

Efecto del estrés hídrico sobre el contenido de inulina y otros carbohidratos en dalia (*Dahlia* sp.)

Ismael de Jesús Román Guzmán*, Sandra Daniela Bravo Andrade, Ernesto Tapia Campos,

Joaquin Qui Zapata, Patricia Dupré⁺

CIATEJ/ Av. Normalistas 800, Col. Colinas de la Normal, Guadalajara, Jalisco, C.P. 44270
/ pdupre@ciatej.net.mx

* Autor que presentará trabajo.

+ Autor a quien la correspondencia deba ser enviada; Tel.: (52)-(33)-33455200 Ext 1705;

Fax: (52)-(33)-33455200 ext. 1001 Unidad de Biotecnología Vegetal

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología

Resumen: Los fructanos son polímeros de fructosa que son derivados de la sacarosa, se sintetizan mediante la acción de fructosiltransferasas, enzimas encargadas de transferir radicales fructosilo para formar diferentes enlaces. En las plantas, los fructanos son carbohidratos de reserva y podrían estar involucrados en la tolerancia al estrés hídrico. Se estima que únicamente el 15 % de las Angiospermas pueden producirlos. La dalia pertenece a la familia *Asteraceae* y tiene la capacidad de producir un fructano con enlaces lineales del tipo β (2-1): la inulina. En el presente estudio se investigó el efecto del estrés hídrico durante 9 días sobre el contenido de inulina y otros carbohidratos relacionados con su síntesis en dalia. Para ello se expusieron las plantas, bajo condiciones *in-vitro*, a un estrés hídrico causado por la adición de PEG 8000 a diferentes concentraciones en los medios de cultivo. El estatus hídrico de las plantas a lo largo del experimento fue evaluado mediante mediciones del contenido relativo de agua (CRA). Se encontró que en presencia de PEG a 20 y 30% el contenido de inulina y glucosa aumenta, el contenido de sacarosa presenta un aumento aunque no es significativo y el contenido de fructosa permanece inalterado. Se concluye que un estrés hídrico provocado por PEG modifica el metabolismo de la inulina en dalia.

Palabras Clave: Fructano; PEG; dalia; cultivo *in vitro*

Abstract: Fructans are fructose polymers which derive from sucrose; they are synthesized by fructosyltransferases, the enzymes that transfer fructosyl radicals between molecules. In plants, fructans function as reserve carbohydrates and might be involved in water stress resistance. It is estimated that only 15% of the angiosperm group can produce fructan. *Dalia* belongs to the Asteracean family and so it can produce a β (2-1) linked fructan named inulin. In this study the effect of 9 days of water stress over inulin and other carbohydrates contents in *dalia* was studied. To achieve this, in-vitro seedlings were exposed to water stress by the use of different concentrations of PEG 8000 in culture media. Throughout the experiment, the water status was evaluated with relative water content measurements. We found that when PEG at 20% and 30% was used, inulin and glucose content increased, sucrose content shows a raise in content although it is not significant and fructose levels remained unaltered. We conclude that inulin metabolism in *dalia* is altered under PEG-induced water stress.

Keywords: Fructan; PEG; *dahlia*; in vitro culture

1. Introducción

La producción de alimentos está cada día más comprometida por diversos factores bióticos y abióticos. Por lo tanto ha crecido un interés por minimizar el impacto negativo del conjunto de estreses que comprometen la producción mundial. El estrés hídrico puede ser resultado de las manifestaciones de uno o más factores abióticos, como es la disminución de agua disponible para las plantas, alta salinidad en el suelo o bajas temperaturas [1]. Dicho estrés es el principal factor limitante de la producción vegetal y como tal se han buscado diferentes acciones para reducir su impacto a nivel mundial.

