

DAÑO OXIDATIVO Y COMPORTAMIENTO ANTIOXIDANTE DE ASCORBATO Y GLUTATIÓN EN DOS GENOTIPOS DE CEBOLLA CON DISTINTA SENSIBILIDAD ANTE LA SALINIDAD

Marina García¹, Grisaly García², José Hernández³ y Alejandro Pieters⁴

RESUMEN

La salinidad es un factor limitante en la productividad de la cebolla porque esta especie es sensible a las sales. Se evaluó el efecto de la salinidad sobre el daño oxidativo y comportamiento antioxidante de ascorbato y glutatión, en dos genotipos de cebolla con respuesta distinta ante las sales, a fin de determinar si la protección antioxidante está relacionada con esa sensibilidad diferencial. Plantas de 40 días de edad de los genotipos ‘Granex 429’ y ‘Texas 502’, con baja y alta sensibilidad al estrés salino respectivamente, fueron estresadas con una mezcla de sales ($CE\ 6\ dS\cdot m^{-1}$) por 20 días, manteniendo un grupo control. Finalizado ese período, se determinó el grado de peroxidación lipídica (GPL) y los contenidos de ascorbato y glutatión en raíces y hojas. La salinidad afectó el GPL en la hoja, en mayor magnitud en ‘Texas 502’ respecto a ‘Granex 429’, mientras que en la raíz esta variable no fue alterada. El contenido radical y foliar de ascorbato disminuyó con la salinidad en ‘Texas 502’; no obstante, en ‘Granex 429’ éste no varió en la raíz, pero en la hoja hubo un aumento significativo en su concentración y estado redox. En ambos genotipos, con la salinidad, el contenido de glutatión se incrementó en la raíz y decreció en la hoja. Estos resultados sugieren que la menor sensibilidad a las sales en ‘Granex 429’ está asociada con una mejor capacidad de protección antioxidante del tejido foliar, acompañada de un incremento en la actividad antioxidante del ascorbato.

Palabras clave adicionales: *Allium cepa*, ascorbato, estrés salino, glutatión, peroxidación lipídica

ABSTRACT

Oxidative damage and antioxidant behaviour of ascorbate and glutathione in two onion genotypes differing in salt sensitivity

Salinity is a limiting factor on the productivity of the onion, because this species is sensitive to salts. In this study, the effect of salinity on oxidative damage and the antioxidant behavior of ascorbate and glutathione, was evaluated in two genotypes of onion with different response to salts, in order to determinate if the antioxidant protection is related to their differential sensitivity to salts. Plants 40 days old of the genotypes ‘Granex 429’ and ‘Texas 502’, with low and high sensitivity to salt stress respectively, were stressed by a mixture of salts ($CE\ 6\ dS\cdot m^{-1}$) for 20 days, maintaining a control group; after the end of the period, it was determined: degree of lipid peroxidation (DLP) and content of ascorbate and glutathione in roots and leaf. The salinity affected the DPL in leaves being that effect higher in ‘Texas 502’ than in ‘Granex 429’ while in roots this variable was not altered. The content of ascorbate in roots and leaves decreased with salinity in ‘Texas 502’ while in ‘Granex 429’ it not changed in roots, but in the leaf there was a significant increase in its concentration and redox state. With salinization the root content of glutathione was increased and the opposite occurred in the leaf of both genotypes. The results suggested that the lower sensitivity to salts in ‘Granex 429’ is associated with a better capacity of antioxidant protection of the foliar tissue, accomplished by an increase in the antioxidant activity of ascorbate.

Additional key words: *Allium cepa*, ascorbate, glutathione, lipid peroxidation, onion, salinity stress

INTRODUCCIÓN

La salinidad se considera el principal factor ambiental que limita la productividad agrícola, ya que la mayoría de los cultivos son sensibles a las

sales y la salinización de los suelos de vocación agrícola se incrementa día a día (Almeida y Serralheiro, 2017; Shrivastava y Kumar, 2015). Las sales afectan procesos fisiológicos fundamentales en la planta, debido al efecto

Recibido: Septiembre 10, 2018

Aceptado: Febrero 1, 2019

¹ Facultad de Ingeniería Agronómica, Universidad Técnica de Manabí. Manabí, Ecuador.
e-mail: marina.garcia@utm.edu.ec (autor de correspondencia)

² Dpto. Ciencias Biológicas, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado. Apdo. 400. Barquisimeto, Venezuela. e-mail: grisalygarcia@ucla.edu.ve.

³ Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CEBAS. Murcia, España.

