

Actividad de la enzima rubulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/ oxigenasa en variedades de trigo en condiciones de salinidad

RubisCO enzyme activity in wheat varieties under salinity conditions

L. Argente¹, R.D. López², L.M. González³, E. Ortega⁴, R. Rodés⁴, Y. Fernández¹

¹Universidad de Granma. Carretera a Manzanillo, Km 17 ½ Peralejo, Bayamo. Cuba.

²Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, La paz, Baja California Sur. México.

³Instituto de Investigaciones Agropecuarias “J. Dimitrov” Peralejo, Bayamo, Cuba.

⁴Universidad de la Habana. Facultad de Ciencias Químicas. La Habana, Cuba

E-mail: largentelm@udg.co.cu

RESUMEN. La actividad de la enzima **RubisCO** fue estudiada en variedades de trigo expuestas a condiciones de salinidad. Se seleccionaron cuatro variedades cubanas de trigo de las especies *T. aestivum* y *T. durum*, (dos variedades respectivamente). Se montaron dos variantes experimentales en condiciones de hidroponía. El primer tratamiento se salinizó con NaCl a una conductividad eléctrica de 8 dS.m⁻¹ en la solución nutritiva, y el tratamiento control sin aplicar NaCl, para todos los casos se ajustó el pH de la solución a 6.0. Los tratamientos se aplicaron desde el momento de la siembra hasta los 35 días de germinadas las semillas cuando se realizaron las determinaciones. Como resultados se obtuvo una significativa disminución de la actividad enzimática **RubisCO** en todas las variedades en el medio salino, existiendo diferencias altamente significativas respecto al tratamiento control. Se encontraron afectaciones superiores al 10 % como consecuencia de la salinidad. Las variedades de trigo de la especie *T. durum* presentaron siempre en el tratamiento control mayor actividad enzimática de la **RubisCO** pero la intensidad del estrés fue superior en esta especie evidenciándose mayor sensibilidad a la salinidad respecto a *T. aestivum*.

Palabras clave: RubisCO, trigo, salinidad.

ABSTRACT. The RubisCO enzyme activity was studied in wheat cultivars exposed to salinity. Four Cuban varieties of wheat species *T. aestivum* and *T. durum* were selected and mounted two experimental variants in hydroponic conditions. He saline the first treatment with NaCl to a conductivity of 8 dS.m⁻¹ in the nutrient solution, while in the control treatment (no applied NaCl for all cases) the pH of the solution was adjusted to 6.0. Treatments were applied from the time of planting to 35 days after seed germination when the determinations were made. As a result a significant decrease in RubisCO enzyme activity was obtained in all varieties in saline, where there were highly significant differences compared to the control treatment. Affectations than 10 % due to salinity were found. Wheat varieties of the species *T. durum* always occurred in the control treatment increased enzyme activity of RubisCO but the intensity of stress was higher in this species so it showed increased sensitivity to salinity compared to *T. aestivum*.

Key words: RubisCO, wheat, salinity.

INTRODUCCIÓN

Ante la presencia de sales en el medio donde se establecen las plantas numerosos cambios bioquímicos tienen lugar para poder asegurar su metabolismo y por consiguiente la supervivencia, adaptación y productividad (Levitt, 1980). En tales condiciones estrés antes se impone la necesidad de disminuir el potencial de solutos y en consecuencia el hídrico, para poder mantener la columna de agua (Ashraf, 1989). Ello se consigue mediante el ajuste osmótico, proceso que tiene lugar por la

acumulación de compuestos osmóticamente activos, y de iones del suelo, siendo éstos últimos los que mayores implicaciones traen a la planta. (Bray, 2002)

Cuando se acumulan iones se produce primeramente una interferencia nutricional y posteriormente el aumento de su concentración propicia la toxicidad iónica (Flowers y Yeo, 1986). Entre los iones que mayormente afectan el metabolismo vegetal se

encuentran el Na⁺ y el Cl⁻, estos generalmente interfieren la actividad de importantes enzimas que aseguran el mantenimiento de los procesos de síntesis. (Zeiger y Lincoln, 2006)

