

Prolina en tejidos y exudados de raíz como respuesta al estrés salino de cultivos de raíces aisladas de patrones frutales del género *Prunus*

J. A. Marin; P. Andreu; A. Carrasco; A. Arbeloa
Estación Experimental de Aula Dei-CSIC
Av. Montañana 1005. 50059 Zaragoza España
jmarin@eead.csic.es

Resumen

La salinidad es una causa de estrés abiótico muy importante para el desarrollo de las plantas y un grave problema para la agricultura. La presencia de sal disminuye las cosechas en una gran variedad de plantas, por lo que la tolerancia a la salinidad es un carácter importante en mejora de plantas. Sin embargo, estas técnicas son largas y costosas, sobre todo en especies frutales debido a sus dilatados periodos de crecimiento y se beneficiarían del desarrollo de técnicas de selección precoz. Por otra parte, la acumulación de prolina, tanto en los tejidos de hoja como de raíz, ha sido relacionada con el estrés salino, indicando un papel esencial en la tolerancia.

En este trabajo se estudia el contenido de prolina en raíces y en sus exudados, a partir de cultivos asépticos de raíces aisladas como modelo experimental, bajo estrés salino, para conocer el posible papel de la prolina como marcador de tolerancia.

En los tejidos de las raíces la prolina aumentó con el estrés siendo muy elevada a 180 mM de NaCl cuando no hubo crecimiento de las raíces. Además, la presencia de prolina en el exudado de raíces aisladas estuvo también relacionada con la concentración de sal y siguió un patrón similar en tres patrones frutales que pertenecen a diferentes especies del género *Prunus* (*P. insititia*, 'Adesoto 101'; *P. cerasus*, 'Masto de Montañana' y *P. dulcis x persica*, GF 677). Estos resultados resaltan la necesidad de nuevos estudios para establecer si la prolina puede ser, en determinadas condiciones, un marcador de la tolerancia de los frutales a la salinidad. Los exudados permitirían, entonces, estudiar la tolerancia con test no destructivos.

Palabras clave: selección precoz, NaCl, estrés abiótico, *Prunus insititia*, *Prunus cerasus*, *Prunus dulcis x persica*

Summary

Proline content in root tissues and root exudates as a response to salt stress of excised root cultures of *Prunus* fruit tree rootstocks

The aim of this work is to demonstrate the presence of proline in both root tissues and root exudates as a response of excised root cultures to salt stress and to ascertain the possible relationship between proline content and NaCl concentration.

Roots from micropropagated *Prunus* rootstocks have been cultured in vitro under increasing NaCl concentrations (0, 20, 60 and 180 mM) to early detect their tolerance to salt stress. After 3 weeks of culture, the proline content of the MS-based liquid medium, in which roots were cultured, was determined. As far as we know, no attempts have been made to determine the proline content of excised root cultures and root exudates under stress.

Proline concentration in root tissues and root exudates from all rootstocks increased as salt concentration in the medium increased, following a trend similar to that of whole plant tissues in all three *Prunus* rootstocks (*P. insititia*, 'Adesoto 101'; *P. cerasus*, 'Masto de Montañana' and *P. dulcis x persica*, GF 677). This opens the possible role of proline exudates to study plant responses to salt stress using non-destructive methods. In addition, proline exudates can be of great interest for the early detection of salt stress tolerance, provided that a relation between proline and salt stress tolerance could be found.

Keywords: Early selection, NaCl, abiotic stress, *Prunus insititia*, *Prunus cerasus*, *Prunus dulcis x persica*

Introducción

La salinidad es un factor abiótico de estrés muy importante para el desarrollo de las plantas (Sengupta y Majumder, 2009) y un grave problema para la agricultura, especialmente en tierras irrigadas de zonas semiáridas donde el 20-30% de las tierras están seriamente dañadas por la sal (FAO, 2002). Altas concentraciones de sal en los suelos disminuyen las cosechas en una gran variedad de plantas en todo el mundo (Gorai y Neffati, 2007).

