

Respuestas fisiológicas a la suplementación con calcio de plántulas de vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) estresadas con NaCl

Physiological responses to calcium supplementation of NaCl-stressed vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) seedlings

Diego Ariel Meloni

Originales: Recepción: 06/09/2011 - Aceptación: 07/08/2012

RESUMEN

Vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) es una especie de importancia forestal, nativa de la Región Fitogeográfica del Chaco Occidental, altamente tolerante al estrés salino. El objetivo de este trabajo fue poner a prueba la hipótesis de que la suplementación con CaSO_4 disminuye la concentración de iones tóxicos en plántulas de vinal, e incrementa la concentración de prolina, permitiendo un ajuste osmótico. Las plántulas se cultivaron en solución nutritiva de Hoagland al 25%, con o sin la adición de $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, y con o sin suplementación de 5 ó 10 mmol L^{-1} de CaSO_4 . Se determinó la materia seca, composición mineral, contenido relativo de agua y concentraciones de prolina y azúcares solubles. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con cinco repeticiones, y los resultados se analizaron con ANOVA y test de Tukey. Los resultados obtenidos en este trabajo confirman el rol protector del Ca^{+2} , a través de la manutención de las concentraciones de Ca^{+2} , K^+ y Mg^{+2} en los tejidos, la inhibición de la absorción de Na^+ y el ajuste osmótico mediante la síntesis de solutos osmocompatibles.

SUMMARY

Vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) is a highly-tolerant to saline stress species of forest-importance native to the Western Chaco Phytogeographical Region. The aim of this paper was to test the hypothesis that supplementing vinal seedlings with CaSO_4 lowers their concentration of toxic ions and increases proline concentration allowing for osmotic adjustment. The seedlings were cultivated in a 25% Hoagland solutions whether adding 0.4 mol L^{-1} of NaCl or not, and whether supplementing it with 5 or 10 mmol L^{-1} of CaSO_4 or not. Both dry matter, mineral composition, relative water content and proline and soluble sugar concentrations were determined. A totally randomized experimental design was used with five repetitions and the results analyzed with ANOVA and the Tukey test. The results obtained endorse the protecting role of Ca^{+2} by maintaining Ca^{+2} , K^+ , and Mg^{+2} concentrations in tissues; the Na^+ absorption inhibition; and the osmotic adjustment by synthesizing osmocompatible solutes.

Palabras clave

Prosopis ruscifolia • nutrición mineral
• relaciones hídricas • ajuste osmótico

Keywords

Prosopis ruscifolia • mineral nutrition
• water relations • osmotic adjustment

INTRODUCCIÓN

El aumento de la concentración salina en el suelo limita la producción vegetal en regiones áridas y semiáridas. El vinal (*Prosopis ruscifolia* G.) es una especie altamente tolerante al estrés salino, que presenta múltiples aplicaciones: madera, leña, forraje, etc. Por estas características es apto para la realización de plantaciones en zonas salinas, donde no pueden desarrollarse otras especies de importancia forestal (18).

Se ha demostrado que el umbral para su germinación es de 0,6 M de NaCl, y para el crecimiento de plántulas de 0,4 M (9). Su elevada tolerancia a la salinidad se basa en la realización de ajuste osmótico, la baja traslocación de Na⁺ a la parte aérea y un eficiente sistema de enzimas antioxidantes, que detoxifican los radicales libres producidos como consecuencia del estrés (9, 18).

La adición de Ca⁺² ha mitigado la inhibición del crecimiento producido por el estrés salino en algunas especies (16, 20, 21), mientras en otras no ha tenido un efecto significativo (15, 19). Por el contrario, en *C. quinoa* y *A. occidentalis* la adición de CaSO₄ incrementó el efecto inhibitorio del NaCl sobre la germinación (1).

Varios mecanismos pueden estar involucrados en la reversión del efecto inhibitorio del NaCl sobre el crecimiento, mediante la adición de Ca²⁺. En trigo (*T. aestivum* L. cv Punjab 85), Zaman *et al.* (21) observaron que este efecto estuvo asociado a un incremento en las concentraciones foliares de K⁺, y en el contenido relativo de agua. Esta mejora en las relaciones hídricas de la planta podría justificarse a través de la síntesis de solutos osmocompatibles (18), como la prolina, azúcares solubles, o glicinabetaína, aunque existen pocos trabajos que estudien la relación entre la suplementación con calcio y la concentración de dichos compuestos orgánicos.