La actividad fotosintética se ve afectada por el efecto de la salinidad al afectar el contenido de clorofila y el proceso de captación de CO₂ en la segunda fase de la fotosíntesis (Feitosa et al., 2001). Así importantes cultivos como el trigo, especie más antigua cultivada por el hombre, que constituye la base de la alimentación de más del 94,6% de la población mundial, necesitan mantener en niveles elevados la actividad fijadora del carbono para asegurar un rendimiento adecuado, máxime si se establecen en condiciones salinas donde la tasa de asimilación neta se afecta considerablemente, dependiendo las afectaciones del grado de tolerancia de cada variedad. (Bray, 2002)

MATERIALES Y MÉTODOS

Las variedades fueron establecidas en condiciones de hidroponía en el invernadero perteneciente al laboratorio de Fisiología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste de México, Unidad Guerrero Negro. Para ello se conformaron flotadores rectangulares (poliestireno expandido) de 30x20 cm (López, 2007) que fueron seccionados en cuatro partes con una superficie de 15x8,5 cm, donde se establecieron 20 semillas por cada sesión. Estas semillas fueron ubicadas de forma alineada, para un total de 80 semillas por variedad.

El fondo de los flotadores se estableció, con una malla plástica, orificios de 4mm². Los flotadores fueron ubicados en bandejas plásticas rectangulares transparentes de 50x39 cm, cubiertas con papel

Al tener en cuenta los daños que pueden devenir tras las afectaciones en la fijación del carbono empleado para la formación de fuentes energéticas y carbonadas en el metabolismo primario y secundario, así como su reflejo en el desarrollo y rendimiento agrícola de las especies (Azcón-Bieto y Talón, 2008), se estudió el efecto de la salinidad sobre la actividad de la enzima Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RubisCO) en cuatro variedades cubanas de trigo, las que han sido estudiadas a través de diferentes indicadores fisiológicos, bioquímicos y agronómicos para su validación en condiciones de estrés salino (Argentel et al., 2010). Cómo en el oriente de Cuba el 55% de los suelos dedicados a la agricultura tienen problemas de salinidad. El objetivo del estudio realizado fue evaluar las afectaciones de la actividad de la enzima RubisCO en cuatro variedades de trigo en condiciones de salinidad.

aluminio para evitar la entrada lateral de luz. En cada bandeja se establecieron dos variedades. La siembra se realizó a las 7:00 am y después fue añadido un volumen inicial de 5 L de solución (tratamientos), hasta completar el volumen final de 18 L de las soluciones que conformaron los tratamientos. Los flotadores se mantuvieron plenamente sobre el agua y con el uso de varillas de suspensión se evitó la hiperhidricidad en las semillas. La aireación de las soluciones, en cada bandeja, se realizó con bombas aireadoras (MELLIN, 2,8) que distribuían el aire a través de mangueras plásticas transparentes de 3mm de diámetro.

Las variedades empleadas en el estudio se describen en la siguiente tabla.

Tabla. Variedades empleadas y especie a la que pertenecen

Variedad	Especie
INIFAT RM -26	<i>T. aestivum</i>
INIFAT RM -36	<i>T. aestivum</i>
INCA TD 18	<i>T. durum</i>
INCA TD 16 E	<i>T. durum</i>

Tratamientos

Los tratamientos consistieron en la aplicación de soluciones nutritivas, las que se describen a continuación.

T₁: Tratamiento salino: solución nutritiva (Hoagland y Arnon, 1950) salinizada a base de NaCl con una conductividad eléctrica de 8 dS.m⁻¹.

T₂; tratamiento control: solución nutritiva (Hoagland y Arnon, 1950), siguiendo las exigencias nutricionales del cultivo, con una conductividad eléctrica de 0,36 dS.m⁻¹.

Las soluciones nutritivas de los dos tratamientos establecidos fueron ajustadas a un pH de 6,0 con el empleo de un medidor de pH, PH 40S. La conductividad eléctrica fue medida con un conductímetro MQ conductimeter- EC.

Los tratamientos se dispusieron mediante un arreglo experimental completamente aleatorizado y se repitió cuatro veces (ambos tratamientos) con cada variedad. Las evaluaciones fueron realizadas a los 35 días después de la germinación, en la fenofase del segundo nudo. Las muestras foliares se tomaron a las 10:30 am aleatoriamente de la parte central de las cuarta, quinta y sexta hojas, de las plantas de trigo en cada variedad y se completó una masa inicial de 20 gramos para obtener un volumen de 5 mL de macerado, repetido tres veces, de los cuales se tomaron posteriormente tres repeticiones técnicas con arreglo 3³.