⁴ Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. San Antonio de los Altos, Venezuela

osmótico y al efecto iónico específico que éstas producen, lo que a su vez desencadena sequía fisiológica, toxicidad iónica y desbalances nutricionales (Sairam y Tyagi, 2004; Negrão et al., 2017). Estas alteraciones inducen un desequilibrio metabólico que promueve la proliferación de moléculas altamente tóxicas, conocidas como especies activas de oxígeno (EAO), tales como oxígeno singlete (1O_2), ión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH \cdot), las cuales en exceso provocan estrés oxidativo (Abd et al., 2016).

Las distintas EAO se originan a partir de la transformación del oxígeno por sobre-reducción durante la transferencia de electrones, en procesos que involucran reacciones de óxido-reducción como la fotosíntesis y la respiración (Halliwell, 2006; Choudhury et al., 2017). La salinidad, propicia el cierre estomático, aumentando la concentración interna de O_2 , el cual puede transformarse en EAO por diferentes vías (Choudhury et al., 2017). El incremento de EAO provoca daños oxidativos que se reflejan en la alteración estructural de diferentes biomoléculas como lípidos, proteínas, enzimas, clorofila y ácidos nucleicos; los lípidos de la membrana sufren una reacción oxidativa en cadena que se conoce como peroxidación lipídica, que afecta la estructura y propiedades de la misma al perder su integridad (Khan y Panda, 2008), con lo cual aumenta la liberación de iones y solutos desde el interior de la célula. En plantas sometidas a estrés por salinidad se ha demostrado que la acumulación de los iones componentes de las sales en los tejidos, provoca deterioro de la estructura de la bicapa de lípidos de la membrana plasmática, lo cual se agudiza con la proliferación de EAO (Khan y Panda, 2008; Choudhury et al., 2017).

Entre los mecanismos que se han relacionado con la tolerancia de las plantas a condiciones salinas se encuentra la activación del sistema antioxidante, el cual incluye componentes de naturaleza enzimática o no enzimática, capaces de controlar la sobreproducción de EAO, reduciendo así el riesgo de daño oxidativo (Farooq et al., 2015; Kibria et al., 2017). Entre los principales antioxidantes no enzimáticos se incluyen ascorbato, glutatión y tocoferoles (Das y Roychoudhury, 2014). El ascorbato se considera el principal antioxidante no enzimático que juega un papel crucial en la mitigación de la actividad

excesiva de las EAO; es por ello que las plantas con baja biosíntesis de este metabolito son más sensibles a diferentes tipos de estrés ambiental, entre éstos la salinidad (Venkatesh y Park, 2014). El glutatión también se considera un antioxidante fuerte, que reduce el estrés oxidativo previniendo la peroxidación de lípidos en la membrana plasmática, por consiguiente, este metabolito también se ha relacionado con la tolerancia a diferentes estreses abióticos, incluyendo la salinidad (Hasanuzzamani et al., 2017). Asimismo, existen evidencias de que la aplicación exógena tanto de glutatión (Sadak et al., 2017; Hasanuzzamani et al., 2017) como de ascorbato (Athar et al., 2008; Siddiqui, 2018) en plantas bajo estrés salino, promueve la actividad de otros antioxidantes con lo cual mejora la respuesta al estrés salino.

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una especie sensible a la salinidad (Maas, 1990). En Venezuela, la mayor producción de este cultivo se ubica en el valle de Quíbor (estado Lara), zona en la cual la salinidad constituye un factor limitante para la producción agrícola (Torres et al., 2017; Villafañe et al., 1999). No obstante, es escasa la información disponible en cuanto al comportamiento ante la salinidad en los genotipos más utilizados en el país. Al respecto, García et al. (2015) evaluaron el crecimiento y rendimiento en siete materiales genéticos de cebolla usados en la zona hortícola de Quíbor y encontraron diferencias en la sensibilidad ante la salinidad en los mismos, resultando 'Texas 502' el genotipo más sensible y 'Granex 429' el menos sensible. En otro estudio, se determinó que el segundo genotipo posee mejor capacidad de exclusión de Na^+ respecto al primero, lo cual ayuda a explicar su menor sensibilidad a las sales (García et al., 2012). Sobre la base de esos antecedentes, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la salinidad sobre el daño oxidativo y el comportamiento antioxidante de ascorbato y glutatión en la raíz y en la hoja de la cebolla 'Texas 502' y 'Granex 429', a fin de determinar si la protección antioxidante está relacionada con la respuesta diferencial ante la salinidad en esos genotipos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en las

instalaciones del Departamento de Mejora Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) en la ciudad de Murcia, España.