Objetivo

- Poner a prueba la hipótesis de que la suplementación con CaSO₄ disminuye la concentración de iones tóxicos en plántulas de vinal, e incrementa la concentración de prolina, permitiendo un ajuste osmótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

El área de estudio se caracteriza por un clima semiárido estacional (3). En esta región, *P. ruscifolia* forma bosques secundarios (vinalares) que se distribuyen naturalmente en áreas relacionadas con los derrames de los ríos Dulce y Salado, y en los márgenes de salitrales.

Los frutos se cosecharon al azar dentro de un bosque *P. ruscifolia* desarrollado al margen de lagunas temporales, en la localidad de Maco (27°51'20" S; 64°13'27"W), Provincia de Santiago del Estero, Argentina. Las semillas se extrajeron manualmente y se escarificaron con ácido sulfúrico durante 10 minutos, luego se enjuagaron con agua corriente durante 30 minutos. La siembra se realizó empleando toallas de papel humedecidas con agua destilada, que se incubaron en cámara de crecimiento por un lapso de 15 días a 25°C y 12 horas de fotoperíodo.

Se seleccionaron plántulas de tamaño homogéneo, y se cultivaron hidropónicamente en invernáculo, en solución nutritiva de Hoagland al 25%, con o sin la adición de 0,4 mol L⁻¹ de NaCl, y con o sin suplementación de 5 ó 10 mM de CaSO₄. En el tratamiento salino, el NaCl se adicionó gradualmente (50 mM cada 24 horas), hasta lograr la concentración final, para evitar un shock osmótico. Las pérdidas por transpiración se compensaron mediante el agregado de agua destilada, manteniendo constante el nivel de solución en los recipientes. El pH se ajustó a 5,5 mediante la adición de 100 mmol L⁻¹ de KOH o HCl. Las soluciones nutritivas se cambiaron cada 5 días.

Durante el período en que se desarrollaron los ensayos, la radiación fotosintéticamente activa osciló entre un mínimo de 120 μmol m⁻² s⁻¹ durante la puesta de sol, hasta 1600 μmol m⁻² s⁻¹ al medio día, y la temperatura media del aire y humedad relativa dentro del invernáculo fue de 28°C y 52%, respectivamente.

Producción de biomasa, contenido relativo de agua (CRA) y determinaciones químicas

Luego de 30 días de tratamiento, las plantas se extrajeron de la solución nutritiva, se lavaron con agua destilada y se llevaron a estufa de ventilación forzada, a 62°C hasta peso constante. En ese material se determinó materia seca y composición mineral. La concentración de Na⁺ y K⁺ se cuantificó mediante espectrofotometría de llama (13), Ca⁺² y Mg⁺² mediante espectrometría de absorción atómica (17) y Cl⁻ por titulación con AgNO₃ (17). El contenido relativo de agua se determinó de acuerdo con el método de Hall *et al.* (10).

Las concentraciones de prolina y azúcares solubles se determinaron en material fresco. La prolina se cuantificó mediante la técnica de Bates *et al.* (2): se homogeneizó el material vegetal en mortero de porcelana, con 5 mL de ácido sulfosalicílico al 3%. Se filtró con papel Whatman N° 1 y se colocaron en tubos de ensayo alícuotas de 1,3 mL de extracto, a las que se le adicionaron 1,3 mL de ninhidrina ácida y 1,3 mL de ácido acético glacial. Se calentaron los tubos en baño María a 100°C, durante una hora y se enfriaron en baño de hielo. Se leyó absorbancia de los extractos en espectrofotómetro, a 520 nm y se calculó la concentración de prolina, con auxilio de una curva patrón. Los resultados se expresaron como μmol de prolina.g PS⁻¹.

