

Universidad Nacional del Nordeste



Facultad de Ciencias Agrarias

Trabajo Final de Graduación

Modalidad Pasantía

Tema:

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PEROXIDASA EN LIMÓN

Alumna: Gisela Silvina Zalas

Asesora: 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. Sargento Cabral 2131 (3400). Corrientes, Argentina.

-Año 2023-

Introducción

Pocos ambientes permanecen siempre dentro de los ámbitos de temperatura óptimos para las funciones vitales (aproximadamente 5-25 °C), y en respuesta a estas limitaciones ambientales las plantas despliegan una amplia plasticidad estructural y fisiológica que les permite adaptarse a diferentes temperaturas provocadas por la geografía, y por los ritmos diurnos y estacionales (Larcher, 1980; Kappen, 1981). Los vegetales son sensibles al estrés por temperatura y sufren cuando estas son bajas o muy altas con respecto a los umbrales definidos para cada una. Por ejemplo, las plantas tropicales sufren daños al ser expuestas a temperaturas menores a 10 °C (“chilling injury”) y la mayoría de las especies empiezan a tener problemas entre los 30 y 40 °C. Pequeños incrementos de la temperatura (de 30 a 35 °C) pueden dañar los órganos reproductivos de muchos cultivos. (Samach y Wigge, 2005). En los agrios las temperaturas óptimas para la actividad fotosintética son de 25° a 30°C y temperaturas de 35°C o superiores la reducen (Agusti, 2010). Aunque se pueden alcanzar temperaturas de más de 55 °C en los trópicos de África, México y California, entre 60 y 70 °C parece ser el límite para la supervivencia de las plantas (Larcher, 1980; Levitt 1980; Berry y Raison, 1981).

En un gran número de cultivos, el ámbito de temperatura bajo el cual el desarrollo es al menos 50% del obtenido a temperaturas óptimas es muy estrecho, y varía de 10-15° a 40-45 °C (Parent y Tardieu, 2012). Esto indica que la tolerancia al calor no ha sido modificada por la domesticación y el mejoramiento genético, ocurridos a lo largo de unos 12000 años de evolución de los cultivos en varios continentes. El promedio mundial de la temperatura ambiental se ha incrementado gradualmente en los últimos 150 años, como consecuencia de la actividad humana y la emisión de gases con efecto invernadero como CO₂, metano, clorofluorocarbonos y óxido nitroso (Jones y Moberg, 2003; Wahid et al., 2007).

La tasa de calentamiento global de 1901 al año 2000 se ha estimado en 0,07 °C cada década (Jones y Moberg, 2003), y en los últimos cien años, a nivel mundial, se produjo un incremento de las temperaturas mínimas y máximas de 1,86 y 0,88 °C, respectivamente ([Hoegh Guldberg et al., 2018](#)). Se estima que para el año 2025 la temperatura promedio global se incrementará 1 °C, y en 3 °C para el 2100 (Wahid et al., 2007). Se proyecta que los efectos del cambio climático incluirán modificaciones de los ámbitos ecológicos y geográficos donde se distribuyen las plantas, la zonificación

agrícola y las épocas de siembra; irregularidades que representan amenazas potenciales para la producción agrícola y que cambiarán las prioridades actuales del mejoramiento genético (Porter, 2005; Long y Ort, 2010), en especial en las regiones tropicales cálidas, donde la temperatura es un factor determinante en el rendimiento de los cultivos (Challinor et al., 2007). Por estas razones, la respuesta de las plantas al incremento en la temperatura ambiental y al calentamiento global ha alcanzado las agendas sociales y políticas del mundo, porque el suministro sostenible de alimentos es crucial para la seguridad alimentaria de las sociedades.

