

Andrea Martínez¹, Elena Aguayo¹, Laura Sempere¹, Pedro Díaz-Vivancos²; Reyes Villalba¹, José A Hernández²

¹IES Juan Carlos I; ²Grupo de Biotecnología de Frutales, CEBAS-CSIC, Murcia

INTRODUCCIÓN

La germinación es un proceso fisiológico que incorpora aquellos eventos que comienzan con la absorción de agua por parte de la semilla y acaban con la elongación del eje embrionario y la protrusión de la radícula (Bewley 1997).

Durante este proceso, se produce una activación del metabolismo, incluyendo la producción especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales, siempre que su generación esté bien regulada, parecen ser beneficiosa para la germinación (Bailly et al. 2008).

Para regular la producción de las ROS, las plantas disponen de mecanismos de defensa antioxidantes, que incluye antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Entre las enzimas más importantes, se incluyen catalasa, peroxidasas (POXs) y la ascorbato peroxidasa (APX), para eliminar H₂O₂ (agua oxigenada) y las superóxido dismutasas (SODs) para eliminar radicales superóxido (O₂⁻).

El H₂O₂ se ha empleado para la estimulación de la germinación de muchas especies vegetales como la cebada, espinaca o guisante (Fontaine et al., 1994; Katzman et al., 2001; Barba-Espín et al 2010).

El efecto positivo del H₂O₂ para la germinación puede ser debido a diferentes factores:

- 1.- El metabolismo del H₂O₂ genera O₂, disponible para la respiración mitocondrial (Katzman et al. 2001).
- 2.- Puede favorecer la aparición de grietas en las semillas duras (Chen et al., 1994).
- 3.- Puede contribuir a oxidar compuestos que inhiben la germinación (Ogawa et al., 2001).
- 4.- Disminuir los niveles endógenos de la hormona ABA (que inhibe la germinación) (Wang et al 1998; Barba-Espín et al., 2010).
- 5.- Inducción de proteínas que estimulan el crecimiento vegetal (Barba-Espín et al., 2010, 2011).

En este trabajo, se ha estudiado el efecto de diferentes concentraciones de H₂O₂ sobre la germinación y el crecimiento temprano de semillas de melón, y se estudió, posteriormente, el efecto en los niveles de algunas enzimas que eliminan H₂O₂ y O₂⁻ (catalasa, POXs, APX y SOD).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas de melón híbrido de la variedad EDECOS (Perú) (Seminis, Barcelona).

En los experimentos con semillas peladas (E1), estas se incubaron en presencia de 20 mM H₂O₂ durante 1 hora. En los experimentos con semillas completas (E2), éstas se imbibieron con agua destilada o con H₂O₂ (1 y 50 mM) durante 24 h. Posteriormente, las semillas se lavaron con agua y se colocaron en placas Pettri con papel humedecido en agua destilada y se incubaron a 25°C hasta 72 horas. Pasado este tiempo, las plántulas se pesaron y midieron.

Para la preparación de los extractos crudos, la extracción se realizó en baño de hielo tal y como describieron Barba-Espín et al., (2010). La determinación de las enzimas catalasa, POX, APX y SOD se llevó a cabo en un espectrofotómetro (V-UV Shimadzu) según se describe en Barba-Espín et al (2010). Las proteínas se determinaron según el método de Bradford (1975).

La separación de las diferentes SODs y POXs y su tinción se realizó por electroforesis en condiciones nativas como se describe en Hernández et al (2001).

RESULTADOS

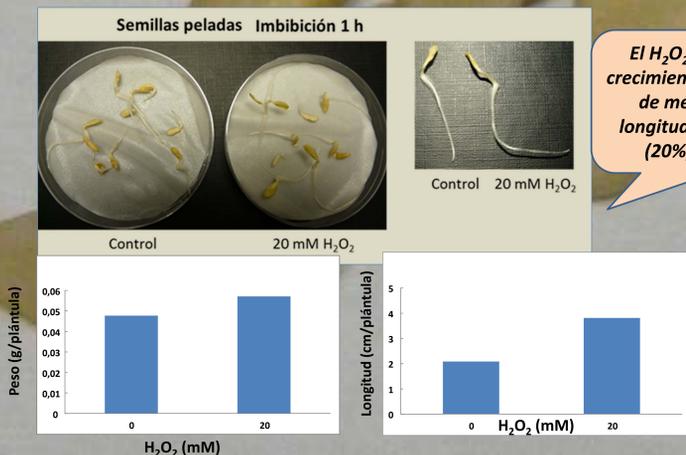


Tabla 1.- Efecto del H₂O₂ 20 mM sobre las enzimas antioxidantes de plántulas de melón

H ₂ O ₂ (mM)	POX	CAT	SOD	APX
<i>Unidades / mg Proteínas</i>				
0	5,69	0,32	8,51	1,12
20	3,51	0,12	8,67	0,87

El H₂O₂ 20 mM reduce la actividad de las enzimas que lo metabolizan.