Los azúcares solubles se determinaron mediante la técnica de Dubois (6). Para ello se homogeneizará 0,1 g de material vegetal en 15 ml de agua destilada, se filtrará con papel Whatman N° 1 y se ajustará el volumen a 50 mL en matraz aforado. Posteriormente se colocará en tubo de ensayo una alícuota de 0,5 ml del extracto y se le adicionarán 0,5 mL de fenol 5% y 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Se hervirá

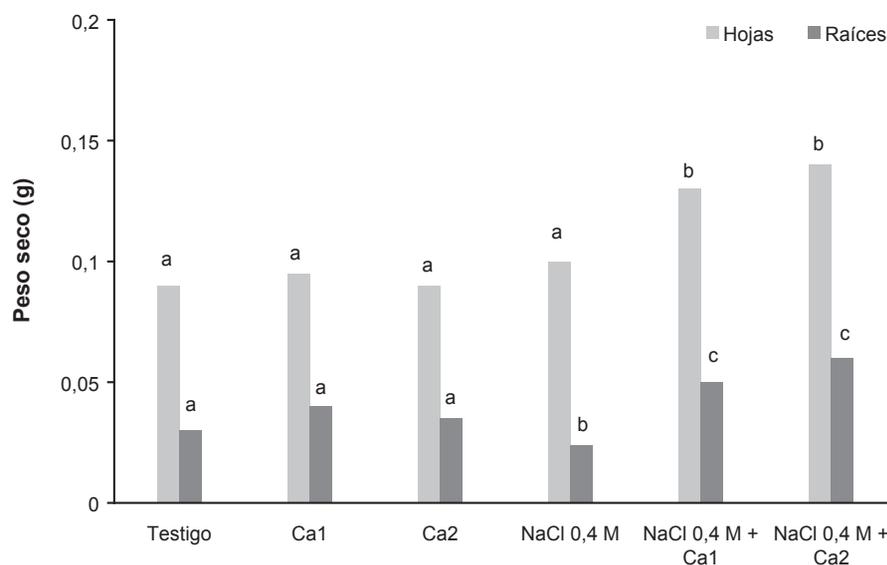
en baño María durante 20 minutos y se leerá absorbancia en espectrofotómetro a 490 nm. La concentración de azúcares será calculada con auxilio de una curva patrón de glucosa y se expresará en mg de glucosa.g PS⁻¹.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones, y los resultados se analizaron con ANOVA y test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La adición de 0,4 mol L⁻¹ de NaCl en la solución nutritiva no afectó el crecimiento de la parte aérea, pero inhibió el desarrollo del sistema radicular (figura 1). La suplementación con calcio incrementó la biomasa de hojas y raíces, aunque no se obtuvieron diferencias entre las concentraciones ensayadas.



Para cada parte (hojas o raíces), barras seguidas por letras distintas difieren estadísticamente por el Test de Tukey al 5%.

For each part (leaves or roots) bars accompanied by different letters are significantly different by the Tukey test at 5%.

Figura 1. Peso seco de hojas y raíces de plántulas de vinal, crecidas en solución nutritiva de Hoagland 25%, con o sin la adición de 0,4 mol L⁻¹ de NaCl, y con o sin suplementación de 5 (Ca1) o 10 mM de CaSO₄ (Ca2).

Figure 1. Dry weight of leaves and roots of vinal seedlings grown in 25% Hoagland solution, with or without adding 0.4 mol L⁻¹ of NaCl, and with or without supplementing 5 (Ca1) or 10 mM of CaSO₄ (Ca2).

El estrés salino produjo un aumento en las concentraciones de Na⁺ y Cl⁻ y una disminución en las de Ca⁺², K⁺ y Mg⁺², tanto en las raíces como en las hojas (tabla).

La suplementación con 5 y 10 mM de Ca⁺² disminuyó la concentración de Na⁺ en raíces y hojas de plantas crecidas en 0,4 M de NaCl, y no modificó los niveles de Cl⁻. Por otra parte, los tratamientos con ambas concentraciones de Ca⁺² lograron incrementar las concentraciones de dicho catión en plantas sometidas a estrés salino, aunque no alcanzaron los valores observados en el testigo. Un efecto similar se observó con las concentraciones de K⁺ y Mg⁺².

Tabla 1. Composición mineral en hojas y raíces de plántulas de vinal, crecidas en solución nutritiva de Hoagland 25%, con o sin la adición de 0,4 mol L⁻¹ de NaCl, y con o sin suplementación de 5 (Ca1) o 10 mM de CaSO₄ (Ca2).

