



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACION PROTEICA DE LA PARED CELULAR DE  
CULTIVOS EN SUSPENSION DE CHILE (*Capsicum annum*)  
CON DIFERENTE TOLERANCIA A LA SEQUIA.

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

María Fernanda Quintero Higuera

ASESORADA POR: DR. RAMON FERNANDO GARCIA DE LA CRUZ  
Y DRA. MA. DEL SOCORRO SANTOS DIAZ

SAN LUIS POTOSI, S. L. P.

DICIEMBRE 1995

C. 1. 51

Q. 51

. C. 5

SB 351

T



1080076870

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSGRADO

**CARACTERIZACION PROTEICA DE LA PARED  
CELULAR DE CULTIVOS EN SUSPENSION DE CHILE  
(*Capsicum annuum*) CON DIFERENTE TOLERANCIA A  
LA SEQUIA.**

Tesis profesional  
Que para obtener el título de:  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO  
p r e s e n t a:

MARIA FERNANDA QUINTERO HIGUERA

Asesorada por: Dr. Ramón Fernando García de la Cruz y Dra. Ma.  
del Socorro Santos Díaz.

San Luis Potosí, S.L.P., México  
1995





## **APROBACION DE TEMA DE TESIS**

**SRITA. MA. FERNANDA QUINTERO HIGUERA  
P R E S E N T E:**

Por este conducto me permito informar a USTED que el H. Consejo Técnico Consultivo de esta Facultad de Ciencias Químicas, en sesión ordinaria de fecha 9 DE JUNIO DE 1995., tuvo a bien aprobar el tema de su tesis profesional titulada: "CARACTERIZACION PROTEICA DE LA PARED CELULAR DE CULTIVOS EN SUSPENSION DE CHILE (*capsicum annum*) CON DIFERENTE TOLERANCIA DE LA SEQUIA.", mismo que será asesorado por el DR. RAMON FERNANDO GARCIA DE LA CRUZ, Y CO-ASESOR DRA, MA. DEL SOCORRO SANTOS DIAZ., para la presentación de su examen profesional de **QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**.

Sin más por el momento queda de usted.

*Atentamente*

  
\_\_\_\_\_  
**ING. ROGELIO A. SOLUNGA REYNA**  
**SECRETARIO DE LA FACULTAD**

**Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la dirección del Dr. Ramón Fernando García de la Cruz y la Dra. Ma. del Socorro Santos Díaz.**

**A la memoria de mi Padre, quien me enseñó a luchar para alcanzar mis metas y por quien siempre he tenido fuerzas para seguir adelante.**

**A mi Madre, por darme todo su apoyo, amor y comprensión.**

**A mis hermanos con mucho cariño.**

**A ti Jorge, con todo mi amor.**



**Mi gratitud a todos aquellos que hicieron posible la realización de este trabajo:**

**Al Dr. Ramón Fernando García de la Cruz, por compartir con migo todos sus conocimientos, así como su valiosa amistad.**

**A la Dra. Ma. del Socorro Santos Díaz, por enseñarme a ser mejor cada día.**

**A todo el personal del Departamento de Bioquímica, por todos esos momentos compartidos.**

**Al los Jefes del laboratorio de Microbiología y de Inmunología por permitirme hacer uso de su equipo.**

**A todos mis compañeros y amigos porque de alguna manera forman parte de este trabajo.**

# INDICE

	página
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	i
ABREVIATURAS	ii
RESUMEN	iii
<b>I. INTRODUCCION.</b>	
1.1 Importancia de las zonas áridas	1
1.2 Características del agua	2
1.3 Mecanismos de resistencia al déficit de agua en planta completa	3
1.3.1 Adaptaciones fenológicas	3
1.3.2 Adaptaciones morfológicas	3
1.3.2.1 Adaptaciones de las hojas	3
1.3.2.2 Adaptaciones radiculares	4
1.3.3 Adaptaciones fisiológico-bioquímicas	4
1.3.3.1 Respuesta estomatal	4
1.3.3.2 Mantenimiento de la turgencia	4
1.3.3.3 Posible participación de los reguladores de crecimiento	5
1.4 Composición de la pared celular	5
1.4.1 Extensinas	6
1.4.2 Proteínas ricas en glicina	6
1.4.3 Proteínas ricas en prolina	7
1.4.4 Lectinas de la familia de las solanaceas	7
1.4.5 Proteínas que contienen arabinogalactanos	7
<b>II. ANTECEDENTES.</b>	9
<b>III. OBJETIVOS.</b>	
3.1 Objetivo general	14
3.2 Objetivos específicos	14
<b>IV. MATERIALES Y METODOS.</b>	
4.1 Reactivos	15
4.2 Material biológico	15
4.3 Lavado y preparación del material	15
4.4 Preparación de medios de cultivo	16

4.4.1 Preparación de medio basal	16
4.4.2 Reguladores de crecimiento	17
4.4.3 Preparación de medio con reguladores de crecimiento	17
4.5 Procedimiento de cultivo	17
4.6 Viabilidad celular	18
4.7 Curvas de crecimiento	18
4.8 Obtención de la pared celular	18
4.9 Solubilización proteica	19
4.9.1 Agentes químicos	19
4.9.2 Tratamiento enzimático	19
4.10 Precipitación de proteínas	20
4.11 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	20
4.11.1 Tratamiento de las muestras	20
4.11.2 Condiciones de la electroforesis	20
4.12 Tinción de geles de poliacrilamida-SDS con nitrato de plata	22
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSION.</b>	
5.1 Características de los cultivos en suspensión	23
5.2 Crecimiento celular	23
5.3 Solubilización proteica y análisis electroforético	26
5.3.1 Agentes químicos	28
5.3.1.1 Solubilización con detergentes	28
5.3.1.2 Solubilización con urea	30
5.3.1.3 Solubilización con $\beta$ -mercaptoetanol	30
5.3.2 Digestión enzimática	34
5.3.2.1 Celulasa	34
5.3.2.2 Liticasa	34
5.3.2.3 Autólisis	35
<b>VI. CONCLUSIONES.</b>	40
<b>PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.</b>	41
<b>BIBLIOGRAFIA.</b>	42

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

	página
Cuadro 1. Relación entre el potencial hídrico y la concentración de PEG	10
Figura 1. Cultivos en suspensión de células no seleccionadas de chile serrano Tampiqueño y de la línea T7 resistente a 15% de PEG	24
Figura 2. Observación microscópica de cultivos en suspensión de chile serrano Tampiqueño	25
Figura 3. Curva de crecimiento de cultivos en suspensión de chile serrano Tampiqueño	27
Figura 4. Observación microscópica de paredes celulares purificadas	29
Figura 5. Patrón electroforético de las proteínas de la pared celular solubilizadas por la acción de detergentes en geles de poliacrilamida-SDS	31
Figura 6. Patrón electroforético de proteínas de la pared celular extraídas con urea	32
Figura 7. Patrón electroforético de las proteínas de la pared celular extraídas con $\beta$ -mercaptoetanol	33
Figura 8. Patrón electroforético de las proteínas de la pared celular extraídas con celulasa	37
Figura 9. Patrón electroforético de las proteínas de la pared celular extraídas con liticasa	38
Figura 10. Patrón electroforético de las proteínas de la pared celular extraídas por autólisis	39

## ABREVIATURAS

BA	Benciladenina
2,4-D	Acido 2,4-fenoxiacético
EDTA	Etilendiaminotetracetato disódico
kDa	Kilodaltones
MES	Acido morfolinoetanosulfónico
MS	Medio de Murashige y Skoog
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Para-metilsulfonil fluoruro
ST	Cultivo de células control
T7	Cultivo de células resistentes a 15 % de PEG
Temed	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
$\psi_a$	Potencial hidrico

## RESUMEN

La comprensión de los mecanismos que desarrollan las plantas para adaptarse a ambientes limitados de agua adquiere un alto valor teórico y práctico. Se sabe bastante a cerca de las adaptaciones a nivel morfológico y fisiológico, pero se tiene muy poca información a cerca de los mecanismos de tipo bioquímico. Una alternativa para conocer adecuadamente los cambios bioquímicos que sufren las plantas en condiciones adversas, es el empleo de cultivos en suspensión.

Basados en que la pared celular es el organelo más externo de las células vegetales, es posible que en esta estructura se encuentre el(los) mecanismo(s) sensor(es) de los cambios en el contenido de agua. Por ello, el objetivo central de este trabajo fué analizar las proteínas asociadas a la pared celular mediante interacciones de tipo covalente y no covalente. En este trabajo se utilizaron cultivos en suspensión de chile sensibles (ST) y resistentes (T7) al déficit de agua. El déficit hídrico fué inducido por la adición de polietilenglicol al medio de cultivo. El análisis de las proteínas extraídas de la pared celular por la acción de agentes químicos y enzimáticos fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, observandose diferencias cualitativas y cuantitativas de los patrones electroforéticos de los cultivos sensibles y tolerantes al déficit de agua. De los resultados encontrados puede destacarse lo siguiente:

- a) Las proteínas solubilizadas con agentes químicos (detergentes, urea y  $\beta$ -mercaptoetanol) se sobreexpresan en la línea T7 con respecto a las células ST.
- b) Una proteína de 10 kDa asociada específicamente a los polímeros estructurales celulosa y  $\beta$ -glucano se expresa unicamente en la línea T7.
- c) Tres polipéptidos con pesos moleculares de 8.6, 10 y 34.3 kDa asociados específicamente a los polímeros estructurales de la pared celular se expresan en la línea T7 pero no en los cultivos ST.
- d) En la pared celular de la línea T7 se observa la represión de algunas proteínas presentes en los cultivos ST.

Los resultados del presente trabajo constituyen el primer paso para el entendimiento de la probable función de las proteínas de la pared celular en respuesta a la sequía.

# I. INTRODUCCION

## 1.1 Importancia de las zonas áridas.

De los 134.602,300 Km<sup>2</sup> en que se estima la superficie de la corteza terrestre, el 35% (46.749,500) es terreno semiárido, árido, o extremadamente árido (Andrade, 1974). Anualmente, 6 millones de hectáreas en el mundo se transforman en desierto, de las cuales el 13% son por el efecto de fenómenos naturales y el 87% restante a causa del hombre. El primero de ellos, llamado "desertización", es imposible frenarlo debido a que es un fenómeno natural (Delgadillo, 1994). No se conocen con precisión las causas de estos cambios, pero se ha sugerido como posible factor desencadenante la variación de la atmósfera terrestre, ya que un mayor contenido en CO<sub>2</sub> o vapor de agua hace aumentar la temperatura del medio ambiente; también, se cree que el proceso obedece a los cambios periódicos en la cantidad de energía irradiada por el sol, a los cambios periódicos de la posición de la tierra respecto al sol y a las alteraciones geográficas (Enciclopedia Hispánica, 1991).