Las plantas poseen estrategias agrupadas en tres categorías dependiendo de la naturaleza de sus mecanismos: estrategia de escape, de evasión y de tolerancia [2]. Las estrategias de escape comprenden la dormancia vegetativa parcial durante el periodo de sequía y el término del ciclo de vida antes de la llegada del periodo de sequía [3]. Las estrategias de evasión están encaminadas a evitar o minimizar los efectos del estrés a la planta, esto se puede lograr maximizando la ingesta de agua o buscar minimizar la pérdida de agua por transpiración y tiene por ejemplo el cierre de estomas, disminución de la absorción de radiación, hojas pequeñas. Finalmente, las estrategias de tolerancia consisten en la capacidad de tolerancia de los tejidos al estrés hídrico mediante la acumulación de solutos compatibles, la acumulación de proteínas protectoras de la membrana celular, el endurecimiento de la pared celular y/o el control del nivel de ROS (revisado por [1])

La estrategia de osmoregulación consiste en acumular en grandes cantidades solutos compatibles dentro de la célula [4]. Cuando se acumulan los solutos en la célula se disminuye la presión osmótica, la cual permite mantener una presión de turgencia en la célula y mantiene su integridad, así como su elongación y el correcto funcionamiento de sus funciones fisiológicas [5]. Otro papel que pueden jugar los solutos compatibles es la protección de la integridad celular. Algunos osmolitos pueden interactuar de manera favorable con la bicapa membranal lipídica impidiendo la fusión de las membranas que existe en presencia de bajas temperaturas y de plasmólisis [6]. Los solutos compatibles más estudiados son la

prolina, la glicina betaina y carbohidratos como la sacarosa y la trehalosa. Últimamente se ha reportado que los fructanos podrían entrar en esta categoría. [7]

Los fructanos son polímeros de fructosa, de diferentes tamaño y con diferentes enlaces glicosídicos, producidos en plantas por fructosiltransferasas que actúan de manera subsecuentes. La inulina es el más simple de ellos. Es de tipo lineal construida a base de enlaces β (2-1), y se encuentra principalmente en plantas pertenecientes a las Asterales [8, 9], como la achicoria (*Cichorium intybus*), alcachofa (*Cynara scolymus*), alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*), *Viguiera discolor*, dalia (*Dahlia variabilis*), etc.

La síntesis de fructano se lleva a cabo mediante la acción de enzimas llamadas fructosiltransferasas, las cuales tienen como sustratos la sacarosa y/u otros fructanos [10]. Dichas enzimas realizan reacciones de transfructosilación, en la cual se transfiere un grupo fructosil de un donador (molécula de sacarosa o de fructano) a un aceptor (otra molécula de sacarosa o de fructano) produciendo largas cadenas de carbohidratos. Así pues, la síntesis de la inulina es realizada por la acción secuencial de dos enzimas. La primera reacción es iniciada por Sacarosa: sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST, EC 2.4.1.99), la cual cambia una molécula de fructosa de una sacarosa y la une a otra molécula de sacarosa justo en el extremo de la fructosa, lo cual genera el trisacárido 1-kestosa (Glu-Fru-Fru; donde Glu = glucosa y Fru = Fructosa). La elongación de la cadena iniciada es realizada por Fructano: fructano 1-fructosiltransferasa (1-FFT, EC 2.4.1.100) sobre 1-kestosa, agregando unidades fructosilo a la molécula de fructosa al final de la cadena y generando inulina (Glu-Fru-[Fru]_n-Fru) [11, 12].

La inulina tiene una utilidad para el ser humano, desde aditivo para preparar algunos alimentos, hasta promotora de la salud humana y es extraída, principalmente, a partir de la raíz de la achicoria.

En plantas, la inulina además de cumplir una función como carbohidratos de reserva [13], también juega un papel en la protección celular y en el ajuste osmótico en caso de estrés hídrico [14, 15]. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan la producción de inulina en este caso de estrés son muy poco conocidos. En este marco se realizó el estudio del efecto del estrés hídrico sobre la acumulación de inulina usando una planta nativa de Mesoamérica, que produce y acumula altos niveles de fructano: la dalia.