Table 1. Mineral composition in leaves and roots of vinal seedlings grown in 25% Hoagland solution, with or without adding 0.4 mol L⁻¹ of NaCl, and with or without supplementing 5 (Ca1) or 10 mM of CaSO₄ (Ca2).

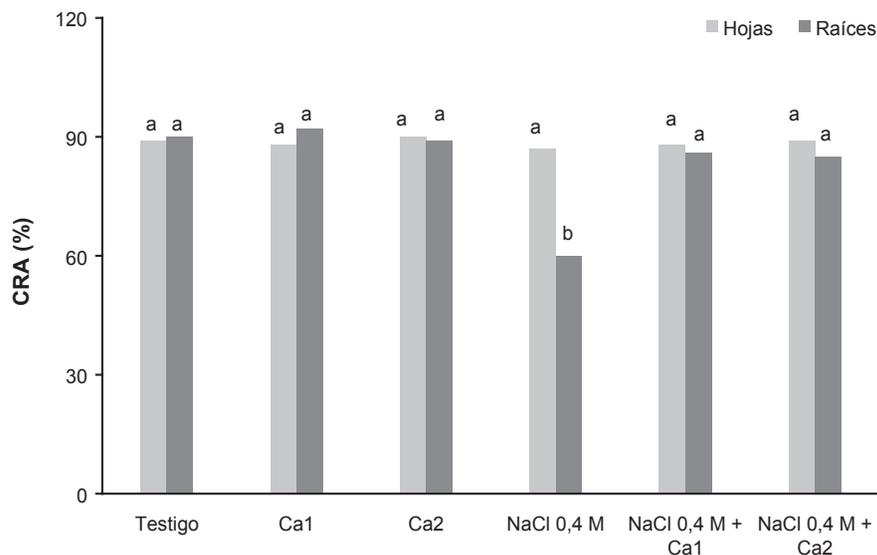
Tratamiento	Solutos (mol kg ⁻¹ PS)				
	Na ⁺	Ca ⁺²	Cl ⁻	K ⁺	Mg ⁺²
	Hojas				
Testigo	0,023 a	0,697 a	0,028 a	0,855 a	0,078 a
NaCl 0,4 M	0,475 b	0,428 b	0,102 b	0,627 b	0,054 b
NaCl 0,4 M+ Ca1	0,213 c	0,579 c	0,105 b	0,079 c	0,088 c
NaCl 0,4M + Ca 2	0,198 c	0,601 c	0,099 b	0,082 c	0,082 c
	Raíces				
Testigo	0,251 a	0,192 a	0,034 a	0,830 a	0,055 a
NaCl 400 mol m ⁻³	0,597 b	0,129 b	0,318 b	0,573 b	0,039 b
NaCl 400 mol m ⁻³ + Ca1	0,342 c	0,163 c	0,305 b	0,739 c	0,043 c
NaCl 400 mol m ⁻³ + Ca 2	0,350 c	0,170 c	0,312 b	0,755 c	0,048 c

Para cada parte (hojas o raíces), letras distintas en cada columna indican diferencias significativas al 5% por el test de Tukey.

For each part (leaves or roots) different letters in each column point out significantly differences by the Tukey test at 5%.

La adición Ca⁺² en el ambiente radicular ha sido sugerida como un método para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés salino (7). Bajo condiciones de elevada salinidad suele disminuir la relación calcio/sodio en el suelo, lo cual afecta las propiedades de las membranas celulares debido al desplazamiento del Ca⁺² asociado a las mismas por el Na⁺ y conduce a una alteración en su integridad y selectividad (14). Esto estimula el incremento de las concentraciones de Na⁺ dentro de las células, que puede inhibir la actividad de algunas enzimas, produciendo alteraciones en el metabolismo, en la absorción de K⁺, y su partición en la planta, afectando la apertura estomática (7). En conjunto, estos cambios inhiben el crecimiento vegetal. La adición de Ca⁺² al ambiente radicular de plantas sometidas a estrés salino mantiene o mejora la absorción selectiva de potasio a altas concentraciones de sodio, lo que previene el efecto deletéreo de un exceso de Na⁺ (7).

