

INDICADORES METABÓLICOS DEL DÉFICIT HÍDRICO, COMO POSIBLE
CRITERIO DE EVALUACIÓN DEL MANEJO DEL RIEGO:
ANÁLISIS EN PIMIENTO (*Capsicum annum* L.)¹

Metabolic indicators of water stress as a possible criterion for the analysis of
irrigation management: the case of sweet pepper (*Capsicum annum* L.)

María Teresa Ponce V.², Gabriel Sellés van S.³, Raúl Ferreyra E.³, José María Peralta A.³,
Stella Moyano A.³ y Patricio Hinrichsen R.³

SUMMARY

The effect of water stress on the proline, glicinbetaine (GB) quaternarium ammonium compound (QAC) contents and patterns of proteins in pepper (*Capsicum annum* L.) plants under greenhouse conditions was evaluated. Results obtained in a drying experience (100 to 22% of soil available water, SAW) showed that in leaves and roots proline began to accumulate when the soil water content was below 75 to 70%, with no apparent GB or QAC accumulation or variations in the protein patterns of leaves and roots. After rewatering to saturation, the proline content of the leaves diminished to levels near those measured before water stress. However, the proline contents in roots were 1.7 times those measured at the beginning of the trial. In a second experiment, maintaining fixed levels of SAW, plants subjected to moderate water stress (between 55 to 45% SAW) and to severe water stress (under 35% of SAW), the proline contents in leaves and roots were clearly higher than those in plants irrigated at 100% of SAW. The accumulation was proportional to water stress level.

Key words: water stress, proline accumulation.

INTRODUCCIÓN

La práctica del riego implica la aplicación de agua al suelo para reponer la consumida por las plantas, con una determinada frecuencia que permita mantener el estado hídrico del cultivo en óptimas condiciones, de modo de obtener altos rendimientos de primera calidad. Cuando los riegos son inadecuados, ya sea porque las cargas de agua son insuficientes o porque las frecuencias no son las correctas, se va desarrollando un déficit hídrico que afectará los rendimientos potenciales del cultivo. El control del estado hídrico de las plantas es, por lo tanto, una herramienta necesaria para evaluar la forma en que se está manejando el riego.

Existen varios métodos para controlar el estado hídrico de un cultivo, los cuales pueden ser directos o indirectos. Dentro de estos últimos se encuentra el control del estado hídrico del suelo,

el cual puede ser expresado como fracción de la humedad aprovechable del suelo o como energía de retención del agua en el suelo o potencial hídrico (Hillel, 1974). Dentro de los métodos directos se encuentra la evaluación del potencial hídrico del agua en la planta, que normalmente se realiza utilizando la técnica de la cámara de presión (Scholander *et al.*, 1965).

Los métodos señalados, sin embargo, por lo general indican situaciones temporalmente puntuales, no reflejando el historial hídrico de la planta a lo largo de su ciclo de desarrollo (Jones, 1990).

Frente a condiciones de un inadecuado abastecimiento de agua (estrés hídrico) las plantas reaccionan de diferente manera, ya sea con respuestas morfológicas, como es la reducción de la velocidad de crecimiento de sus órganos, cambios de posición de las hojas, por citar algunos (Begg, 1980) y respuestas fisiológicas o metabólicas, tales como el cierre estomático (Jones, 1990), la acumulación de ácido absísico (Aspinall, 1980), acumulación de pequeñas moléculas (Wyn Jones y Storey, 1981) y aparición de nuevas proteínas (Lin y Ho, 1987; Bozarth y Boyer, 1987), entre otras.

¹Recepción de originales: 22 de noviembre de 1994.

Financiado por proyecto FONDEF 02-01.

²Escuela de Post-Grado, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile.

³Centro Regional de Investigación La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

Las reacciones metabólicas o fisiológicas se basan en la respuesta de éstas frente a un estrés hídrico (Jones, 1990). Dentro de este contexto se ubica la acumulación de prolina (Levy, 1980), de glicín-betaina (Wyn Jones y Storey, 1981) y la aparición de proteínas específicas (Desgupta y Bewley, 1984).

