

Variación de las cualidades de *Asparagus officinalis* con la senescencia

David Ibarra Díez
Davidelx@gmail.com

Resumen

La senescencia provoca un declive de los procesos funcionales en un vegetal. Por ello, es necesario estudiar cómo este proceso afecta a las concentraciones de los componentes de una planta. Como material vegetal se utilizó *Asparagus officinalis* y se realizaron extracciones y cuantificaciones de clorofilas, azúcares y proteínas, tanto en parte basal como apical de la planta para observar las posibles variaciones en las concentraciones de estos compuestos según el grado de senectud de la planta. Se vio que en la parte apical había más concentración de clorofilas con lo que se relacionó con una menor senescencia. Por tanto, se puede afirmar que la concentración de proteínas y azúcares reductores va a variar a lo largo de la vida de *Asparagus officinalis*, produciéndose una disminución en las concentraciones conforme aumenta el proceso de senescencia.

Introducción

El espárrago (*Asparagus officinalis* L.), cereal perenne, es una buena fuente de minerales esenciales, vitaminas, aminoácidos y fibras. Sin embargo, su valor nutricional se ve afectado por factores ambientales, especialmente, temperatura y la luz[1].

La senescencia se define comúnmente como una serie de cambios degenerativos que conducen a la muerte[2]. Se trata de un proceso genético conducido y programado.

Investigaciones recientes, han identificado el papel de los azúcares en la senescencia. Según, Genix et al. (1990), la pérdida de azúcares puede jugar un papel en la senescencia del espárrago tras la escisión del brote.

Aunque los síntomas de la senescencia se han estudiado intensivamente, los procesos implicados no se conocen bien. La característica más visible de la senescencia de las hojas es el cambio del color verde al amarillo o rojo. Estos cambios de color se deben a que la clorofila degrada más rápidamente que los carotenoides. Por tanto, la disminución de clorofilas es un indicativo de senescencia[3].

Por otro lado, la acumulación y/o agotamiento de los productos finales de la fotosíntesis (por ejemplo, hidratos de carbono) también está asociada con la senescencia en las hojas[4].

El espárrago es un alimento de consumo habitual del que suponemos que su sabor y valor nutritivo están determinados por las concentraciones de azúcares reductores y proteínas. En nuestro estudio, intentaremos demostrar que estas concentraciones se verán afectadas por el fenómeno de senescencia. Para lo cual, realizaremos la extracción y cuantificación de azúcares reductores y de proteínas en dos tejidos con diferente grado de senescencia, cuantificada a través de la concentración de clorofilas. Otros autores también se han centrado en estudios como estos, demostrado la

existencia de una relación entre clorofilas y senescencia, utilizando como material vegetal el maíz[5].

Materiales y métodos

Extracción y cuantificación de clorofilas

Debemos comenzar midiendo la senescencia de alguna manera, y para ello utilizamos la concentración de clorofilas, basándonos en que a más cantidad de clorofilas, menos senescente estará el tejido.

Partimos de segmentos apicales y basales liofilizados que serán nuestro material vegetal.

Haremos medidas de clorofilas en los segmentos apical y basal, y cada uno por duplicado. Para ello utilizaremos 10mg de material vegetal y 1'5ml de acetona al 80%, centrifugamos a 12.225 rpm durante 5 minutos. Extraemos el sobrenadante que guardaremos y al resto se le repite la operación tantas veces como sea necesario hasta obtener un *pellet* blanquecino[6].

A los sobrenadantes se les medirá la absorbancia a 663nm y a 646nm. El procedimiento se realizó como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Extractos y absorbancias.