Otro rol atribuido a la suplementación con Ca^{+2} es su contribución al ajuste osmótico, incrementando la acumulación de solutos osmocompatibles (8). Coincidiendo con estos resultados, el estrés salino no afectó el contenido relativo de agua (CRA) de las hojas, pero produjo una reducción significativa en las raíces, la cual fue revertida por la adición de calcio (figura 2). No se observaron diferencias significativas entre ambas concentraciones de Ca^{+2} .



Para cada parte (hojas o raíces), barras seguidas por letras distintas difieren estadísticamente por el Test de Tukey al 5%.

For each part (leaves or roots) bars accompanied by different letters are significantly different by the Tukey test at 5%.

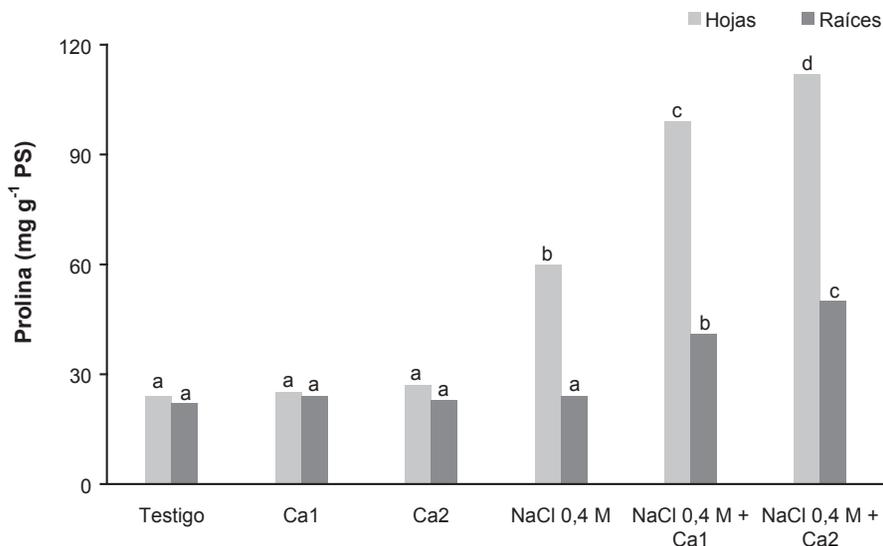
Figura 2. Contenido relativo de agua (CRA) de hojas y raíces de plántulas de vinal, crecidas en solución nutritiva de Hoagland 25%, con o sin la adición de $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, y con o sin suplementación de 5 (Ca1) o 10 mM de CaSO_4 (Ca2).

Figure 2. Relative water content (CRA) in leaves and roots of vinal seedlings grown in 25% Hoagland solution, with or without adding $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ of NaCl, and with or without supplementing 5 (Ca1) or 10 mM of CaSO_4 (Ca2).

El incremento en el CRA, producido por la suplementación con Ca^{+2} en las plántulas sometidas a estrés salino, indica la existencia de algún mecanismo de ajuste osmótico, que permitió mantener el gradiente de potencial hídrico entre los tejidos y la solución nutritiva, con la concomitante absorción de agua.

En concordancia con este resultado, el estrés salino duplicó la concentración de prolina en hojas, y la suplementación con 5 y 10 mM de Ca^{+2} incrementó su concentración en 310 y 360% con respecto al testigo, respectivamente (figura 3, pág. 85).

En raíces, la salinidad no afectó la concentración de este soluto osmocompatible, mientras que la adición de 5 y 10 mM de Ca^{+2} incrementó los valores en 86 y 127% en relación con el testigo, respectivamente.



Para cada parte (hojas y raíces), barras seguidas por letras distintas difieren estadísticamente por el Test de Tukey al 5 %.

For each part (leaves or roots) bars accompanied by different letters are significantly different by the Tukey test at 5%.

Figura 3. Concentración de prolina en hojas y raíces de plántulas de vinal, crecidas en solución nutritiva de Hoagland 25%, con o sin la adición de 0,4 mol L⁻¹ de NaCl, y con o sin suplementación de 5 (Ca1) o 10 mM de CaSO_4 (Ca2).