El objetivo del presente trabajo, de carácter preliminar, fue explorar la sensibilidad de respuesta de la acumulación de prolina, glicín-betaina y la composición de proteínas en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) sujetas a distintos niveles de restricción hídrica, como un aporte a la búsqueda de una posible herramienta de diagnóstico del historial de riego al cual han sido sujetas las plantas durante su desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo, de carácter preliminar, consistió en dos experimentos, que se llevaron a cabo en el Centro Regional de Investigación La Platina del INIA, Región Metropolitana.

Los experimentos se realizaron en invernadero, en plantas de pimiento, variedad Júpiter, cultivadas en maceteros (3,5 kg).

Los maceteros se llenaron con un mezcla de suelo franco, arena y materia orgánica (tierra de hoja), en partes iguales en volumen; se determinó la capacidad de retención de humedad, obteniéndose un contenido de humedad a capacidad de campo de 0,19 y 0,068 g g⁻¹ a porcentaje de marchitez permanente.

La plantación se realizó en octubre de 1993 y las mediciones se realizaron cuando las plantas presentaron una altura promedio de 30 cm (diciembre).

Se realizaron dos experimentos complementarios:

Experimento 1. Este consistió en evaluar el efecto de la disminución gradual de humedad aprovechable del suelo sobre la acumulación de prolina, glicín-betaina (GB), compuestos cuaternarios del amonio (CCA) y la variación de la composición proteica tanto en hojas como raíces de las plantas.

Para ello se utilizaron 35 plantas, las que se colocaron en 7 hileras de 5 maceteros cada una.

En este experimento se realizó un riego a saturación en todos los maceteros y luego se dejó que las plantas extrajeran el agua por un período de 216 hr (período de desecamiento), para volver a regar nuevamente, manteniendo los maceteros cercanos a capacidad de campo por un período de 168 hr (período de recuperación).

Durante el proceso de desecamiento se tomaron muestras para evaluar la variación de humedad aprovechable del suelo (HA), el estado hídrico de las plantas y la evolución de los distintos compuestos señalados. El muestreo se realizó a las 48, 96, 144, 168, 192 y 216 horas contadas desde el inicio de este proceso. Durante el período de recuperación se tomaron muestras a las 24, 71 y 168 horas.

Experimento 2. En este experimento se evaluó la respuesta de la acumulación de prolina frente a distintos niveles de disponibilidad de agua en el suelo, de acuerdo a tres tratamientos de riego:

- Húmedo, que consistió en la mantención de la humedad del suelo entre 100 y 70% de la humedad aprovechable.
- Normal, que correspondió a la mantención de la humedad del suelo entre 50 y 40% de la humedad aprovechable, valores correspondientes al umbral de riego descrito para pimiento (Doo-rembos y Pruitt, 1977, Ferreyra *et al.*, 1984).
- Seco, en el cual se mantuvo la humedad aprovechable del suelo por bajo del 35%.

Cada tratamiento se efectuó en 9 maceteros, dispuestos en tres hileras de tres plantas cada una, repetidos tres veces. A objeto de evitar posibles efectos de luminosidad del invernadero sobre los tratamientos se utilizó un diseño estadístico de cuadrado latino.

Los tratamientos se aplicaron durante tres semanas, en las cuales el riego se efectuó diariamente a partir del consumo determinado por pesada de los tres maceteros centrales de cada tratamiento y repetición; de esta forma se mantuvo el contenido de humedad en los valores preestablecidos para cada tratamiento, sin grandes variaciones a lo largo del experimento.

Los resultados se sometieron a análisis de varianza y las posibles diferencias, fueron analizadas mediante pruebas de comparación múltiple de Duncan.

En ambos experimentos se midió el contenido de humedad del suelo, mediante el método gravimétrico descrito por Caseel y Nielsen (1986); el potencial hídrico a mediodía en hojas completamente expandidas, mediante el método de la bomba a presión, descrito por Scholander *et al.* (1965) y modificado por Turner (1981). El contenido de prolina en hojas y raíces se determinó según el método descrito por Bates *et al.* (1973). Para esta medición se utilizaron entre 3 a 4 hojas ubicadas cerca del ápice y totalmente expandidas. En raíces, se tomaron raíces secundarias, formando una muestra compuesta.