Zona	Peso (mg)	1ªExtracción (ml)	2ªExtracción (ml)	3ªExtracción (ml)	Abs. 663	Abs. 646
Apical 1	10.8	1.5	1.5	1.3	0.095	0.064
Apical 2	10.4	1.5	1.3	1.3	0.094	0.064
Basal 1	10.7	1.5	1.3	1.3	0.058	0.040
Basal 2	10.6	2	1.3	1.3	0.051	0.036

Extracción y cuantificación de azúcares

Para la extracción de azúcares se realiza el protocolo por duplicado, para ello, se pesan 20 mg de la zona apical y de la zona basal del espárrago, previamente liofilizado. Cada ependorf con la muestra se lava con unos 3 ml de metanol al 80% y se introducen en 4 tubos distintos de vidrio, llevándose a calentar durante 2 minutos a 80°C. Transcurrido este tiempo se agita y se filtra el extracto utilizando unas jeringuillas y lana de vidrio. A continuación, en otros tubos de vidrio, se preparan diluciones 1:1 en el caso de la zona apical y 1:2, en el caso de la zona basal, es decir, se añade 1 ml de metanol al 80% y 1 ml de la muestra (en el caso de la zona apical) y 2 ml de metanol al 80% y 1 ml de muestra (en el caso de la zona basal). Seguidamente, en otros tubos añadir 2 ml de tampón borato a pH 9, 1 ml de 2-cianoacetamida (compuesto que se une al azúcar y cuyo espectro de absorbancia es el de la luz UV) y 1 ml de la muestra diluida en metanol. Se preparan también 2 blancos que lleven únicamente 1 ml de metanol al 80%, 1 ml de 2-cianoacetamida y 2 ml de tampón borato a pH 9. Calentar en agua hirviendo durante 5 minutos y transcurrido ese tiempo, inmediatamente, enfriar los tubos con agua corriente. Por último, medir las absorbancias de los 4 tubos. Se muestran los datos obtenidos en la tabla 2.

Tabla 2: Absorbancias por zona.

Zona	Peso (mg)	Abs. (276 nm)
Apical 1	20.2	0.757

Apical 2	20.0	0.779
Basal 1	20.1	0.740
Basal 2	20.1	0.748

Para la cuantificación de azúcares, utilizamos glucosa 1mM o 1 μ mol/ml. Colocar, en tubos de vidrio, 1 ml de las disoluciones patrón (0-750 μ mol/ml) preparadas con agua destilada y glucosa. Añadir también 1ml de 2-cianoacetamida y 2 ml de tampón borato a pH 9. Preparamos 2 blancos que lleven únicamente 1 ml de agua destilada, 1 ml de 2-cianoacetamida y 2 ml de tampón borato a pH 9. Por último, se miden las absorbancias.

Mediante la recta patrón de la figura 1 se calculará la concentración.

Tabla 3: Patrones

Concentración	Absorbancia
0,1	0,143
0,2	0,281
0,3	0,411
0,4	0,54
0,5	0,675
0,6	0,815
0,7	0,951