Se utilizaron dos genotipos de cebolla, que como ya se mencionó, poseen sensibilidad diferencial ante la salinidad: 'Texas 502' (mayor sensibilidad) y 'Granex 429' (menor sensibilidad). Las semillas fueron germinadas en vermiculita, mantenidas en condiciones de oscuridad a 25 °C durante 5 días. Posteriormente, las plántulas fueron trasladadas a una cámara de crecimiento ajustada a un fotoperiodo de 10 horas, temperatura de 25/20 °C diurna/nocturna, humedad relativa entre 60 y 80% y radiación fotosintéticamente activa de 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Transcurridos 20 días después de la siembra (dds), se seleccionaron 64 plantas de cada genotipo, las cuales fueron trasplantadas a recipientes de 10 L de capacidad, provistos de una lámina PVC a manera de tapa con 32 agujeros de 2 cm de diámetro aproximadamente y de un sistema de aireación permanente. En cada agujero se colocó una planta sostenida con algodón para mantenerla estable y en el interior de cada recipiente se agregó solución nutritiva Hoagland diluida al 50 %. A los 40 dds se inició la aplicación del tratamiento salino en 32 plantas de cada genotipo, incorporando a la solución nutritiva una mezcla de las tres sales predominantes en la zona de Quíbor (Villafañe et al., 1999): CaSO_4 , MgSO_4 y NaCl en proporción 1:2,5:3 hasta lograr una conductividad eléctrica de 6 $\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$; paralelamente se dejó un tratamiento control conformado por 32 plantas por genotipo, en el que no se añadió sales a la solución nutritiva. El período de salinización se prolongó por 20 días y las soluciones nutritivas fueron reemplazadas semanalmente desde el inicio del ensayo.

Se usó un diseño completamente aleatorizado, en un arreglo de tratamientos factorial 2 x 2: dos genotipos y dos tipos de solución de riego (solución salina y no salina), para un total de cuatro tratamientos y cuatro repeticiones con ocho plantas por repetición. El muestreo se realizó al finalizar el período de estrés salino; para ello se seleccionó tanto el tercio medio del sistema radical como de la lámina foliar de la tercera hoja expandida en sentido descendente; el material vegetal fue preservado inmediatamente en nitrógeno líquido y mantenido a -80 °C hasta su

procesamiento.

El daño oxidativo fue evaluado mediante la determinación del grado de peroxidación lipídica, para lo cual se siguió el método de Çakmak y Horst (1991). Se preparó un extracto con 1 g de las muestras radicales y foliares congeladas, las cuales se maceraron y luego se incorporó 1 mL de ácido tricloroacético (0,1 %); el extracto obtenido se centrifugó a 10.000 rpm, se tomó 0,4 mL de sobrenadante y se agregó a 1,2 mL de una solución de ácido tiobarbitúrico (0,5 %) y ácido tricloroacético (20 %); esta mezcla se calentó a 95 °C durante 30 min, se incubó en baño de hielo para detener la reacción, se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm y en el sobrenadante se cuantificó el contenido de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS, del inglés), mediante la lectura de la absorbancia en éste a 532 y 600 nm; la concentración de TBARS se estimó dividiendo la diferencia en absorbancia (A532-A600), entre el coeficiente de extinción molar del ácido tiobarbitúrico (1,55 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) y el resultado fue expresado en $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco.

El contenido de ascorbato se determinó según el método de Law et al. (1983), el cual se basa en la reducción del Fe^{+3} a Fe^{+2} por el ascorbato reducido (ASC) en una solución ácida. Se maceró en frío 1 g de las muestras vegetales congeladas en 1 mL de ácido tricloroacético (10% p/v). El extracto obtenido se centrifugó a 13.000 rpm y 4 °C durante 15 min; el sobrenadante se incorporó a un buffer HEPES/NaOH (pH 7) y se usó para medir la concentración de ASC y ascorbato total. Para determinar ASC se incorporó a esa mezcla una solución de buffer fosfato sódico NaH_2PO_4 (150 mM, pH 7,4), H_3PO_4 (44 % v/v), biperidil 4 % (p/v en etanol 70 %) y FeCl_3 (3 % w/v), se agitó, se dejó en reposo durante 1 hora a 37 °C y se midió la absorbancia a 525 nm. Para medir ascorbato total, además de esos reactivos se adicionó diotetrol (DTT 10 mM) el cual actúa como agente reductor del dehidroascorbato (DHA) o ascorbato oxidado, se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente, se agregó N-etilmaleimida (0,5 % p/v) a fin de neutralizar el excedente de DTT y se midió nuevamente la absorbancia. El contenido de ASC se calculó a partir de una curva patrón de concentraciones

conocidas de ASC y la concentración de DHA se estimó mediante la diferencia entre el ascorbato total (ASC+DHA) y el ASC. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco. A fin de conocer el estado redox o poder reductor del ascorbato, se determinó la relación ASC/ASC+DHA y se expresó en porcentaje.