La tolerancia a la salinidad es por tanto un carácter importante en mejora de plantas que de esta forma incrementarían las cosechas, principalmente en zonas marginales (Türkan y Demiral, 2009). Mediante técnicas de selección y mejora tradicionales se ha conseguido mejorar considerablemente la tolerancia a la salinidad de plantas con importancia agrícola (Ashraf y Harris, 2004) aunque estas técnicas son largas y costosas. Esto se aplica especialmente a la selección de material vegetal de frutales debido a sus largos periodos de crecimiento, por lo que se beneficiaría de estrategias que permitieran acortar estos procesos.

El cultivo *in vitro* ha demostrado ser una técnica aplicable para el estudio del estrés salino (Naik y Widholm, 1993; Woodward y Bennett, 2005) y recientemente ha sido usado para la selección de plantas de tomate y *Vigna radiata* tolerantes a la salinidad (Hassan et al., 2008). Por otra parte, la acumulación de solutos como la glicina o la prolina ha sido relacionada con estrés hídrico, salino y otros estreses abióticos de la planta (Ashraf y Harris, 2004; Munns y Tester, 2008; Lu et al., 2009) indicando un papel esencial en la tolerancia a estos estreses. La prolina se acumula bajo estrés salino en los tejidos tanto de hoja como de raíz (Aziz et al., 1999) atribuyéndole un posible papel protector frente al potencial osmótico generado por la sal (Watanabe et al., 2000; Chen et al., 2007).

En este trabajo se propone el estudio de la acumulación de prolina en relación al estrés salino con un nuevo y simplificado modelo basado en el cultivo *in vitro* de raíces aisladas de patrones frutales de *Prunus* (Marín y Marín, 1998). Estas raíces sometidas a concentraciones salinas crecientes (Andreu et al., 2009) presentaron diferencias en el crecimiento en longitud y acumulación de almidón entre especies con distinta tolerancia a la sal. El modelo permite estudiar el efecto del estrés en el lugar donde se aplica, en lugar de estudiarlo en planta entera o en zonas alejadas del origen de la fuente de sal. El cultivo de raíces *in vitro* ha mostrado en trabajos previos una cierta correlación con trabajos de tolerancia en organismos enteros (Vijayan et al., 2003) y ha resultado ser un modelo eficaz en la detección precoz de la tolerancia a la sal en *Prunus*. Una patente ha sido solicitada para la protección de este procedimiento (Andreu et al., 2008). Sin embargo, el crecimiento en condiciones de estrés no ha sido relacionado con la acumulación de prolina en los tejidos o el exudado de la raíz. La composición del exudado de las raíces podría tener funciones de protección, ajuste de pH o potencial redox, entre otras, en condiciones de estrés para la planta y dada la influencia de los microorganismos de la rizosfera en el metabolismo de estos exudados

(Suzuki et al., 2009) el estudio de los exudados en condiciones asépticas como las desarrolladas en este método de cultivo de raíces aisladas permitirá la comparación en distintas condiciones de estrés salino.

El objetivo de este trabajo es estudiar la presencia de prolina en raíces aisladas y su relación con el estrés salino. Para la determinación de la prolina, se realiza previamente una puesta a punto del método con este tipo de tejidos crecidos en altas concentraciones de sacarosa, que pueden interferir en la medida de la prolina (Magné y Larher, 1992; Trotel-Aziz et al., 2000).

Además, se estudia por primera vez la presencia de prolina en los exudados de raíces sometidas a concentraciones crecientes de sal en el medio de cultivo. Este método posibilitaría en un futuro el desarrollo de un test de tolerancia no destructivo, analizando el medio en el que se desarrollan las raíces y viendo la respuesta frente al estrés.

Material y métodos

Material vegetal

Raíces de los patrones 'Adesoto 101' (*Prunus insititia*), GF 677 (*P. dulcis* x *P. persica*) y 'Masto de Montañana' (*P. cerasus*) micropropagados y enraizados in vitro se usaron para su puesta en cultivo en condiciones de estrés (Andreu et al., 2009).