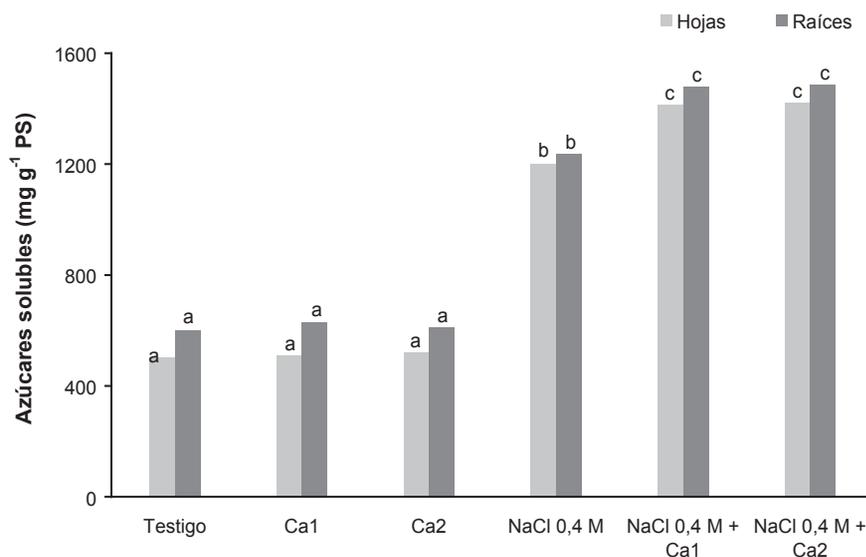
Figure 3. Proline concentration in leaves and roots of vinal seedlings grown in 25% Hoagland solution, with or without adding 0.4 mol L⁻¹ of NaCl, and with or without supplementing 5 (Ca1) or 10 mM of CaSO_4 (Ca2).

La prolina no sólo contribuye al ajuste osmótico a nivel celular sino que ha sido citada como un protector de enzimas y un estabilizador de estructuras de organelas y macromoléculas. También actúa como una reserva de energía y nitrógeno, para ser utilizada luego de la exposición a la salinidad (4, 8).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Colmer *et al.* (5) quienes observaron aumentos significativos en las concentraciones foliares de prolina, luego de la adición de Ca^{2+} , en plántulas de *Sorghum bicolor* estresadas con NaCl. Por otra parte, difieren con los de Lacerda *et al.* (16) y Viera Silva *et al.* (20) que no detectaron cambios en las concentraciones de este soluto en plantas de *Sorghum bicolor* y *Vigna unguiculata*, respectivamente, sometidas a estrés salino, con suplementación de Ca^{+2} .

Por el contrario, Girija *et al.* (8) demostraron que el Ca^{+2} inhibe la síntesis de prolina, induciendo su degradación, en plantas de *Arachis hypogaea*. También difieren con los resultados citados por Jaleel *et al.* (11, 12) que reportaron una disminución en la concentración de prolina, en hojas de *Phyllanthus amarus* y *Dioscorea rotundata*, en presencia de NaCl, y suplementación con calcio.

El estrés salino también incrementó la concentración de azúcares solubles, tanto en raíces como en hojas (figura 4).



Para cada parte (hojas o raíces), barras seguidas por letras distintas difieren estadísticamente por el Test de Tukey al 5%.

For each part (leaves or roots) bars accompanied by different letters are significantly different by the Tukey test at 5%.

Figura 4. Concentración de azúcares solubles en hojas y raíces de plántulas de vinal, crecidas en solución nutritiva de Hoagland 25%, con o sin la adición de $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, y con o sin suplementación de 5 (Ca1) o 10 mM de CaSO_4 (Ca2).

Figure 4. Soluble sugars in leaves and roots of vinal seedlings grown in 25% Hoagland solution, with or without adding 0.4 mol L^{-1} of NaCl, and with or without supplementing 5 (Ca1) or 10 mM of CaSO_4 (Ca2).

La adición de Ca^{+2} en ambas concentraciones incrementó el contenido de azúcares, lo que demuestra que este catión estimuló la síntesis de solutos osmocompatibles. Resultados similares fueron citados por Jaleel *et al.* (11, 12) en *Dioscorea rotundata*; estos autores atribuyeron dicho incremento a un aumento en la actividad α -amilasa, que utiliza calcio como cofactor.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman el rol protector del Ca^{+2} , a través de la manutención de las concentraciones de Ca^{+2} , K^+ y Mg^{+2} en los tejidos, la inhibición de la absorción de Na^+ y el ajuste osmótico mediante la síntesis de solutos osmocompatibles.