La determinación del glutatión se realizó siguiendo el método de Griffith (1985); 1 g de muestra congelada de cada órgano, se maceró en frío con 1 mL de ácido perclórico 1M y el extracto obtenido se centrifugó a 13.000 rpm y 4 °C por 15 min. Para cuantificar el contenido de glutatión total se tomaron 300 μL del sobrenadante y se neutralizó con buffer fosfato potásico (0,5 M pH 7,5); esta mezcla se agitó y se incorporó en una solución preparada con buffer fosfato potásico (0,5 M pH 7,5), NADPH (0,2 mM), ácido 5,5'-ditiobis (2-nitro-benzoico) (DTNB 1.2 mM) y 3 unidades de glutatión reductasa. Esta enzima transforma el glutatión oxidado (GSSG) en glutatión reducido (GSH), por lo que el glutatión total (GSSG + GSH) se midió en estado reducido; este último al reaccionar con el DTNB genera tionitrobenzoato, el cual se midió por espectrofotometría a 412 nm.

El contenido de glutatión total fue determinado mediante una curva patrón elaborada a partir de concentraciones conocidas de GSH. Para medir GSSG se tomó una alícuota del sobrenadante inicial y se neutralizó con buffer fosfato potásico (0,5 M pH 7,5) y 2-vinilpiridina, la cual bloquea los grupos tiol permitiendo enmascarar el GSH presente en la muestra; esta mezcla se agitó vigorosamente hasta lograr su emulsión, se incubó por una hora a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 412 nm; la concentración de GSSG se determinó a partir de una curva patrón de concentraciones conocidas de este producto. Una vez determinados los valores correspondientes a la concentración de glutatión total y de GSSG, se estimó el contenido de GSH presente en la muestra, mediante la diferencia entre esos dos valores. A fin de conocer el estado redox o poder reductor del GSH, se calculó la relación GSH/GSH+GSSG y se expresó en porcentaje.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de medias de Tukey, utilizando el programa Statistix

versión 8.0 (Tallahassee FL, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Grado de peroxidación lipídica. La salinidad no tuvo efecto sobre el grado de peroxidación lipídica en el tejido radical, ya que la concentración de TBARS fue similar en las plantas del grupo control y en las salinizadas en los dos genotipos probados (Cuadro 1), lo cual indica que las sales no provocaron un efecto deletéreo sobre la estructura de bicapa lipídica de la membrana en las células de los tejidos radicales; no obstante, existe la probabilidad de que hayan ocasionado algún daño oxidativo en otras biomoléculas de la membrana. Resultados similares han sido documentados por otros autores en maíz (Azevedo et al., 2006) y sorgo (Alves et al., 2005); Por el contrario, Khan y Panda (2008) encontraron un aumento significativo en el GPL en la raíz de un genotipo de *Oryza sativa* sensible a la salinidad, en comparación con otro tolerante, lo cual evidencia la variabilidad que existe en cuanto a esta respuesta en distintas especies.

Contrariamente a lo observado en la raíz, en la hoja las sales provocaron un incremento significativo en el GPL (Cuadro 1), el cual fue de 78 % en 'Texas 502' y 42 % en 'Granex 429', respecto al tratamiento control, lo que indica que en este órgano el daño oxidativo provocado por las sales fue sustancialmente mayor en el genotipo sensible, por lo que se puede deducir la existencia de una relación entre la sensibilidad de estos genotipos ante las sales y el grado de daño oxidativo en este órgano.

En un estudio previo, García et al. (2012) encontraron que bajo condiciones salinas, hubo una mayor acumulación de Na^+ en el tejido foliar de 'Texas 502', en comparación con 'Granex 429', lo cual podría vincularse con el mayor daño oxidativo observado en la hoja del primer genotipo. El comportamiento descrito se corresponde con lo observado por otros investigadores en cultivos como la mostaza verde (Kumar et al., 2018), guisante (Ahmad et al., 2008), maíz (Azevedo et al., 2005; Azooz et al., 2009) y cebolla (El-Baky et al., 2003), ya que en esas especies el GPL bajo condiciones de salinidad fue mayor en los materiales genéticos

García et al. Daño oxidativo y efecto antioxidante en cebolla en condiciones salinas

más sensibles a este factor de estrés. Tomando en consideración este hallazgo, el GPL a nivel foliar podría sugerirse como un indicador útil para la selección de genotipos de cebolla por su sensibilidad a las sales. Es posible que el mayor daño oxidativo en el tejido foliar, respecto al

radical, en los dos genotipos estudiados, se deba a que en este órgano ocurre un mayor número de eventos que involucran la liberación de electrones y la acumulación de O₂, propiciando su sobre-reducción y la proliferación de EAO (Apel y Hirt, 2004; Azevedo et al., 2006; Hamed et al., 2007).