Adicionalmente, en el experimento 1 se midió, tanto en hojas como raíces, la concentración de glicín-betaina y compuestos cuaternarios del amonio, según el método descrito por Grieve y Grattan (1983) y la variación de la composición de proteínas, mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, según la técnica descrita por Laemmli (1970).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. La humedad aprovechable (HA) durante el período de desecamiento, llegó a valores cercanos al 22% (Figura 1). El potencial hídrico de las hojas por su parte (Figura 2), bajó de -0,6 a -2,6 MPa al término del período de desecamiento (220 hr), sin embargo, entre las 100 y 140 horas, cuando la HA presentó valores entre 40 y 60%, el potencial hídrico se estabilizó en torno a -1,6 MPa, lo que podría estar asociado a un control estomático de las pérdidas de agua. Posteriormente, el potencial disminuyó rápidamente, llegando a -2,6 MPa al término del desecamiento, cuando la HA disminuyó considerablemente.

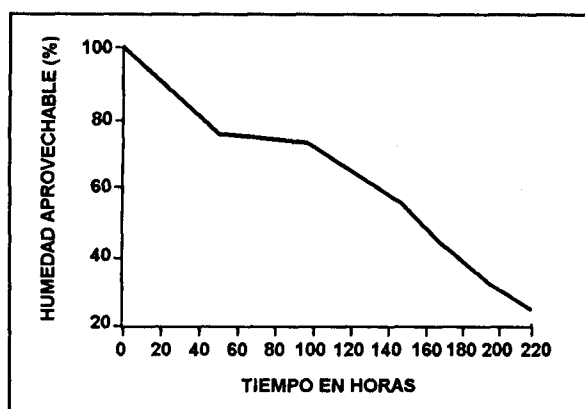


FIGURA 1. Variación de la humedad aprovechable del suelo (HA) durante el período de desecamiento.

FIGURE 1. Soil available water (HA) change during the drying period.

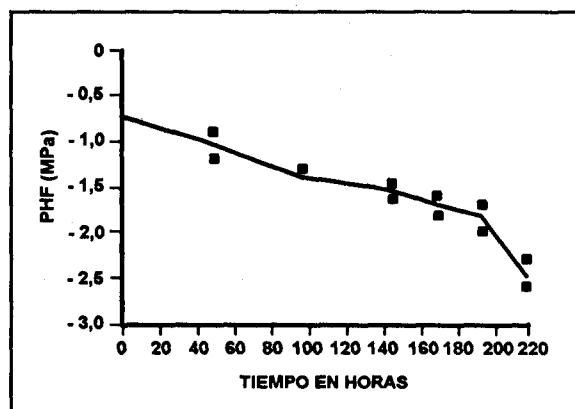


FIGURA 2. Variación del potencial hídrico foliar (PHF) durante el período de desecamiento.

FIGURE 2. Leaf water potential (PHF) change during the drying period.

Durante el período de estrés a que fueron sometidas las plantas en el experimento 1, no se detectó acumulación de GB ni de CCA. En las hojas se midió una concentración de 0,42 y 1,11 mg g⁻¹ de materia seca de GB y CCA, respectivamente. En raíces sólo se registró la presencia de CCA en una concentración de 1,6 mg g⁻¹ de materia seca. La acumulación de GB frente a un estrés hídrico o salino ha sido observada en varias especies, sin embargo, el estrés salino parece ser más determinante en la acumulación de este metabolito (Wyn Jones y Storey, 1981). Por otra parte, la acumulación de GB está correlacionado con la cantidad que presentan las plantas en condiciones normales. Si esta es pequeña, no es esperable una gran acumulación del compuesto en respuesta a una condición de estrés (Hanson y Hitz, 1982). La ausencia de respuesta observada se podría deber a que los mecanismos involucrados en la acumulación de GB no han sido afectados a los niveles de estrés hídrico alcanzado por las plantas en las condiciones de este ensayo, o bien, simplemente que la acumulación de GB no responde al estrés hídrico en esta especie.

Tampoco se observó una variación en la composición de proteínas en respuesta al estrés hídrico. Efectos del estrés hídrico sobre la composición proteica ha sido observada en algunas especies tales como tomate (Lin y Ho, 1987), cebada (Jacobsen *et al.*, 1986) y soja (Bozarth y Boyer, 1987). Por ejemplo, en cebada (Jacobsen *et al.*, 1986) se encontró la acumulación de una proteína de 60 kilodalton (KDa) y en soja y tomate una de aproximadamente 28 KDa (Bozarth y Boyer, 1987; Lin y Ho, 1987).

