

TOLERANCIA LA DESECACION EN BRIOFITAS . PARTICIPACION DE AZUCARES

Gustavo E. Zúñiga

Marisol Pizarro

Rodrigo A. Contreras

Hans Kohler

RESUMEN

Las plantas están constantemente expuestas a condiciones adversas que afectan su desarrollo. En muchas plantas, la falta de agua en el suelo, provoca daño significativo, que puede ocasionar su muerte. Solo una pocas especies presentan mecanismos, que les permiten tolerar periodos prolongados de falta de agua en el ambiente. Las briofitas o musgos colonizan biomas tales como bosques tropicales, desiertos, tundras ártica y antártica. *Sanionia uncinata* Hedw. (Amblystegiaceae) es uno de los musgos mas importante del territorio Antártico. Su contenido hídrico depende de la humedad ambiental, razon por la cual, debido a las condiciones ambientales en durante el verano antartico, está constantemente sometido a desecación. Muchas plantas al estar sometidas a desecación acumulan osmólitos compatibles, principalmente hidratos de carbonos y los aminoácidos. Estudios previos de nuestro grupo han determinado que esta especie acumula altos niveles de azúcares, en particular de rafinosa. Por estos antecedentes se evaluó la participación de la acumulación de azúcares en la tolerancia a la desecación en el musgo antártico *S. uncinata*, mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de índice de refracción (HPLC-RIA). Los resultados obtenidos mostraron que el

tipo de azúcar acumulado depende del nivel de pérdida de agua. A niveles de pérdida menor o iguales al 65% se acumuló rafinosa y verbascosa, mientras que a niveles de pérdida de agua mayores al 65%, acumuló principalmente verbascosa. Estos hidratos de carbono actuarían como agentes antioxidantes, crioprotectores y agentes inhibidores de la fusión de membranas y destoxicantes de galactosa, permitiendo la recuperación de *S. uncinata*. Finalmente, se concluye que el metabolismo de la rafinosa es un factor clave en la tolerancia a la desecación de *S. uncinata*.

Palabras claves: Antartica, *Sanionia uncinata*, azúcares, deshidratación.

DESECATION TOLERANCE IN BRIOPHYTES. PARTICIPATION OF SUGARS

ABSTRACT

Plants are constantly exposed to adverse conditions affecting their development. In many plants, the lack of water in the soil, causes significant damage, which can cause his death. Only a few species have mechanisms that allow them to tolerate long periods of lack of water in the environment. The bryophytes and mosses colonize biomes such as tropical forests, deserts, Arctic and Antarctic tundra. *Sanionia uncinata* Hedw. (Amblystegiaceae) is one of more important mosses of the Antarctic territory. Its water content depends on the humidity, reason by which, due to the environmental conditions in the Antarctic summer, is constantly subjected to desiccation. Many plants subjected to desiccation accumulate compatible solutes, mainly carbohydrates and amino acids. Previous studies of our group have determined that this species accumulate high levels of sugars, particularly raffinose. The participation of the accumulation of sugars in tolerance to desiccation in the Antarctic moss *S. uncinata* was determined by using HPLC-RIA. The results showed that the accumulated sugar type depends on the level of loss of water.

At levels ≤ 1 to 65%, the moss accumulated raffinose and verbascosa, while that levels greater than 65%, the moss accumulated mostly verbascosa. These carbohydrates act as antioxidant agents, cryoprotectant agents and inhibitors of membrane fusion and destoxicantes of galactose, allowing recovery of *S. uncinata*. Finally, it is concluded that the metabolism of raffinose is a key factor in the tolerance to desiccation of *S. uncinata*.

Keywords: Antarctic, *Sanionia uncinata*, sugars, water deficit.

INTRODUCCION

Las briófitas son el segundo grupo más numeroso de plantas luego de las plantas con flores (Glime, 2006) y están constantemente sometidas a variaciones de factores medioambientales, que pueden generar en ellas estrés (Schulze y cols, 2005).

Debido a su condición de poiquilohidría (Glime, 2006), es decir, su contenido hídrico depende de la humedad ambiental (Oliver y cols, 2005), la baja disponibilidad hídrica es uno de los principales agentes estresantes en musgos, dado además, por la ausencia de sistema vascular y cutícula, elementos esenciales para el transporte de agua a grandes distancias y evitar evaporación de ésta (Glime, 2006).

Sanionia uncinata es un musgo colonizador antártico que tolera condiciones medioambientales extremas, como baja disponibilidad hídrica y vientos desecantes (Alberdi y cols, 2002). Debido a que los musgos antárticos están constantemente sometidos a desecación, dado las condiciones climáticas en las que habitan, es decir, altos niveles de radiación, vientos huracanados, bajas temperaturas, nieve y oscilaciones extremas en la humedad del aire durante gran parte del año (Kejna y Láska, 1999; Robinson y cols, 1999), el estudio de los mecanismos de tolerancia a la desecación en éstas briofitas, podría tener grandes aplicaciones en la agricultura, para la generación de

especies capaces de crecer en suelos áridos, y capaces de tolerar períodos de sequía (Toldi, 2009; Oliver y cols, 2005; Proctor, 2001).