Cultivo de raíces aisladas

Se utilizaron ápices de raíces de 10mm de longitud. Los ápices en número de 10 por tratamiento, se colocaron en frascos de cultivo con 30ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con un 3% de sacarosa y sin reguladores de crecimiento (Andreu y Marín, 2005). El estrés salino se aplicó añadiendo al medio de cultivo concentraciones crecientes de NaCl: 0 (control), 20, 60 y 180mM. En el medio de cultivo a 25º C la conductividad (E.C.) total fue de 6,0; 8,2; 12,5 y 23,6 dS.m⁻¹ respectivamente. Se mantuvieron en la cámara de cultivo a 24º C, en oscuridad y a 90 rpm en un agitador orbital durante 3 semanas (Andreu et al., 2009). Los experimentos se repitieron 2 veces.

Determinación de la prolina

La determinación de la prolina se realizó siguiendo el método descrito por Bates et al. (1973) basado en la reacción de la prolina con la ninhidrina. El método se validó para la posible interferencia de sacarosa (Magné y Larher, 1992; Trotel-Aziz et al., 2000), presente en el medio de cultivo, mediante la determinación de la prolina en soluciones de ácido

sulfosalicílico (3 %) con distintas concentraciones de prolina a las que se añadió, o no, sacarosa (90mM) a una concentración similar a la del medio de cultivo de las raíces aisladas. Finalmente se compararon los resultados de absorbancia obtenidos. Para la determinación de la prolina las diluciones se mezclaron en una proporción 1:1:1 con ninhidrina ácida y ácido acético glacial, incubándose a 100° C durante 1 hora. La reacción se detuvo en un baño de hielo y el cromóforo se extrajo añadiendo 4ml de tolueno. La absorbancia se midió a 520 nm en un espectrofotómetro BioMate (Thermo Spectronic). Los resultados se analizaron con ANOVA.

La concentración de prolina en exudados y tejidos de raíz se determinó después de tres semanas en cultivo en condiciones de estrés. Posteriormente se midió la longitud de las raíces y se mantuvieron congeladas hasta el momento de su utilización. El exudado se filtró con un filtro Acrodisc con doble membrana de 0,8 y 0,2µm y se mantuvo congelado hasta su liofilización en un liofilizador Genesis 25EL (Virtis, Gardiner, EEUU). El exudado liofilizado se resuspendió con 1,2 ml de ácido sulfosalicílico al 3% y una vez centrifugado (10 min a 12000 rpm) se mezcló en una proporción 1:1:1 con ninhidrina ácida y ácido acético glacial. La reacción y determinación de la prolina se realizó de manera similar a lo descrito anteriormente.

La concentración de prolina en tejidos de raíz se determinó triturando las raíces congeladas. Posteriormente 0,5 g de triturado se mezclaron con 2ml de ácido sulfosalicílico al 3%. El sobrenadante después de la centrifugación se mezcló en una proporción 1:1:1 con ninhidrina y ácido acético glacial. La reacción y determinación de la prolina se realizó de manera similar a lo descrito anteriormente. Se realizaron las correspondientes curvas patrón para cada determinación dentro del rango de detección del método (0-39 µg. ml⁻¹).

Resultados

1. Interferencia de la sacarosa

La presencia de sacarosa, a la concentración utilizada en el medio de cultivo, no ha interferido de forma significativa en la medida de la concentración de prolina de soluciones patrón de prolina de concentraciones crecientes analizadas siguiendo el método de Bates (Bates et al., 1973). En la figura 1 se muestra que no existieron diferencias apreciables en la determinación de prolina, excepto una menor valoración de la concentración más alta (25 µg.l⁻¹) en presencia de sacarosa (90 mM). La comparación de los dos conjuntos de datos de prolina, con y sin sacarosa añadida, no tuvo diferencias significativas según el ANOVA correspondiente (F=1.42, p=0.286, con 1 y 5 g.l.)

Dado que la sacarosa incluida en el medio de cultivo no interfirió de forma significativa en la cuantificación de prolina, se utilizó este método en las determinaciones de prolina de este trabajo.

2. Determinación de la prolina en cultivos de raíces aisladas y sometidas a estrés

La concentración de prolina en los tejidos de raíces aisladas del patrón 'Adesoto 101' cultivadas in vitro y sometidas a concentraciones crecientes de NaCl se determinó tras tres semanas de cultivo. La prolina en los tejidos de las raíces aumentó con el estrés siendo muy elevada a 180 mM de NaCl (Figura 2A), donde prácticamente no hubo crecimiento de las raíces .