El otro proceso que es más grave es el de la "desertificación". Este proceso involucra la degradación del medio ambiente causado por la actividad humana y sus causas principales son:

- a) La sobreexplotación de los recursos naturales, ya sean forestales (deforestación, sobrepastoreo), mineros, hídricos, etc.
- b) El uso inadecuado de la tecnología en zonas de temporal y de riego, así como el abuso de pesticidas, fertilizantes y detergentes.
- c) La inadecuada tenencia de la tierra.
- d) Los asentamientos humanos sobre terrenos fértiles y todas las consecuencias relacionadas con el urbanismo (Medellín, 1978).

Por supuesto, México no queda exento de este fenómeno. En nuestro país, en sólo 30 años el grado de erosión creció considerablemente ocupando San Luis Potosí el tercer lugar, debido a que el 60% de su territorio está catalogado como semidesértico (Delgadillo, 1994).

Por otra parte la precipitación media anual de las zonas áridas es menor de 250 mm acompañada generalmente de altas temperaturas en verano y bajas en invierno; la vegetación principalmente es de plantas xerófitas; la agricultura en estas zonas es aleatoria al punto de perderse un 50% de las cosechas de cereales. Las zonas semiáridas son semejantes, solo que la precipitación fluvial varía entre 250 y 500 mm por año (Enciclopedia de México, 1978).

Los datos del censo de 1993 realizados por el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, consideran que el clima seco y muy seco comprende un 49.1% del territorio nacional, e incluyen 574 municipios de 19 entidades, entre los que se encuentra San Luis Potosí.

La Comisión Nacional sobre Zonas Áridas, considera como zonas áridas aquellas donde no es posible obtener cosechas costeables en ningún año, a menos que se disponga de riego; y aquellas en que la escasa precipitación pluvial provoca la pérdida total de los cultivos en la mitad de las veces que se intentan (Enciclopedia de México, 1978).

Para el mejor aprovechamiento de los recursos de las zonas áridas debe buscarse la capacitación científica, profesional y técnica de personal que permita resolver los problemas del desarrollo agrícola en zonas semiáridas sin riego. Debemos señalar que para el combate de la desertificación es necesaria una eficiente organización social, económica y política, así como un manejo eficiente de los recursos naturales (Medellín y Ballín, 1977).

## **1.2 Características del agua.**

El agua es un ingrediente vital para cualquier organismo vivo. Más del 90% de la masa total de las plantas es agua. Sin agua las plantas se marchitan y eventualmente mueren.

Debido a las diferencias en el estado termodinámico del agua, esta es capaz de moverse en el sistema suelo-planta-atmósfera. Al estado de energía del agua, se le conoce como potencial de agua o potencial hídrico ( $\psi_a$ ), el cual está definido por la energía libre de Gibbs. Por lo tanto el movimiento del agua dependerá de un gradiente de  $\psi_a$ , en el que el agua va a ser absorbida cuando el  $\psi_a$  en las raíces sea menor que el  $\psi_a$  del suelo.

Al potencial hídrico del agua pura se le ha asignado un valor igual a cero, el cual se hace más negativo con la adición de solutos; por lo que el  $\psi_a$  de las plantas tendrá valores negativos. Las unidades en las que se maneja este parámetro están dadas en valores de presión, ya que están basados en términos de energía por unidad de volumen (Milburn, 1979).

El movimiento del agua en la célula provocado por el fenómeno de ósmosis produce un incremento en el volumen celular. Esta presión dentro de la célula detiene el flujo osmótico e incrementa la energía del agua inhibiendo el paso de la misma hacia el interior de la célula.



En este punto los niveles de energía dentro y fuera de la célula son iguales; a este estado se le define como:  $\psi_s = \psi_s + \psi_p$  donde:

$\psi_p$  es el potencial de presión o de turgencia, que corresponde a la presión ejercida sobre la pared celular y  $\psi_s$  es el potencial osmótico, que está dado por los solutos disueltos en el agua. Esto es, no habrá flujo neto de agua cuando el  $\psi_s$  dentro y fuera de la célula sean iguales.

Las propiedades del agua hacen posible la actividad bioquímica y biofísica de la célula. Su calor específico protege a la célula de los cambios excesivos de temperatura y por su transparencia permite que la luz solar penetre a la célula y se realice la fotosíntesis (Woodward, 1989).

### **1.3 Mecanismos de resistencia al déficit de agua en planta completa.**

Las plantas que crecen en el desierto o aquellas que se someten a déficit hídrico presentan mecanismos que les permiten aliviar en mayor grado los efectos provocados por la falta de agua. Estos mecanismos se pueden agrupar en adaptaciones fenológicas, morfológicas y fisiológico-bioquímicas.

#### **1.3.1 Adaptaciones fenológicas.**

La fenología se refiere a los principales eventos que ocurren durante el desarrollo, la germinación, la floración, la formación de semillas y la senescencia de las plantas. Por ejemplo, la mayoría de las especies vegetales muestran mayor sensibilidad hídrica durante la floración. Así, cualquier mecanismo que impida los efectos perjudiciales de la sequía durante esta etapa permitirá la sobrevivencia de la especie vegetal en cuestión. Existen también algunas especies que previenen la germinación en épocas desfavorables, ya que contienen inhibidores de la germinación que solo se eliminan cuando cae lluvia abundante. Por otro lado, algunas especies evitan la sequía porque llevan a cabo su fenología en unas cuantas semanas (Turner y Begg, 1981).

#### **1.3.2 Adaptaciones morfológicas.**

##### **1.3.2.1 Adaptaciones de las hojas.**

Las plantas como respuesta al déficit hídrico disminuyen el área foliar, aceleran la velocidad de senescencia eliminando las hojas más viejas y reduciendo con ello la superficie de transpiración.

Otras adaptaciones provocadas por la deficiencia de agua son el aumento en la densidad específica de la hoja (peso de la hoja por unidad de área), cambios en el ángulo de las hojas con respecto a la luz solar, la presencia de vellosidades, de glándulas excretoras de sal y de ceras en la superficie de la hoja y el enrollamiento de la misma. Tales mecanismos contribuyen a la reducción de la tasa de transpiración y evitan la elevación de la temperatura foliar (Begg, 1980; Turner y Begg, 1981).

### **1.3.2.2 Adaptaciones radiculares.**

La raíz tiene un papel preponderante en la dotación de agua a las plantas y puede modificarse como un mecanismo de adaptación a la deficiencia de ésta. Por ejemplo, la *Larrea tridentata* (gobernadora) posee un sistema radicular extenso y poco profundo, en tanto que las raíces del mezquite penetran a profundidades mayores a los 4 metros (Simpson y Solbries, 1977). Otro tipo de adaptación es la que presenta *Paqupodium succulentum* especie que utiliza sus raíces como órganos de almacenamiento de agua permitiéndole mantener el suplemento de agua durante períodos largos de déficit hídrico en el suelo (Kummerow, 1980).

### **1.3.3 Adaptaciones fisiológico-bioquímicas.**

#### **1.3.3.1 Respuesta estomatal.**

Las plantas en general han desarrollado una epidermis con una cutícula provista de estomas, que son verdaderas válvulas que participan en el control del flujo de agua hacia la atmósfera y la entrada de CO<sub>2</sub> a la planta.

La planta puede controlar el grado de transpiración mediante la apertura o cierre de los estomas, es decir poros que se forman por cambios en la turgencia de las células guardianas. Estas células mantienen su turgencia por acumulación de solutos forzando al agua a que se mueva por ósmosis. Cuando la concentración intracelular de solutos es baja, el estoma se cierra provocando que el agua salga de la célula guardiana, mientras que al aumentar la concentración de solutos, el poro se abre promoviendo la entrada de agua. Las plantas controlan la apertura del estoma regulando el movimiento de iones dentro y fuera de la célula guardiana (Woodward, 1989).

#### **1.3.3.2 Mantenimiento de la turgencia.**

La membrana celular separa la solución concentrada dentro de la célula de la solución más diluída en la pared celular; permite además el paso de moléculas de agua pero no de otros solutos. Esto significa que la membrana es semipermeable. Esta

propiedad permite a la célula el uso de la diferencia de energía entre las dos soluciones para forzar la entrada de agua a la célula; a éste fenómeno se le conoce como ósmosis (Woodward, 1989).

El mantenimiento del potencial de turgencia en las plantas se lleva a cabo por medio de ajuste osmótico, es decir por incremento de los solutos intracelulares. Así, al aumentar los solutos se iguala la presión osmótica intracelular con la del medio externo impidiendo la salida de agua. El tipo de compuestos que participan en el ajuste osmótico durante el déficit hídrico incluye: iones (cloruro, potasio, calcio), aniones orgánicos (citratos), carbohidratos solubles (sacarosa), polioles (glicerol, D-manitol), aminoácidos (prolina.), compuestos de amonio cuaternario (betaina) y poliaminas (espermidina) (Borowistka, 1981).

### **1.3.3.3 Posible participación de los reguladores de crecimiento.**

El déficit de agua induce la acumulación de ácido abscísico en la mayoría de las plantas. Los niveles endógenos de este regulador de crecimiento aumentan con la caída substancial en el potencial hídrico y su acumulación ocurre en cuestión de minutos (Kriedermann y cols, 1972).

Otro regulador de crecimiento que se incrementa como resultado del déficit hídrico es el etileno; sin embargo se cree que el aumento es provocado por el ácido abscísico. El etileno participa en la abscisión de las hojas con lo cual la planta pierde tejido fotosintético y área de transpiración (Mc Michael y cols, 1972).

## **1.4 Composición de la pared celular de plantas.**

La pared celular no es una barrera inerte responsable de mantener exclusivamente la forma física de las células, sino que es una estructura compleja y altamente dinámica. La gran diversidad de funciones que desempeña la pared celular está estrechamente relacionada con la interacción de la célula y su entorno.

La naturaleza multifuncional de la pared celular es indudablemente un reflejo de la composición y organización especial de sus constituyentes. Los componentes de la pared celular pueden clasificarse en polímeros microfibrilares y polímeros amorfos. Los polímeros microfibrilares están representados por polisacáridos cuya función consiste en conferir a la pared su rigidez y forma característica, mientras que los polímeros amorfos, entre quienes se incluye a las proteínas, desempeñan una función estructural o enzimática.

Los componentes amorfos de la pared celular se pueden clasificar en 5 grupos

principales: extensinas, proteínas ricas en glicina, proteínas ricas en prolina, lectinas de la familia de las solanáceas y proteínas que contienen arabinogalactanos.

Los componentes estructurales minoritarios presentes en la pared celular, incluyen proteínas ricas en histidina-triptofano, tioninas ricas en cisteína, proteínas reguladoras de agua de 28-70 kDa. Se han descrito en la pared celular la presencia de proteínas con actividad enzimática, tales como peroxidasas, fosfatasas, invertasas,  $\alpha$  y  $\beta$ -manosidasas,  $\beta$ -1,3 glucanasas,  $\beta$ -1,4 glucanasas, poligalactorunidasas, pectinmetilesterasas, malatodeshidrogenasas, arabinosidasas,  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasas y oxidasas (Keller, 1993).