El sobrecalentamiento es solo uno de los múltiples estreses que interaccionan cotidianamente en los agroecosistemas tropicales, y es a menudo acompañado por alta radiación, poca disponibilidad de agua e incrementos en la concentración de CO₂ atmosférico. Además de acelerar el metabolismo celular y causar la deshidratación de los tejidos, el estrés por calor genera un estrés oxidativo porque induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas incluyen el oxígeno singulete (¹O₂ “singlet”), radicales de superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radicales hidroxilos (·OH), que provocan la peroxidación autocatalítica de los lípidos y los pigmentos de las membranas celulares, la pérdida de la semi-permeabilidad de estas y la modificación o pérdida de sus funciones fundamentales de transporte y osmoregulación (Almeselmani et al., 2006; Wahid et al., 2007), que culmina con la fuga de electrolitos y agrava los problemas osmóticos y los desbalances hídricos. La protección contra el estrés oxidativo es un componente importante en el repertorio de las plantas para tolerar el estrés por altas/bajas temperaturas (Wahid et al., 2007).

Las plantas responden con la producción de enzimas antioxidantes como la guayacol peroxidasa específica (POX) (Mittler, 2002; Almeselmani et al., 2006; Nagesh y Devaraj, 2008).

Las membranas celulares son las primeras afectadas por el estrés debido al calor (Wang et al., 2011), porque el incremento de la temperatura conduce a la desnaturalización de proteínas y enzimas, y a aumentos en la cantidad de ácidos grasos insaturados (Savchenko et al., 2002). Lo anterior ocasiona que los lípidos de las membranas se vuelvan más fluidos y permeables, y permite la pérdida de electrolitos (Porch y Hall, 2013).

En cultivares tolerantes se activan los mecanismos antioxidantes y se duplica el nivel de POX en la planta (Nagesh y Devaraj, 2008).

Las bajas o altas temperaturas es un factor abiótico que limita el crecimiento y desarrollo de las plantas. Teniendo en cuenta esto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de un complejo nutricional de avanzada, [formulado para estimular el crecimiento y desarrollo de cultivos sometidos a condiciones de estrés], sobre la actividad de la enzima peroxidasa como mecanismo por el cual las plantas responden al estrés por altas/bajas temperaturas.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad de la enzima peroxidasa (POD) en hojas de limón (*Citrus limón*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destreza en la recepción, acondicionamiento y procesamiento de las muestras para su análisis.
- Adiestramiento en la determinación de la actividad peroxidasa (POD).

MATERIALES Y METODOS

El experimento se realizó en el Departamento Mburucuyá, Corrientes, en lotes de Limón (*Citrus limón*) cv 'Eureka' injertado sobre Limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush), de 11 años de edad, densidad 357 plantas ha.

El muestreo foliar se realizó colectando cuatro hojas sanas por árbol, una en cada cuadrante y a la altura media de la planta, luego que hayan pasado más de 30 días después de la última aplicación foliar del fertilizante líquido indicado para estimular el crecimiento y desarrollo en condiciones de estrés en la mayoría de los cultivos con un 2% de nitrógeno total y 2,5% de potasio soluble en agua y trazas de hormonas vegetales. Todas las plantas fueron fertilizadas: 200 kg ha⁻¹ de N; 80 kg ha⁻¹ P₂O₅; 200 kg ha⁻¹ K₂O; 60 kg ha⁻¹ OCa y 80 kg ha⁻¹ de OMg.

Para la determinación de la actividad enzimática, la recolección se realizó tomando la tercera o cuarta hoja en buen estado sanitario y nutricional generada en la primavera anterior o bien la tercera o cuarta hoja de rama fructífera con frutos de un tamaño de 3-4 cm de diámetro. Cada muestra fue puesta en bolsa y almacenada en conservadora con agua y hielo para su envío inmediato al laboratorio. Luego de recolectar las muestras por

la mañana 9 am aproximadamente, se enviaron inmediatamente al laboratorio de Física y Química de la Facultad de Ciencias Agrarias y se procedió a la determinación de la actividad enzimática, el tiempo que transcurrió entre el muestreo y el análisis fue poco más de dos horas. Este muestreo se realizó en el invierno (agosto).

Las muestras se tomaron con 4 repeticiones por tratamiento y cada tratamiento está compuesto por cuatro plantas por parcela siendo las plantas útiles las dos centrales donde se realizaron las mediciones.