Por otra parte, se ha demostrado la presencia de prolina en el exudado de las raíces aisladas, determinando la concentración de prolina en el medio de cultivo. La concentración de prolina en el exudado aumentó, al igual que en los tejidos de raíz, según aumentó el estrés salino al que fueron sometidos (Figura 2B).

3. Determinación de la prolina en exudados de patrones de distintas especies de *Prunus*

El análisis del exudado de raíces cultivadas de patrones de distintas especies de *Prunus* (*P. insititia*, 'Adesoto 101'; *P. cerasus*, 'Masto de Montañana' y *P. dulcis x persica*, GF 677) y sometidas a concentraciones crecientes de sal demostró la presencia de prolina en los exudados de las tres especies estudiadas. Los exudados incrementaron su contenido en prolina conforme aumentó la concentración de NaCl. A la mayor concentración, 180 mM, de NaCl las tres especies presentaron unos valores muy elevados y variables: 'Adesoto 101', 1.67 µg/ml; GF 677, 1.07 µg/ml y 'Masto de Montañana', 17.64 µg/ml. El incremento de prolina observado a menores concentraciones de NaCl (0-60 mM) mostró un patrón de aumento similar en los tres patrones, en relación al aumento de la concentración de sal del medio de cultivo (Figura 3).

Discusión

Los resultados presentados en este trabajo muestran que 1) la prolina se acumula en las raíces aisladas cultivadas in vitro como respuesta a la aplicación de un estrés salino, de forma similar a lo que sucede en planta entera y 2) la prolina se encuentra igualmente en los exudados de las raíces, recogidos en el medio de cultivo líquido.

La determinación de prolina se realiza desde antiguo en numerosos trabajos de selección frente a estreses abióticos como la sequía y posteriormente, la salinidad, mediante un método rápido, sencillo y suficientemente preciso, basado en la reacción de la prolina con la ninhidrina (Bates et al., 1973). Sin embargo, se ha descrito una interferencia de la sacarosa con la prolina que podría afectar su determinación (Magné y Larher, 1992; Trotel-Aziz et al., 2000). Dado que el modelo experimental empleado en este trabajo consiste en el cultivo de raíces aisladas in vitro en un medio de cultivo líquido con una concentración de sacarosa relativamente alta (88 mM), se efectuó una valoración de soluciones de prolina de concentración creciente en ácido sulfosalicílico (3 %) con o sin sacarosa (90 mM) añadida. Sin embargo, las absorbancias a 520 nm del resultado de la reacción de la ninhidrina mostraron que a esa concentración de sacarosa, el posible efecto de la sacarosa no es significativo. Consecuentemente, para la determinación de la prolina en este trabajo se utilizó el método

descrito por Bates et al. (1973) que presenta ventajas importantes como su rapidez y sencillez.

El cultivo de raíces aisladas ha resultado ser un modelo experimental muy adecuado para la detección precoz de la tolerancia a estreses abióticos como la salinidad (Marín y Marín, 1998; Hossain et al., 2004; Suzuki et al., 2009, Andreu et al., 2009). Entre las ventajas del modelo se encuentra la rápida respuesta de los ápices radicales al estrés (3 semanas) con crecimientos longitudinales decrecientes a medida que el estrés aumenta. Además, se observó una acumulación de almidón en la zona de maduración de la raíz que estaba relacionada indirectamente con el estrés aplicado. Por otra parte, se encontró una buena correspondencia entre la respuesta al estrés de las raíces aisladas y de la planta entera, lo que permite su utilización como herramienta en la selección precoz de patrones de especies frutales (Andreu et al., 2008). Asimismo, el modelo nos permite estudiar los exudados de las raíces al aplicarles distintas presiones de estrés en condiciones asépticas, sin interferencia de microorganismos de la rizosfera (Suzuki et al., 2009).