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que esta especie acumula altos niveles de azúcares, en particular de rafinosa, un α -galactósido. Por estos antecedentes se consideró que *S. uncinata* es un buen modelo para determinar la participación de la rafinosa en la tolerancia a la desecación en condiciones antárticas..

MATERIALES Y MÉTODOS

Registro de variables ambientales

El registro diario de la temperatura y la humedad relativa del aire, se realizó usando un termohigrómetro DO9406 (DELTA OHM Chile Ltda, Santiago, Chile), la determinación de la temperatura del suelo se realizó utilizando una termocupla (Digi-Sense, Cole Palmer Instrument Company, Illinois, EUA) y para la determinación de la radiación PAR (radiación fotosintéticamente activa) se utilizó un foto-radiómetro Data logger DO9721 (DELTA OHM Chile Ltda, Santiago, Chile).

Material vegetal y protocolo de desecación.

Los especímenes de *S. uncinata*, se recolectaron en el sector Base Bellingshausen de la Bahía Fildes, Antártica Chilena (62°11,74' S; 58°57,77' O). Para evaluar la tolerancia a la desecación, alfombras de 100 cm² de *S. uncinata* se colocaron sobre hielo en el exterior de las dependencias de la base Profesor Julio Escudero del Instituto Antártico Chileno, éstas se regaron periódicamente cada 3 horas a saturación mientras que otro grupo se dispuso sobre papel absorbente dentro de una bolsa de polietileno parcialmente sellada y cada tres horas se renovó el papel absorbente.

Parámetros de daño.**Determinación del contenido de agua (CA).**

Se masaron 100 mg de tejido fresco y se secaron en estufa a 55 ± 2 °C durante 48 horas. El CA se expresó en porcentaje, utilizando la fórmula: $100 \cdot [(masa\ inicial - masa\ final) / masa\ inicial]$.

Determinación de la lipoperoxidación de membranas.

Se utilizó el método descrito por Ederli y cols (2004). Se masaron 50 mg de tejido, se congelaron en nitrógeno líquido, posteriormente se maceró en mortero frío y se añadió 1 mL de solución acuosa de TCA 1 v/v% (ácido tricloroacético) y la mezcla se centrifugó a 16.060 g por 5 minutos. A la mezcla de reacción consistente en 500 µL de TBA (ácido tiobarbitúrico) al 0,5 % en TCA al 20% se añadieron 125 µL de sobrenadante y se incubó durante 30 minutos en un baño termorregulador a 100 °C. Seguidamente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 532 y 600 nm. Los equivalentes de malondialdehído (MDA) se determinaron utilizando la siguiente la fórmula: $A_{532} - A_{600}$ utilizando el coeficiente de extinción molar del aducto formado por MDA y TBA $\xi = 155\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Análisis de azúcares

Un volumen de 200 µL de extractos etanólicos se concentraron (DNA Speed Vac, Savant, Minn, EUA), posteriormente se resuspendieron en 100 µL de agua Milli Q y se filtraron (0,45 µm). Un volumen de 20 µL por muestra se inyectó en un cromatógrafo Agilent 1100, equipado con una columna Sugar-pak I (300mm x 6,5 mm), (Waters, Waters Corp., Massachusetts, EUA) a 75 °C y con un detector de índice de refracción Agilent 1110 a 55 °C. El programa de elución isocrático consistió en una fase móvil de EDTA cálcico 0,1 mM, con un flujo de 0,35 mL/min a una presión de 38 bars por 25

minutos. Para la identificación de los azúcares se utilizaron estándares de D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, galactinol, sacarosa, rafinosa, estaquiosa y verbascosa.

RESULTADOS Y DISCUSION

La temperatura, humedad del suelo y la radiación PAR experimentan cambios significativos durante el verano antártico, alcanzando valores que puede provocar condiciones de estrés en plantas.

En condiciones de desecación antárticas se observó que este mugo es capaz de perder una cantidad de agua significativa (85%), en un periodo mayor que el necesario para hidratarse, alcanzando un contenido de agua equivalente al 90% (Fig. 1)

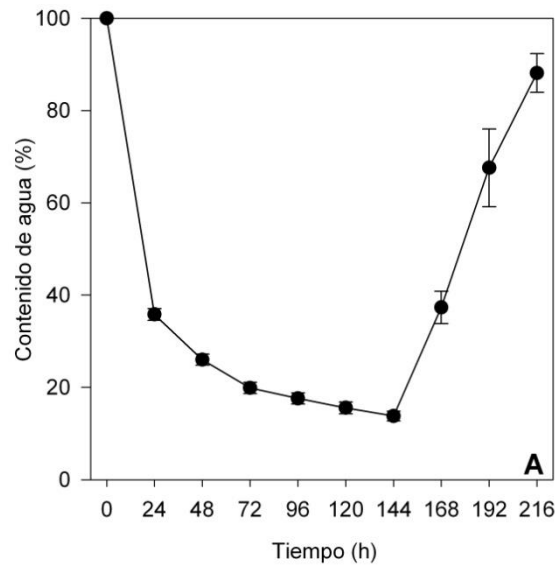


Figura 1. Cinetica de deshidratacion de plantas de *S. uncinata* en condiciones antartricas. Cada punto corresponde al promedio de 3 muestras \pm 1. e.e.