A diferencia de los compuestos señalados, la prolina se acumuló tanto en hojas como raíces. Los contenidos iniciales de prolina fueron, en promedio, $256 \mu\text{g g}^{-1}$ de materia fresca (mf) y $268 \mu\text{g g}^{-1}$ de mf en raíces, llegando al término del experimento a valores superiores a 1.000 y $800 \mu\text{g g}^{-1}$ de mf, en hojas y raíces, respectivamente.

En ambos órganos la prolina presente aumentó rápidamente cuando la HA disminuyó por bajo 75 a 70% (figuras 3a y 3b). Por otra parte, con respecto al potencial hídrico foliar, la concentración de prolina se produjo cuando este disminuyó por bajo $-1,6$ a $-1,7$ MPa (figuras 4a y 4b). De acuerdo a estos resultados, la acumulación de prolina en plantas de pimiento se manifiesta frente a estrés moderados a severos y la cantidad acumulada es función de la intensidad del estrés, lo que concuerda con lo señalado por Hanson y Hitz (1982). La acumulación de prolina es una respuesta a la disminución del potencial hídrico en los tejidos; sin embargo, no está claro si es un efecto del potencial osmótico o de turgencia o ambos a la vez (Aspinall y Paleg, 1981).

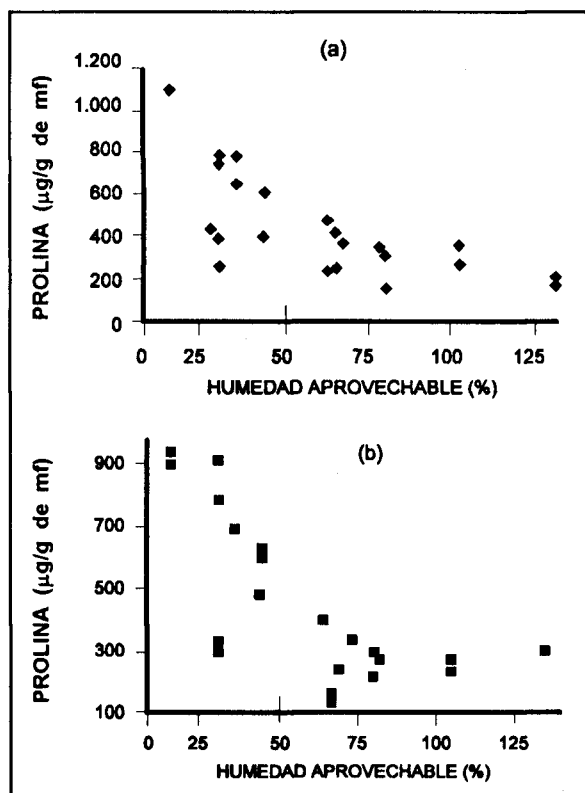


FIGURA 3. Relación entre la humedad aprovechable del suelo y el contenido de prolina en las hojas (a) y en las raíces (b).

FIGURE 3. Relationship between soil available water and proline content in leaves (a) and roots (b).

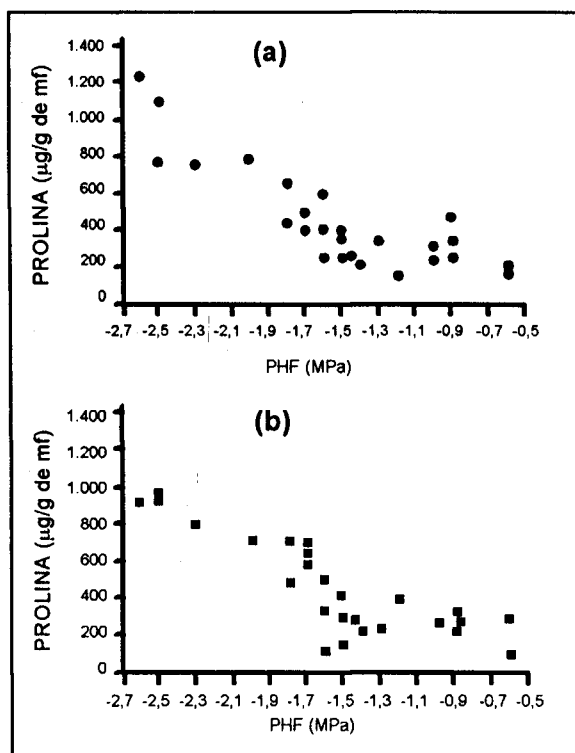


FIGURA 4. Relación entre el potencial hídrico foliar (PHF) y el contenido de prolina en las hojas (a) y en las raíces (b).