Numerosos estudios han relacionado la acumulación de prolina frente al estrés salino (Aziz et al., 1999; Munns y Tester, 2008) atribuyéndole un posible papel protector frente al potencial osmótico generado por la sal (Chen et al., 2007; Hoque et al., 2008). Este modelo ha permitido observar si la acumulación de prolina se encontraba entre las respuestas de las raíces aisladas al estrés salino. Tanto en los tejidos de las raíces aisladas, como en sus exudados, se han encontrado, por primera vez, concentraciones crecientes de prolina en respuesta a mayores concentraciones de NaCl. Además, los exudados mantienen, al igual que las raíces, una fuerte relación con la concentración de sal del medio de cultivo en el que crecieron las raíces, es decir, con la intensidad del estrés (coeficientes de correlación de 0.99 para 'Masto de Montañana' y GF677 y de 0.97 para 'Adesoto 101' en el rango de 0 a 60 mM de NaCl). A 180 mM de NaCl el estrés es máximo en relación a las mayores concentraciones de prolina encontradas en el exudado, a pesar de que la actividad de las raíces a esta concentración es mínima, no apreciándose crecimiento longitudinal.

El hecho de que patrones pertenecientes a especies diferentes de *Prunus* muestren una respuesta similar al estrés mediante la acumulación de prolina en tejidos y exudados permite sugerir que es un mecanismo muy conservado en el género *Prunus*, que además podría generalizarse a otros géneros frutales como *Malus* y *Pyrus*.

Los resultados de este trabajo resaltan la necesidad de nuevos estudios para establecer si la prolina puede ser, en determinadas condiciones, un marcador de la tolerancia de los frutales a la salinidad. La evaluación de la respuesta al estrés salino de la acumulación de prolina en los tejidos o, preferentemente, en los exudados de la raíz, puede estar relacionada con el grado de tolerancia a la salinidad de los distintos clones. Los exudados permitirían, entonces, estudiar la tolerancia con tests no destructivos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado, en parte, como Grupo de Excelencia A-43 por el Gobierno de Aragón. Agradecemos a M. Joy (CITA-DGA) su ayuda en la liofilización de las muestras de exudados.

Bibliografía

Andreu P, Marín JA 2005. In vitro culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock 'Adesoto 101' (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Sci Hort.*106: 258-267.

Andreu P, Arbeloa A, Andreu P. 2008 Método para la detección precoz de patrones de frutales tolerantes al estrés salino. Solicitud de patente a la Oficina Española de Patentes y Marcas num P200803727

Andreu P, Arbeloa A, Lorente P, Marín JA 2009. Excised root cultures of *Prunus* rootstocks were affected by increasing NaCl concentrations in accordance to their salt tolerance in vivo (enviado)

Ashraf M, Harris, P 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16.

Aziz A, Martin-Tanguy J, Larher F 1999. Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Science* 145: 83–91

Bates L, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207

Chen Z, Cuin T A, Zhou M, Twomey A, Naidu B P, Shabala S 2007. Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 4245-4255

FAO, 2002. Crops and Drops. Making the best use of water for agriculture. Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Roma, 26 pp.

Gorai M, Neffati M, 2007. Germination responses of *Reaumuria vermiculata* to salinity and temperature. *Ann. Appl. Biol.* 151: 53-59.

Hassan N, Serag M S, El-Feky FM, Nemat Alla MM 2008. In vitro selection of mung bean and tolerance to NaCl. *Ann Appl Biol* 152: 319–330.

Hoque M A, Banu M N, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y 2008. Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology* 165: 813-824.

Hossain Z, Mandal A K, Shukla R, Datta S K 2004. NaCl stress - its chromotoxic effects and antioxidant behavior in roots of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Plant Science* 166: 215-220.

Lu S Y, Chen C H, Wang Z C, Guo Z F, Li H H 2009. Physiological responses of somaclonal variants of triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* x *Cynodon dactylon*) to drought stress. *Plant Cell Reports* 28: 517-526.

Magné C, Larher F. 1992. High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry* 200: 115-118

Marín ML, Marín JA 1998. Excised rootstock roots cultured in vitro. *Plant Cell Rep.* 18: 350-355.

Munns R, Tester M 2008. Mechanisms of salt tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681

Murashige T, Skoog F 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Naik P S, Widholm J M 1993. Comparison of tissue culture and whole plant responses to salinity in potato. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 33: 273-280.