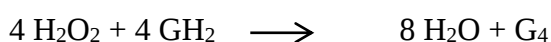
Los tratamientos evaluados fueron T1: testigo, T2: [0,5 L ha⁻¹ de producto en julio (invierno)], T3 [0,5 L ha⁻¹ de producto en enero (verano)], T4 [0,5 L ha⁻¹ de producto (invierno) y 0,5 L ha⁻¹ de producto (verano)], T5 [1 L ha⁻¹ de producto (invierno)], T6 [1 L ha⁻¹ de producto (verano)], T7 [1 L ha⁻¹ de producto (invierno) y 1 L ha⁻¹ en Verano)].

La actividad peroxidasa se determinó por el método continuo. Se utilizó como sustrato el guayacol (0,018 M) y el peróxido de hidrógeno (30 %). Se determinó la velocidad de la oxidación del guayacol por la enzima en presencia de peróxido de hidrogeno, durante seis minutos, y se midió la absorbancia a 436 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 2100 pro UV/visible (Thongsook y Barrett 2005).

Las peroxidasas se conocen con el nombre corriente de POD, la cual convierte el H₂O₂ en agua; (Oueslati et al., 2010). La actividad enzimática se reportó como U/g de peso fresco, donde U = Unidad de actividad enzimática y una unidad es igual a la formación de 1 μmol de tetraguayacol/min. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

Es una oxidoreductasa, la cual cataliza la deshidrogenación de una gran cantidad de compuestos orgánicos Ej. 2,6-dicloro fenol indo fenol o guayacol.

Aquí se transfieren hidrógenos de un donador al H₂O₂



GH₂ es guayacol y el producto de reacción (G₄) es el octadehidrotetraguayacol.

Obtención de los extractos.

Para la obtención del extracto se tomaron 3 hojas, colocándolas en agua destilada con 0,01% de NaCl en vaso de precipitado durante 4 horas en heladera y luego se secó con ayuda de papel suplex (Figura 1, A-B-C). Se pesaron las hojas rápidamente utilizando una balanza de plato externo, para confirmar masa constante de las muestras, indicando que las hojas han sido infiltradas con la solución 0,01% de NaCl. Posteriormente las hojas

se disponen con el envés hacia arriba, y con ayuda de un tubo plástico, se enrollaron, de tal manera que no superaron el borde superior de un tubo de centrifuga de 20 mL para finalmente ser centrifugados durante 20 minutos a 2500 rpm (Figura 1, D-E). Se obtiene una pequeña cantidad de líquido (800µL aproximadamente), el cual debe estar libre de clorofilas. En el caso de que se presente este tipo de pigmentos indica lesiones de las hojas durante el proceso, y se recomienda repetir la extracción.