2. Materiales y Métodos

Material vegetal:

El material vegetal usado en este estudio proviene de la micropropagación de una sola plántula de *Dahlia* sp. Cv. Unwin (Vilmorin, Francia). La micropropagación se realizó en frasco con el medio basal de Murashigue y Skoog (Sigma-Aldrich cat. M5524), adicionado de 0.1g/L de Mioinositol, 0.4 mg/L de Tiamina, 30 g/L. de sacarosa, 0.5 g/L. de MES y 8 g/L. de Agar. En un cuarto de crecimiento bajo las siguientes condiciones: 16 hrs luz de 1200 Lux / 8 hrs oscuridad y 21°C. Los diferentes tratamientos de estrés fueron aplicados a plántulas de 10 días, micropropagadas a partir de yemas apicales.

Ensayo de estrés:

El estrés hídrico fue impuesto vía PEG 8000 (Sigma-Aldrich cat. P2139) en diferentes concentraciones (10%, 20% y 30%) según el protocolo elaborado por Verslue et al. [16], Para el ensayo se diseñó un experimento completamente al azar con 12 tratamientos (combinación de 4 concentraciones de PEG y 3 días), y se midió CRA y el contenido de los diferentes carbohidratos. El experimento contó con 4 repeticiones por tratamiento y 12 plántulas por repetición.

Medición de CRA:

El CRA se calculó empleando la siguiente fórmula: “CRA = (Peso fresco - peso seco)/(peso hidratado - peso seco)” y usando la metodología de Verslue *et al.* [16].

Medición de carbohidratos:

Para las mediciones del contenido de carbohidratos, se liofilizaron las muestras colectadas y se extrajeron los azúcares con agua caliente, finalmente el extracto líquido se analizó en un equipo de cromatografía líquida de fase reversa de alta presión (horno Prostar 570, detector de índice de refracción Prostar 355, Varian inc) y una columna para determinar carbohidratos (HPX-87C, Bio-Rad) para medir el contenido de fructano, sacarosa, y glucosa.

3. Resultados

Evaluación del estatus hídrico

Los resultados presentados en la figura 1, muestran los CRA de plántulas de dalia de 10 días, sometidas a diferentes concentraciones de PEG a través del tiempo. En presencia de un estrés hídrico todos los CRA son estadísticamente diferentes ($\alpha < 0.05$) a los obtenidos en el tratamiento control (0% PEG). Desde los 3 días de estrés, se observa una disminución de los CRA que es solo significativa en presencia de un estrés severo dado por 30% de PEG. Posteriormente se observa como a los seis días se elevan todos los CRA hasta no ser significativamente diferentes del control. A los 9 días vuelve de nuevo a disminuir el CRA de las plantas en relación con la concentración de PEG.

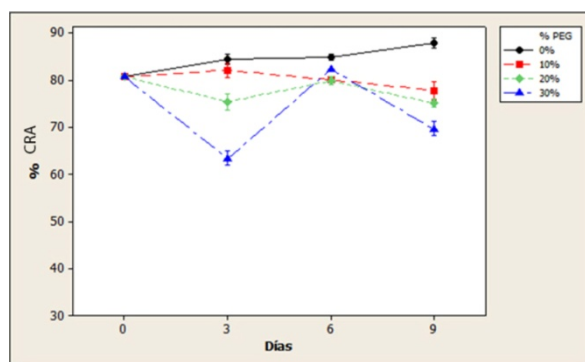


Figura 1. Contenido relativo de agua de plántulas de dalia sometidas a estrés hídrico mediciones a 3, 6 y 9 días y se utilizó PEG a concentraciones diferentes (0, 10, 20 y 30%) para simular la condición de estrés. Las barras indican el \pm error estándar

Evaluación de contenido de carbohidratos

El contenido de inulina de plántulas de dalia de 10 días sometidas a diferentes concentraciones de PEG a través del tiempo se presenta en la figura 2. Se puede observar que en presencia de un estrés hídrico de cualquier intensidad, el contenido de inulina es aumentado, sin embargo este aumento es solo significativo por los tratamientos con 20 y 30 % de PEG que corresponden a un estrés hídrico severo. Finalmente no existen diferencias significativas en el contenido de este carbohidrato a través de los días evaluados.