Sengupta S, Majumder A L. 2009. Insight into the salt tolerance factors of a wild halophytic rice, *Porteresia coarctata*: a physiological and proteomic approach. *Planta* 229: 911-929

Suzuki K, Okazaki K, Tawaraya K, Osaki M, Shinano T 2009. Gas chromatography-mass spectrometry associated global analysis of rice root exudates under aseptical conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 55: 505-513.

Trotel-Aziz P, Niogret MF, Larher F. 2000. Proline level is partly under the control of abscisic acid in canola leaf discs recovery from hyper-osmotic stress. *Physiologia Plantarum* 110: 376-383

Türkan, I; Demiral, T. 2009 Recent developments in understanding salinity tolerance . *Environmental and Experimental Botany* 67: 2-9

Vijayan K, Chakraborti SP, Ghosh PD, 2003. In vitro screening of mulberry (*Morus spp.*) for salinity tolerance. *Plant Cell Rep.* 22: 350-357

Watanabe A, Kojima K, Ide Y, Sasaki S 2000. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* in vitro. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 63: 199-206.

Woodward A J, Bennett I J 2005. The effect of salt stress and abscisic acid on proline production, chlorophyll content and growth of in vitro propagated shoots of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 82: 189-200.

Figura 1. Efecto de la sacarosa (90 mM) en la determinación de prolina en soluciones patrón

Figure 1. Effect of sucrose (90 mM) in proline determination of standard solutions

Figura 2. Concentración de prolina en (A) raíces aisladas cultivadas y (B) en el medio de cultivo (exudado)

Figure 2. Proline concentration in (A) cultured excised roots and (B) in the culture medium (exudate)

Figura 3. Concentración de prolina exudada en el medio de cultivo por las raíces de diferentes patrones del género *Prunus* (*P. insititia*, 'Adesoto 101'; *P. cerasus*, 'Masto de Montañana' y *P. dulcis x persica*, GF 677).

Figure 3. Proline concentration exudated into the culture medium from excised roots of different *Prunus* rootstocks (*P. insititia*, 'Adesoto 101'; *P. cerasus*, 'Masto de Montañana' and *P. dulcis x persica*, GF 677).