Variable evaluada

La actividad carboxilasa de la RubisCO se determinó siguiendo el método de Lorimer (1976), basado en la incorporación del ¹⁴C, introducido en el ensayo como [¹⁴C]-NaHCO₃ (Amersham, 51,7 Ci/mol), en productos estables al tratamiento ácido 3-fosfoglicerato. El ensayo se realizó con el enzima presente en 20 ìL del extracto homogeneizado anteriormente con el tampón TEP. La RubisCO se llevó a un volumen final de 200 ìL con tampón de preincubación (Tris-HCl 100mM pH 8,2, MgCl₂ 10mM y NaHCO₃ 10mM) y se preincubó en viales de plástico (Biovial, Beckman) durante 10min a 30 °C, con la finalidad de activar el enzima.

La reacción se inició con la adición de 50 ìL de Tris-HCl 100mM pH 8,2, MgCl₂ 10 mM, 55 mM [¹⁴C]-

NaHCO₃ (4x10⁸ dpm/mmol) y RubisCO (Sigma) 2,3 mM, y se detuvo después de 1 min de incubación a 30 °C, mediante la adición de 50 ìL de HCl 2M. El [¹⁴C]-NaHCO₃ no fijado fue eliminado mediante la evaporación para lo cual se colocaron las muestras en una estufa de vacío a 80 °C, esta operación fue realizada dos veces tras disolver el residuo seco en 200 ìL de agua. El residuo final se resuspendió en 200 ìL de agua y añadieron 3 mL de la mezcla de centelleo (Cocktail-22 Normascint, Scharlau) para medir la radiactividad del ¹⁴C incorporado mediante un contador de centelleo LKB Rack Beta, realizando el cálculo de la eficiencia del conteo mediante el método del estándar externo.

El cálculo preciso de la radiactividad específica del sustrato marcado [¹⁴C]-NaHCO₃, se realizó contando la marca introducida en cada ensayo. Para ello se añadieron 50 ìL de la disolución radiactiva, con la que se inició el ensayo, a 3 mL de mezcla de centelleo alcalina, 0,98 g de PPO (Scharlau) y 0,2 g de POPOP (Merck) en 115 mL de la mezcla tolueno/feniletilamina/agua/metanol (57:50:5:3, v/v) y se procedió a contar la radioactividad. La eficiencia del conteo se determinó por el método de la relación entre canales.

Análisis estadísticos

De cada variedad en los dos tratamientos se analizaron tres repeticiones biológicas y tres técnicas. Se analizó el cumplimiento de los supuestos teóricos de normalidad y homogeneidad de varianza según la prueba de Kolmogorov. Los datos obtenidos en el tratamiento control y el estrés fueron comparados mediante la prueba de *t-student* para el nivel de significación del 1%. Además se realizó un análisis de varianza de clasificación simple para compararla intensidad del estrés, calculada mediante la fórmula propuesta por Fernández (1993) sobre la actividad enzimática, a través de la comparación de las medias mediante la prueba de MDS para un 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad carboxilasa de la enzima RubisCO

La actividad carboxilasa de la RubisCO en condiciones salinas respecto al control presentó diferencias altamente significativas en las cuatro

variedades estudiadas (Figura 1). La diferencia más marcada es entre las variedades INCA TD 16 E e INCA TD 18, donde se observó una disminución de los valores del indicador en más de un 30%, en condición de estrés.