Fig. 2.- Efecto del H₂O₂ sobre la germinación y crecimiento de semillas completas de melón

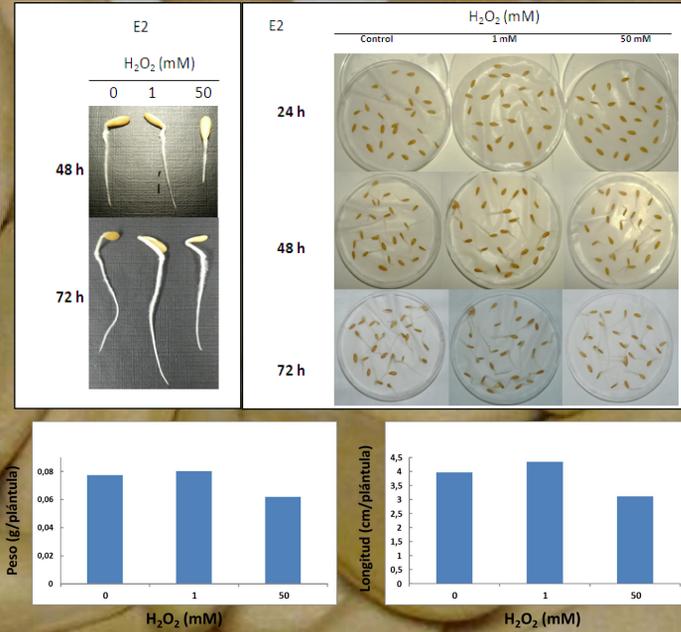
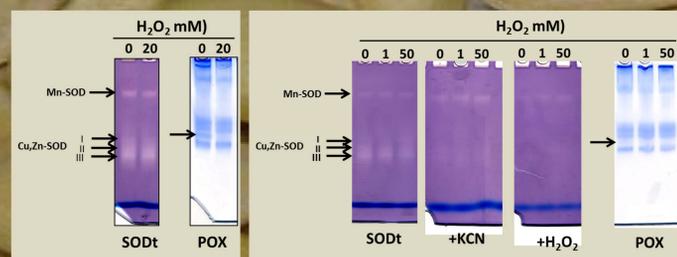


Tabla 2.- Efecto del H₂O₂ (1 y 50 mM) sobre las enzimas antioxidantes de plántulas de melón

H ₂ O ₂ (mM)	POX	CAT	SOD	APX
<i>Unidades / mg Proteínas</i>				
0	12,14	0,15	50,62	2,2
1	4,72	0,14	62,68	1,47
50	4,33	0,17	33,81	1,58

Bajas concentraciones de H₂O₂ reduce las actividades CAT y APX y aumenta la SOD. Altas concentraciones (50 mM) también disminuye las actividades POX y APX pero inhibe la actividad SOD en un 33%.



Las plántulas de melón presentan una Mn-SOD y tres Cu-Zn-SOD, que tienen una resistencia parcial al KCN. Presentan al menos 6 bandas de actividad POX, una de las cuales desaparece en muestras tratadas con el H₂O₂.

Fig. 3. Separación de las diferentes isoenzimas de SOD y POX de plántulas de melón en geles nativos de poliácridamida.

CONCLUSIONES

La imbibición de semillas de melón con H₂O₂ estimula el crecimiento temprano de las plántulas. Este efecto era más evidente en semillas desprovistas de la cubierta. En semillas completas, bajos niveles de H₂O₂ estimulaban el crecimiento, mientras que niveles más elevados lo reducían.

El H₂O₂ a una concentración de 20 mM reducía la actividad de las enzimas POX, CAT y APX. Estas enzimas eliminan H₂O₂. Esto quiere decir que este tratamiento haría que el H₂O₂ se pudiera acumular de una forma controlada en las plántulas de melón y podría explicar el efecto positivo sobre el crecimiento, tal y como se ha descrito en otras especies vegetales (Barba-Espín et al., 2010).

En semillas completas, bajas concentraciones de H₂O₂ (1 mM) producía un descenso de las enzimas CAT y APX (eliminadoras de H₂O₂) y aumentaba la SOD (generadora de H₂O₂). En estas plantas podría acumularse el H₂O₂ debido a una menor capacidad para eliminarlo y a una mayor capacidad para generarlo. Sin embargo, a altas concentraciones (50 mM) también disminuyen las actividades de la POX y del APX pero inhibe la actividad del SOD en un 33%. En este caso, las plántulas acumularían menos H₂O₂ debido a la inhibición de la SOD.

El análisis mediante electroforesis en geles de poliácridamida reveló que las plántulas de melón presentaban 4 isoenzimas con actividad SOD: una Mn-SOD (resistente a KCN y a H₂O₂) y tres Cu,Zn-SODs, denominadas I, II y III en orden de movilidad electroforética creciente. Las isoenzimas Cu,Zn-SOD son inhibidas por KCN y por H₂O₂. Sin embargo, las de melón presentaban una resistencia parcial al KCN. Probablemente sea necesaria una mayor concentración de KCN o un mayor tiempo de incubación para inhibirlas totalmente. El descenso observado en la actividad SOD por efecto del H₂O₂ 50 mM era evidente en los geles, ya que se observó una tinción menos intensa de las Cu,Zn-SODs.

Como conclusión general, podemos decir que el pre-tratamiento de semillas con H₂O₂ puede estimular la germinación y el crecimiento temprano de las plántulas. Por lo tanto, se puede conseguir una vigorización de las mismas. Esta técnica tiene implicaciones prácticas en viveros, con el fin de mejorar el crecimiento y desarrollo de especies de interés agronómico.

BIBLIOGRAFÍA

- Bailly et al. (2008) Comptes Rendus Biologies 331, 806-814.
- Barba-Espín et al. (2010) Plant Cell & Environment 33, 981-994
- Barba-Espín et al. (2011) Plant Cell Environ 34,1907-19.
- Bewley (1997) Plant Cell 9, 1055-1066.
- Bradford (1976) Anal. Biochem.72, 248-254.
- Chen et al. (1993) Science 262, 1883-1886.
- Fontaine et al. (1994) Plant Physiol.Biochem. 32, 677-683
- Hernández et al. (2001) Plant Physiol. 127, 817-831
- Katzman et al. (2001) HortScience 36, 979-981.
- Ogawa and Iwabuchi (2001) Plant Cell Physiol., 42, 286-291.
- Wang et al. (1998) Seed Sci. Res. 8, 129-137