



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

MODALIDAD PASANTÍA

“ DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE
MEMBRANA CELULAR COMO INDICADOR DE
ESTRÉS TÉRMICO EN LIMÓN (*CITRUS LIMON*) CV
'EUREKA' INJERTADO SOBRE LIMÓN RUGOSO
(*CITRUS JAMBHIRI LUSH*) ”



Alumno: Anselmo Ricardo, González Galarza.

Asesor: Ing. Agr. (Mgter.) María de las M. Yfran Elvira.

Lugar de Trabajo: Cátedra de Química Analítica y Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias. U.N.N.E. Sargent Cabral 2131 (3400). Corrientes, Argentina.

INDICE:

<u>INTRODUCCIÓN</u>	2
<u>OBJETIVOS</u>	3
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	3
<u>RESULTADOS</u>	7
<u>COMENTARIOS FINALES</u>	10
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	11

INTRODUCCIÓN

Argentina se destaca como octavo productor mundial de cítricos y principal productor mundial de limón. La citricultura es una de las principales actividades económicas de las regiones Noroeste (NOA) y Noreste (NEA) del país, especialmente en las provincias de Tucumán, Jujuy, Salta, Entre Ríos y Corrientes. A su vez los productores se enfrentan a un mercado dinámico y competitivo en el cual, como sucede en otros mercados alimenticios, cada vez son mayores los requisitos de calidad e inocuidad. Por ello es necesario conocer e integrar todos los factores que afectan la producción (1). Entre los factores climáticos que ejercen influencia sobre los cítricos, se destaca la temperatura. El rango óptimo se establece entre 23°-34°C, asimismo el intervalo de 25°C a 30°C se consideran favorables para la actividad fotosintética, señalándose como valores máximos sin efectos secundarios indeseables 39°C y mínimo de 13°C, sin embargo, a partir de 10°C aparecen efectos secundarios y cesa la actividad (2).

La exposición de las plantas al calor intenso ($>50^{\circ}\text{C}$) ocasiona severos daños celulares e incluso colapso celular en minutos, lo que podría causar un grave deterioro en la organización celular (3).

En cambio, cuando las temperaturas son altas y moderadas, los daños o muerte solo pueden ocurrir después de una exposición prolongada; las **alteraciones indirectas** lo podemos advertir como: aumento de la demanda evaporativa del aire, elevación desmedida de la transpiración, y disminución de la conductancia estomática. Esto reduce la disipación del calor que lleva a quemaduras, abscisión temprana de hojas, aborto de flores y/o frutos, perdida de viabilidad del polen e inhibición del crecimiento; por otra parte, las **alteraciones directas** comprenden: inactivación de enzimas en cloroplastos y mitocondrias, inhibición de la síntesis, desnaturización y agregación de proteínas, pérdida de la integridad de la membrana, incremento de la fluidez de los lípidos, fuga de electrolitos y formación de lesiones superficiales que facilitan el desarrollo de infecciones, senescencias y muerte celular (4,5,6).

Las membranas celulares son uno de los componentes más sensibles al estrés por calor en las células de las plantas (7) que lleva a cambios en su función, composición y estructura (8). La ruptura o daño que se producen en ellas conducen a la pérdida de electrolitos (aminoácidos, ácidos orgánicos, proteínas y otros solutos) (9).

Sullivan (10) desarrolló una prueba para medir la tolerancia al calor, la cual determina la termo-estabilidad de la membrana celular a través de la medición de la cantidad de electrolitos perdidos en discos de hojas (mediante lecturas de la conductividad eléctrica), después de una exposición a un tratamiento de calor ($>40^{\circ}\text{C}$). Los resultados obtenidos por la pérdida de electrolitos puede ser un criterio de selección indirecto para la tolerancia al calor (11,12,13). Sin embargo, la sensibilidad sobre los procesos fisiológicos varía según el estado general del cultivo, etapa fenológica, especie, genotipo, y los niveles de temperatura (asociada a su intensidad, duración y tasa de ascenso) (14). Un genotipo es tolerante cuando la pérdida de electrolitos es baja, debido a una alta termo-estabilidad de la membrana (15).