Fig. 1

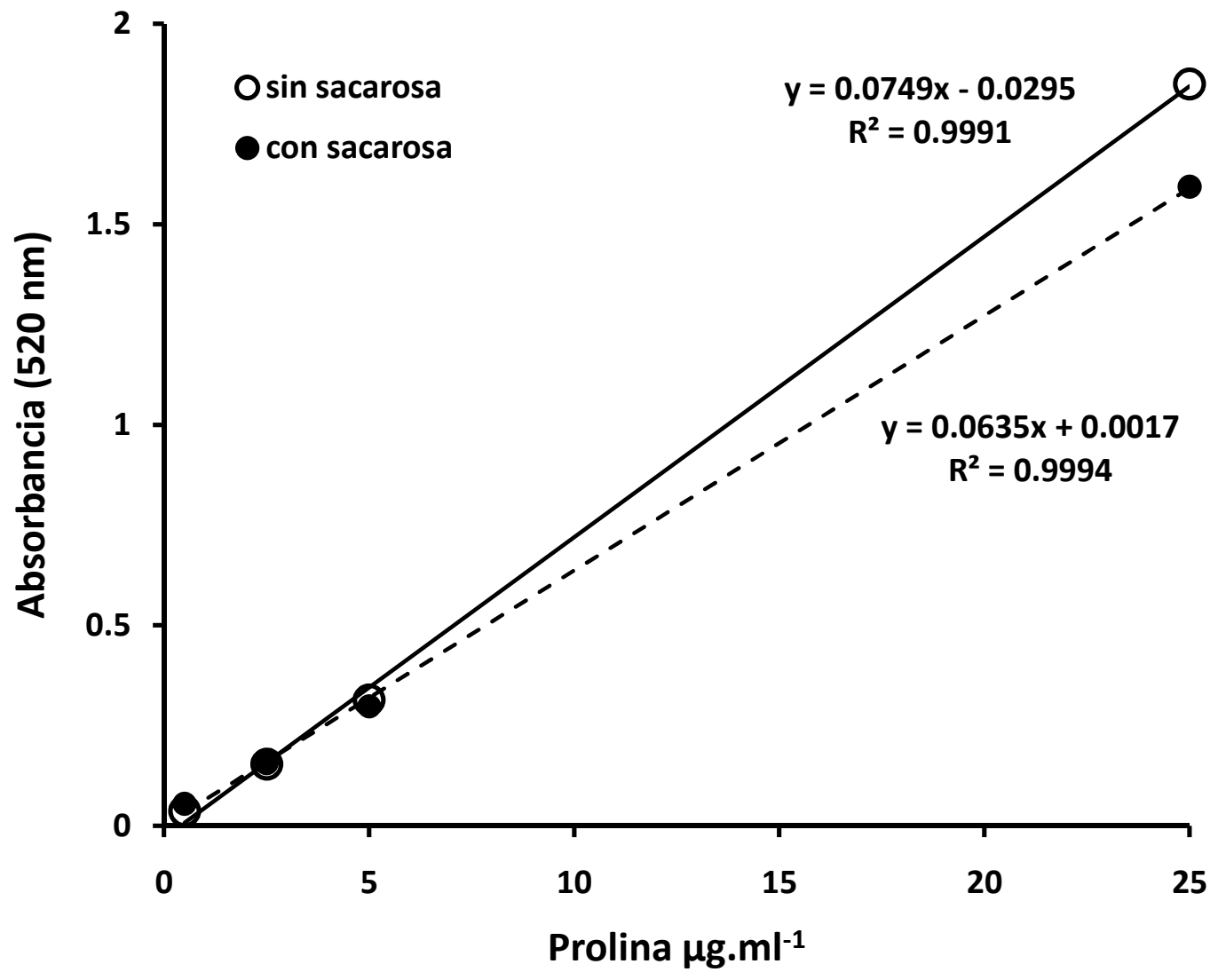


Fig. 2

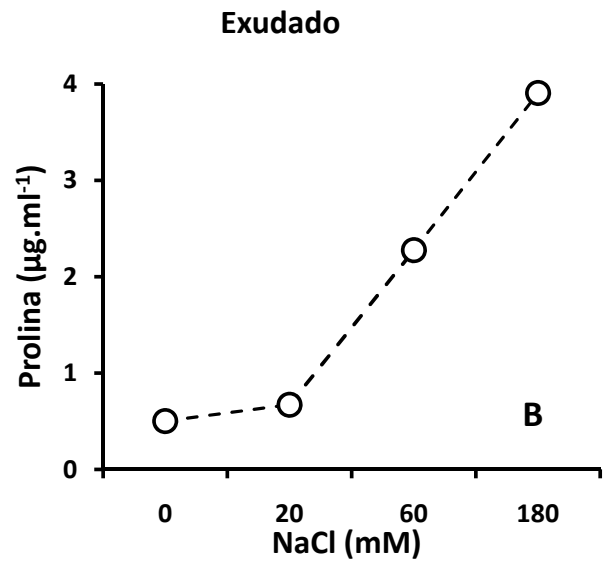
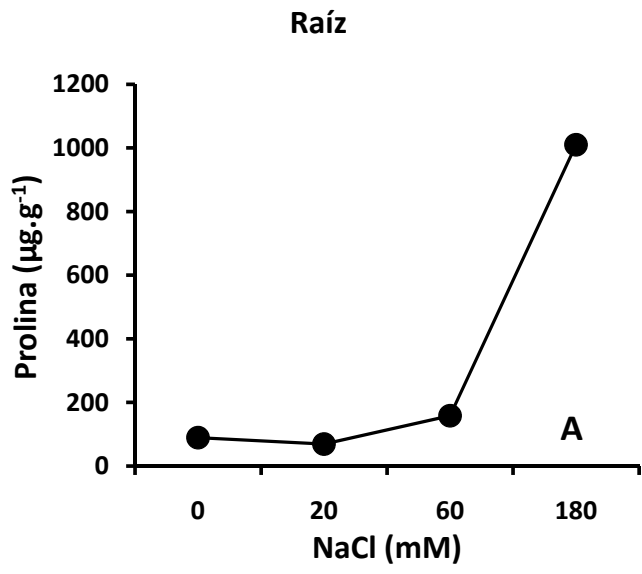


Fig. 3