#### **1.4.1. Extensinas (GPRH).**

Las extensinas son muy abundantes en dicotiledóneas y generalmente se caracterizan por ser glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Hyp) y serina (Ser) con alguna combinación de los aminoácidos valina, tirosina, lisina e histidina. Contiene una secuencia repetida de Ser-(Hyp)<sub>4</sub>, en donde los residuos de Hyp son O-glicosilados con arabinosa y los de Ser son O-sustituidos por galactosa (Keller, 1993).

La parte proteica de las extensinas es de carácter básico debido a su alto contenido de lisina, confiriéndole un punto isoeléctrico de aproximadamente 10. La lisina permite además, la interacción con bloques de pectina, tal vez provocado por la carga positiva de éste aminoácido que interacciona con la carga negativa de la pectina.

La abundancia de la tirosina en la estructura de las extensinas favorece el entrecruzamiento de sus radicales hidroxifenílicos formando enlaces difeniléter intermoleculares entre dos restos de tirosina (Showalter, 1993). Los enlaces de isoditrosina, probablemente son responsables de la insolubilidad que presenta la pared celular (Keller, 1993).

Las extensinas pueden estar involucradas en los mecanismos de defensa de la planta. En el caso de heridas, se incrementa la disposición de extensinas en el sitio de la lesión, formando una barrera celular que impide la infección patógena.

#### **1.4.2 Proteínas ricas en glicina (PRG).**

Representan una clase de proteínas en las plantas que se caracterizan por tener una estructura primaria que contiene más del 70% de glicina (Gly). Su estructura consiste en restos repetidos de Gly-X, donde X además de Gly corresponde a serina o alanina. La estructura sugiere un arreglo de estructura beta-plegada.

Las PRG se pueden clasificar en dos clases: la primera se encuentra en la pared celular y está regulada por el desarrollo de la célula, mientras que la segunda se

encuentra en el citoplasma y es regulada por variaciones en las condiciones de estrés, incluyendo ácido abscísico y sequía.

Las PRG de la pared celular son proteínas estructurales que tienen una función importante con respecto al sistema vascular de la planta y a la curación de heridas.

#### **1.4.3 Proteínas ricas en prolina (PRP).**

Existen al menos dos clases de PRP las que son componentes normales de la pared celular y las que forman parte del nódulo generado en respuesta a la infección producida por bacterias fijadoras de nitrógeno.

Las PRP se caracterizan por la secuencia repetida del pentapéptido prolina-prolina-X-Y-lisina, donde X y Y pueden ser valina, tirosina, histidina y ácido glutámico, además carecen de carbohidratos o están ligeramente glicosilados.

Estas proteínas constan de un N-terminal rico en prolina con secuencias repetidas de prolina-prolina-tirosina-valina y prolina-prolina-triptofano-prolina-arginina-prolina-serina; el extremo C-terminal es pobre en prolina, es hidrófobo y contiene ciertos residuos de cisteína. Estas características se presentan en las PRP de frijol y jitomate. Se ha observado que la expresión de las PRP ocurre en el mismo tipo de células que las extensinas.

Las PRP parecen tener un papel importante en el desarrollo normal de la planta ya que se ha demostrado que utilizando inhibidores de la peptidil prolin hidroxilasa en cultivos celulares de soya, se observa que la cantidad de PRP disminuye afectando el crecimiento celular (Showalter, 1993).

#### **1.4.4 Lectinas de la familia de las solanaceas.**

Son glicoproteínas de diversos orígenes. Representan una clase única de lectinas vegetales que se pueden distinguir de otras lectinas por su presencia estricta en solanáceas, su habilidad para aglutinar oligómeros de N-acetilglucosamina, su localización predominantemente extracelular y su inusual composición de aminoácidos y carbohidratos en los que la hidroxiprolina y la arabinosa son los mayores constituyentes.

Las lectinas por su localización en la pared celular y su similitud con las extensinas se pueden considerar como proteínas que actúan de la misma manera que éstas. Aunque su contenido en tirosina y lisina es considerablemente menor que el de las extensinas, forman enlaces isoditirosina e interacciones iónicas con otros componentes de carga negativa de la pared celular (Showalter, 1993).

#### **1.4.5 Proteínas que contienen arabinogalactanos (PAG).**

Son proteínas generalmente muy solubles y altamente glicosiladas, distribuidas en toda la planta, y de peso molecular muy heterogéneo, tal vez debido a sus diferencias en los niveles de glicosilación.

Las PAG contienen D-galactosa y L-arabinosa como constituyentes mayores. Su estructura consiste en un polisacárido de la D-galactopiranososa con enlaces  $\beta(1-3)$  y ramificaciones  $\beta(1-6)$  que se unen con la arabinofuranosa y otros monosacáridos menos abundantes.

La parte proteica es rica en hidroxiprolina, serina, alanina, treonina y glicina con un punto isoelectrico entre 2-5.

La función de las proteínas que contienen arabinogalactanos no está definida, pero se ha propuesto que participan en la interacción entre las células, como lubricante y como humectante (Showalter, 1993).

## **II. ANTECEDENTES**

Las plantas continuamente están expuestas a cambios del medio ambiente. Estos cambios pueden incluir diferentes procesos, como son: la presencia de metales pesados, el exceso de sal en el suelo y el déficit de agua. Todas estas condiciones que afectan la estabilidad de la planta, se han estudiado para demostrar que la célula vegetal cuenta con mecanismos capaces de responder al estrés al que está sometida (Lurie y cols, 1994). Algunos autores sugieren que la respuesta de la planta es general; es decir, la planta tiene la capacidad de percibir el estrés y generar una respuesta, que va a depender de factores tales como la severidad y duración del estrés, el genotipo y estado de desarrollo de la planta, pero nunca específica hacia determinado tipo de estrés (Deulaney y Verna, 1993). Sin embargo, por otro lado se ha descrito que las proteínas que se producen durante el proceso de adaptación son en su mayoría específicas para cada tipo de estímulo y no muestran una respuesta generalizada ante el estrés (Singh y cols, 1989).

Una alternativa para conocer adecuadamente los cambios bioquímicos que sufren las plantas en condiciones adversas, es el estudio de los mecanismos celulares involucrados en la respuesta al estrés hídrico utilizando células en cultivo. Los estudios de los mecanismos de resistencia empleando plantas completas presentan algunos inconvenientes como:

- a. Contar con un área de tierra suficiente para sembrar las plantas.
- b. Mantener las condiciones propicias de la tierra (sales, minerales y nutrientes en general).
- c. Controlar el medio ambiente (temperatura, agua, aire, fotoperíodo).
- d. El riesgo de posibles enfermedades o plagas.

La técnica de Cultivo de Tejidos *in vitro* es un método que ofrece ventajas para estudiar los mecanismos de tolerancia al estrés, y permite:

- a. Eliminar todas las respuestas, excepto aquellas que son operativas a nivel celular.
- b. Controlar rigurosamente el medio ambiente físico y el estado nutricional, parámetros que usualmente son difíciles de controlar en la planta completa.
- c. Exponer uniformemente a las células a cambios en el estado de agua e indefinidamente a un potencial de agua .
- d. Aislar líneas celulares con diferente grado de tolerancia y comparar su comportamiento fisiológico y bioquímico con células no seleccionadas.
- e. Realizar experimentos durante todo el año puesto que el crecimiento es independiente de las fluctuaciones estacionales del medio ambiente.

f. Medir en muestras pequeñas de células, parámetros como potencial de agua y potencial osmótico representativos de la población total.

g. Estudiar la respuesta de tejidos o células aisladas de diferentes partes de las plantas y analizar su posible contribución a la resistencia de la planta (Hasegawa, 1984).

El déficit hídrico en el cultivo *in vitro* se puede provocar utilizando sacarosa, manitol o glicerol, sin embargo estos compuestos tienen el inconveniente de penetrar a la célula. Por lo tanto existen estudios realizados con polietilenglicol (PEG), que demuestran que esta molécula reduce el potencial de agua en el medio y no penetra a la célula (Lawlor, 1969). Así, al añadir PEG al medio de cultivo se simula el estrés hídrico. El gradiente de potencial entre la célula y el medio causado por el PEG origina una deshidratación, pero no una plasmólisis (Hasegawa y cols, 1984).

La relación que existe entre el potencial hídrico y la concentración de PEG 8000 no es lineal (Cuadro 1.); los valores del potencial son más negativos conforme aumenta la concentración del agente osmótico (Santos-Díaz, 1992).

#### CUADRO 1.

##### Relación entre el potencial hídrico y la concentración de PEG.

Conc. de PEG.	Potencial hídrico (MPa).
P0	-0.50
P15	-0.98
P20	-1.41
P30	-2.61

Desde hace tiempo mediante el Cultivo de Tejidos Vegetales se han podido obtener variantes tolerantes al PEG. Bressan y cols., en 1982, obtuvieron líneas celulares de jitomate resistentes a 15%, 20%, 25% y 30% de PEG. Las células altamente adaptadas presentaron una turgencia mayor pero un crecimiento menor. Los autores sugieren que la adaptación al PEG involucra una alteración de la coordinación entre las propiedades osmóticas y las características de la pared, lo que ocasiona una expansión celular más lenta. Así mismo, Santos-Díaz y Ochoa-Alejo (1992) obtuvieron y caracterizaron líneas celulares de *Capsicum annum* resistentes al PEG. Utilizando las semillas del cultivar Tampiqueño-74A, se establecieron dos cultivos de chile serrano



Tampiqueño de crecimiento vigoroso: la línea T7 en 20% de PEG y la línea T6 en 25% de PEG. Debido a que la disminución del potencial osmótico se considera como un mecanismo para mantener la turgencia a potenciales hídricos bajos (Turner y Begg, 1981) el trabajo se basa en el análisis del contenido de solutos (potasio, calcio, sodio, prolina y betaina) y su contribución al potencial osmótico. Los resultados indican que la mayor aportación en el potencial osmótico es debida al potasio (42%), mientras que la prolina y betaina a pesar de que aumentaron su concentración en una cantidad considerable, su contribución al potencial osmótico fué pequeña (1.4% y 0.8%, respectivamente). Por lo tanto el potasio se considera como un osmoregulador, en tanto que la prolina y betaina tienen como función osmoprotector a las proteínas de los efectos deletereos causados por el déficit de agua. Por otro lado también demostraron que el crecimiento de las células no seleccionadas (ST) se inhibe en un 50% cuando el cultivo es expuesto a una concentración del 3% de PEG.