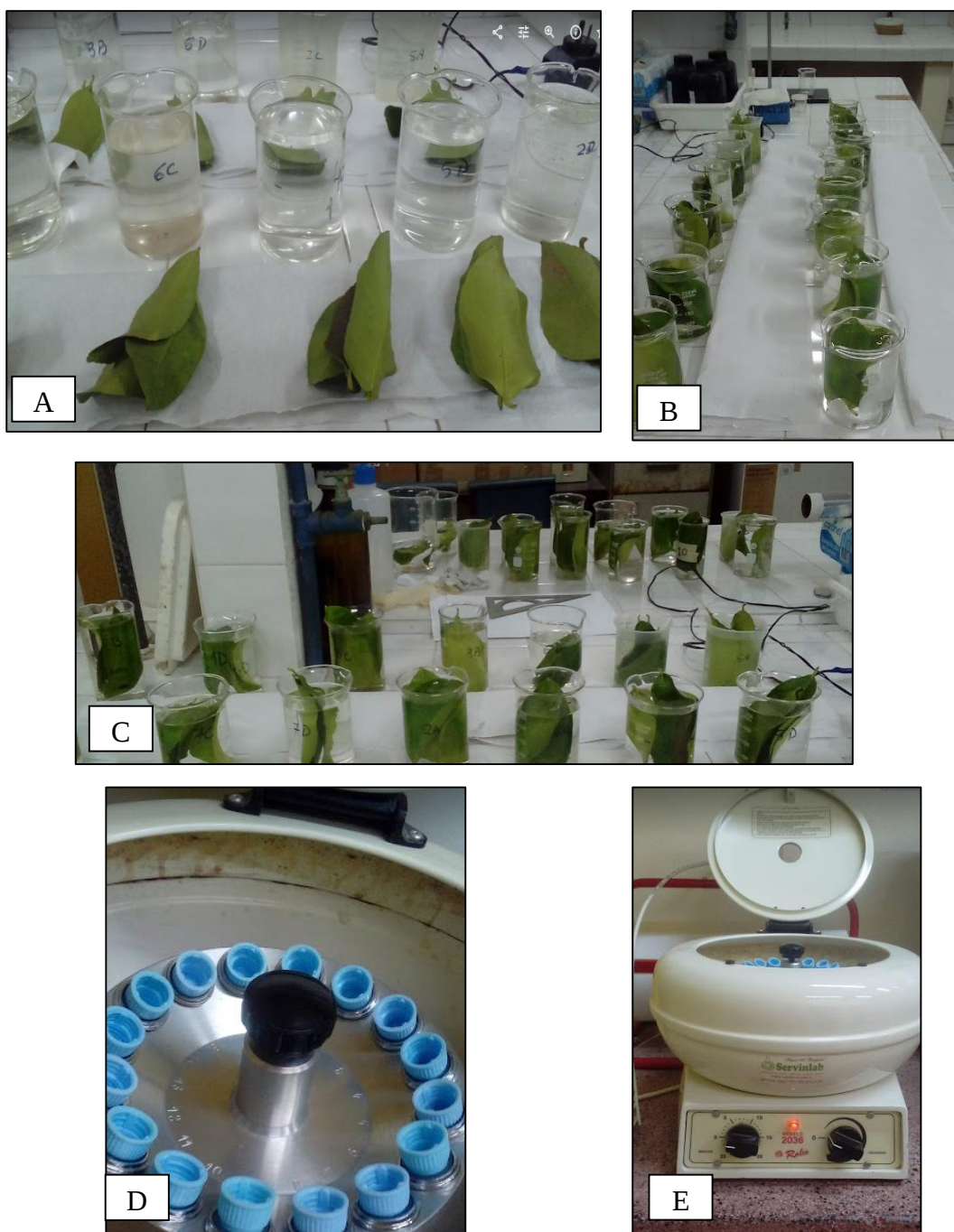


Figura 1: Pasos para la obtención del extracto para realizar determinaciones de la actividad enzimática.

A-B-C: hojas, previamente lavadas con agua destilada para luego ser colocadas en agua destilada con 0,01% de NaCl en vaso de precipitado durante 4 horas. D-E muestras en tubos de centrifuga para ser centrifugados por 20 minutos a 2500 rpm.

Para la determinación se tomaron cubetas de 3 mL y se adicionó la *mezcla de reacción a temperatura ambiente para leer la absorbancia a 436 nm (Figura 2).

*mezcla de reacción:

Solución tampón de acetato de sodio pH 5,2, 0,1 M	2,7 mL
Muestra problema	0,01 mL
Guayacol 10 mg/mL	0,2 mL
H ₂ O ₂ 1% en solución tampón	0,1 mL

La reacción se inició al adicionar peróxido de hidrógeno.

Se evaluó el cambio de la absorbancia en seis minutos a 436 nm.

