

# El estrés salino incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y la concentración de polifenoles en Vinal (*Prosopis ruscifolia* G.)

*Saline stress increases antioxidative enzymes activity and polyphenol content in vinal (Prosopis ruscifolia G.)*

Meloni, D. A.<sup>1,2</sup>; M. R. Gulotta<sup>2</sup>; M. A. Oliva Cano<sup>3</sup>

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la importancia de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa (POD), y los polifenoles en la tolerancia del vinal a altas concentraciones salinas. Plántulas de vinal, de 20 días de edad se cultivaron hidropónicamente en solución nutritiva de Hoagland modificada, suplementada con concentraciones de 0; 0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 mol L<sup>-1</sup> de NaCl. Luego de 30 días de tratamiento se determinó la peroxidación de lípidos a través de la concentración de malondialdehído (MDA), y se evaluó la capacidad antioxidante a través de la determinación de las actividades de las enzimas SOD y POD, y las concentraciones de polifenoles en hojas. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 5 repeticiones. Los datos se analizaron con ANOVA y test de Duncan. Los niveles de MDA no fueron modificados por la salinidad, demostrando que la especie posee un eficiente sistema de detoxificación de especies reactivas de oxígeno. Coincidiendo con este resultado, el estrés incrementó las actividades de las enzimas SOD y POD, y las concentraciones de polifenoles. Se concluye que en presencia de altas concentraciones NaCl, vinal incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y sintetiza polifenoles en hojas, para contrarrestar los efectos negativos del estrés oxidativo.

**Palabras claves:** Estrés salino; NaCl; Polifenoles; Superóxido dismutasa.

## 1. INTRODUCCION

Vinal (*Prosopis ruscifolia* G.), es una especie leñosa nativa de la Región Fitogeográfica del Gran Chaco, que se destaca por su elevada tolerancia a la salinidad y al estrés hídrico (Giménez y Moglia, 2003).

Posee múltiples usos. Sus frutos son aptos para el consumo humano, y muy apetecidos por el ganado. Presenta propiedades terapéuticas, siendo las hojas utilizadas como antiséptico, desinflamante, y para el tratamiento de conjuntivitis, y los frutos muy apreciados para el control de la diabetes y como desinfectante externo. También es utilizado como leña y para la producción de postes (Leonardis, 1949). La realización de investigaciones básicas permitirá incrementar el valor agregado a los productos de esta especie forestal.

Sus aplicaciones, y la tolerancia a los estreses abióticos, la constituyen en una halófito muy interesante para el desarrollo de zonas áridas con suelos salinos, donde no pueden prosperar otras especies. Para tal fin, es necesario realizar un mejoramiento genético de la especie, y conocer los mecanismos que le confieren tolerancia a tales condiciones.

<sup>1</sup> Instituto para el Desarrollo de Zonas Áridas y Semiáridas (INDEAS), Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero. E-mail: dmeloni@unse.edu.ar

<sup>2</sup> Laboratorio de Fisiología Vegetal, Instituto de Silvicultura y Manejo de Bosques (INSIMA). Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Nacional de Santiago del Estero. Av. Belgrano (s) 1912. 4200 Santiago del Estero. Argentina.

<sup>3</sup> Departamento de Biología Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Las plantas tolerantes al estrés salino recurren a diferentes estrategias: ajuste osmótico, exclusión de iones tóxicos de la parte aérea, traslocación de fotoasimilados a órganos subterráneos, para incrementar el crecimiento del sistema radicular y asegurar una mayor disponibilidad de agua y nutrientes, etc (Meloni *et al.*, 2004).

Por otra parte, la salinidad puede producir una rápida acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como los radicales superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), oxidrilo ( $OH^{\bullet}$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), en cloroplastos y mitocondrias (Zhu, 2001). Estrés oxidativo, es un término comúnmente utilizado para describir los efectos adversos de las ROS sobre las plantas. Éstos pueden consistir en la degradación de pigmentos fotosintéticos, peroxidación de lípidos, alteraciones en la permeabilidad selectiva de las membranas celulares, desnaturalización de proteínas, y mutaciones en el ADN (Mittler, 2002). Para reparar y mitigar el daño producido por las ROS, ciertas especies han desarrollado mecanismos de protección como la síntesis de dos tipos de antioxidantes: a) sustancias no enzimáticas, de bajo peso molecular, como los fenoles, y b) enzimas como la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) y la peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7) (Gossett *et al.*, 1994).