FIGURE 4. Relationship between leaf water potential (PHF) and proline content in leaves (a) and roots (b).

En condiciones de estrés se produciría síntesis de novo, ya que la cantidad que se acumula no guarda relación con la prolina contenida en las proteínas y la liberada por proteólisis de las mismas (Aspinall y Paleg, 1981, Fukutoku y Yamada 1984).

Una vez complementado el período de desecamiento, los maceteros se regaron a saturación, iniciándose el período de recuperación hídrica, en el cual la HA del suelo se mantuvo cercana a 100% durante las 168 hr que duraron las mediciones. Los potenciales hídricos foliares se mantuvieron entre $-0,75$ y $-0,90$ MPa, ligeramente inferiores a los medidos al inicio del experimento. Los niveles de prolina tanto en hojas como raíces disminuyeron rápidamente luego de aliviado el estrés hídrico (Figura 5), lo que concuerda con lo observado por diferentes autores en distintas especies: en cebada (Singh et al., 1973), sorgo (Aspinall y Paleg, 1981); y limoneros (Levy, 1980). Esta pérdida se debe principalmente a su oxidación a glutamato. En las raíces, sin embargo, la concentración de prolina se mantuvo 1,75 veces mayor que la medida al inicio del experimento 1

(Figura 5). Esto se podría deber a una mayor tasa de inhibición de las enzimas responsables de la oxidación de la prolina a glutamato en raíces que en las hojas, como consecuencia de la magnitud del estrés hídrico (El Sayed, 1992).

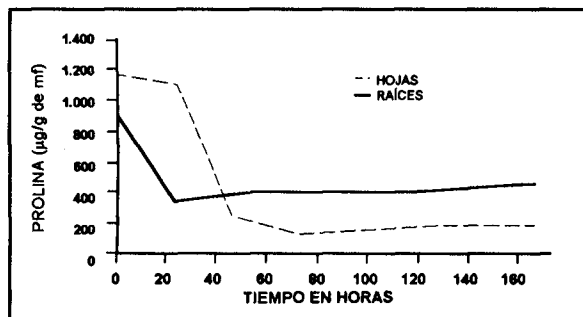


FIGURA 5. Variación del contenido de prolina en hojas y raíces después de riego.

FIGURE 5. Change on proline concentration in leaves and roots after irrigation.

Experimento 2. En el Cuadro 1 se presentan las condiciones de HA del suelo y potencial hídrico foliar que caracterizaron los tratamientos de riego durante las tres semanas que duró el experimento. Tanto los valores de HA como los potenciales hídricos medidos fueron estadísticamente diferentes entre los tratamientos ($P \leq 0,10$ y $P \leq 0,05$, respectivamente).

A pesar de que en todos los tratamientos se realizaron aplicaciones diarias de agua para mantener los niveles de HA de cada tratamiento, los contenidos de prolina tanto en hojas como raíces fueron estadísticamente diferentes entre ellos ($P \leq 0,10$), durante las tres semanas que duró

CUADRO 1. Humedad aprovechable (HA, %) y potencial hídrico foliar (PHF, MPa) en cada tratamiento de riego, durante las tres semanas de experimento

TABLE 1. Soil available water (HA, %) and leaf water potential (PHF, MPa) in each irrigation treatment during the three weeks of experience

	Tratamiento	Primera semana	Segunda semana	Tercera semana
HA	Húmedo	136,0 a	115,0 a	105,0 a
	Normal	67,8 b	39,2 b	41,6 b
	Seco	49,2 c	18,3 c	22,5 c
PHF	Húmedo	-0,65 a	-0,66 a	-0,67 a
	Normal	-0,90 b	-1,50 b	-1,32 b
	Seco	-1,65 c	-2,18 c	-2,15 c

este experimento (figuras 6a y 6b), lo que estaría indicando que la prolina se acumula frente a un estrés permanente cuando éstos son moderados a severos, aun cuando exista una cierta aplicación de agua. Por otra parte, en las mismas figuras se puede observar que, en cada tratamiento, las cantidades de prolina medida en las distintas semanas, fueron similares, por lo que su acumulación estaría más determinada por la intensidad del estrés a la cual son sometidas las plantas que por la duración del mismo, lo que concuerda con lo señalado por Hanson y Hitz (1982).