Las características específicas de los lípidos que conforman la membrana celular varían con la especie (15). Debido a esto, la estabilidad de la membrana también cambia bajo estrés por calor. Por ésta razón, dado el interés y alcance de lo señalado, la importancia de la tarea a desarrollar radica en la posibilidad de probar dicha técnica para los cítricos, y así obtener datos preliminares acerca de la permeabilidad de la membrana celular y daño celular relativo como indicadores de estrés térmico en plantas de limón.

OBJETIVOS

Adquirir destreza en la recepción, acondicionamiento y procesamiento de las muestras para su análisis y puesta a punto de la técnica de determinación de la estabilidad de membrana celular en hojas de limón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del presente trabajo se tomaron muestras provenientes de ensayos de lotes comerciales homogéneos de Limón (*Citrus limón*) cv 'Eureka' injertado sobre Limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush) de 11 años de edad, y una densidad de 357 plantas ha^{-1} en el Departamento Mburucuyá, Corrientes-Argentina, el día 16 de enero del año 2023 registrando temperatura de 35°C en horas del mediodía, considerando la franja horaria de mayor estrés térmico (dato disponible en [Sistema de Gestión CLIMA \(bolsacer.org.ar\)](http://Sistema de Gestión CLIMA (bolsacer.org.ar))).

El tamaño de la muestra seleccionada de forma aleatoria fue de 28 árboles, colectando la tercera o cuarta hoja en buen estado sanitario y nutricional; una en cada cuadrante y a la altura media de la planta generada en la primavera o bien la tercera o cuarta hoja después que los frutos hayan alcanzado un tamaño de 3-4 cm de diámetro.

Cada muestra fue puesta en bolsa y almacenada en conservadora con agua sin hielo de manera tal que conserve las condiciones de temperatura ambiente reinantes para su envío inmediato al laboratorio.

Las mediciones de la termo-estabilidad de la membrana celular se realizaron en el departamento de Química Analítica y Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, siguiendo el procedimiento inicial propuesto por Sullivan (10):

1. Se realizaron cortes de aproximadamente 1cm² de hojas de limón con eliminación de la vena media, cubriendo un área foliar de 10 y 20 cm² por muestra, tomadas de la misma lámina (Figura 1) y que fueron colocados rápidamente en tubos de ensayos. Seguidamente, se construyeron dos grupos de 28 tubos cada uno, para diferentes procesos térmicos en ambas áreas foliares, contabilizando un total de 112 muestras procesadas.



Figura 1: procesamiento de las muestras tomando un Área foliar de 10 y 20 cm² para la determinación de la estabilidad de membrana.

2. Cada muestra se lavó tres veces con agua destilada a temperatura ambiente (25°C), a fin de eliminar los electrolitos liberados debido al corte del tejido y que las mismas permanezcan húmedas.
3. Después del lavado, se agregaron 2mL de agua destilada a cada tubo de ensayo, cubriéndolos con una película de papel aluminio a fin de evitar la desecación y evaporación durante los sometimientos de calor.

4. El 1^{er} grupo de tubos fueron sumergidos en baño maría y llevados a estufa manteniendo el control de la temperatura de 45°C por 1 hora (Tratamiento); y el 2^{do} grupo se mantuvo en condiciones ambientales a 25°C durante el mismo periodo (Control) (Figura 2).



Figura 2: grupo de muestras que fueron sometidos a tratamiento térmico de 45°C por 1h

5. Terminado el procedimiento anterior, se agregaron 10mL de agua destilada al número total de tubos y llevados a 10°C por 24 horas en el refrigerador para permitir la difusión de electrolitos.
6. Transcurrido dicho tiempo se dejaron reposar a 25 °C por 1 hora.
7. Luego se procedió a realizar la 1^{ra} lectura de la conductividad eléctrica (CE₁) con el conductímetro de laboratorio Digital Conductivity Meter (marca APERA EC700 con compensación de temperatura automática) [determinando T₁ y C₁] (Figura 3).