Se han realizado estudios en planta de frijol con respecto a algunos mecanismos moleculares inducidos por el estrés hídrico y la relación que presenta con la fisiología de la planta. Los resultados indican un retraso en el crecimiento de las plantas sometidas al estrés hasta de un 30% con respecto al control, existiendo además un patrón de proteínas diferente entre ellas, lo cual se postula como una modificación en la expresión genética (Mendieta y cols, 1991). Por otro lado se ha descrito que la actividad fotosintética de cultivares de frijol resistentes a la sequía, se afectaron en menor grado por el déficit hídrico que los cultivares sensibles (Peña-Valdivia y cols, 1991).

En tejidos de plantas sometidas a déficit de agua se ha observado una disminución en la síntesis de proteínas (Hanson y Hits, 1982), la cual se recupera rápidamente si el proceso de desecación es lento (Oliver y Bewley, 1984). En otros casos, se ha descrito un incremento en las proteínas solubles como en *Fleucine coracana* en donde se detectó un aumento en el contenido de polisomas y estimulación de la incorporación de aminoácidos marcados radiactivamente en proteínas (Kandpal y Appaji Rao, 1985). También se han detectado cambios cuantitativos en los patrones electroforéticos de las proteínas solubles en diferentes cultivares de trigo y centeno sometidos a déficit hídrico (Cloutier, 1983).

Por otro lado en plantas de soya sometidas a déficit de agua se observaron cambios en las proteínas de la pared celular. Se encontraron dos especies proteicas, una de 28 kDa que se encuentra mayoritariamente en la zona de división de la plántula; y otra de 70 kDa, presente principalmente en la zona de maduración. No se sabe si estas proteínas tienen alguna actividad catalítica o una función estructural; sin embargo, se ha sugerido que la proteína de 28 kDa podría estar involucrada en la formación de pared

celular nueva, mientras que la proteína de 70 kDa posiblemente participa en el proceso de maduración de la planta (Bozarth y cols, 1987). Otro trabajo describe la acumulación de una proteína de 150 kDa en el alga *Dunaliella salina* en respuesta al choque hiperosmótico. Esta proteína es una glicoproteína de membrana cuya acumulación coincide con la reiniciación del crecimiento (Sadka y cols, 1991).

Bray (1993), propone la existencia de un grupo de genes en plantas, denominados *lea*, los cuales se activan por el déficit hídrico. Estos genes codifican para un grupo de proteínas con diferentes funciones como, protección de membranas, formación de canales para la captación de agua, secuestradores de iones, proteasas y enzimas hidrolíticas; todas estas proteínas podrían estar relacionadas con el (los) mecanismo(s) de resistencia de la planta al déficit de agua.

A pesar de una intensa búsqueda solo se han identificado una cuantas proteínas inducidas por déficit de agua y su significado fisiológico se desconoce. Una de las proteínas mejor caracterizadas en células de tabaco inducidas por estrés de tipo osmótico es la osmotina. La detección inmunocitoquímica de la osmotina (26 kDa) la sitúa en inclusiones densas dentro de la vacuola y en menor proporción libre en el citoplasma. La osmotina presenta homología con otras proteínas involucradas en mecanismos de defensa en plantas como la taumatina, el inhibidor tripsina/ $\alpha$ -amilasa de maíz, una proteína de respuesta a patógenos inducida por el virus del mosaico del tabaco en *Nicotiana tabacum*, y la proteína NP24 de jitomate inducible por sal (Singh y cols, 1989). Los estudios mencionados fueron hechos en células en suspensión; sin embargo, ya se ha comprobado la presencia de la osmotina en plantas completas, no solo en tabaco sino en otras solanáceas y en algunas leguminosas como alfalfa y frijol. A pesar de todos los estudios al respecto, hasta hoy se desconoce la función exacta de la osmotina dentro del mecanismo de tolerancia al estrés, sin embargo se cree que desempeña un papel importante ya que hay una clara correlación entre la acumulación de la osmotina y la estabilidad de la tolerancia al NaCl (La Rosa y cols, 1989), por lo que se requiere una extensa investigación para aproximarse al conocimiento de los mecanismos básicos implicados en la percepción y transducción de señales en las plantas como respuesta al estrés.

De acuerdo con algunos datos descritos, las células expuestas a salinidad o a la sequía presentan una disminución en su tamaño, debido a su incapacidad para mantener el potencial de turgencia. A niveles moderados de salinidad, las células incrementan su  $\psi_p$ , como una función del nivel de adaptación exhibiendo una reducción en su tamaño, provocada tal vez por una alteración en las propiedades de la pared celular (Casas y

cols, 1991). Por lo tanto es posible que el mecanismo sensor de los cambios en el contenido de agua se encuentra a nivel de la pared celular.

En la literatura se ha descrito que la pared celular juega un papel importante en los mecanismos de defensa que desarrolla la célula como respuesta al estrés ya sea biológico (ataque de microorganismos) o no biológico (sequía, calor). Se conoce que la inducción del mecanismo de defensa en una planta confrontada con un patógeno está bajo el control de un gen simple dominante, llamado gen de resistencia. La interacción entre este gen y el gen de avirulencia del patógeno, provoca una serie de reacciones de estrés en la planta y por lo tanto la iniciación de mecanismos de defensa regulados por mensajero intracelulares, como el etileno. El estrés provocado por esta interacción activa por otro lado las hidrolasas de la planta degradando la pared celular del patógeno o de la planta misma liberando de esta manera oligosacáridos, (conocidos como inductores externos e internos respectivamente) que a su vez activan algunas enzimas o moléculas (quitinasas, glucanasas, fitoalexinas, proteínas ricas en prolina) que conducen a la fase de resistencia (Fernandez-Bolaños y Heredia, 1993).

En la literatura no existen estudios sobre la composición y estructura de la pared celular de chile (*Capsicum annuum*). Modificaciones en los polímeros estructurales de la pared celular, actividades enzimáticas y/o la síntesis de proteínas específicas podrían desempeñar un importante papel en los mecanismos de resistencia de las plantas al déficit de agua. Con base en lo anterior decidimos realizar un análisis polipeptídico comparativo entre las proteínas de la pared celular de células sensibles y tolerantes al déficit de agua y conocer además el grado de asociación de estas proteínas a la estructura de la pared celular.

## **III. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Determinar las posibles diferencias cualitativas y cuantitativas existentes en las proteínas de la pared celular de cultivos en suspensión de chile (*Capsicum annuum*) con diferente tolerancia al polietilenglicol.

### **3.2 Objetivos específicos**

1. Mantener y propagar los cultivos de las células no seleccionadas de chile (ST) en medio sin PEG y la línea T7 en medio selectivo conteniendo 15% de PEG.
2. Establecer las curvas de crecimiento de los cultivos en suspensión.
3. Estandarizar las condiciones para la obtención de la pared celular de las células en cultivo.
4. Solubilizar las proteínas presentes en la pared celular mediante el uso de agentes químicos (SDS, triton X-100, urea y  $\beta$ -mercaptoetanol) y agentes enzimáticos (Celulasa, liticosa y autólisis).
- 5.- Separar e identificar las proteínas, extraídas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 Reactivos.

Se adquirieron de Industrial Kem de León (México) los siguientes reactivos: nitrato de amonio, fosfato de potasio monobásico, ácido bórico, molibdato de sodio, sulfato cúprico, fosfato de sodio dibásico, acetato de sodio, ácido acético, glicerina, nitrato de plata, hidróxido de sodio, formaldehído, metanol, hidróxido de amonio, ácido cítrico y etanol.

De Productos Químicos Monterrey (México), nitrato de potasio, cloruro de calcio, sulfato ferroso, sulfato manganeso, sulfato de zinc, ioduro de potasio, ácido ascórbico, hidroxido de potasio y ácido clorhídrico.

De Química Dinámica (México), Azul de Bromofenol.

De Sigma Chemical Co. (EUA),  $\beta$ -mercaptoetanol, tocoferol, dimetil sulfóxido (DMSO), para-metilsulfonil fluoruro (PMSF), azida de sodio, celulasa, liticasa, ácido morfolinoetanosulfónico (MES), sacarosa, polietilenglicol (PEG), glicina, piridoxina, ácido nicotínico, tiamina, mio-inositol, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y benciladenina (BA).

De Baker Analyzed (México), sulfato de magnesio y cloruro de cobalto.

De Bio-Rad Laboratories (EUA), etilendiaminotetracetato disódico (EDTA), acrilamida, N,N'-metilén-bis-acrilamida (bisacrilamida), glicina, dodecilsulfato de sodio (SDS), triton X-100, tris hidroximetil amino metano (Tris), persulfato de amonio y N,N,N',N'-tetrametil etilen diamina (Temed),

De Becton Dickinson and Co.(México), agar de dextrosa Sabouraud y Agar nutritivo.

### 4.2 Material biológico.

Las suspensiones celulares de chile (*Capsicum annuum*) ST y la línea T7, fueron proporcionadas por el Dr. Neftalí Ochoa Alejo del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del departamento de Ingeniería Genética del CINVESTAV, Unidad Irapuato.

### 4.3 Lavado y preparación del material.

Los matraces Erlenmeyer de 250 ml se lavaron con jabón y agua corriente, se enjuagaron con agua destilada, se secaron a temperatura ambiente colocados hacia abajo, se taparon con hojas dobles de papel aluminio y se esterilizaron en autoclave durante 15

min a 15 lb/pulg<sup>2</sup>.

Las pipetas graduadas se lavaron 5 veces con solución de jabón líquido (marca comercial) al 1% y se enjuagaron 3 veces con agua corriente en sifón, se secaron a temperatura ambiente, se colocaron en cilindros metálicos y se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 15 lb/pulg<sup>2</sup>.

Todo el material estéril se guardó en gavetas cerradas.

El material utilizado en la electroforesis se dejó remojando en agua con jabón líquido durante 12 hrs, se enjuagó con agua corriente y después con agua destilada.

#### **4.4 Preparación de medios de cultivo.**

##### **4.4.1 Preparación de medio basal.**

La concentración de los componentes del medio MS corresponde a la descrita originalmente por Murashige y Skogg (1962). Se indica la concentración de las soluciones madre con un número seguido de una X, que indica su concentración respecto a la solución de trabajo 1X.

Solución I (1000x). CaCl<sub>2</sub> 22 g; agua desionizada hasta 50 ml.

Solución II (100x). MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 9.25 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.25 g; agua desionizada hasta 250 ml.

Solución III (200x). FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.557 g; Na<sub>2</sub>EDTA 0.745 g; agua desionizada hasta 100 ml.

Solución IV (1000x). MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1.69 g; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.059 g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.62 g; KI 0.083 g; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.025 g; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.0025 g; agua desionizada hasta 100 ml.

Solución V (100x). Glicina 50 mg; piridoxina-HCl 12.5 mg; tiamina-HCl 2.5 mg; mio-inositol 2.5 g; ácido nicotínico 12.5 mg; agua desionizada hasta 250 ml.