La SOD participa en la detoxificación del radical superóxido, y su acción produce  $H_2O_2$  y  $O_2$ . La POD, por su parte, descompone el  $H_2O_2$ , por la oxidación de cosustratos, como fenoles y antioxidantes (Mittler, 2002).

En este trabajo hipotetizamos que en presencia de altas concentraciones NaCl, vinal incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y sintetiza fenoles, para contrarrestar los efectos negativos del estrés oxidativo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la importancia de las enzimas SOD y POD, y los polifenoles en la tolerancia del vinal a altas concentraciones salinas.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se cosecharon frutos de vinal, en las inmediaciones de la localidad de Maco, Santiago del Estero, Argentina ( $27^{\circ} 51'$  latitud S y  $64^{\circ} 13'$  longitud W), durante el mes de febrero del año 2007. Las semillas se extrajeron manualmente, y escarificaron con ácido sulfúrico concentrado durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron durante media hora con agua corriente, y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada. La siembra se realizó sobre toallas de papel de filtro embebidas con solución nutritiva de Hoagland modificada (Meloni *et al.*, 2001), dispuestas en forma de rollos, y cubiertas con bolsas de plástico transparente para disminuir la evaporación. La incubación se realizó en cámara de crecimiento, a  $25^{\circ}C$  de temperatura y 12 horas de fotoperíodo. Plántulas así obtenidas, de 20 días de edad, se cultivaron hidropónicamente, en recipientes de 3 litros de capacidad, conteniendo solución nutritiva de Hoagland modificada (Meloni *et al.*, 2001), bajo aireación continua. El pH se ajustó diariamente a 6,5, mediante la adición de KOH ó  $H_2SO_4$ , y la solución nutritiva se cambió semanalmente. Al cabo de 7 días, se iniciaron los tratamientos de salinidad, mediante la adición de 50 mM de NaCl cada 24 hs, hasta lograr concentraciones finales de 0; 0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 mol  $L^{-1}$ . Luego de 30 días de tratamiento las hojas se extrajeron y congelaron en nitrógeno líquido, para su conservación.

La peroxidación de lípidos se determinó a través de la cuantificación de la concentración de malondialdehído, mediante la técnica descrita por Hendry *et al.*, (1993).

Las enzimas se extrajeron a partir de 0,4 g de hojas, que se homogeneizaron con 50 mmol  $L^{-1}$  de buffer fosfato de sodio (pH 6.8), conteniendo 1 mmol  $L^{-1}$  de  $EDTA.Na_2$  y 2% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVPP). El proceso de extracción se realizó a  $4^{\circ}C$ . Posteriormente los extractos se centrifugaron a 13.000 g durante 40 minutos, y el sobrenadante se utilizó para la

determinación de las actividades enzimáticas. Éstas se expresaron en función de la concentración proteica, determinada mediante la técnica Bradford (1976), usando albúmina sérica bovina como standard. La actividad de la enzima superóxido dismutasa se estimó espectrofotométricamente, a 560 nm, siguiendo el método de Beauchamp y Fridovich, (1971). La actividad de la enzima peroxidasa se cuantificó a través de la oxidación del guayacol, según la técnica de Maehly y Chance (1954).

Para la extracción de los polifenoles, las hojas se secaron a temperatura ambiente durante una semana. Al material, previamente molido, se le adicionó metanol y se lo incubó durante 24 horas a 4°C. Luego se filtró y se determinó la concentración a través del método de Singleton modificado (Dewanto *et al.*, 2002).

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 5 repeticiones. Los datos se analizaron con ANOVA y test de Duncan.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El incremento de la salinidad en la solución nutritiva no modificó los tenores de malondialdehído en las hojas de vinal (Figura 1 A), lo que demuestra que la especie posee un eficiente sistema de detoxificación de radicales libres. Coincidiendo con este resultado, el estrés salino incrementó la actividad de la enzima SOD, a partir de concentraciones de 0,2 M de NaCl. Esta tendencia se mantuvo con el incremento de la concentración salina en la solución nutritiva (Figura 1 B). De este modo, la actividad de la SOD en plantas crecidas soluciones conteniendo 0,4 M de NaCl fue 147 % superior que en el testigo. El aumento en la actividad de esta enzima permite detoxificar el radical superóxido, producido por el estrés, y constituye una importante estrategia para disminuir los efectos nocivos del estrés oxidativo. Una respuesta similar ha sido observada en cultivares de algodón tolerantes a la salinidad (Meloni *et al.*, 2003). Molassiotis *et al.* (2006) demostraron un aumento en la actividad SOD en hojas de manzano sometido a estrés salino, y detectaron nuevas isoformas que no estaban presentes en el testigo.