Figura 3: Uso del conductímetro para la medición de la CE a temperatura ambiente.

8. Seguidamente, el total de las muestras (tratadas y control) se introdujeron en autoclave (a 120°C y 1 atm de presión) por 15 min para destruir el tejido completamente y liberar todos los electrolitos (Figura 4).



Figura 4: Uso del Autoclave facilitado por el departamento de Fisiología Vegetal con las muestras.

9. Una vez finalizado el paso anterior, se dejaron reposar a 25 °C por 1 hora.
10. Posteriormente se realizó la 2^{da} lectura de la CE (CE₂) [determinando T₂ y C₂].
11. La estabilidad de membrana celular se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{CMS \%} = [1 - (T_1/T_2) / 1 - (C_1/C_2)] \times 100$$

Donde, **T** corresponde al valor de CE de las muestras que recibieron tratamiento térmico en baño maría a 45°C y **C** corresponde al valor de CE testigo a 25°C. Los subíndices ₁ y ₂ concierne a la lectura de CE inicial y final (pre y post autoclave respectivamente).

12. El % de daño celular relativo (DCR) se llegó a partir de:

$$\text{DCR (\%)} = 100 - \text{CMS (\%)}$$

RESULTADOS

A partir de las mediciones de la conductividad eléctrica y posterior determinación de la estabilidad y daño de la membrana celular, siguiendo el protocolo sugerido por (10) y (16) podemos observar que cuanto mayor sea la conductividad eléctrica, mayor será la perdida de electrolitos y menor su retención en relación al total contenido en el tejido, resultando así en una menor estabilidad de la membrana y mayor daño celular relativo.

Los resultados de este estudio, evaluando una superficie foliar de 10 cm^2 , confirman que se evidencia mayor estabilidad de membrana celular [EMC] (entre 76 y 96%) y menor daño celular (valores menores de 24 a 4%) en las muestras provenientes de árboles numerados del 21 al 28, lo que señala su mayor tolerancia al calor. En general el resto presentaron valores menores de 71% de EMC y daños de entre 29 y hasta 68% (Figura 5).

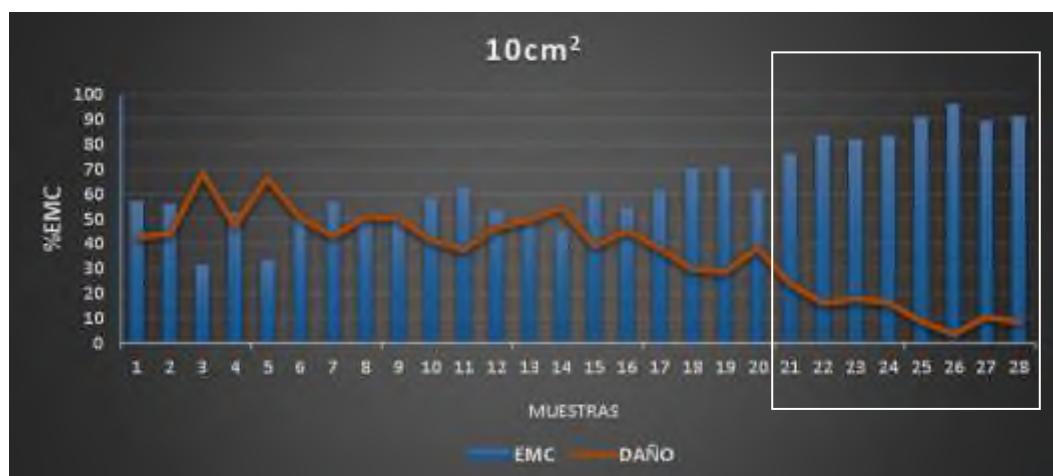


Figura 5: grafico combinado de EMC (columnas) y Daño a la membrana celular (línea) en Limón (*Citrus limón*) cv 'Eureka' en muestras de 10 cm^2 de área foliar en respuesta al incremento de la temperatura de exposición del tejido foliar mediante el método de la termoestabilidad de la membrana celular.

