa seca tanto de la parte aérea como de las raíces de las plántulas no asperjadas con EBL. Se destaca, en la segunda repetición, el tratamiento de 2 μmolesL^{-1} de EBL, el cual provocó una estimulación significativa en la acumulación de biomasa seca de las raíces a los 14 días de la recuperación.

Tabla 2. Efecto de la aspersión foliar de EBL en los porcentajes de variación (decremento o incremento) que el tratamiento con NaCl induce en la biomasa seca de la parte aérea y de las raíces de plántulas de arroz variedad J-104 a los 0, 7 y 14 días de recuperación. **A.** Primera repetición. **B.** Segunda Repetición.

A

TRATAMIENTOS	PARTE AÉREA			RAÍCES		
	0	7	14	0	7	14
Control	-3.1	-19.0	-20.8	23.6	-50.8	-42.7
0.5 μM EBL	-13.7	-4.9	-14.1	-30.0	-41.7	-53.6
1.0 " "	16.8	-5.0	-10.3	-10.8	-46.3	-60.0
2.0 " "	1.6	-1.7	-13.0	-18.0	-45.8	-50.4

B

TRATAMIENTOS	PARTE AÉREA			RAÍCES		
	0	7	14	0	7	14
Control	1.9	-11.9	7.1	59.6	-10.0	-28.4
0.5 μM EBL	-9.2	12.4	-17.5	-22.0	-8.7	-18.8
1.0 " "	7.4	-6.8	-5.0	-10.5	6.3	-12.9
2.0 " "	23.1	-11.5	5.8	72.4	-28.7	57.5

De manera general, la biomasa seca de las plántulas de arroz tratadas con NaCl se vio menos afectada en la segunda repetición del experimento, donde prevalecieron las temperaturas más bajas (Tabla 1). Estas condiciones climáticas influyeron en un menor crecimiento de las plantas controles y por tanto, en una menor variación de la biomasa seca de las plántulas estresadas. Otros autores han demostrado que el tratamiento por siete días con 24-EBL (1 μM) fue capaz de incrementar significativamente las velocidades de crecimiento de las raíces y la parte aérea de las plántulas de arroz variedad INCA LP-7 en medio salino (100 mM NaCl), mientras que en la variedad J-104 el tratamiento con EBL (0.1 μM) fue el mejor aunque sólo aumentó la masa fresca de las raíces (Núñez, 2006).

Anuradha y Rao informaron una recuperación en el crecimiento y un incremento de los niveles de proteínas solubles y RNA en semillas de arroz var IR-64 tratadas durante 24h con NaCl (150mM) y EBL (3 μM) (Anuradha y Rao, 2001). Estos mismos autores en un trabajo posterior demostraron que la imbibición de las semillas con BL, EBL y HBL (3 μM) restauró considerablemente el crecimiento, los niveles de clorofila y la actividad de la nitrato reductasa ante estrés salino (150mM) (Anuradha y Rao, 2003). Por otra parte, en Turquía, otros autores evaluaron la germinación de las semillas y el crecimiento inicial de plántulas de arroz variedad

IR-28 ante estrés salino (120mM) con 24-EBL (3 μ M). Los resultados obtenidos fueron que los tratamientos con BR aumentaron el crecimiento de las plántulas pero no la germinación.

En la tabla 3 se muestran los niveles de malondialdehido (MDA) y prolina.

El MDA se produce cuando los ácidos grasos poliinsaturados se oxidan por efecto de los radicales libres del oxígeno. Esta peroxidación lipídica da una medida indirecta del daño celular inducido por el estrés oxidativo que provoca la salinidad. Como se puede observar, en la primera repetición del experimento, los niveles de MDA aumentaron levemente ante el estrés salino. Sin embargo, la EBL disminuyó significativamente estos niveles en los tratamientos sin NaCl, y en los tratamientos con estrés las concentraciones de 0,5 y 1 μ molL $^{-1}$ también redujeron los niveles de peroxidación lipídica. En la segunda repetición, no hubo un aumento de los niveles de MDA ante el estrés salino. No obstante, la EBL (0,5 y 2 μ molesL $^{-1}$) disminuyó los niveles de peroxidación lipídica en los tratamientos sin estrés, mientras que la concentración de 0,5 μ molesL $^{-1}$ fue la única que disminuyó significativamente los niveles de MDA en las plantas tratadas con NaCl.