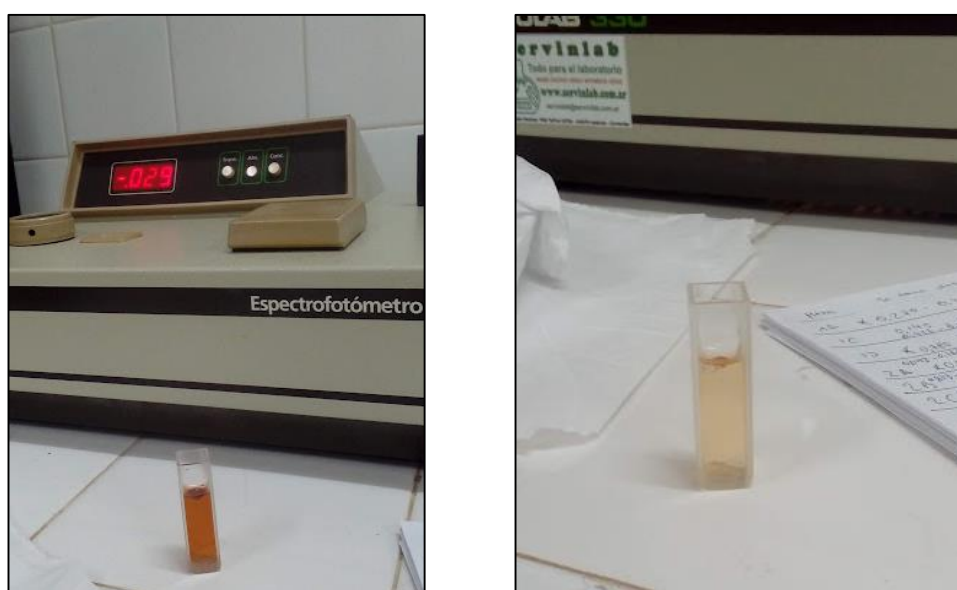


Figura 2: Medición de la absorbancia a 436 nm en Equipo espectrofotómetro Ultrospec 2100 pro UV/visible.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 3 se presentan los resultados de la actividad enzimática en función del tiempo y el tratamiento. Se puede observar que todos los tratamientos presentaron mayor actividad enzimática transcurrido 1 minuto en relación al testigo, excepto el tratamiento T3 [0,5 L ha⁻¹ de producto en enero (verano)] que presentó valores inferiores. Luego de los 3 minutos la actividad enzimática de la peroxidasa de los tratamientos T2 [0,5 L ha⁻¹ de producto en julio (invierno)], T6 [1 L ha⁻¹ de producto (verano)], y T7 [1 L ha⁻¹ de producto (invierno) y 1 L ha⁻¹ en verano]] aumentan respecto del testigo y del resto de los tratamientos, siendo más contrastada esta diferencia en los tratamientos T6 y T7 respecto del resto de los tratamientos en el tiempo. Los tratamientos T3 [0,5 L ha⁻¹ de producto en enero (verano)], T4 [0,5 L ha⁻¹ de producto (invierno)]

y 0,5 L ha⁻¹ (verano)] y T5 [1 L ha⁻¹ de producto (invierno)] presentaron actividad de la peroxidasa inferiores al testigo en el tiempo.

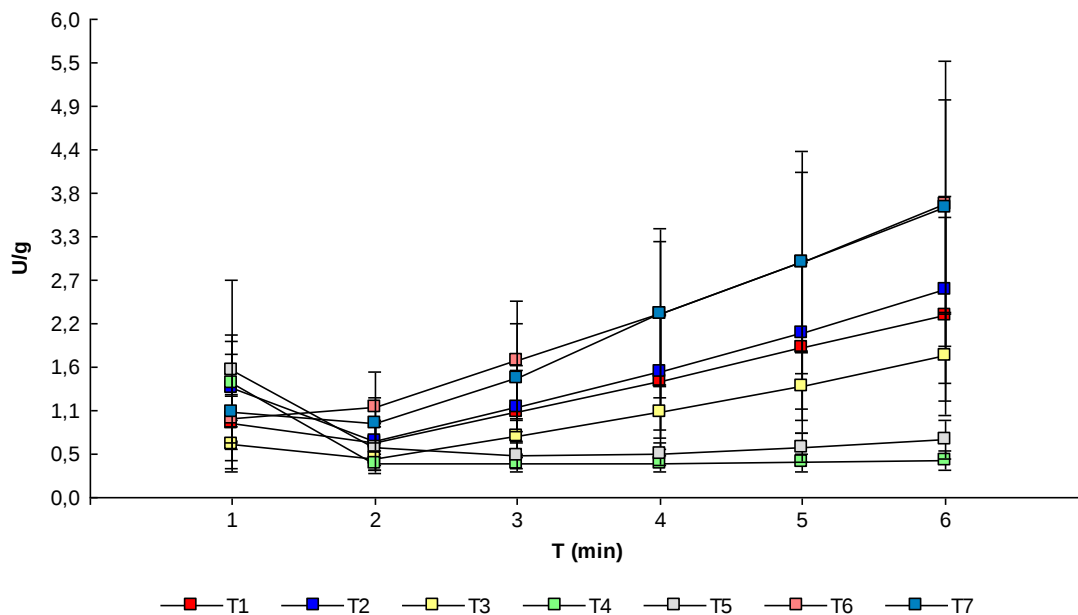


Figura 3: Actividad específica de la enzima peroxidasa en hojas de limón en los siete tratamientos probados.