Cuadro 1. Contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) indicadoras de la peroxidación de lípidos en la raíz y la hoja de dos genotipos de cebolla sometidos a estrés salino

Órgano	Genotipo	Control	Salino
		nmol·g ⁻¹ peso fresco	
Raíz	‘Texas 502’	154 aA	115 aA
	‘Granex 429’	122 aA	117 aA
Hoja	‘Texas 502’	241 cC	430 aA
	‘Granex 429’	248 cC	353 bB

Letras minúsculas para comparaciones entre tratamientos y mayúsculas entre genotipos. Letras distintas indican diferencia significativa según prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

Contenido de ascorbato y su estado redox. En el tejido radical de ‘Texas 502’ el estrés salino provocó una disminución de 49 y 58 % en la concentración de ascorbato reducido (ASC) y oxidado (DHA) respectivamente, en relación a las plantas no estresadas; mientras que el estado redox de este metabolito (ASC/ASC+DHA), no se afectó bajo la condición de estrés (Cuadro 2). En ‘Granex 429’, la acumulación de ASC y DHA en la raíz no varió por efecto de las sales y el estado redox del ascorbato fue similar en las plantas control y en las salinizadas. A pesar de que

el estado redox del ascorbato en la raíz de ‘Texas 502’ y ‘Granex 429’ mostró valores similares, el poder antioxidante de este metabolito pudiera ser más limitado en las plantas del primer genotipo, dado que en éste el contenido de ASC disminuyó respecto al control, mientras que en el segundo, su concentración no fue afectada por las sales (Cuadro 2). Contrariamente, Abd et al. (2016) encontraron un aumento en el contenido de ASC y una reducción en el poder redox del ascorbato en plántulas de maíz sometidas a estrés salino.

Cuadro 2. Contenido de ascorbato reducido (ASC) y de dehidroascorbato (DHA) y estado redox (ASC/ASC+DHA), en la raíz y la hoja de dos genotipos de cebolla sometidos a estrés salino

	Tratamiento	ASC	DHA	Estado redox	
		(μmol·g ⁻¹ peso fresco)		(%)	
Raíz	‘Texas 502’	Control	0,91 a	0,57 a	61,26 a
		Salino	0,46 b	0,24 b	65,68 a
	‘Granex 429’	Control	0,81 a	0,48 a	62,85 a
		Salino	0,77 a	0,53 a	59,82 a
Hoja	‘Texas 502’	Control	2,89 c	2,28 a	55,95 cd
		Salino	1,63 d	1,52 bc	51,77 d
	‘Granex 429’	Control	3,48 b	1,79 b	66,00 b
		Salino	4,01 a	1,37 c	74,53 a

Letras distintas en cada columna indican diferencia significativa según prueba de Tukey ($P < 0,05$)

En el tejido foliar de ‘Texas 502’ la acumulación de ASC y DHA descendió significativamente por efecto de las sales, en una

magnitud de 44% y 33% respectivamente, en comparación con el tratamiento control, mientras que su estado redox no mostró diferencias

significativas entre tratamientos (Cuadro 2). La disminución en el contenido de ASC observada en 'Texas 502' constituye una desventaja y posiblemente está relacionada con el mayor GPL en el tejido foliar de este genotipo, respecto a 'Granex 429' (Cuadro 1), ya que se considera que el incremento en la concentración de este metabolito en plantas salinizadas, es lo que garantizaría su efecto depurador de EAO reduciendo el riesgo de estrés oxidativo (Shalata et al., 2001; Hernández et al., 2010).

En cuanto a 'Granex 429', se encontró que la concentración foliar de ASC se incrementó en un 15% por efecto de las sales, mientras que el de DHA descendió en 24%; este efecto diferencial del estrés salino sobre los dos estados del ascorbato, se tradujo en un aumento significativo en su capacidad redox bajo la condición salina y por ende en un incremento en su poder antioxidante (Cuadro 2), lo cual demuestra que bajo la condición de estrés salino se estimuló la capacidad de protección antioxidante del ascorbato en la hoja, y ello contribuye a explicar el menor daño oxidativo observado en el tejido foliar de 'Granex 429', respecto a 'Texas 502' (Cuadro 1). Este comportamiento constituye una ventaja que puede estar vinculada con la menor sensibilidad a las sales de 'Granex 429', respecto a 'Texas 502', ya que se sabe que el ASC es un sustrato fundamental para la activación del ciclo ascorbato-glutatión ó Halliwell-Asada-Foyer, en el cual se reduce el H_2O_2 a H_2O y además este metabolito juega un papel crucial en la remoción de EAO que se generan durante la fotosíntesis (Venkatesh y Park, 2014; Kumar et al., 2018).