En estas condiciones, el daño a nivel de membranas aumento, alcanzando un maximo a las 96 h, permaneciendo constante hasta las 192 h. En este punto las plantas

fueron hidratadas sometienolas a un exceso de agua, lo que provocó una rapida caída del contenido de MDA (Fig 2)..

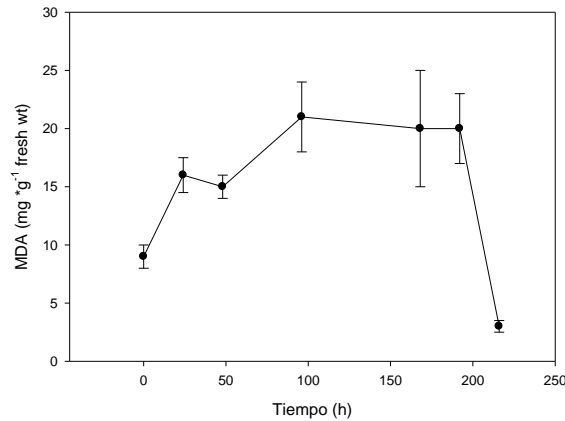


Figura 2. Acumulacion de MDA en plantas de *S. uncinata* deshidratada en condiciones antarticas. Cada punto corresponde al promedio de 3 muestras \pm 1. e.e.

Un mecanismo que se expresa en plantas deshidratadas, es la acumulacion de azucares, que ayudan a mantener la estabilidad de macromoleculas. En este especie la acumulacion de azucares para ser un mecanismo que contribuye a la tolerencia a la desecacion. (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de H₂O y azucares en *Sanionia uncinata*.

Contenido de H ₂ O (%)	Azucares (mg X g ⁻¹ peso fresco)				
	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	Rafinosa	Verbascosa
85 \pm 3	2 \pm 0,5	1 \pm 0,5	5 \pm 2	17 \pm 2	2 \pm 0,5
63 \pm 3	2 \pm 0,5	1 \pm 0,5	6 \pm 1	18 \pm 2	2 \pm 0,5
12 \pm 1	6 \pm 1	100 \pm 8	35 \pm 2	ND	38 \pm 2
5 \pm 0,5	200 \pm 15	110 \pm 7	60 \pm 6	ND	36 \pm 2

En conclusion, los resultados mostrados en este trabajo, sugieren que la acumulacion de azucares, representa un mecanismos que contribuye a la tolerancia de *S. uncinata* a la deshidratacion celular.

REFERENCIAS

ALBERDI, M.; BRAVO, L.A.; GUTIERREZ, A.; GIDEKEL, M. CORCUERA, L.J. (2002). Ecophysiology of Antarctic vascular plants. *Physiol Plant.* **115**: 779-486.

EDERLI, L., PASQUALINI, S., BATINI, P., ANTONIELLI, M. (1997). Photoinhibition and oxidative stress: effects on xanthophyll cycle, scavenger enzymes and abscisic content in tobacco plants. *Journal of Plant Physiology*, 151: 422–428.

GLIME, J. (2006). Bryophyte ecology. Volumen 1 Physiological ecology. Published online at <http://www.bryoecol.mtu.edu/>

kejna, m.; láska, K. (1999). Weather conditions at Arctowski Station, King George Island, South Shetland Islands, Antarctica in 1996. *Pol Res.* **20**: 203-220.

OLIVER, M.; VELTEN, J.; MISHLER BRENT. (2005). Dessication tolerance in Bryophytes: A reflection of the primitive strategy for plant survival in dehydrating habitats?. *Integr. Comp. Biol.* **45**:788-799

OLIVER, M.; VELTEN, J.; MISHLER BRENT. (2005). Dessication tolerance in Bryophytes: A reflection of the primitive strategy for plant survival in dehydrating habitats?. *Integr. Comp. Biol.* **45**:788-799

PROCTOR, M. (2001). Patterns of desiccation tolerance and recovery in bryophytes. *Plant Growth Reg*, **25**:147-156.

ROBINSON, SA.; WASLEY, J.; POPP, M.; LOVELOCK, C. (1999). Desiccation tolerance of three moss species from continental Antarctica. *Aust. J. Plant Physiol.* **26** : 000-000.

SCHULZE, E.; BECK, H.; MÜLLER-HOHENSTEIN, K. (2005). Environment as stress factor: stress physiology of plants. En: *Plant Ecology*. erlin/Heidelberg: Springer 8-22.

TOLDI, O.; TUBA, Z.; SCOTT, P. (2009). Vegetative desiccation tolerance: Is it a goldmine for bioengineering crops?. *Plant Sci.* 176: 187-199.