Todas las soluciones se filtraron y se almacenaron a 4°C, con excepción de la solución V que se distribuyó en alícuotas de aproximadamente 40 ml y se congeló a -10°C

Para preparar 1 lt de medio basal, se disolvieron 1.9 g de KNO<sub>3</sub>, 1.65 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1.95 g de MES y 30 g de sacarosa en 850 ml de agua desionizada; luego se añadieron 1 ml de la solución I, 10 ml de la solución II, 5 ml de la solución III, 1 ml de la solución IV y 10 ml de la solución V. El pH del medio se ajustó a 5.7 con KOH 1N, se aforó a 1 litro con agua desionizada y se esterilizó en autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 20 minutos.

#### **4.4.2 Reguladores de crecimiento.**

1. Benciladenina (BA) (1000x). se disolvieron 10 mg de benciladenina en aproximadamente 5 ml de HCl 1N y se aforaron a 100 ml con agua desionizada. Se distribuyeron en alícuotas de aproximadamente 20 ml y se almacenaron a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

2. Acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (100x). Se disolvieron 27.62 mg de 2,4-D en aproximadamente 5 ml de KOH 1N y se aforaron a 100 ml con agua desionizada. Se distribuyeron en alícuotas de 20 ml y se almacenaron a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4.3 Preparación de medio con reguladores de crecimiento.**

Los medios con reguladores de crecimiento se ajustaron a pH 5.7 después de la adición de éstos y posteriormente se aforaron al volumen indicado.

a. Medio para suspensiones de chile serrano Tampiqueño. ácido 2,4-D (100x) 5 ml y BA (1000x) 0.50 ml por litro de medio basal, para tener una concentración final de  $6.25\ \mu\text{M}$  y de  $0.22\ \mu\text{M}$  respectivamente.

b. Medio para la línea T7. En la elaboración del medio con PEG los constituyentes del medio basal se disolvieron en la mitad del volumen indicado para tener una solución doblemente concentrada. A 500 ml del medio concentrado se añadieron, 150 g de PEG, 5 ml de 2,4-D (100x) y 0.5 ml de BA (1000x). Se ajustó el pH a 5.7 y se aforó a 1 lt con agua desionizada para tener un medio al 15% de PEG.

Para evitar la oxidación de los cultivos se les añadió en condiciones estériles  $84\ \mu\text{l}$  de vitamina E para tener una concentración final de 0.5 mg/ml. La vitamina E se preparó disolviendo  $10\ \mu\text{l}$  de tocoferol en 10 ml de dimetil sulfóxido, esta solución se esterilizó por ultrafiltración (membrana de  $0.22\ \mu\text{m}$ ) y se guardó en alícuotas de aproximadamente  $100\ \mu\text{l}$  en recipientes estériles los cuales se almacenaron a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.5 Procedimiento de cultivo.**

El manejo de los cultivos se hizo en campana de flujo laminar VECO que se limpió previamente con una solución de etanol al 70% (v/v). Todo el material introducido a la campana se limpió anticipadamente con una solución de detergente líquido (marca comercial) al 1% y los matraces con suspensiones celulares se rociaron con etanol al 70% y se flamearon antes de abrirse.

Para la propagación rutinaria de las células, las suspensiones densas se diluyeron al doble con los medios MS correspondientes. Después de mezclar bien se distribuyeron

aproximadamente 100 ml en matraces de 250 ml

#### **4.6 Viabilidad celular.**

Se disolvieron 5 mg de diacetato de fluoresceína en 1 ml de acetona (0°C) con agitación continua y manteniendo la solución siempre en baño de hielo. Se agregaron 200 µl de la solución a una alícuota de 1 ml del cultivo (concentración final 0.1%), se incubó en baño de hielo durante 10 min y se contaron las células fluorescentes al microscopio. La solución de trabajo se preparó en el momento de usarla.

#### **4.7 Curva de crecimiento.**

Inicialmente y con el propósito de descartar la posible contaminación de los cultivos en suspensión de chile ST, se tomó una alícuota y se sembró en agar nutritivo y agar Sabourad dextrosa durante 2 días. Después de asegurar la asepsia de los cultivos se reunió el contenido de 5-8 matraces y se ajustó el volumen celular para tener el equivalente a 5 mg de peso seco por ml. Se colocaron 10 ml de la suspensión en matraces de 50 ml y cada 4 días se colectó su contenido (por triplicado) en tubos cónicos que se centrifugaron a 4500 rpm durante 20 min y se determinó el volumen de paquete celular.

#### **4.8 Obtención de pared celular.**

Se recolectó el contenido de 1 matrás de las suspensiones celulares (aproximadamente 100 ml) en tubos cónicos de 50 ml y se centrifugaron durante 20 min a 4700 rpm para determinar el volumen del paquete celular.

Las células se lavaron 3 veces (4700 rpm/5min) con un volumen final de 150 ml de agua desionizada para los cultivos ST y 6 veces para la línea T7. A continuación las células se rompieron en un sonicador Braun-Sonic U, a 165 watts durante 1 minuto a 40°C; esta operación se repitió 3 veces para los cultivos ST y 6 veces para la línea T7 o hasta la observación de paredes celulares al microscopio.

Las paredes celulares obtenidas de los cultivos ST se lavaron 5 veces, mientras que las de los cultivos T7 se lavaron 10 veces, con una solución de Tris-HCl 10 mM pH 6.8 y conteniendo metilsulfonil fluoruro (PMSF), (potente inhibidor de proteasas) a una concentración de 1 mM, las paredes se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min. Los cultivos T7 fueron posteriormente dializados durante 48 hrs contra una solución de tris-HCl 10mM pH 6.8 conteniendo PMSF 1mM. Las membranas de diálisis de la marca



Spectra/Por No. 4, con un límite de exclusión de 12-14 kiloDaltons (kDa) , fueron tratadas previamente con una solución de EDTA 10 mM y sometidas a ebullición durante 5 min. Las membranas así tratadas se conservaron a 4°C en una solución de azida de sodio 1mM.

Para obtener una suspensión más uniforme de las paredes celulares obtenidas por sonicación, se utilizó un homogenizador manual de cristal con émbolo esmerilado y la suspensión homogénea se lavó otras 5 veces con una solución de Tris-HCl 10 mM pH 6.8 conteniendo PMSF 1mM. Durante todos los lavados el material se mantuvo en baño de hielo. Las paredes celulares se secaron en un liofilizador LABCONCO en un tiempo aproximado de 6-7 hrs.

#### **4.9 Solubilización proteica.**

##### **4.9.1 Agentes químicos.**

30 mg de peso seco de paredes celulares de los cultivos ST y la línea T7 se hidrataron con 400 µl de agua desionizada y se trataron por separado con:

- a) SDS al 2% durante 5 min en baño de agua hirviendo.
- b) Urea 6 M durante 1 hr a temperatura ambiente.
- c) Triton al 2% durante 1 hr a temperatura ambiente.
- d) β-mercaptoetanol a 30 °C durante 30 min.

Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga Eppendorf (IEC MICRO-MB ) para recolectar el sobrenadante.

##### **4.9.2 Tratamiento enzimático.**

2 mg de celulasa se resuspendieron en 1 ml de amortiguador de acetatos 10 mM pH 5.5 y PMSF 1 mM.

2 mg de liticasa se resuspendieron en 1 ml amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.5 y PMSF 1 mM.

30 mg de paredes celulares (peso seco), se hidrataron con 400 µl de agua desionizada y luego por separado se les añadió 1 ml de las soluciones enzimáticas de celulasa y liticasa. En el caso de la celulasa la muestra se incubó a 37 °C, mientras que en el de la liticasa se incubó a 25 °C, durante 2.5 hrs; se preparó paralelamente un testigo para cada una de las enzimas tal como se describió anteriormente. Después del tiempo de incubación las paredes se centrifugaron a 12 000 rpm, durante 10 min y se recolectó el sobrenadante.

Basados en que la pared celular contiene una variedad de enzimas hidrolíticas y con el objeto de estimular la autodigestión de este organelo, 30 mg de paredes celulares se hidrataron con 400  $\mu$ l de agua desionizada y se les añadió 1 ml de amortiguador de acetatos 50 mM conteniendo PMSF 1 mM, con un pH de 5.5. El material se incubó durante 24 hrs a 25 °C con agitación constante, se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min y se recolectó el sobrenadante. Este sobrenadante se proceso para ser analizado en geles de poliacrilamida-SDS, como a continuación se describe.

#### **4.10 Precipitación de proteínas.**

Al material solubilizado por agentes químicos (SDS, triton X-100, urea y  $\beta$ -mercaptoetanol) y enzimáticos (celulasa, liticosa y autolisis), tal como se describe en el apartado 4.9, se le añadió el doble de su volumen de etanol al 75% (v/v) frío (4°C). Las muestras se incubaron a esa misma temperatura durante 18 hrs y se centrifugaron a 4700 rpm durante 10 min. El material precipitado se mantuvo a 4 °C hasta realizar la electroforesis.

#### **4.11 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.**

Se utilizó el sistema descrito por Laemmli (1970), el cual se describe a continuación.

##### **4.11.1 Tratamiento de las muestras.**

A los precipitados obtenidos por el tratamiento con etanol se les agregó 20  $\mu$ l de agua desionizada y 20  $\mu$ l de solución solubilizadora, en seguida se sumergieron en un baño de agua hirviendo durante 5 min.

La solución solubilizadora contenía: Tris-HCl 0.125M, pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.02%.

##### **4.11.2 Condiciones de la electroforesis.**

Se utilizaron geles planos discontinuos. El gel separador media 1.5 mm de espesor y 140 mm de ancho; el peine tenía 28 mm de largo y contenía 15 hendiduras de 7 mm de ancho; el espacio entre las hendiduras era de 4 mm. La electroforésis se realizó a voltaje constante empleando en el gel concentrador 100 volts y en el gel separador 135 volts. El tiempo total de corrida fué de 7-8 horas o hasta que la marca de azul de bromofenol estuviera a 5 mm del extremo inferior de la placa.

La composición de las soluciones empleadas fué la siguiente:

1. Solución patrón. Acrilamida 30 gr (30%) y bis-acrilamida 0.8 gr (0.8%). Se aforó a 100 ml con agua desionizada.

2. Tampón A. Tris 18.16 gr, SDS 0.4 gr y HCl 1M 24.3 ml. La solución se ajustó a pH 8.8 y se aforó a 200 ml con agua desionizada.

3. Tampón B. Tris 3.027 gr, SDS 0.2 gr y HCl 1M 22.1ml, la solución se ajustó a pH de 6.8 y se aforó a 100 ml con agua desionizada.

4. Persulfato de amonio 10 mg/ml. Se pesaron 10 mg de persulfato de amonio y se disolvieron en 1 ml de agua desionizada. Esta solución se preparó en el momento de usarse.