Pese a que la SOD actúa como la primera enzima de defensa contra la oxidación producida por las ROS, su actividad genera la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un producto tóxico para las plantas (Mittler, 2002). Por este motivo, vinal debería contar con un mecanismo que le permita transformar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una sustancia inocua.

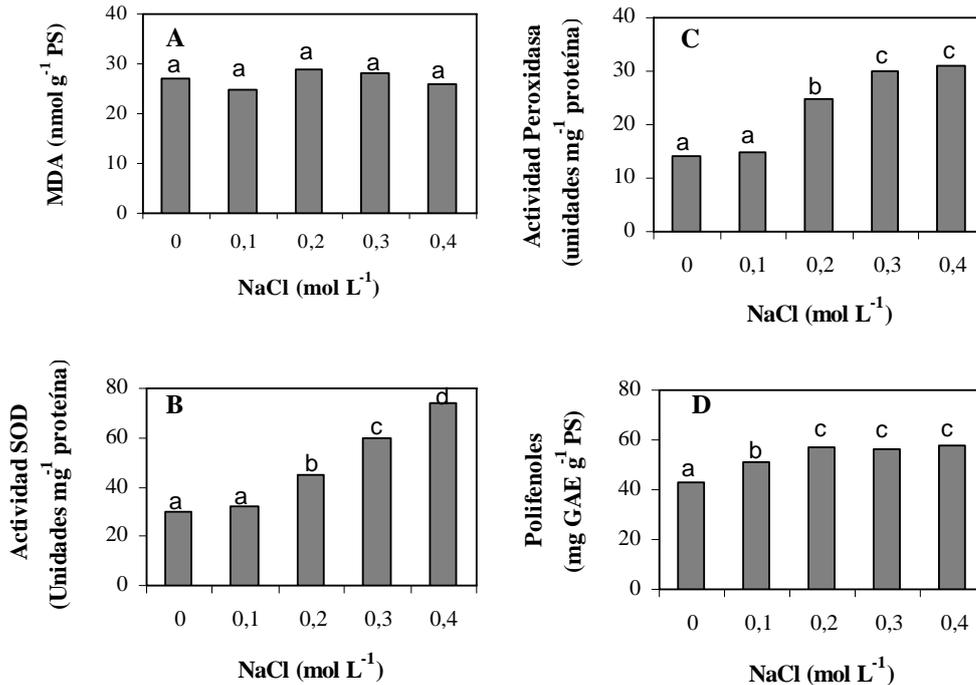
El estrés también produjo un incremento en la actividad de la enzima POD, a partir de concentraciones de NaCl de 0,2 mol L<sup>-1</sup> (Figura 1C). En las plantas que crecieron en soluciones suplementadas con 0,4 mol L<sup>-1</sup> de NaCl, la actividad POD se duplicó con respecto al testigo. La POD descompone al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la oxidación de diversos sustratos, por lo que su actividad se complementa con la de la SOD, eliminando el producto tóxico producido por ésta.

La concentración de polifenoles fue más sensible al estrés que la actividad enzimática, incrementándose incluso en el menor nivel de salinidad. Las plantas cultivadas en presencia de 0,1 M de NaCl mostraron un aumento significativo del 18% en relación al testigo, alcanzándose la máxima concentración a partir de 0,2 mol L<sup>-1</sup> de NaCl.

Aunque los polifenoles son comunes en los vegetales, y actúan como antioxidantes, su importancia en plantas sometidas a estrés abiótico, ha recibido poca atención. Su actividad antioxidante se debe a las propiedades redox, que juegan un rol fundamental en la adsorción y neutralización de ROS y la descomposición de peróxidos (Rice-Evans *et al.*, 1997).