El incremento en la concentración foliar de ascorbato con la salinidad, se ha reportado también en *Brassica juncea* (Kumar et al., 2018) y *Phaseolus vulgaris* (Taïbi et al., 2016), mientras que lo contrario fue observado en hojas de un cultivar sensible y otro tolerante de *Pisum sativum* en respuesta a la salinidad (Hernández et al., 2000).

Contenido de Glutatión y su estado redox. La acumulación de GSH en el tejido radical de ambos genotipos se incrementó significativamente por efecto de la salinidad, en una magnitud de 30 % 'y 32 % en 'Texas 502' y 'Granex 429'

respectivamente, en relación a las plantas no estresadas, mientras que la de GSSG fue similar en ambos tratamientos en el primer genotipo y tuvo un aumento significativo en el segundo; el estado redox del glutatión indicó que éste se presenta predominantemente en condición reducida, en ambos genotipos sin diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 3). El incremento en la acumulación de GSH en el tejido radical de los dos genotipos por efecto de la salinidad, sugiere que este metabolito participa en la protección antioxidante de este órgano cuando las plantas están sometidas a estrés salino, dada su propiedad de regular la proliferación de EAO (Hasanuzzamani et al., 2017) y posiblemente debido a ello no se observó un aumento en el GPL bajo la condición salina en ninguno de los dos genotipos (Cuadro 1). Un aumento en el contenido radical de GSH bajo condiciones salinas también se ha descrito en plantas de arroz (Tsai et al., 2004), girasol (Di Baccio et al., 2004) y en plántulas de maíz (Abd et al., 2016) y por ello este metabolito se ha vinculado con la mitigación del daño oxidativo provocado por las sales en esos cultivos. El hecho de que el incremento en la acumulación de GSH haya sido similar en los dos genotipos de cebolla estudiados, parece indicar que no hay una asociación entre el contenido radical de este metabolito y su grado de sensibilidad a las sales, lo cual contrasta con hallazgos obtenidos en otros cultivos, en los que se ha evidenciado que el incremento en la acumulación de glutatión por efecto de las sales es mayor en genotipos tolerantes, respecto a los sensibles (Shalata et al., 2001; Khan y Panda, 2008).

En relación a la acumulación foliar de glutatión, se encontró que en las plantas salinizadas de ambos genotipos hubo una disminución significativa en el contenido de GSH, la cual fue de 16 y 45 % en 'Texas 502' y 'Granex 429' respectivamente, en relación al grupo control, mientras que el GSSG aumentó en un 24 % en el primer genotipo y se mantuvo en el segundo; en cuanto al estado redox del glutatión, hubo una disminución significativa en los dos genotipos pero ésta fue de mayor magnitud en 'Granex 429' (Cuadro 3). El comportamiento descrito, indica que el efecto deletéreo de las sales

García et al. Daño oxidativo y efecto antioxidante en cebolla en condiciones salinas

sobre el contenido foliar de GSH fue más severo en ‘Granex 429’ que en ‘Texas 502’, lo cual se reflejó en un descenso más marcado en el estado redox del glutatión en el primer genotipo. Estos resultados coinciden con lo observado por Hernández et al. (2000) en dos cultivares de *Pisum sativum* con tolerancia salina diferencial. Por el contrario, en arroz (Vaidyanathan et al., 2003) y en *Brassica juncea* (Kumar et al., 2018), se ha reportado un incremento en la acumulación foliar de este antioxidante bajo condiciones

salinas. Asimismo El-Baky et al. (2003), trabajando con tres cultivares de cebolla (‘Behary Red’, ‘Giza 6’ y ‘Giza 20’) sometidos a estrés por sales, encontraron que bajo la condición salina se produjo un incremento en la acumulación foliar de GSH el cual fue más pronunciado en ‘Behary Red’, genotipo con menor sensibilidad a las sales. Estos hallazgos evidencian que la capacidad antioxidante del glutatión en cultivos sometidos a estrés por salinidad varía no solo entre especies, sino también dentro de éstas.