BIBLIGRAFÍA

1. Abo-Kassem, E. 2007. Effects of salinity: calcium interaction on growth and nucleic acid metabolism in five species of *Chenopodiaceae*. Turkish Journal of Botany, 31: 125-134.
2. Bates, L. S.; Waldren, R. P.; Tear, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
3. Boletta, P. E.; Acuña, L. R.; Juárez de Moya, M. L. 1989. Análisis de las características climáticas de la provincia de Santiago del Estero y comportamiento del tiempo durante la sequía de la campaña agrícola 1988 / 1989. Convenio INTA - UNSE. Santiago del Estero. Argentina. p. 23 y anexo.
4. Chandrasekhar, K. R.; SandhyaRani, S. 1996. Salinity induced chemical changes in *Crotalaria striata* D.C. Indian Journal of Plant Physiology, 1: 44-48.
5. Colmer T. D.; Fan, T. W.; Higashi, R. M.; Läuchli, A. 1996. Interactive effects of Ca^{2+} and NaCl salinity on the ionic relations and proline accumulation in the primary root tip of *Sorghum bicolor*. Physiologia Plantarum, 97: 421-424.
6. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356.
7. Epstein, E. 1998. How calcium enhances plant salt tolerance. Science, 40: 1906-1907.
8. Girija, C.; Smith, B. N.; Swamy, P. M. 2002. Interactive effects of sodium chloride and calcium chloride on the accumulation of proline and glycinebetaine in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Environment and Experimental Botany, 47(1): 1-10.
9. González, D.; Acosta, M.; Pece, M.; Meloni, D. 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.
10. Hall, D. O.; Scurlock, J. M.; Bolhàr, H. R.; Leegood, R. C.; Long, S. P. 1999. Photosynthesis and production in changing environment. Ed. Chapman & Hall.
11. Jaleel, C. A.; Manivannan, P.; Lakshmanan, G. M. A.; Sridharan, R.; Panneerselvam, R. 2007. NaCl as physiological modulator of proline metabolism and antioxidant potential in *Phyllanthus amarus*. Comptes Rendus Biologies 330: 806-813.
12. Jaleel, C. A.; Gopi, R.; Gomathinayagan, M.; Panneerselvam, R. 2008. Effects of calcium chloride on metabolism of salt-stressed *Dioscorea rotundata*. Acta Biológica Cracoviensia Series Botánica, 50: 63-67.
13. Jameel Al-Kahayri, M. 2002. Growth, proline accumulation, and ion content in sodium chloride-stressed callus of date palm. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 38, 79-82.
14. Kinraide, T. B. 1998. Three mechanisms for the calcium alleviations of mineral toxicities. Plant Physiology, 118: 513-520.
15. Kinraide, T. B. 1999. Interactions among Ca^{+2} , Na^+ and K^+ in salinity toxicity: quantitative resolution of multiple toxic and ameliorative effects. Journal of Experimental Botany, 50: 1495-1505.
16. Lacerda, C. F.; Cambraia, J.; Oliva, M. A.; Ruiz, C. A. 2004. Influência do cálcio sobre o crescimento e solutos em plântulas de sorgo estressadas com cloreto de sódio. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 25: 289-295.
17. Malavolta, E.; Vitti, G. C.; Oliveira, S. A. 1989. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, Brasil.
18. Meloni, D. A.; Gulotta, M. R.; Martínez, C. A. 2008. *Prosopis ruscifolia* Griseb. (vinal) tolera concentraciones salinas equivalentes al agua de mar y excluye iones tóxicos de la parte aérea. Quebracho, 16: 32-40.
19. Reid, R. J.; Smith, A. 2000. The limits of sodium/calcium interactions in plant growth. Australian Journal of Plant Physiology, 27: 709-715.

20. Vieira Silva, J.; Feitosa de Lacerda, C.; Alves da Costa, P. H.; Enéas Filho, J.; Gomes Filho, E.; Prisco, J. T. 2003. Physiological responses of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplemented with CaCl_2 . *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 15: 99-105.
21. Zaman, B.; Niazi, B. H.; Athar, M.; Ahmad, M. 2005. Response of wheat plants to sodium and calcium ion interaction under saline environment. *International Journal of Environment Science and Technology*, 2: 7-12.