En tanto, la evaluación del área foliar de 20 cm^2 (Figura 6), se hallaron EMC entre 37% y 67%, excepto las muestras correspondientes del 21 al 28 que superan valores de 80% de EMC, acompañados de valores de daño celular relativo bajos (de 2 a 19%).

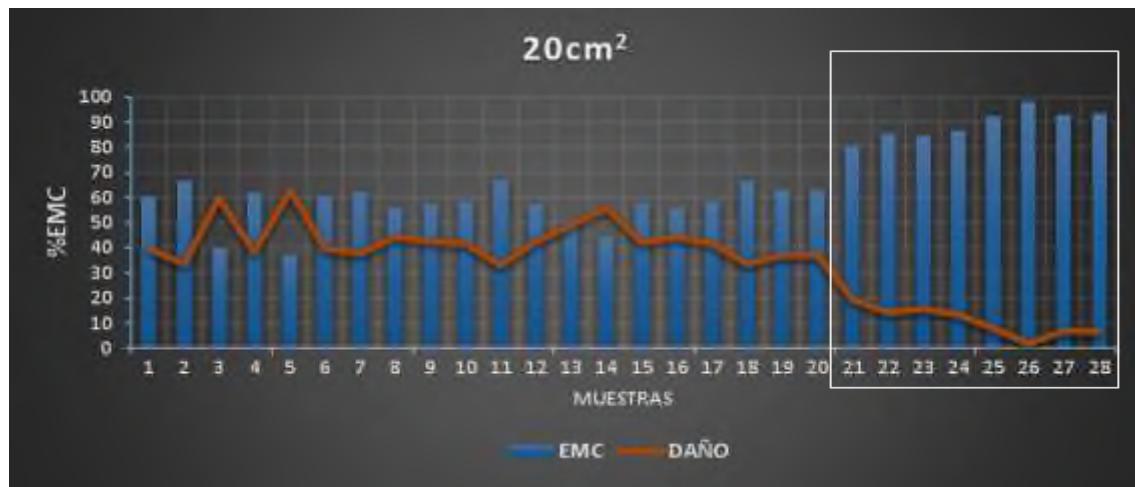


Figura 6: grafico combinado de EMC (columnas) y Daño a la membrana celular (línea) en Limón (*Citrus limón*) cv 'Eureka' en muestras de 20 cm^2 de área foliar en respuesta al incremento de la temperatura de exposición del tejido foliar mediante el método de la termoestabilidad de la membrana celular.

De acuerdo a lo esperado, los aumentos de la temperatura bajo estrés por calor provocaron incrementos en el Daño celular, lo cual coincide con lo encontrado en cultivos de maíz, frijol y quínoa (16, 17, 18).

El porcentaje de daño por exposición a alta temperatura y la pérdida de electrolitos de la célula, a partir de mediciones condutometricas es un método fiable y fácil de realizar (19). A partir de evaluaciones de termoestabilidad en diversos cultivos señalaron un aumento significativo en el rendimiento en lugares cálidos a partir de la selección de líneas con membranas termoestables (20). Por ello se conoce que los cultivos subtropicales han desarrollado diversos mecanismos para hacer frente a los efectos nocivos del estrés por calor, en particular, bajo estrés térmico no letal ($<40^\circ\text{C}$); así pueden ser inducidas para ajustar la condición de estrés, como es la aclimatación al calor, que resulta de cambios de muchas respuestas fisiológicas y bioquímicas de las plantas (21, 22).

En cuanto al análisis de las superficies foliares probadas no se ve diferencia marcada en los resultados, por lo tanto, se pueden utilizar cualquiera de las dos superficies para la metodología descrita (Figura 7); teniendo en cuenta que la utilización de menor cantidad de material vegetal resulta más conveniente por su facilidad en el procesamiento de las muestras.