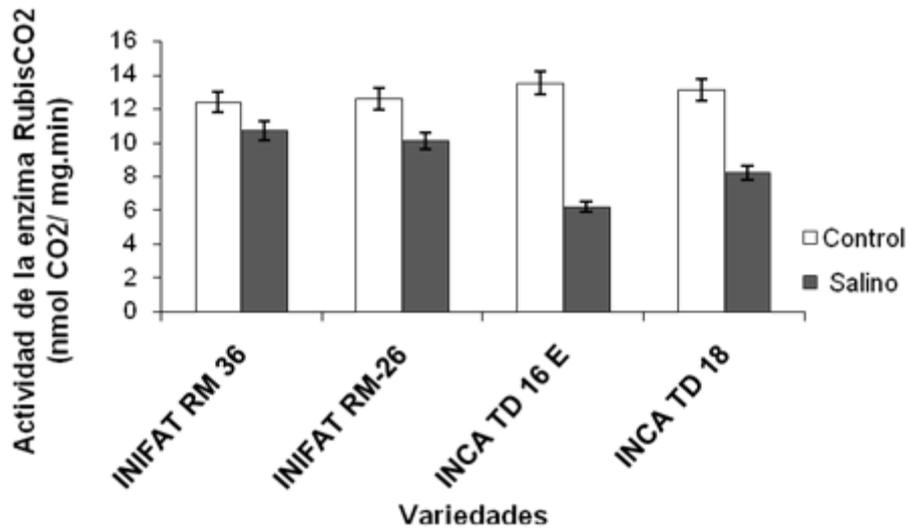
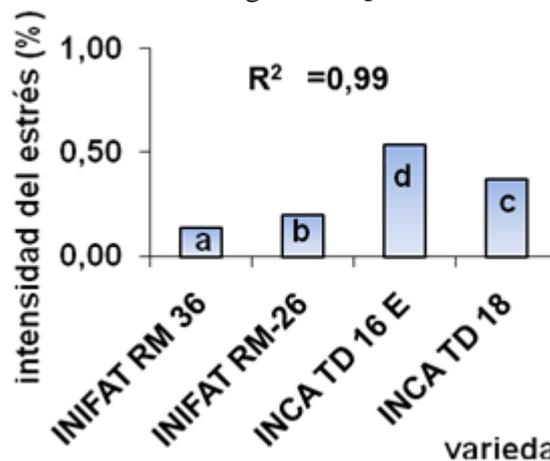


Figura 1. Actividad del enzima Ribulosa 1,5- bifosfato carboxilasa/oxigenasa

Un elemento importante en el estudio realizado fue que las variedades de mayores afectaciones siempre presentaron en el tratamiento control valores más altos de actividad. En este sentido, algunos estudios demuestran que la especie de *T. durum*, en la cual se ubican estas variedades, poseen mayor grado de rusticidad y generalmente la eficiencia de la enzima en cuestión es mayor (Flexas et al., 2006). Otros autores, sin embargo, sostienen que existe correlación inversa entre la rusticidad de la especie y la actividad de la RubisCO, dado posiblemente por la sensibilidad de los estomas a la condición salina, función de la incapacidad de disminución del potencial osmótico y consecuentemente, el hídrico que propicia un cierre activo estomático para evitar la marchites permanente debido a la pérdida excesiva de agua

por transpiración, lo que propicia la disminución de la concentración de CO₂ en la cámara subestomática. (ZongSuo, 2006; Mayek-Pérez y López-Salinas, 2004)

El análisis de la intensidad del estrés por salinidad en la actividad enzimática de las variedades probadas mostró la existencia de diferencias significativas entre las cuatro variedades, que aunque pertenecen a especies diferentes, el método empleado para su determinación lo hace en función de su respuesta en condiciones normales, por ello permitió determinar el coeficiente de determinación y su valor fue de R²= 0,99 (Figura 2). Esto demuestra que las variaciones encontradas son función solamente del efecto varietal, y permite concluir que existe variabilidad natural para responder a la salinidad.



*Medias con letras diferentes muestran diferencias significativas por MDS. R²: coeficiente de determinación

Figura 2. Intensidad del estrés salino (11) sobre la actividad enzimática de la RubisCO de cuatro variedades de trigo

El resultado se considera importante dado que en los germoplasmas con que se dispone es necesario seleccionar aquellas variedades que en condiciones de estrés no se afecten procesos importantes como

el fotosintético, que tributa directamente al rendimiento en materia seca. En el caso de estudio, al rendimiento agrícola del cultivo del trigo que en Cuba está siendo rescatado como vía importante para

la sustitución de importaciones, la alimentación animal, humana; así como para lograr un acercamiento a la rentabilidad de los suelos de ecosistemas afectados por salinidad donde otras especies no expresan un favorable potencial genético productivo. (Mayek-Pérez y López-Salinas, 2004)