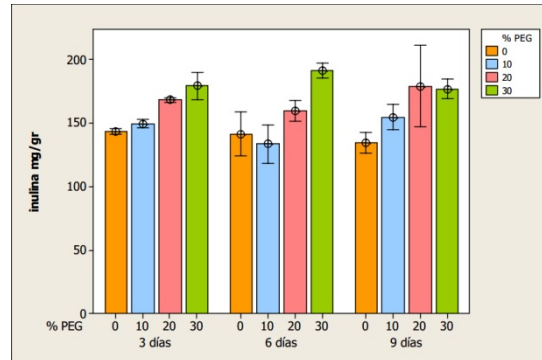


Figura 2. Contenido de inulina en plántulas de dalia sometidas a estrés hídrico, mediciones a 3, 6 y 9 días y se utilizó PEG a concentraciones diferentes (0, 10, 20 y 30%) para simular la condición de estrés. Las barras indican el \pm error estándar

El contenido de sacarosa en las plántulas de dalia en función del tiempo de presencia con diferente grado de estrés hídrico se muestra en la figura 3. Aunque aparece una tendencia al incremento del contenido en sacarosa a partir de 6 días de estrés, este aumento es solo significativo ($\alpha < 0.05$) cuando las plantas están en presencia de 20% PEG. No existe diferencia en su contenido en relación a un día en específico.

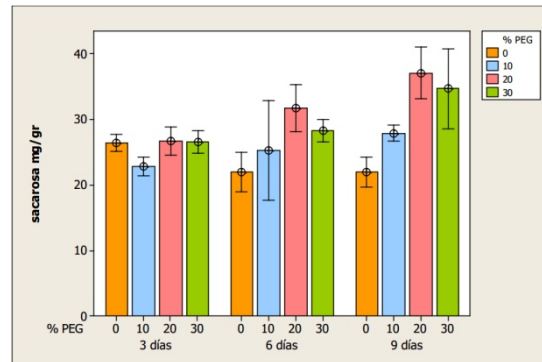


Figura 3. Contenido de sacarosa en plántulas de dalia sometidas a estrés hídrico, mediciones a 3, 6 y 9 días y se utilizó PEG a concentraciones diferentes (0, 10, 20 y 30%) para simular la condición de estrés. Las barras indican el \pm error estándar

El contenido de glucosa a través del tiempo de presencia con diferente grado de estrés hídrico se presenta en la figura 4. Ahí se puede observar que el contenido de glucosa en las plantas de dalia, se incrementa de manera significativa ($\alpha < 0.05$) en presencia de cualquier concentración de PEG siendo la concentración de 10% PEG la que proporcionó el mayor contenido de glucosa. Así mismo se puede observar como a seis días la concentración de glucosa en plantas expuestas a 10% de PEG es superior a todas las otras concentraciones obtenidas a los otros dos días, siendo la mayor de todas.

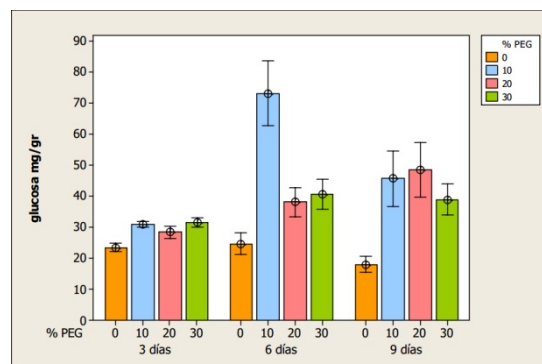


Figura 4. Contenido de glucosa en plántulas de dalia sometidas a estrés hídrico, mediciones a 3, 6 y 9 días y se utilizó PEG a concentraciones diferentes (0, 10, 20 y 30%) para simular la condición de estrés. Las barras indican el \pm error estándar

Finalmente en el estudio se midieron los contenidos de fructosa (datos no mostrados) y como resultado de su medición no se encontraron diferencias en sus contenidos en ninguna concentración y en ningún día.