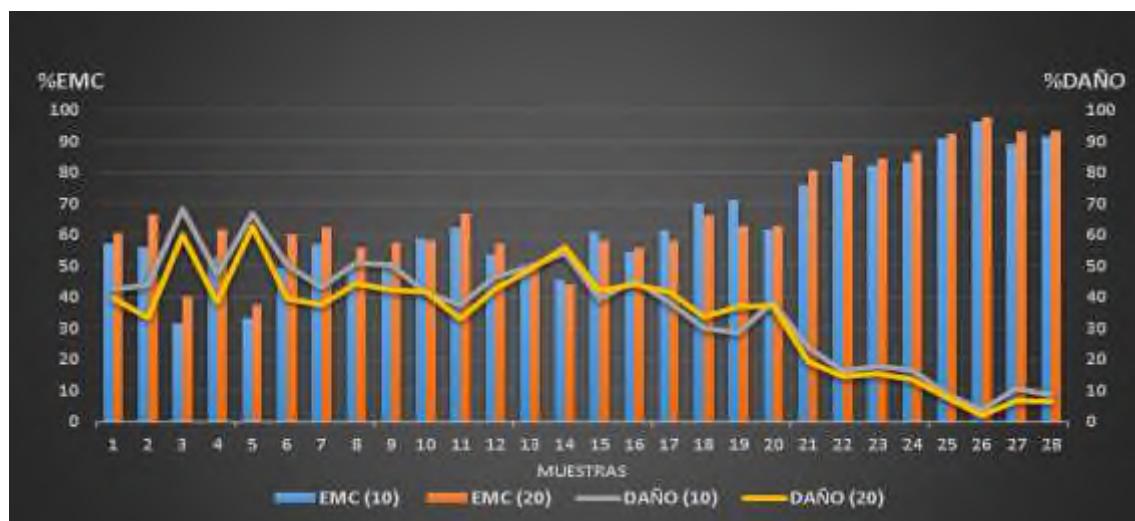


Figura 7: Estabilidad de membrana y Daño de membrana celular para las dos superficies foliares evaluadas (10 cm^2 y 20 cm^2).

COMENTARIOS FINALES

El trabajo de laboratorio es de suma importancia, siguiendo los protocolos, desde el acondicionamiento de las muestras para su análisis, y hasta cada paso de los procedimientos para la determinación de la EMC y posterior análisis de resultados. La importancia de las determinaciones que en la teoría se resaltan y que en la práctica se evidencian, donde se debe destacar la habilidad de la persona que realiza la práctica, donde mínimas distracciones o la propia humanidad juegan un papel importante en no cometer errores y que el análisis se realice de la forma más precisa posible y arribar a resultados fidedignos.

La determinación de la estabilidad de membrana celular (EMC) y de Daño celular es un método rápido y seguro para determinar plantas más tolerantes al estrés por calor. Por esta razón se ha llevado a cabo el acondicionamiento y procesamiento de las muestras para su análisis y puesta a punto de la técnica en hojas de limón.

El análisis de los resultados indicó que la EMC y daño en este estudio fue similar en cuanto a las dos superficies foliares probadas (10 y 20 cm²), a su vez, que las muestras de los arboles 21 al 28 presentaron mayor EMC y menor daño, indicando mayor tolerancia de estas plantas al estrés por calor respecto al resto de las plantas de Limón (*Citrus limón*) cv 'Eureka'.

BIBLIOGRAFIA:

- 1- <https://www.federicitrus.org/wp-content/uploads/2018/05/Actividad-Citricola-2018.pdf>
- 2- Agustí M. Citricultura, 2010, 2^a Edición. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España.
- 3- Schoffl F., R. Prandl & A. Reindl. 1999. Molecular responses to heat stress. In: Shinozaki, K, Yamaguchi-Shinozaki, K. (Eds.), Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants. R.G. Landes Co.,Austin, Texas, pp. 81–98.
- 4- Chaves-Barrantes, Néstor Felipe; Gutiérrez-Soto, Marco Vinicio. 2017. Respuestas al estrés por calor en los cultivos II. Tolerancia y tratamiento agronómico. Agronomía Mesoamericana, vol. 28. Universidad de Costa Rica.
- 5- Wahid A., S. Gelani, M. Ashraf & M.R. Foolad. 2007. Heat tolerance in plants. Environmental and experimental Botany 61, 199-223.
- 6- Howarth C.J. 2005. Genetic improvements of tolerance to high temperature. In: Ashraf, M., Harris, P.J.C. (Eds.), Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches. Press Inc., New York.
- 7- Wang, L.C., M.C. Tsai, K.Y. Chang, Y.S. Fan, C.H. Yeh, and S.J. Wu. 2011. Involvement of the *Arabidopsis* HIT1/AtVPS53 tethering protein homologue in the acclimation of the plasma membrane to heat stress. *J. Exp. Bot.* 62:3609-3620.
- 8- Barnabas B., Jager K., Feher A. 2008. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ.* 31: 11-38.
- 9- McDaniel R.G. 1982. The physiology of temperature effects on plants. In: Christiansen, M.N., and Lewis C.F. (eds), pp. 13-45. Breeding plants for less favorable environments. Wiley, New York. 459 p.
- 10- Sullivan, C.Y. 1972. Mechanisms of heat and drought resistance in grain sorghum and methods of measurement. En: Rao, N.G.P., and L.R. House (eds), pp. 247-264. Sorghum in the seventies. Oxford & IBH Publishing Co. New Delhi, India. 638 p.
- 11- Blum, A., N. Klueva y H.T. Nguyen 2001. Wheat cellular thermotolerance is related to yield under heat stress. *Euphytica* 117: 117-123.
- 12- ur Rahman, H., S.A. Malik y M. Saleem 2004. Heat tolerance of upland cotton during the fruiting stage evaluated using cellular membrane thermostability. *Field Crops Research* 85: 149-158.
- 13- Thiaw, S. y A.E. Hall (2004). Comparison of selection for either leaf- electrolyte-leakage or pod set in enhancing heat tolerance and grain yield of cowpea. *Field Crops Research* 86: 239-253.
- 14- Castro N.S. 2013. Temperatura optima y etapa fenológica para determinar la termoestabilidad de la membrana celular en maíz y frijol. Revista Internacional de Botánica Experimental ØPHYTON 82:249-254.
- 15- Blum, A. (1988). Plant breeding for stress environments. CRC Press, Boca Raton, Fl. 223 p.
- 16- Blum, A. y A. Ebercon (1981). Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science* 21: 43-47.

- 17- Bouslama, M. y W.T. Schapaugh Jr. (1984). Stress tolerance in soybeans. I. Evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. *Crop Science* 24: 933-937.
- 18- Guy, C. (1999). The influence of temperature extremes on gene expression, genomic structure, and the evolution of induced tolerance in plants. En: Lerner, H.R. (ed), pp. 497-548. Plant responses to environmental stresses. Marcel Dekker, New York. 730 p.
- 19- Savchenko G.E., E.A. Klyuchareva, L.M. Abrabchik & E.V. Serdyuchenko. 2002. Effect of periodic heat shock on the membrane system of etioplasts. Russ. J. Plant Physiol. 49, 349–359.
- 20- Muthappa S.K., G. Kumar, V. Srikanthbabu & U. Makarla. 2007. Assessment of variability in acquired thermotolerance: potential option to study genotypic response and the relevance of stress genes. J. Plant Physiol. 164, 111–125.
- 21- Quan R., M. Shang, H. Zhang, Y. Zhao & J. Zhang. 2004. Engineering of enhanced glycine betaine synthesis improves drought tolerance in maize. Plant Biotech. J. 2, 477–486.
- 22- Hanumappa M. & H.T. Nguyen. 2010. Genetic approaches toward improving heat tolerance in plants. In: Genes for plant abiotic stress, Ed. Jenks, M. y A.J. Wood, Wiley-Blackwell, pp. 221-260.