Este incremento de los niveles de MDA ante estrés salino ha sido informado por otros autores pero en raíces de arroz de variedades susceptibles y ha sido correlacionado con decremento en las actividades de enzimas antioxidantes como catalasa y glutatióna reductasa y una actividad basal de superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa. Sin embargo en variedades tolerantes ha sucedido todo lo contrario (Demiral y Turkan, 2005; Khan y Panda, 2008).

Además, la EBL (3 μ M) logró disminuir la peroxidación lipídica y la acumulación de prolina causada por el estrés salino (120mM) de plántulas de arroz variedad IR-28. Entre las enzimas antioxidantes sólo se incrementó la ascorbato peroxidasa ante el tratamiento con esta hormona (Ozdemir *et al.*, 2004).

En cuanto a la prolina, se puede observar el incremento que experimentó este indicador a los 14 días de la recuperación en las plántulas tratadas con NaCl (Tabla 3). Las plantas superiores pueden acumular L-prolina (Pro) en respuesta a diversos estrés medioambientales como sequía y salinidad (Munns y Tester, 2008).

Tabla 3. Influencia de la aspersión foliar con EBL en la concentración de prolina y de MDA de hojas de plántulas de arroz variedad J-104, a los 14 días de recuperación de un tratamiento con 100 mM de NaCl por siete días. (Medias \pm intervalos de confianza a $p \leq 0.05$)

Tratamientos	Prolina (μ moles.mg MF $^{-1}$)		MDA (μ moles de TBARS.mg MF $^{-1}$)	
	Primera Repetición	Segunda Repetición	Primera Repetición	Segunda Repetición
Control	8.8 \pm 1.6	5.5 \pm 0.6	2.2 \pm 0.1	2.4 \pm 0.1
0.5 μM EBL	9.0 \pm 1.0	4.1 \pm 0.1*	1.9 \pm 0.1*	1.9 \pm 0.1*
1.0 “ “	8.3 \pm 0.9	5.4 \pm 0.2	1.8 \pm 0.1*	2.2 \pm 0.1
2.0 “ “	8.6 \pm 0.9	7.4 \pm 0.3*	1.7 \pm 0.1*	2.1 \pm 0.0*
NaCl	27.0 \pm 2.3	17.3 \pm 0.6	2.7 \pm 0.2	2.5 \pm 0.1
NaCl + 0.5 μM EBL	43.2 \pm 2.5*	5.3 \pm 0.5*	2.0 \pm 0.1*	2.2 \pm 0.1*
NaCl + 1.0 “ “	20.1 \pm 0.4*	5.2 \pm 0.1*	2.1 \pm 0.1*	2.3 \pm 0.1
NaCl + 2.0 “ “	16.6 \pm 0.8*	10.2 \pm 2.4*	2.4 \pm 0.1	2.2 \pm 0.2

*Los asteriscos representan los tratamientos que difieren significativamente de los controles sin EBL.

Aunque la acumulación de prolina ha sido observada en arroz expuesto a estrés salino, su rol exacto es muy controversial, pues es considerada más un síntoma de daño que un indicador

de tolerancia al estrés. La acumulación de prolina ha sido correlacionada con el grado de deterioro inducido por el estrés y hay autores que plantean que el aumento de este aminoácido podría deberse a una necesidad de la planta de eliminar el exceso de amonio (Amini y Ehsanpour, 2005).

En la primera repetición, la aspersión foliar con 0,5 μmolesL^{-1} de EBL aumentó aún más los niveles de prolina en las plántulas sometidas a estrés salino, mientras que las concentraciones de 1 y 2 μmolesL^{-1} redujeron estos niveles. En el segundo experimento, las tres concentraciones estudiadas redujeron los niveles de prolina en las plántulas tratadas con NaCl.