4. Discusión

En el presente estudio se investigó el efecto del estrés hídrico sobre la acumulación de fructanos en dalia, para ello se utilizó el PEG como herramienta para imponer el estrés hídrico en un sistema *in-vitro*. El CRA es un parámetro indicador del estatus hídrico de una planta cuando está sometida a un estrés hídrico. La disminución del potencial hídrico del medio vía el PEG provoca una fuga del agua de las células. Como se ha reportado anteriormente [1], esta fuga tiene como consecuencia una disminución del contenido relativo de agua lo que se puede observar después de 3 días de estrés en dalia. La observación de que a los 6 días los CRA aumentan hasta igualar el CRA de las plantas crecidas en condición control, podría señalar la presencia de algún mecanismo o mecanismos de tolerancia al estrés hídrico que permite una mejora del estatus hídrico, es decir la creación de un entorno celular favorable para la ingesta de agua, aun en condiciones adversas [5] que podría ser causado por la acumulación de solutos compatibles. Cuando vuelve a disminuir el CRA, lo hace en relación a la concentración de PEG, lo que podría indicar la incapacidad de la planta por mantener sus niveles óptimos de CRA a partir del sexto día.

Como objetivo principal de este estudio se contempló el caracterizar el contenido de carbohidratos en presencia del estrés hídrico, pues sería el indicador del efecto del estrés hídrico sobre la ruta de síntesis de fructanos, ya que el contenido de ellos se modifica cuando la planta se expone a dicho estrés [14, 17]. Se analizó el contenido de inulina, fructano simple que tendría un papel en la tolerancia del estrés hídrico de las plantas [10]. Encontrar que existen diferencias estadísticas en el contenido de inulina entre los tratamientos control y los niveles de estrés enseña que se modifica el contenido del carbohidrato en presencia de estrés. Este hecho ha sido reportado por Kerepesi et al [17], dónde encontraron también una acumulación mayor de carbohidratos en plántulas estresadas de trigo que en las plantas control. Posteriormente, De Roover *et al.* [14] reporta que plántulas estresadas de achicoria presentaron diez veces más fructano con respecto a las plantas sin estrés. En 2011, García *et al.* reportan una acumulación mayor de carbohidratos en plantas estresadas de *Vernonia herbacea* [18]. Y esta es la primera vez que se reporta un incremento del contenido de inulina en presencia del estrés hídrico en dalia.

Respecto a la sacarosa, se sabe que es el sustrato de la primera enzima que participa en la ruta de biosíntesis de inulina, por lo tanto juega un papel crucial en el primer paso para la transformación del disacárido a 1-cestosa, el cuál posteriormente será transformado en inulina. De Roover *et al.* [14] reporta un aumento de sacarosa en plántulas de achicoria cultivada en tierra cuando se expone a un estrés hídrico mediante ausencia de riego, interpretando el aumento como la forma de la plántula de tener el sustrato necesario para la síntesis de las inulinas. Además se ha reportado que en caso de sequía existe un cambio en la partición de los fotosintatos a favor de la síntesis de la sacarosa [19]. No obstante y aun con el incremento observado es difícil interpretar el contenido de sacarosa obtenido en las plántulas de nuestro experimento, esto es debido al sistema de crecimiento *in vitro*, ya que al adicionar sacarosa al

medio, las cantidades de sacarosa que se miden en las plantas no provienen exclusivamente de la fotosíntesis.

La observación que las plántulas en contacto con el PEG tienen una cantidad de glucosa superior a la cantidad obtenida con las plántulas control podría ser evidencia de una dinámica de síntesis diferente entre plantas estresadas y no estresadas. Ahí se podría pensar que si la glucosa es un residuo de la actividad de la enzima 1-SST [12] entonces habrá mayor acumulación de glucosa entre las plantas que sintetizan mayor cantidad de inulina, y a su vez podría sugerir una mayor actividad de dichas enzimas cuando existe un estrés hídrico, lo que reporta de esta manera García *et al.* [18] cuando evalúan el efecto de la sequía sobre el metabolismo de carbohidratos en *Vernonia*. En nuestro estudio reportamos niveles de glucosa superiores en presencia de estrés que en ausencia pero no se puede asegurar dicha actividad enzimática. La correlación reportada inulina/glucosa podría estar presente en el caso de los estrés inducidos por 20 y 30% de PEG, intensidades de estrés que finalmente eran significativas para provocar el aumento de inulina en las plantas, sin embargo, las cantidades de glucosa obtenidas en presencia de 10% de PEG no se pueden explicar con este esquema.