Múltiples síntomas fisiológicos asociados a la toxicidad de los iones a partir de determinados niveles críticos han sido descritos, tales como las interferencias causadas por ellos en el metabolismo y a los daños que, como consecuencia, tienen lugar en los cloroplastos, específicamente la destrucción de los tilacoides (Yuen *et al.*, 2004) disminución o inhibición de la actividad enzimática y finalmente inhibición de la fotosíntesis, lo que trae como resultado la derivación de parte de la energía metabólica de la planta para su inversión en procesos distintos al crecimiento. (Munns, 2009)

En la actualidad la mejora genética asistida a través de la ingeniería genómica en múltiples especies de interés económico está basándose en la introgresión de genes que confieran tolerancia y estabilidad de rendimiento bioquímico, en procesos como la actividad fotosintética, que en su máxima expresión, es la base fundamental del rendimiento de los cultivos. (Flexas *et al.*, 2006; Munns, 2009)

La ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RubisCO) es una enzima bifuncional con la capacidad de utilizar competitivamente CO₂ y O₂, es la enzima clave responsable de la fijación de CO₂ durante la fotosíntesis y el mayor contribuyente a la ganancia de materia seca en todas sus manifestaciones (Mikman, 1982). Algunos estudios afirman que la salinidad puede disminuir la actividad de esta enzima, así como también la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, en las plantas C₄, no

así en las de metabolismo CAM (PEPC) (Mikman, 1982). Plantas sometidas a estrés poseen mayor fotorrespiración, lo cual se considera un proceso de gasto innecesario involucrado en la liberación de CO₂ y NH₃, por ello su rendimiento merma considerablemente en dependencia de su grado de tolerancia (Blee, 2008). Está bien demostrado que la actividad oxigenasa de la RubisCO cataliza el primer paso de la fotorrespiración, y que ésta a su vez consume hidratos de carbono estructurales, llegando en algunos casos a utilizar como sustrato hasta el 50 % de los mismos. (Pintux, 2001)

Como se mencionó anteriormente, la fotosíntesis se inhibe cuando altas concentraciones de Na⁺ y/o de Cl⁻ se acumulan en los cloroplastos. Sin embargo, se conoce que el transporte de electrones del aparato fotosintético es relativamente insensible a la salinidad, con lo cual se deduce que los mecanismos afectados podrían ser el metabolismo del carbono o la fotofosforilación. (Sivakumar *et al.*, 2000)

La salinidad causa una disminución significativa en los niveles de proteínas solubles, especialmente de la RubisCO (Sibole *et al.*, 2005; Teakle *et al.*, 2007). La oxigenación de ribulosa-1,5-bifosfato catalizada por RubisCO es la primera reacción de un proceso llamado fotorrespiración y como la fotosíntesis, la fotorrespiración actúa en sentido opuesto. Cuando la salinidad afecta la fotosíntesis propicia un incremento de la fotorrespiración y por consiguiente, provoca pérdida de CO₂ necesario como fuente carbonada (Miteva *et al.*, 1992). Además, los daños ocasionados por la salinidad sobre la fijación del CO₂ son más nocivos en las fenofases finales que en las iniciales de cultivos como el arroz y la caña de azúcar (Iman-Barber, 2005), no así en cebada y trigo. (Hempler, 2008)

CONCLUSIONES

1. La actividad enzimática RubisCO disminuyó en todas las variedades evaluadas en el medio salino, donde existieron diferencias altamente significativas respecto al tratamiento control.

2. Las variedades de la especie *T. durum* presentaron siempre en el tratamiento control mayor actividad enzimática de la RubisCO; pero la intensidad del estrés fue superior por lo que evidenció mayor sensibilidad a la salinidad respecto a *T. aestivum*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Argentel, L.; R. D. López; L. M. González: Contenido de prolina, glicina betaina y proteínas solubles totales de 12 variedades cubanas de trigo

(*Triticum aestivum* L.) en condiciones de salinidad. *Cultivos Tropicales* 31(4): 82-86, 2010.