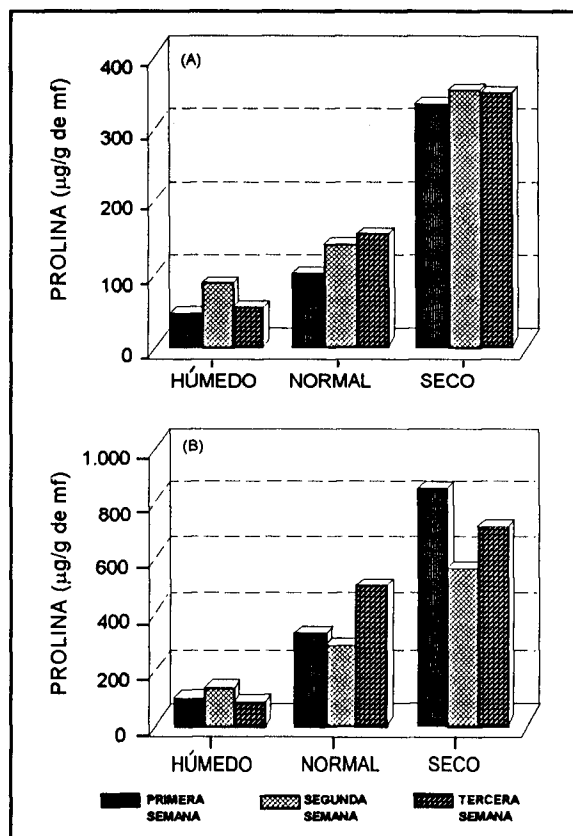


FIGURA 6. Contenido de prolina en las hojas (a) y raíces (b) en cada tratamiento de riego.

FIGURE 6. Proline content in pepper leaves (a) and roots (b) in each irrigation treatment.

CONCLUSIONES

- La prolina fue el único compuesto que se acumuló en las hojas y raíces, como respuesta a un estrés hídrico en pimiento.
- En pimiento la acumulación de prolina comenzó a producirse frente a un estrés moderado.

- La acumulación de prolina disminuyó rápidamente luego de recuperado el estrés hídrico, sin embargo, se mantuvo elevada cuando los riegos fueron deficitarios, aun cuando estos se realicen diariamente.
- Esta última característica podría ser útil para usar este aminoácido como indicador del historial hídrico de las plantas; sin embargo, será necesario correlacionar la acumulación de prolina con parámetros de crecimiento para juzgar su sensibilidad como indicador.

RESUMEN

En dos experimentos de carácter preliminar se evaluó el efecto del estrés hídrico sobre la acumulación de prolina, glicín-betaina (GB), compuestos cuaternarios totales del amonio (CCA) y la composición de proteínas en plantas de pimiento (*Capsicum annum L.*), cultivadas en condiciones de invernadero. Los resultados obtenidos en una primera experiencia de desecamiento (entre 100 y 22% de humedad aprovechable del suelo, HA) mostraron que, tanto en hojas como raíces, la prolina se comienza a acumular cuando la HA disminuye por bajo 75 a 70% de la HA, no observándose acumulación GB, CCA ni variaciones en la composición de proteínas de las plantas. Luego de un riego a saturación el contenido de prolina de las hojas disminuye a niveles cer-

canos a los medidos antes del déficit, sin embargo, en las raíces los contenidos de prolina presentaron valores 1,7 veces mayor que la medida al inicio del experimento. En un segundo experimento, en el que se mantuvieron diferentes niveles permanentes de HA en el suelo, plantas sometidas déficit hídricos moderados (entre 55 a 45% de HA) y severos (35 a 25% de HA) los contenidos de prolina en hojas y raíces son claramente superiores a plantas bien regadas (100 a 70% de HA), siendo la acumulación de prolina proporcional a la magnitud del déficit hídrico sufrido por las plantas.