Finalmente, el estrés hídrico no modificó el contenido de fructosa de las plantas debido, quizá, a que su ruta metabólica no está alterada por el estrés impuesto.

5. Conclusiones

En este estudio se investigaron los cambios en el contenido de carbohidratos en respuesta a un estrés hídrico y se encontró que dicho estrés modificaba el metabolismo de inulina en dalia. Así, el contenido de inulina aumentó en presencia de PEG a 20% y 30%, el contenido de sacarosa aunque presenta una tendencia al aumento, las diferencias no fueron significativas. El contenido de glucosa presenta un aumento con respecto a las plantas control, finalmente los niveles de fructosa no presentan modificación alguna. El incremento en el contenido de inulina puede ser consecuencia de una aumentación de su síntesis o de una disminución de su degradación. Observar que existe un aumento en el contenido de glucosa podría indicar un aumento en la actividad de la primera enzima de la ruta de síntesis de inulina ya que por su actividad se libera dicha molécula. La ausencia de modificación de los contenidos de fructosa podría también apoyar esta hipótesis. Sin embargo para poder resolver estas incógnitas será necesario en futuras investigaciones medir actividad enzimática y expresión genética de la ruta de síntesis de inulina en dalia.

Agradecimientos

Este trabajo formó parte del proyecto CB2010/153816 apoyado con recursos del Fondo Sectorial de Investigación Básica SEP-CONACYT. IJRG fue apoyado durante parte de este trabajo con una beca de licenciatura CONACYT.

Referencias

- [1] Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. y Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45, 523–539

- [2] Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Camarero, J. J., Corcuera, L., Sisó S. y Gil-Pelegrín, E. (2004). Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. En: *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. Páginas 163-190. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A., Madrid.
- [3] Mulroy, T. W. y Rundel. P. W. (1977). Annual plants: Adaptations to desert environments. *Bioscience*, 27, 109
- [4] Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal* (3ra Ed). Universitat Jaume I.
- [5] Moreno, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico, una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27, 179-191
- [6] Ingram, J. y Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 47, 377-403
- [7] Bohnert, H. J., Nelson, D. E. y Jensen, R. G. (1995). Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell*, 7, 1099-1111
- [8] Bonnett, G. D., Sims, I. M., John, J. A. S. y Simpson R. J. (1994). Purification and characterization of fructans with b (2,1) and b (2,6) glycosidic linkages suitable for enzyme studies. *New Phytologist*, 127, 261-269
- [9] Kooops, A. J. y Jonker, H. H. (1996). Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia (II. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis in vitro with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan 1-fructosyltransferase). *Plant Physiology*, 110, 1167-1175
- [10] Vijn, I. y Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate?. *Plant physiology*, 120, 351-350
- [11] Edelman, J. y Jefford, T.G. (1968). The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist*, 67, 517-531
- [12] Banguela, A. y Hernández, L. (2006). Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotecnología Aplicada*, 23, 202-210
- [13] Pollock, C. J. y Cairns, A. J. (1991). Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42, 77-101

- [14] De roover, J., Vandenbranden, K., Van laere A. y Van den Ende, W. (2000). Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). *Planta*, 210, 808-814
- [15] Bielecki, R. L. (1993). Fructan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylilyflower. *Plant Physiology*, 103, 213-219
- [16] Verslues, P. E. (2010). Quantification of water stress-induced osmotic adjustment and proline accumulation for *Arabidopsis thaliana* molecular genetic studies. *Methods of Molecular Biology*. 639, 301-315.
- [17] Kerepesi, I., Galiba G. y Bányai, E. (1998). Osmotic and salt stresses induced differential alteration in water-soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5347-5354
- [18] Garcia, P. M., Asega, A. F., Silva, E. A. y Carvalho, M. A. (2011). Effect of drought and rewatering on fructan metabolism in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant physiology and biochemistry*, 49, 664-670
- [19] Lu, C. y Zhang, J. (1999). Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany*, 50, 1199–1206