2. Ashraf, M.: The effect of NaCl on water relations, chlorophyll, and protein and proline contents of two cultivars of Black gram (*Vignamungo*L.). *Plant Soil*, 119: 205-210, 1989.
3. Azcón-Bieto, J.; M. Talón: Fundamentos de fisiología Vegetal. *Publicaciones y ediciones de la Universitat de Bracelona*. España, 2008, 639 p. ISBN 84-486-0258-7.
4. Blee, T.: Sodium concentration and its influence on CO₂ fixation in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiol*. 136: 2457-2462, 2008.
5. Bray, E.A.: Classification osmotic implications during saline stress. *Annals of Botany. Water Stress*, 89 (7): 803-811, 2002.
6. Feitosa de Lacerda, C.; J. Cambraia; M.A. Oliva Cano; H.A. Ruiz: Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes under NaCl stress. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 13 (3):270-284, 2001. ISSN: 0103-3131.
7. Fernández, G. C. J.: Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. 1993. In C.G Kuo (Edt). *Adaptation of Food Crops to Temperature and Water Stress*. Proc. of an Inter. Symp. Taiwan. 13-18 August 1999. AVRDC. p. 257-270.
8. Flexas, J.; M. Ribas-Carbó; J. Bota; J. Galmés; M. Henkle; S. Martínez-Cañellas; H. Medrano: Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist* 172(1): 73-82, 2006.
9. Flowers, T. J.; A. R. Yeo: Ion Relations of Plants under Drought and salinity. In: *Australian Journal of Scientific Research* 13(1):75 – 91, 1986.
10. Hempler, E.: Actividad carboxilasa de la RuBP en hojas frescas de plantas de trigo hexaploide expuestas a condiciones de estrés (en español). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499, 2008.
11. Hoagland, D.R.; D.I. Arnon: The water-culture for growing plants without soil. College of Agriculture, University of California, Estados Unidos, 1950, 500 p.
12. Iman-Barber, N.: Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field Crops Research* 92(2-3): 185-202, 2005.
13. Levitt, J.: Response of plants to environmental stresses. En: *Water, Radiation, Salt and other Stresses*. Vol. II. *Academic Press. London*. 1980, 607 p. ISBN: 0124455026, 9780124455023
14. López, R.D.: Sodium content corroboration in spectrophotometric methods with micronealysys. *Water experiment. Biochemical Sciences* 23: 156-159, 2007.
15. Lorimer, G.H.: The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism, and physiological implications. *Biochemistry*, 15 (3): 529–536, 1976.
16. Mayek-Pérez, N.; E. López-Salinas: Breeding wheat resistance to salt and drought based on photosynthetic activity in lowland tropics. *Euphytica*, 136(2): 213-222, 2004.
17. Mikman, Z.: Effect of water stress in photosynthetic activity and its contribution to yield of wheat grown in a semi-arid environment. *Field Crops Research* 5: 55 – 67, 1982.
18. Miteva, T.S.; N.Z. Zhelev; L.P. Popova: Effect of salinity on the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in sugarcane leaves. *Journal of Plant Physiology* 140: 46-51, 1992.
19. Munns, R.: Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25(2): 239-250, 2009.
20. Pintux, T.: Photorespiration and salt stress. *The Plant J.* 27(2): 129-142, 2001.
21. Sibole, J.V.; C. Cabot; W. Michalke; Ch. Poschenrieder; J. Barcelo. Relationship between expression of the PM H⁺-ATPase, growth and ion partitioning in the leaves of salt-treated *Medicago* species. *Planta* 221(4): 557-566, 2005.
22. Sivakumar, P.; P. Sharmila; P. PardhaSaradhi: Proline alleviates salt-stress-induced enhancement in ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279: 512-515, 2000.

23. Teakle, N.L.; T.J. Flowers; D. Real; T.D. Colmer: *Salinity implications on photosynthetic activity*. Journal of Experimental Botany 58(8):2169-2180, 2007.

24. Yuen, G.; Y. Luo; X. Sun; D. Tang: Evaluation of a crop water stress index for detecting water stress in water wheat in the North China Plain. *Agricultural Water Management*, 64 (1): 29-40, 2004.

25. Zeiger, E.; T. Lincoln: *Fisiología Vegetal*. Publicacions de la Universitat Jaume I. 2006, pp. 26-27. ISBN978-84-8021-601-2.

26. ZongSuo, S.: Photosynthetic activity during salt stress in wheat (*Triticuma estivum* L.) genotypes at soil water deficits. *Colloids and Surf. Biointerfaces* 47(2): 132-139, 2006.

Recibido: 23/10 /2012

Aceptado: 15/05/2014