5. Regulador de corrida Tris 0.025 M, SDS 0.1% y glicina 0.192 M. Se pesaron Tris 6.04 gr, SDS 0.2 gr y glicina 28.8 gr. Se ajustó el pH a 8.3 con HCl 1M y se aforó a 2 lt con agua desionizada.

#### Preparación del gel separador al 12%.

	(ml)
Tampón A	14.100
Solución patrón	11.280
Persulfato de amonio	0.710
Temed	0.056
Agua desionizada	<u>2.050</u>
	28.200

La concentración final de los reactivos fué Tris-HCl 0.375M, SDS 0.1%, Temed 0.2% y de persulfato de amonio 0.025%. La solución se desgasificó al vacío antes de aplicarse a la cámara de electroforesis.

#### Preparación del gel concentrador al 6%.

	(ml)
Tampón B	5.00
Solución patrón	2.00
Persulfato de amonio	0.25
Temed	0.02
Agua desionizada	<u>2.73</u>
	10.00

La concentración final de los reactivos fué Tris-HCl 0.125M, SDS 0.1%, Temed 0.2% y de persulfato de amonio 0.025%.

Los geles se prepararon en placas de vidrio de 155 mm de largo x 180 mm de ancho empleando un equipo de electroforesis en placa vertical Bio-Rad modelo Protean II.

Las proteínas de peso molecular conocido utilizadas como estándares fueron las siguientes: fosforilasa B de 106 kDa, albúmina de 80 kDa, ovoalbumina de 49.5 kDa, anhidrasa carbónica de 32.5 kDa, tripsina de 27.5 kDa y lisozima de 18.5 kDa. Al graficar el logaritmo del peso molecular contra la migración ( $R_f$ ) de cada proteína marcadora obtuvimos, por el método de mínimos cuadrados, una curva cuyo coeficiente de correlación con la recta fué de 0.991 ( $\pm 0.001$ ), correspondiente a 4 experimentos independientes.

#### **4.12 Tinción de geles de poliacrilamida-SDS con nitrato de plata.**

Se utilizó la técnica descrita por Wayne y col. (1981), la cual se describe a continuación.

a) Se sumergió el gel en metanol al 50% (v/v) al menos durante 1 hr y se enjuagó tres veces con agua desionizada durante 5 min antes de su tinción.

b) La solución para teñir (solución C) se preparó disolviendo separadamente 1.2 gr de nitrato de plata en 6 ml de agua desionizada (solución A), y mezclando por otro lado 42 ml de NaOH al 0.36% y 2.8 ml de hidróxido de amonio (solución B); se adicionó gota a gota la solución A en la solución B con agitación constante y se completó el volumen a 200 ml con agua desionizada (solución C) para ser utilizada en los 5 min siguientes.

c) El gel se sumergió en la solución C durante 15 min con agitación constante, y posteriormente se lavó con agua desionizada al menos tres veces durante 5 min, manteniéndolo en agitación.

d) La solución reveladora se preparó mezclando 2.5 ml de una solución de ácido cítrico al 1% con 0.25 ml de formaldehído y aforando a 500 ml con agua desionizada. La solución reveladora se utilizó recién preparada.

e) Para revelar las bandas de proteína, se sumergió el gel en la solución reveladora hasta la aparición de las bandas, lo cual lleva de 10-15 min.

f) Finalmente, el gel se lavó con agua desionizada y se sumergió en metanol al 50% (v/v) para detener el desarrollo de color. El gel se conservó en agua desionizada y en bolsas de plástico con cierre hermético.

## **V. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **5.1 Características de los cultivos en suspensión.**

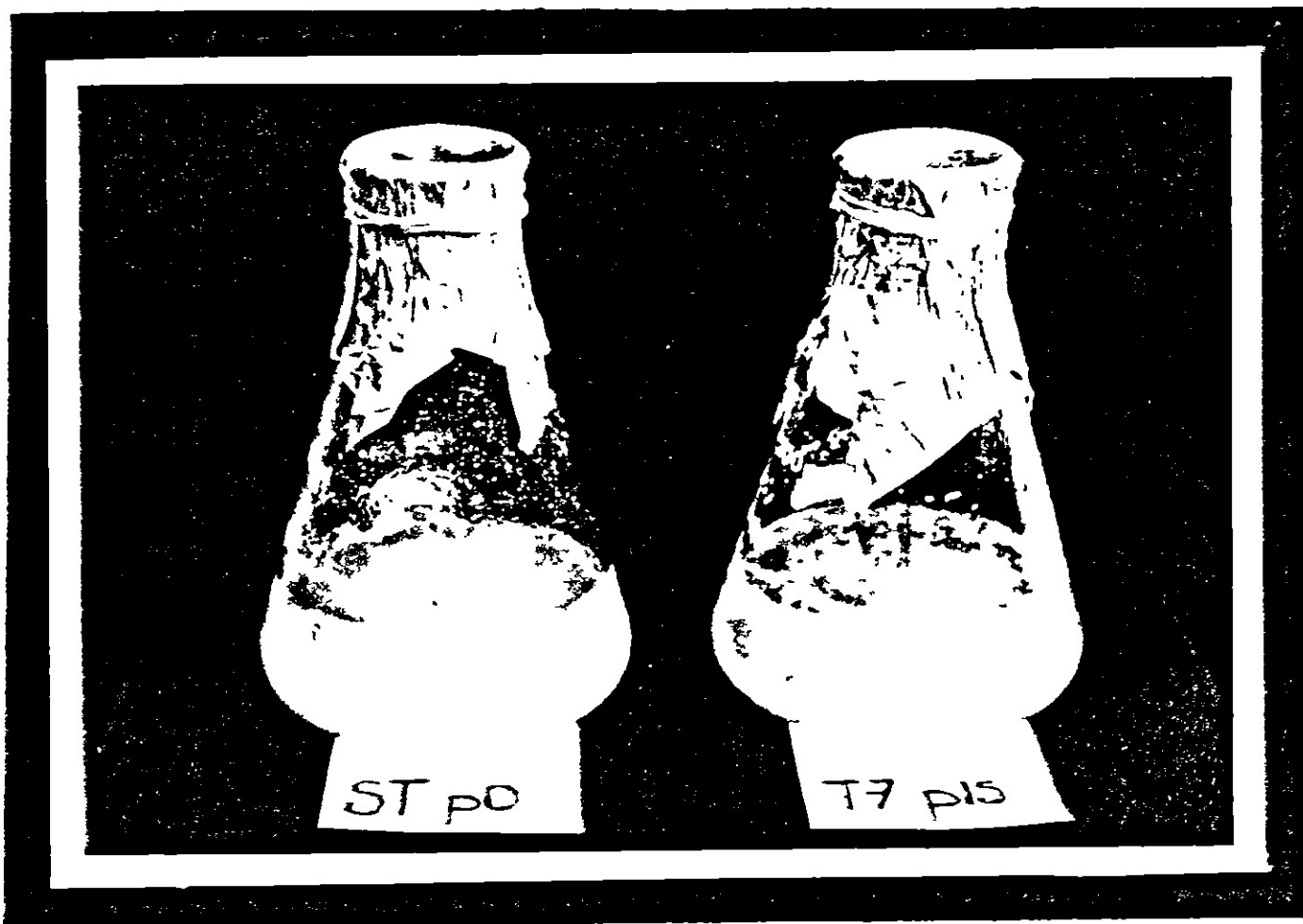
En este estudio se emplearon cultivos en suspensión de chile serrano Tampiqueño (ST) como testigo y una línea celular resistente a 15% de PEG denominada T7. Esta línea celular se obtuvo después de plaquear células de chile serrano Tampiqueño, en medios con soporte de poliuretano conteniendo 15% de PEG; después de más de un año de selección se lograron obtener colonias de buen crecimiento entre las que destacó la denominada T7. Esta colonia se transfirió a medio líquido con 15% de PEG para obtener suspensiones celulares (Santos-Díaz, 1992). En la figura 1 se muestra el aspecto de las células sensibles ST y la línea T7. Las células ST son suspensiones homogéneas, mientras que las células T7 tienden a formar agregados, que sedimentan rápidamente. La aglomeración celular presente en la línea T7 se podría interpretar como un mecanismo de cooperación celular, en respuesta al estrés hídrico.

Por otro lado, la observación microscópica de los cultivos celulares mostró diferencias morfológicas notables; el cultivo ST se caracterizó por presentar células con morfologías muy variadas entre las que se destacaban células alargadas (Figura 2a); en tanto que la línea T7 presentó células redondas irregulares con aspecto rugoso (Figura 2b). Estas diferencias podrían deberse a modificaciones bioquímicas como resultado de los mecanismos de adaptación de las células al déficit hídrico.

### **5.2 Crecimiento celular.**

Con el fin de evaluar el crecimiento celular de los cultivos ST en función del tiempo, 10 ml de suspensiones celulares (por triplicado) se centrifugaron en tubos cónicos a 4700 rpm para determinar el volumen del paquete celular. Esta operación se realizó durante 20 días, tomando alícuotas de 10 ml cada 4 días.

El crecimiento celular de los cultivos sensibles ST y la línea resistente a 15% de PEG (T7) fué diferente. Las células ST crecieron más rápidamente que las células de la línea T7, ya que los cultivos de las células no seleccionadas duplicaron su volumen en aproximadamente 15 días, en tanto que las células de la línea T7 requerían más de 30 días por lo que no fué posible realizar la curva de crecimiento de esta línea celular. No es posible determinar si este fenómeno se debe a un crecimiento más lento de la línea T7 o bien a un fenómeno de agregación que provoca la formación de grumos celulares.



**Figura 1. Cultivos en suspensión de células no seleccionadas de chile serrano Tampiqueño y de la línea T7 resistente a 15% de PEG.**



**Figura 2. Observación microscópica de cultivos en suspensión de chile serrano Tampiqueño. (A) células no seleccionadas y (B) línea T7 en 15% de PEG.**

Los resultados obtenidos de la curva de crecimiento de los cultivos ST se muestran en la Figura 3. Los cultivos no presentaron fase lag, sino que entraron directamente a la fase de crecimiento lineal hasta el octavo día, seguida de una fase de crecimiento exponencial (12<sup>o</sup> al 16<sup>o</sup> día). Las células alcanzaron la fase de crecimiento estacionario al 16<sup>o</sup> día, periodo en que el volumen de paquete celular aumentó casi 3 veces.