El incremento de la concentración de polifenoles, no sólo contribuye a la tolerancia del vinal al estrés oxidativo generado por la salinidad, sino que también tendría un impacto relevante sobre las propiedades de esta especie. La incorporación de fenoles a la alimentación humana correlaciona con una baja tasa de mortalidad y previene ciertas enfermedades. También

presentan propiedades terapéuticas, actuando como antihistamínicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antitrombóticos, cardioprotectores y vasodilatadores (Balasundram et al., 2006). En la actualidad hay una gran demanda mundial de antioxidantes naturales, para su uso en la industria de alimentos, y en medicina preventiva, en reemplazo de los antioxidantes sintéticos que son cancerígenos (Hu *et al.*, 2000). De este modo, las plantas sometidas a estrés salino pueden tener gran importancia económica, por su elevada producción de fenoles. Sin embargo, el estrés tienen dos efectos opuestos: aumenta la producción de polifenoles, pero inhibe el crecimiento. En caso de vinal, los resultados muestran un significativo incremento en la concentración de fenoles en niveles de salinidad que no inhibieron su crecimiento (González *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Concentraciones de malondialdído -MDA- (A), actividad superóxido dismutasa -SOD- (B), actividad peroxidasa (C), y concentración de polifenoles (D) en hojas de plántulas de vinal incubadas en soluciones de NaCl. Letras diferentes indican diferencias significativas al 5% por el Test de Duncan.

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman la hipótesis propuesta. En presencia de altas concentraciones NaCl, vinal incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y sintetiza polifenoles en hojas, para contrarrestar los efectos negativos del estrés oxidativo.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Balasundram, K.; K. Sundram and S. Sammam. 2006. "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses". *Food Chem.*, 99: 191-203.
- Beauchamp, C. and I. Fridovich. 1971. "Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels". *Anal. Biochem.*, 44: 276-287.
- Bradford, M. M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Dewanto, V.; X. Wu; K. K. Adom and R. H. Liu. 2002. "Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity". *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3010-3014.
- Giménez, A. M. y J. G. Moglia. 2003. "Árboles del Chaco Argentino. Guía para el reconocimiento dendrológico". Editorial El Liberal, Argentina. 307 p.
- González, D.; M. Acosta; M. Pece; D. Meloni. 2006. "El NaCl induce la acumulación de solutos osmocompatibles en plántulas de Vinal (*Prosopis ruscifolia* G.)". III Congreso Iberoamericano de Ambiente y Calidad de Vida. Catamarca, Argentina, 27 al 29 de septiembre de 2006.
- Gossett, D. R.; E. P. Millhollon and M. C. Lucas. 1994. "Changes in antioxidant levels in response to NaCl treatment in salt tolerant and sensitive cultivars of cotton, *Gossypium hirsutum* L. Crop". *Sci.*, 34: 706-714.
- Hendry, G. A. F.; P. C. Thorpe and M. N. Merzlyak. 1993. "Stress indicators- lipid peroxidation". In: Hendry, G.A.F., Grime, J.P. (Eds.), *Methods in Comparative Plant Ecol.*, pp. 154-156. Chapman and Hall, London, UK.
- Hu, C.; Y. Zhang and D. Kitts. 2000. "Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo *Phyllostachys nigra* var. Henonis leaf extract in vitro". *J. Agric. Food. Chem.*, 48:3170-3176.
- Leonardis, R. 1949. "Árboles de la Argentina y aplicaciones de su madera". Editorial Suelo Argentino. Buenos Aires, 277 p.
- Maehly, P. C. and M. Chance. 1954. "The assay of catalase and peroxidases". In: Gluck, D. (ed.) *Methods of Biochemical Analysis*. Pp. 357-424. Interscience Publishers, New York.
- Meloni, D. A.; M. R. Gulotta and C. A. Martínez. 2004. "The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*". *Braz. J. Plant Physiol.*, 16: 39-46.
- Meloni, D. A.; M. A. Oliva; C. A. Martinez and J. Cambraia. 2003. "Photosynthesis and activity of stress-related enzymes in cotton under salt stress". *Env. Exp. Bot.*, 49: 69-76
- Meloni, D. A.; M. A. Oliva; H. A. Ruiz and C. A. Martinez. 2001. "Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress". *J. Plant Nutr.*, 24: 599-612.
- Mittler, R. 2002. "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance". *Trends Plant Sci.*, 7: 405-410.
- Molassiotis, A. N.; T. Sotiropoulos; G. Tanou; G. Kofidis; D. Diamantidis and I. Therios. 2006. "Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol". *Biol. Plantarum*, 50: 61-68.
- Rice-Evans, C. A.; N. J. Miller and G. Paganga. 1997. "Antioxidant properties of phenolic compounds". *Trends Plant Sci.*, 2:152-159.
- Zhu, J. K. 2001. "Plant salt tolerance". *Trens Plant Sci.*, 6: 66-71.