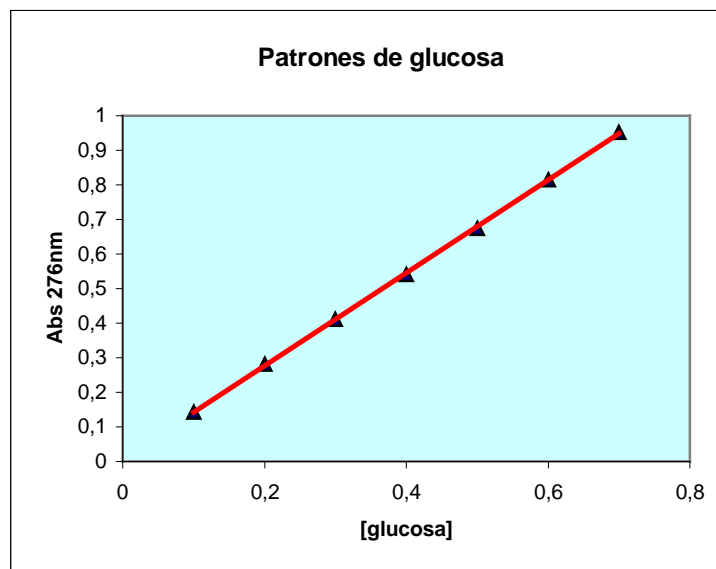
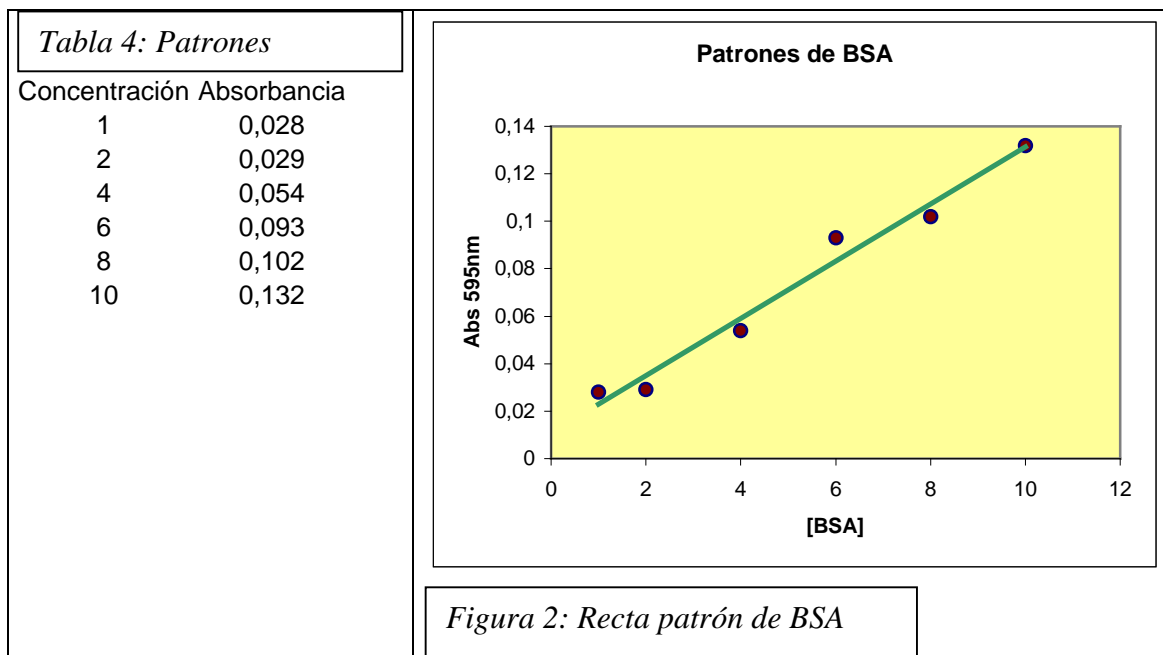


Figura 1: Recta patrón de glucosa

Extracción y cuantificación de proteínas

Antes que nada habremos de preparar nuestra recta de calibrado, donde enfrentaremos concentración de proteínas frente a absorbancia a 595nm, ya que el colorante utilizado es el reactivo de Bradford, que al unirse a las proteínas vira de color hacia el azul.

Para ello partimos de una disolución inicial de BSA (Albúmina del suero bovino) de concentración 20mg/l, o lo que es lo mismo 20 μ g/ml. Y realizamos disoluciones a 10, a 8, a 6, a 4, a 2, y a 1 μ g/ml. Los datos se muestran en la tabla 4, y se representan en la figura 2.



Para extraer las proteínas de nuestros tejidos de espárrago usamos los restos que nos quedaron tras extraerles las clorofilas (modificado de King et al., 1988). Con 9 ml de NaOH añadidos, llevamos al baño 10 minutos. Posteriormente centrifugamos 5 minutos y recuperamos el sobrenadante.

La porción apical se diluyó 30 veces, mientras que la porción basal 10 veces. 1ml de muestra se mezcló con 1ml de reactivo de Bradford y se midió la absorbancia a 595nm, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Absorbancia por réplica

	Réplica 1	Réplica 2
Porción apical	0.089	0.129
Porción basal	0.142	0.136

Resultados

A partir de las absorbancias medias en las zonas apical y basal obtenemos la concentración de clorofilas en las mismas, según las fórmulas:

$$[\text{clorofila a}] = (12.21)\text{Abs}663 - (2.81)\text{Abs}646$$

$$[\text{clorofila b}] = (20.13)\text{Abs}646 - (5.03)\text{Abs}663[7]$$

De esta forma sacamos la tabla 6 que resume las concentraciones de clorofilas según la porción utilizada:

Tabla 6: Concentraciones de clorofila.