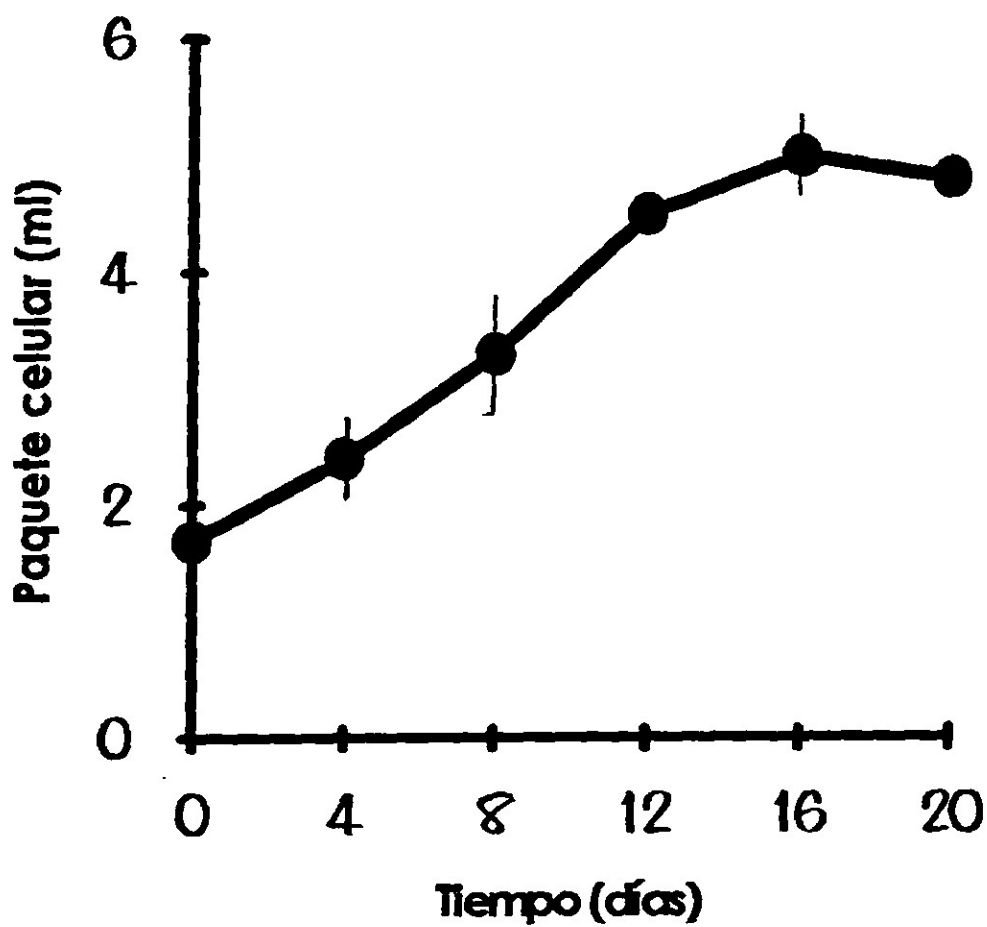
El porcentaje de viabilidad celular de los cultivos, se determinó usando una alícuota de diacetato de fluoresceína. Esta molécula penetra a las células vivas y una vez en el interior, las esterasas celulares rompen la molécula dejando libre la fluoresceína que se observa con luz ultravioleta. Los resultados demostraron que las células no seleccionadas presentaron 90% de viabilidad, mientras que en la línea T7 se observó un 80% de viabilidad. La menor captación de fluoresceína por la línea T7 puede deberse a la viscosidad del medio causado por el PEG o bien al estado de agregación celular.

### **5.3 Solubilización proteica y análisis electroforético.**

Las células vegetales están rodeadas por la pared celular. En la actualidad se conoce que la composición química de la pared celular contiene celulosa como componente estructural, y como material cementante un grupo complejo de proteínas. Sin embargo se conoce muy poco sobre las funciones biológicas y las interacciones moleculares de los componentes de la pared.

El interés por analizar la composición química de la pared en los cultivos ST y en la línea T7 es determinar si cambios en los componentes estructurales están relacionados con los mecanismos de adaptación al déficit de agua. Por lo tanto en este trabajo se analizó la composición proteica de la pared celular. Ya que este organelo es el primero que está en contacto con el medio ambiente, es probable que en esta estructura residan alguno(s) de los sistemas que le permitan a la célula traducir los estímulos externos en respuestas bioquímicas. Trabajos previos sobre la caracterización de las proteínas de la pared celular indican que esta estructura participa en los mecanismos de respuesta. Por ejemplo en plantas de frijol sometidas a déficit hídrico, se demostró la existencia de dos especies proteicas glicosiladas con pesos moleculares de 36 y 33 kDa (García y cols 1994).





**Figura 3. Curva de crecimiento de cultivos en suspensión de chile serrano Tampiqueño. Se utilizaron cultivos con una densidad de aproximadamente 5 mg de peso seco por ml. El análisis se realizó con alícuotas de 10 ml de cultivo celular. Las barras indican  $\pm$  desviación estándar, D.E. (n= 6).**

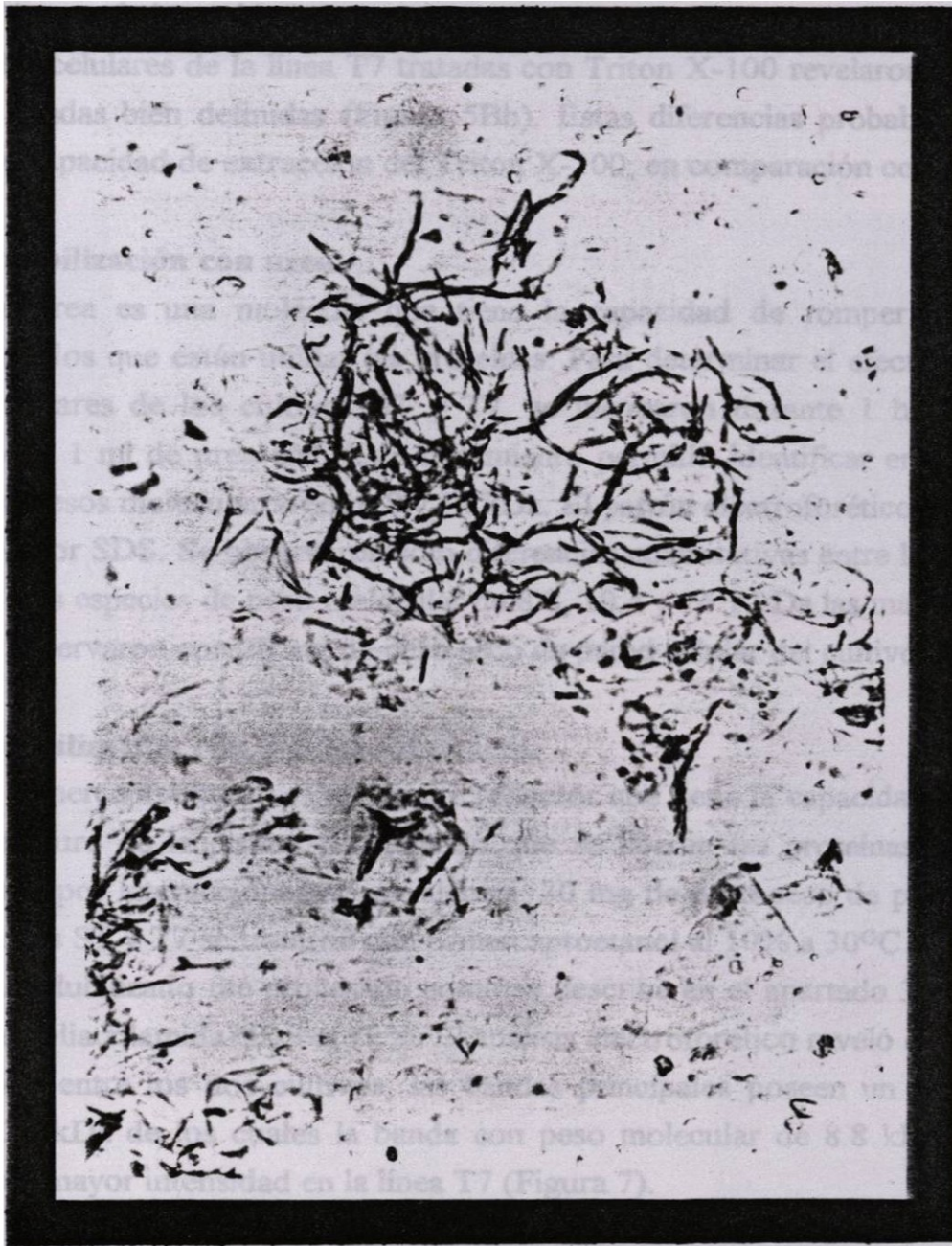
Una aproximación experimental para entender si la adaptación de los cultivos en suspensión de la línea T7 involucra cambios cualitativos y/o cuantitativos en las proteínas asociadas a la estructura de la pared, fué realizar un análisis polipeptídico comparativo entre las células ST y la línea T7. Primeramente se obtuvieron las paredes celulares de los cultivos ST y T7 en fase estacionaria por sonicación (Apartado 4.8). Como se muestra en la Figura 4, las paredes celulares de los cultivos ST y la línea T7 muestran el mismo aspecto microscópico, además con la metodología empleada fué posible obtener paredes celulares totalmente purificadas de residuos citoplasmáticos. Se ha descrito en la literatura que las proteínas presentes en la pared celular, pueden encontrarse unidas por enlaces débiles de tipo no covalente o unidas a los polímeros estructurales por enlaces covalentes. Por ello las proteínas se extrajeron con agentes químicos y enzimáticos (Valentin y cols; 1984; Elorza y cols; 1985; 1989).

### **5.3.1 Agentes químicos.**

#### **5.3.1.1 Solubilización con detergentes.**

La estructura de la pared celular de los cultivos ST y T7 probablemente está constituida por algunas proteínas asociadas a la estructura de la pared por enlaces de tipo no covalente. El SDS es un detergente capaz de envolver a las proteínas a manera de micelas, rompiendo los enlaces de unión y promoviendo entonces su extracción. Las paredes celulares de la línea T7 y las células sensibles, se trataron con SDS a una concentración del 2% incubándolas durante 5 min a ebullición. El material solubilizado con este agente se analizó en geles de poliacrilamida-SDS utilizando 30 y 15 mg de peso seco de paredes celulares del cultivo ST. En el primer caso no se obtuvo una buena resolución de bandas dada la alta concentración de proteínas extraídas (Figura 5a). Sin embargo fué posible observar la resolución de 15 bandas con pesos moleculares comprendidos entre 7 y 52 kDa cuando se emplearon 15 mg de peso seco de paredes celulares (Figura 5b).

El material solubilizado de la pared celular de la línea T7 (15 mg de peso seco de pared celular), presentó el mismo patrón electroforético, pero una mayor intensidad de las bandas en comparación con el patrón de los cultivos ST (Figura 5b,c). Las especies mayoritarias fueron siete proteínas con pesos moleculares de 7.2, 8.8, 10.4, 11.5, 12.3, 14.1 y 19.1 kDa. Estas bandas se observan aún con 5 mg de peso seco de las paredes celulares de la línea T7 (Figura 5d). Es posible que la expresión de estos polipéptidos esté relacionada con el grado de tolerancia al PEG en la línea T7.