Palabras claves: estrés hídrico, acumulación de prolina.

LITERATURA CITADA

- ASPINALL, D. 1980. Role of abscisic acid and other hormones in adaptation to water stress. In: Turner, N.C. and P.J. Kramer (ed.). Adaptation of plant to water and high temperature stress. John Wiley & Sons. p.: 155-172.
- ASPINALL, D. and PALEG, L.G. 1981. Proline accumulation: Physiological aspects. In: Paleg, L.G. and D. Aspinall (ed.). Drought Resistance in plants. Academic Press. p.: 206-240.
- BATES, L.S., WALDREN, R.P., and TEARE, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
- BEGG, J.E. 1980. Morphological adaptations of leaves to water stress. In: Turner, N.C. and P.J. Kramer (ed.). Adaptation of plant to water and high temperature stress. John Wiley & Sons. p.: 155-172.
- BOZARTH, C.S. and BOYER J.S. 1987. Characterization of a cell wall protein which is altered at low potential. Plant Physiology 83 Nº 4 (Supl.) Abstract 282.
- CASSEL, D.K. and NIELSEN, D.R. 1986. Field capacity and available water capacity. In: Klute, A. (ed.). Methods of soil analysis. Physical and mineralogical methods. Vol. 1. American Society of Agronomy, Inc. p.: 901-24.
- DESGUPTA, J. and BEWLEY, J.D. 1984. Variations in protein synthesis in different regions of greening leaves of Barley seedlings and effect of imposed water stress. Journal of Experimental Botany 35 (159): 1450-59.
- DOOREMBOS, J. and PRUITT, W.D. 1977. Crop water requirements. Serie FAO Irrigation and drainage Nº 24. 180 p.
- EL SAYED, H. 1992. Proline metabolism during water stress in sweet pepper (*Capricum annum L.*) Plant. Phyton (Horn, Austria) 32(2): 255-261.
- FERREYRA, R., SELLÉS, G. y GONZÁLEZ, M. 1984. Efecto de diferentes alturas de agua sobre el cultivo del Pimentón. III. Relaciones hídricas del cultivo y absorción de N-P-K. Agricultura Técnica (Chile) 47: 304-307.
- FUKUTUKU, Y. and YAMADA, Y. 1984. Sources of proline nitrogen in stressed soybean (*Glicine max*). II. Fate of 15 N-labeled protein. Physiologia Plantarum 61: 622-628.
- GRIEVE, C.M. and GRATTAN, S.R. 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternarium compounds. Plant and Soil 70: 303-307.
- HANSON, A.D. and HITZ, W.D. 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. Annual Review of Plant Physiology 33: 163-203.

- HILLEL, D. 1974. *L'eau et le sol. Principes et processus physiques.* Academic Press. 286 p.
- JACOBSEN, J.V. HANSON, A.D. and CHANDLER, P.C. 1986. Water stress enhances expression of an α -amylase in barley leaves. *Plant Physiology* 80: 350-59.
- JONES, H.J. 1990. Physiological aspects of control of water status in Horticultural Crops. *HortScience* 25: 19-23.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-87.
- LEVY, Y. 1980. Field determination of free proline accumulation and water-stress in lemon trees. *HortScience* 15: 302-303.
- LIN, L.-S. and HO, T.-H. D. 1987. Salt and water stress induced proteins in barley aleurone layers. *Plant Physiology* 83 N^o 4 (Supl.) Abstract. 288.
- SINGH, T.N., PALEG, L.G. and ASPINALL, D. 1973. Stress metabolism. I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. *Australian Journal of Biological Science* 26: 45-56.
- SCHOLANDER, P.F., HAMMEL, H.T., BRADSTEET, E.D. and HEMMINGSEN, E.A. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346.
- TURNER, N.C. 1981. Techniques and experimental approaches for measurement of plant water status. *Soil and Plant* 58: 339-366.
- WYN JONES, R.G. and STOREY, R. 1981. Betaines. In: Paleg, L.G. and D. Aspinall (ed.). *Drought Resistance in plants.* Academic Press. p.: 172-204.