A modo de conclusión, se puede plantear que la respuesta del crecimiento de las plántulas de arroz variedad J-104 al tratamiento con 100 μmolesL^{-1} de NaCl por siete días y a la aplicación exógena de 24-epibrasinolida estuvo muy relacionada con las temperaturas en las cuales estaban creciendo las mismas. Esto último es de gran interés científico-técnico, pues la mayoría de los resultados que se han informado en cuanto a la inducción de tolerancia al estrés salino por la 24-epibrasinolida en el cultivo del arroz se han obtenido mediante el tratamiento a la semilla (22, 23, 24) y se ha evaluado el crecimiento inicial de las plántulas en condiciones controladas; sin embargo, no hay información anterior de aplicaciones mediante aspersión foliar en esta etapa de crecimiento del cultivo en condiciones abiertas; por lo que se hace necesario continuar profundizando en este sentido, pues al parecer la respuesta a determinadas dosis de la hormona dependerá en gran medida de las condiciones de crecimiento de las plantas.

Referencias bibliográficas.

- **Alfonso, R. I.** (1998) Determinación de parámetros genético-fisiológicos indicadores del estrés hídrico para su empleo en el mejoramiento genético del arroz (*Oryza sativa L.*) y la estabilidad varietal. Tesis de grado.
- **Amini, F., Ehsanpour, A. A.** (2005) Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na^+/K^+ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under *in vitro* salt stress. Am. J. Biochem & Biotech. **1** 212-216
- **Anuradha, S., Rao, S.** (2001) Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa L.*). Plant Growth Regul **33**: 151-153
- **Anuradha, S., Rao, S.** (2003) Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa L.*) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic pigment loss and increase nitrate reductase activity. Plant Growth Regul **40**: 29-32
- **Bajguz, A., Hayat, S.** (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. Plant Physiology and Biochemistry **47**: 1-8
- **Bates, L., Waldren, RP, Teare, ID** (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil **39**: 205-207
- **Demiral, T., Turkan, I.** (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Env Exp Bot **53**: 247-257
- **Duan, D. Y., Li, W. Q., Liu, X. J., Ouyang, H., An, P.** (2007) Seed germination and seedling growth of *Suaeda salsa* under salt stress. Ann. Bot. Fennici **44**
- **FAO** (2008) FAO Land and Plant Nutrition Management Service. . *In*,
- **Hodges, M. D., DeLong, J. M., Forney, C. F., Prange, R. K.** (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta **207**: 604-611
- **Instituto de Suelos** (1999) Nueva clasificación de los suelos de Cuba. La Habana : Agrinfor. Cuba. MINAGRI. 64
- **Kagale, S., Divi, U. K., Krochko, J. E., Keller, W.A., Krishna, P.** (2007) Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. Planta **225**: 353-364
- **Khan, M. H., Panda, S. K.** (2008) Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. Acta Physiol Plant **30**: 81-89

- **Lau, A., Garea, E., Ruiz, M. E.** (2005) Estimación de la salinidad de los suelos utilizando una imagen espectrozonal y el sistema de información geográfica TELEMAP. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* **14**: 47-54
- **Morales, D., Bolarín, M. C., Cayuela, E.** (2006) Respuesta de plantas de arroz (*Oryza sativa L.*) a la aplicación de diferentes niveles de NaCl. I. Crecimiento y relaciones hídricas. *Cultivos Tropicales* **27**: 27-32
- **Munns, R., Tester, M.** (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**
- **Núñez, M., Mazorra,L.M., Martínez,L., González, M. C., Robaina,C.** (2006) Influencia de la 24-epibrassinolida y un análogo espirostánico de brasinoesteroides en el crecimiento de plántulas de dos variedades de arroz (*Oryza sativa L.*) en medio salino. *Cultivos Tropicales* **27**: 75-82
- **Ozdemir, F., Bor, M., Demiral, T., Turkan, I.** (2004) Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa L.*) under salinity stress. *Plant Growth Regul* **42**: 203-211
- **Sánchez, S., Socorro, M.** (2008) Tecnología del cultivo del arroz en pequeña escala. . *In EM* Oliva., ed. Biblioteca ACTAF
- **Singh, I., Shono, M.** (2005) Physiological and molecular effects of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid on thermotolerance of tomato. . *Plant Growth Regulation* **47**: 111-119
- **Yoshida, S.**, ed (1981) Fundamentals of rice crop science. International Rice Research Institute Los Banos, Philippines.