Otros autores han informado resultados acerca de la actividad de la enzima peroxidasa y la tolerancia a estrés. Martínez Damián et al., (2013) señalan incrementos de la actividad de la enzima peroxidasa (POD) en menta (*Mentha piperita* L.), variedad “mint moroco” almacenadas a bajas temperaturas. Estos resultados pueden estar asociados a la generación de un estrés oxidativo provocado por la exposición del área foliar a condiciones no favorables de temperatura, por lo que se puede generar una mayor liberación de la POD al citoplasma, incrementando su actividad. Este comportamiento ha sido mencionado por Goodman et al. (1986) y confirmado por Altunkaya y Gökmen (2008) y Ding et al. (2009). A los 6 días de almacenamiento en frío (6 y 10°C) la actividad de la POD en la menta fue significativamente superior a lo observado a temperatura ambiente. Estos resultados sugieren que la POD es una molécula clave en la aclimatación de las plantas o de alguno de sus órganos a los cambios que experimenta el medio ambiente en el que se desarrolla.

La planta tolerante muestra una elevada actividad POD, en respuesta defensiva de la planta, al desempeñar su papel protector en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno en extractos de hojas (Díaz et al., 2010); así como su utilidad para la selección del grado de tolerancia de los cultivos al estrés abiótico por temperaturas extremas.

Nagesh y Devaraj, (2008) encontraron en vainica (*Phaseolus vulgaris*) que el estrés produjo una reducción de más del 50% de la actividad antioxidante de las enzimas catalasas, provocando daño moderado en el ADN genómico, y, finalmente la muerte celular. Sin embargo, en cultivares tolerantes se activan los mecanismos antioxidantes y se duplica la producción de enzimas antioxidantes en la planta. Así mismo en fresa (Wang y Zheng, 2001), cuando las plantas se sometieron a temperaturas relativamente altas (22-30 °C), aumentaron la concentración de antioxidantes en los frutos con respecto a las plantas que crecieron en temperaturas menores (12-18 °C).

CONCLUSION

La actividad de la enzima peroxidasa fue mayor en los tratamientos T2 [0,5 L ha⁻¹ en julio (invierno)], T6 [1 L ha⁻¹ (Verano)] y T7 [1 L ha⁻¹ (Invierno) y 1 L ha⁻¹ Verano)] respecto de las plantas sin aplicación (testigo), siendo los tratamientos 6 y 7 los que superaron en un 183% y 174% respectivamente a la POD del testigo en el transcurso del tiempo (6 minutos).

Comentarios finales

En el laboratorio, al transitar todas las instancias, desde el procesamiento de las muestras, la preparación de los reactivos y las determinaciones químicas, adquirí destrezas en la recepción, acondicionamiento y procesamiento de las muestras y entendí que es un trabajo de mucha precisión que requiere una gran dedicación. Aprendí a manipular los materiales para realizar los análisis, sabiendo lo peligrosos que algunos de estos pueden ser y sobre todo aprendí a trabajar en equipo. Puedo decir que fue una experiencia enriquecedora, positiva y de aprendizaje permanente, donde pude integrar conceptos teóricos con la práctica profesional.

Agradecimientos

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud y fortaleza para lograr mis objetivos.

A mi familia por no dejarme bajar los brazos, por alentarme y acompañarme siempre.

A mi asesora Ing. Agr. (Mgter.) María de las M. Yfran por sus enseñanzas durante mi formación profesional, por el tiempo, dedicación y sobre todo por su paciencia.

Al equipo de laboratorio por compartir sus experiencias, conocimientos y por ayudarme a analizar las muestras y de esa forma hacer que todo sea más llevadero.