	Clorofila a	Clorofila b
Segmento apical	0.974	0.813
Segmento basal	0.559	0.491

Podemos concluir entonces que la parte basal del espárrago es más senescente que la parte apical.

Promediamos las réplicas; y obtenemos la cantidad de azúcares, según el segmento, multiplicando por su factor de dilución y por el volumen usado para su extracción. Se obtienen los datos de la tabla 7.

$$\text{Abs} = (1.351 \times C) + 0.0055$$

Tabla 7: Resumen de los azúcares en las muestras.

Zona	Abs.	Concentración (μmoles/ml)	Concentración (mg/ml)	Promedio	Factor de dilución	Volumen (ml)	Total azúcar (mg)
Apical	0.757	0.518	0.093	0.0945	2	6	1.134
Apical	0.779	0.534	0.096				
Basal	0.740	0.506	0.091	0.0915	3	6	1.647
Basal	0.748	0.512	0.092				

Obtenemos un total de 1.134 mg de azúcar/g peso seco en la porción apical y 1.647 mg de azúcar/g peso seco en la porción basal.

Promediamos las réplicas; y obtenemos la cantidad de proteína que había, según el segmento, multiplicando por su factor de dilución y por el volumen de NaOH usado para su extracción. Obtenemos los datos de la tabla 8.

$$\text{Abs} = (0.0128 \times C) + 0.0055$$

Tabla 8: Resumen de las proteínas en las muestras.

Zona	Abs.	Concentración (μg/ml)	Promedio	Factor de dilución	Volumen NaOH (ml)	Cantidad de proteína (mg)
Apical 1	0.089	6.5	8	30	9	2.160
Apical 2	0.129	9.5				
Basal 1	0.142	10.7	10.45	10	9	0.9405
Basal 2	0.136	10.2				

Si estas cantidades de proteína que hemos calculado las referimos al peso de espárrago seco que se utilizó para su obtención, tendremos, entonces, los miligramos de proteína por cada gramo de peso de vegetal seco.

Obtenemos un total de 0.204 mg de proteína/g peso seco en la porción apical y 0.088 mg de proteína/g peso seco en la porción basal.

Conclusiones

De los datos se desprende que la zona apical es menos senescente que la basal. En el caso de las proteínas se puede observar como en la zona menos senescente hay una mayor concentración de éstas. Sin embargo, en el caso de los azúcares, en la zona basal que era más senescente, hemos obtenido una mayor concentración de estos. Estos datos nos llevan a pensar que con la senescencia, la concentración de proteínas disminuye pero la de azúcares aumenta. Con lo cual, podemos concluir que la senescencia afecta a dichas concentraciones.

Estas evidencias están en desacuerdo con otros[4] que estudiaron un aumento de la senescencia relacionada con la disminución de los productos de la fotosíntesis. En nuestro caso observamos un aumento en los azúcares.

Como se mencionó en la introducción, la concentración de carbohidratos en las hojas disminuyen con un aumento en la defoliación de plantas de maíz, y por tanto, con un aumento en el proceso de senescencia, al contrario que los datos obtenidos de nuestra experiencia.

Este hecho tiene importancia a la hora de las plantaciones de esta planta, ya que, el sabor del *Asparagus officinalis* va estar relacionado directamente con la concentración de azúcares y proteínas. Debido a esto, ejemplares *Asparagus officinalis* que tengan un grado de senescencia elevado presentarán una menor concentración de proteínas, pero una mayor de azúcares.

Bibliografía

[1] Makus, 1994, 1995; Papadopoulou et al., 2003; Tenorio et al., 2004

[2] Nooden, 1980

[4] Allison and Weinmann, 1970; Crafts-Brandner et al., 1984; Ceppi et al., 1987; Schussler and Westgate, 1991; Prioul and Schwebel-Dugue, 1992; Bonnett and Incoll, 1993; Rajcan and Tollenaar, 1999

[5] Irena Rajcana, Lianne M. Dwyer, Matthijs Tollenaar. Note on relationship between leaf soluble carbohydrate and chlorophyll concentrations in maize during leaf senescence. *Field Crops Research* 63 (1999)

[6] King et al., 1988

[7] Alan R. Wellburn. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Phys.* Vol. 144, 307-313 (1994)