Cuadro 3. Contenido de Glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) y su estado redox (GSH/GSH+GSSG), en la raíz y la hoja de dos genotipos de cebolla sometidos a estrés salino

	Genotipo	Tratamiento	GSH	GSSG	Estado redox
			($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco)		(%)
Raíz	‘Texas 502’	Control	1,96 bc	0,46 bc	81,02 ab
		Salino	2,55 a	0,47 bc	84,66 a
	‘Granex 429’	Control	1,75 c	0,53 b	76,82 bc
		Salino	2,31 ab	0,62 a	78,92 bc
Hoja	‘Texas 502’	Control	0,55 a	0,34 b	61,70 b
		Salino	0,46 b	0,42 a	51,98 c
	‘Granex 429’	Control	0,60 a	0,21 c	73,81 a
		Salino	0,33 c	0,27 bc	55,31 c

Letras distintas en cada columna indican diferencia significativa según prueba de Tukey ($P<0,05$)

Es de hacer notar que los dos genotipos de cebolla estudiados, presentaron mayor contenido de GSH en la raíz que en la hoja, lo cual coincide con lo observado por Di Baccio et al. (2004) en un genotipo de girasol tolerante a las sales, en el cual éstas provocaron un incremento en este metabolito sólo en la raíz. Cabe destacar que el glutatión ha sido reconocido como un antioxidante eficaz en la remoción directa de EAO altamente tóxicas, como el radical hidroxilo y el superóxido y por su participación en la transformación de H_2O_2 a H_2O en el ciclo ascorbato-glutatión (Tausz et al., 2004), por lo cual se presume que su disminución en la hoja por efecto de la salinidad, limita su papel en la protección antioxidante de este órgano en los genotipos de cebolla estudiados.

CONCLUSIONES

La salinidad no provocó aumento en el grado de peroxidación lipídica en la raíz de los genotipos de cebolla, mientras que en la hoja sí hubo un

incremento en el mismo con el estrés salino, siendo ese efecto de menor magnitud en el genotipo menos sensible a las sales, lo que evidencia su mejor capacidad de protección antioxidante. Lo anterior sugiere que el grado de peroxidación lipídica en la hoja, pudiera ser un indicador útil para la selección de genotipos de cebolla por su sensibilidad a las sales.

El contenido de ASC en la raíz disminuyó con el estrés salino en ‘Texas 502’ y se mantuvo en ‘Granex 429’, indicando que el ascorbato no participa en la protección antioxidante del tejido radical. En la hoja, la concentración de ASC y su estado redox aumentó solo en ‘Granex 429’, lo que sugiere que la menor sensibilidad a las sales en este genotipo está relacionada con la participación de ascorbato en la protección antioxidante a nivel foliar.

La concentración de GSH en la raíz aumentó con la salinidad en ambos genotipos, por lo que se presume que el glutatión participa en la protección antioxidante de los tejidos radicales de los

genotipos probados, independientemente del grado de sensibilidad que presentan al estrés salino. En la hoja, por el contrario, el contenido de GSH disminuyó con la salinidad en los dos genotipos, sugiriendo que el glutatión no está involucrado en la protección antioxidante de la hoja contra el estrés salino en los genotipos estudiados.

LITERATURA CITADA

1. Abd Elgawad, H., G. Zinta, M. Hegab, R. Pandey, H. Asard y W. Abuelsoud. 2016. High salinity induces different oxidative stress and antioxidant responses in maize seedlings organs. *Front. Plant Sci.* 7(276): 1-11.
2. Ahmad P., R. John, M. Sarwat y S. Umar. 2008. Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. *Int. J. Plant Prod.* 2(4): 353-366.
3. Almeida R. y R. Serralheiro. 2017. Soil salinity: effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization. *Horticulturae* 3(2):30. 13 p.
4. Alves Da Costa P., A. Azevedo Neto, M. Alves Bezerra, J. Prisco y E. Gomes-Filho. 2005. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerant. *Braz. J. Plant Physiol.* 17(4): 353-361.
5. Apel K. y H. Hirt. 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, oxidative stress, and signaling transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
6. Athar H., A. Khan y M. Ashraf. 2008. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environ. Exp. Bot.* 63: 224-231.
7. Azevedo-Neto A., J. Prisco, J. Eneas-Filho, C. Braga y E. Gomes-Filho. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environ. Exp. Bot.* 56(1): 87-94.
8. Azooz M., A. Ismail y M. Elhamd. 2009. Growth, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities as a selection criterion for the salt tolerance of maize cultivars grown under salinity stress. *Int. J. Agric. Biol.* 11(1): 21-26.
9. Çakmak I. y J. Horst. 1991. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol.Plant.* 83: 463-468.
10. Choudhury F., R. Rivero, E. Blumwald y R. Mittler. 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J.* 90(5): 856-867.
11. Das K. y A. Roychoudhury. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2:53. 13 p.
12. Di Baccio D, F. Navari-Izzo y R. Izzo. 2004. Seawater irrigation: antioxidant defense responses in leaves and roots of a sunflower (*Helianthus annuus* L.) ecotype. *J. Plant Physiol.* 161: 1359-1366.
13. El-Baky A., H. Hanna, M. Amal y M. Hussein. 2003. Influence of salinity on lipid peroxidation and isoenzymes in leaves of some onion cultivars. *Asian J. Plant Sci.* 2(17): 1220-1227.
14. Farooq M., M. Hussain, A. Wakeel, H. Kadambot y M. Siddique. 2015. Salt stress in maize: Effects, resistance mechanisms, and management. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 35: 461-481.
15. García G., M. García y H. Ramírez. 2012. Acumulación radical y foliar de iones en dos genotipos de cebolla con distinta sensibilidad ante el estrés salino. *Journal of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* 56: 63-68.
16. García G., M. García y H. Ramírez. 2015. Comportamiento de siete cultivares de *Allium cepa* L. ante diferentes niveles de estrés salino. *Bioagro* 27 (2): 93:102.
17. Griffith O. 1985. Glutathione and glutathione disulfide. *In:* H. Bergmeyer (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Edit. Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany. Volume 8. pp. 521-529.
18. Halliwell B. 2006. Reactive species and

- antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141(2): 312-322.
19. Hamed K., A. Castagna, E. Salem, A. Ranieri y Ch. Abdelly. 2007. Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regul.* 53(3): 185-194.
 20. Hasanuzzamani M., K. Nahar, T. Anne y M. Fujita. 2017. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 23(2): 249-268.
 21. Hernández J., A. Jiménez, P. Mullineaux y F. Sevilla. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.* 23: 853-862.
 22. Hernández M., N. Fernández-García, P. Díaz-Vivancos y E. Olmos. 2010. A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. *J. Exp. Bot.* 61(2): 521-535.
 23. Khan M. y S. Panda. 2008. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiol. Plant.* 30(1): 81-89.
 24. Kibria M., M. Hossain, Y. Murata y A. Hoque. 2017. Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes. *Rice Science* 24(3): 155-162.
 25. Kumar M., R. Kumar, V. Jain y S. Jain. 2018. Differential behavior of the antioxidant system in response to salinity induced oxidative stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of *Brassica juncea* L. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 13: 12-19.
 26. Law M., S. Charles y B. Halliwell. 1983. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem. J.* 210: 899-903.
 27. Maas E. 1990. Crop salt tolerance. In: K. Tanji (ed.). *Agricultural Salinity Assessment and Management*. American Society of Civil Engineers. New York. pp. 262-304.
 28. Negrão S., S. Schmöckel y M. Tester. 2017. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Ann. Bot.* 119(1): 1-11.
 29. Sadak M., E. Abd Elhamid y M. Ahmed. 2017. Glutathione induced antioxidant protection against salinity stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plant. *Egypt. J. Bot.* 57(2): 293-302.
 30. Sairam R. y A. Tyagi. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* 86(3): 407-421.
 31. Shalata A., V. Mittova, M. Volokita, M. Guy y M. Tal. 2001. Response of the cultivated tomato and this wild salt-tolerance relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiol. Plant.* 112(4): 487-494.
 32. Shrivastava P. y R. Kumar. 2015. Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J. Biol. Sci.* 22(2): 123-131.
 33. Siddiqui M., S. Alamri, M. Al-Khaishany, M. Al-Qutami y H. Ali. 2018. Ascorbic acid application improves salinity stress tolerance in wheat. *Chiang Mai J. Sci.* 45: 1-11.
 34. Taïbi, K., F. Taïbi, L. Abderrahima, A. Ennajahb, M. Belkhdja y J. Mulet. 2016. Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *S. Afri. J. Bot.* 105: 306-3012.
 35. Tausz M., H. Šircelj y D. Grill. 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: Is a stress-response concept valid? *J. Exp. Bot.* 55(404): 1955-1962.
 36. Torres D., J. Alvarez, J. Contreras, M. Henríquez, W. Hernández, J. Lorbes y J. Mogollón. 2017. Identificación de potencialidades y limitaciones de suelos agrícolas del estado Lara, Venezuela. *Bioagro* 29(3): 207-218.
 37. Tsai Y., C. Hong, L. Liu y C. Kao. 2004. Relative importance of Na⁺ and Cl⁻ in NaCl induced antioxidant systems in roots of rice seedlings. *Physiol. Plant.* 122(1): 86-94.
 38. Vaidyanathan H., P. Sivakumar, R. Chakrabarty y G. Thomas. 2003. Scavenging

- of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. Plant Sci. 165: 1411-1418.
39. Venkatesh J. y W. Park. 2014. Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. Botanical Studies 55:38. 19 p.
40. Villafañe R., O. Abarca, M. Azpúrua, T. Ruíz y J. Dugarte. 1999. Distribución espacial de los suelos de Quíbor y su relación con las limitaciones del drenaje y la calidad de agua. Bioagro 11(2): 43-50.