A todas las personas que de alguna u otra manera influyeron en mi formación.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Agustí, M. 2010. Fruticultura. Mundi Prensa, ESP.
- 2- Almeselmani, M., P.S. Deshmukh, R.K. Sairam, S.R. Kushwaha, and T.P. Singh. 2006. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Sci.* 171:382-388.
- 3- Altunkaya, A; Gökmen, V. 2008. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chemistry* 107:1173-1179.
- 4- Berry, J.A., and J.K. Raison. 1981. Responses of macrophytes to temperature. In: O.L. Lange et al., editors, *Physiological plant ecology*. Vol. 12A. Responses to the physical environment. Springer-Verlag, Berlin, GER. p. 277-338.
- 5- Challinor, A.J., T.R. Wheeler, P.Q. Craufurd, C.A. Ferro, and D.B. Stephenson. 2007. Adaptation of crops to climate change through genotypic responses to mean and extreme temperatures. *Agric. Ecosyst. Environ.* 119:190-204.

6- Ding, Z; Tian, S; Meng, X; Xu, Y. 2009. Hydrogen peroxide is correlated with browning in peach fruit stored at low temperature. *Frontiers of Chemical Engineering in China* 3:363-374.

7- [Hoegh-Guldberg, O. y col. \(2018\). «Global warming of 1.5C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strength-ening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty». En: ed. por V. Masson-Delmotte y col. Press. Cap. Impacts of 1.5oC global warming on natural and human systems. \[Links \]](#)

8- Goodman, RN; Kiraly, Z; Wood, KR. 1986. Secondary metabolite. In Goodman, RN. ed. *The biochemistry and physiology of plant disease*. Missouri: University of Missouri. USA. p. 221-224.

9- Jones, P.D., and A. Moberg. 2003. Hemispheric and large-scale surface air temperature variations: an extensive revision and an update to 2001. *J. Climate* 16:206-223.

10- Kappen, L. 1981. Ecological significance of resistance to high temperature. In: O.L. Lange et al., editors, *Physiological plant ecology*. Vol. 12A. Responses to the physical environment. Springer-Verlag, Berlin, GER. p. 439-474.

11- Larcher, W. 1980. *Physiological plant ecology*. 2 ed. Springer-Verlag, Berlin, GER.

12- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. I. Chilling, freezing, and high temperature stress. 2nd ed. Academic Press, N.Y., USA.

13- Long, S.P., and D.R. Ort. 2010. More than taking the heat: crops and global change. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13:241-248.

14- Martínez Damián, M.T.; Cruz-Álvarez, O.; Beryl Colinas-León, M.T.; Rodríguez-Pérez, J.E.; Ramírez-Ramírez, S.P. 2013. Actividad enzimática y capacidad antioxidante en menta (*Mentha piperita* l.) almacenada bajo refrigeración. *Agronomía Mesoamericana* 24(1):57-69. 2013 ISSN: 1021-7444

15- Mittler, R. 2002. Oxidative stress; antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405-410.

16- Nagesh, R., and V.R. Devaraj. 2008. High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Aust. J. Crop Sci.* 2:40-48.

17- Oueslati, S; Karray-Bouraoui, N; Attia, H; Rabhi, M; Ksouri, R; Lachal, M. 2010. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulgium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 32:289-296.

- 18- Parent, B., and F. Tardieu. 2012. Temperature responses of developmental processes have not been affected by breeding in different ecological areas for 17 crop species. *New Phytol.* 194:760-774.
- 19- Porch, T.G., and A.E. Hall. 2013. Heat tolerance. In: C. Kole, editor, *Genomics and breeding for climate-resilient crops*. Vol. 2. Springer-Verlag, Berlin, GER. p. 167-202
- 20- Porter, J.R. 2005. Rising temperatures are likely to reduce crop yields. *Nature* 436:174. doi:10.1038/436174b
- 21- Samach, A., and P.A. Wigge. 2005. Ambient temperature perception in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:483-486.
- 22- Savchenko, G.E., E.A. Klyuchareva, L.M. Abrabchik, and E.V. Serdyuchenko. 2002. Effect of periodic heat shock on the membrane system of etioplasts. *Russ. J. Plant Physiol.* 49:349-359.
- 23- Thongsook, T. and Barret, D. 2005. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53(8):3206 - 3214.
- 24- Wahid, A., S. Gelani, M. Ahsraf, and M.R. Fooland. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environ. Exp. Bot.* 61:199-223.
- 25- Wang, S.Y., and W. Zheng. 2001. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *J. Agric. Food Chem.* 49:4977-4982.
- 26- 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