**Figura 4. Observación microscópica de paredes celulares purificadas.** Una alícuota de 10  $\mu$ l de las suspensiones celulares de los cultivos T7 se observó en el microscopio óptico con aumento de 20x. El aspecto de las paredes celulares de la línea ST era el mismo.

El análisis de las paredes celulares de los cultivos ST solubilizadas con Triton X-100, (30 mg de pared celular), mostró el mismo patrón de bandas que el obtenido con SDS al 2%, pero la intensidad de las mismas fue menor.

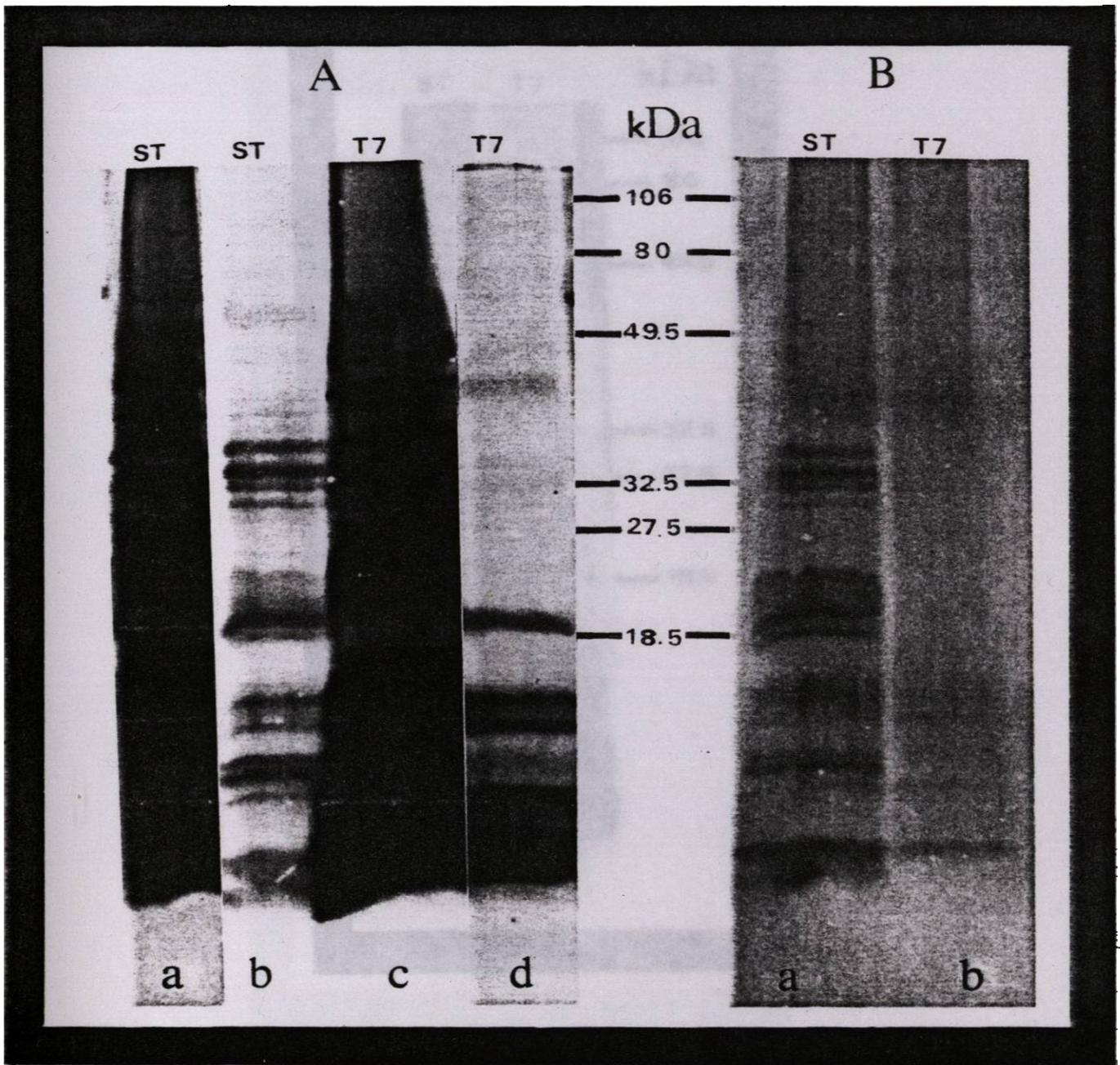
Las paredes celulares de la línea T7 tratadas con Triton X-100 revelaron la presencia de solo tres bandas bien definidas (Figura 5Bb). Estas diferencias probablemente reflejen una menor capacidad de extracción del Triton X-100, en comparación con el SDS.

### **5.3.1.2 Solubilización con urea.**

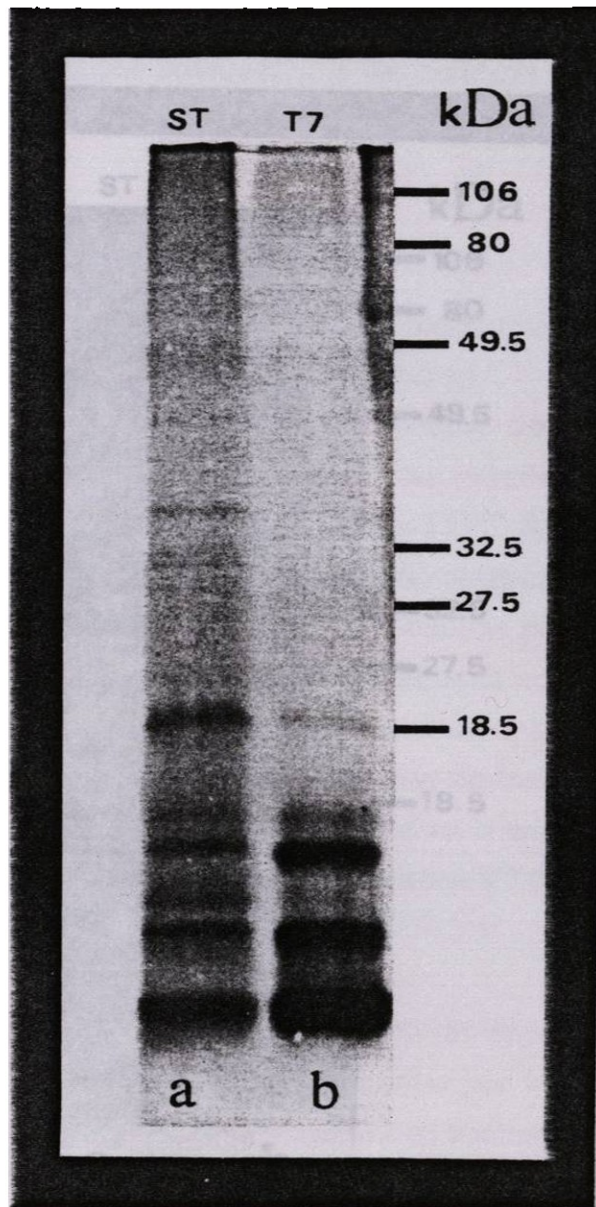
La Urea es una molécula que tiene la capacidad de romper los enlaces no covalentes a los que están unidas las proteínas. Para determinar el efecto de la urea las paredes celulares de los cultivos ST y T7, se incubaron durante 1 hr a temperatura ambiente con 1 ml de urea 6M. Este tratamiento permitió identificar en los geles, siete bandas con pesos moleculares entre 8 y 34 kDa. El patrón electroforético fue muy similar al obtenido por SDS. Se observaron solo diferencias cuantitativas entre los cultivos ST y T7 siendo tres especies de peso molecular de 8.8, 10.4 y 14.1 kDa las mayoritarias. Estas bandas se observaron con 20 mg de peso seco de pared celular del cultivo T7 (Figura 6).

### **5.3.1.3 Solubilización con $\beta$ -mercaptoetanol.**

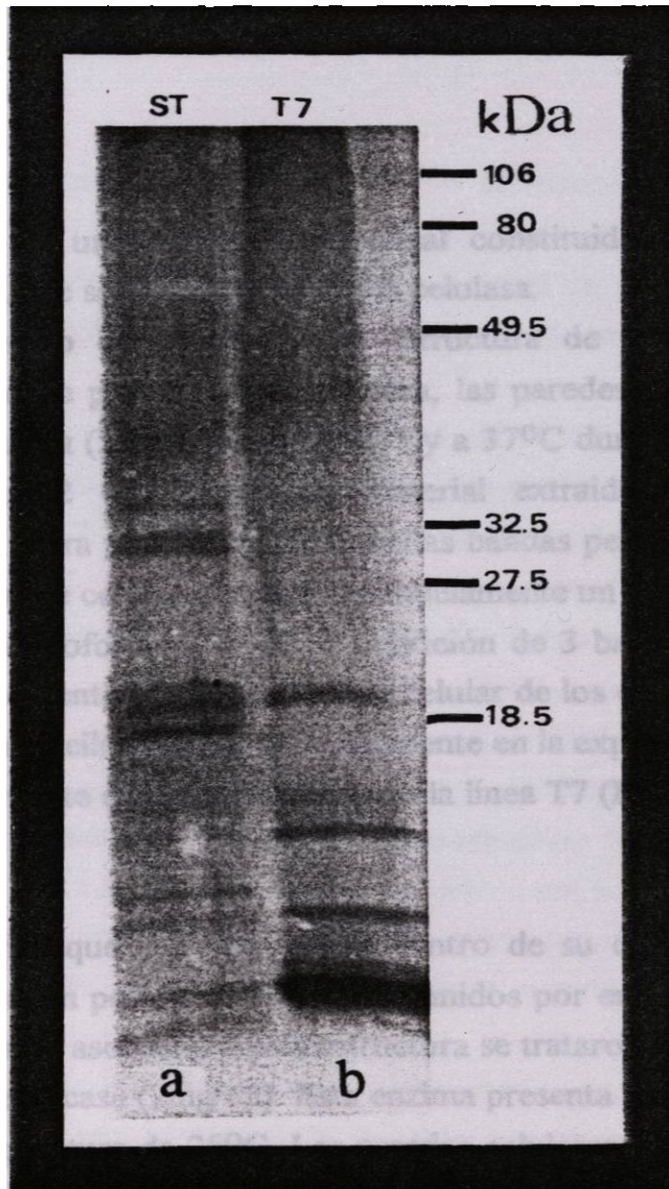
El  $\beta$ -mercaptoetanol, es un agente reductor que tiene la capacidad de romper los enlaces disulfuro de la cistina permitiendo que se liberen las proteínas asociadas a la pared celular por interacciones no covalentes. 30 mg de peso seco de paredes celulares de los cultivos ST y T7 se trataron con  $\beta$ -mercaptoetanol al 10% a 30°C durante 30 min. El material solubilizado fue procesado como se describe en el apartado 3.10 y analizado en geles de poliacrilamida-SDS al 12%. El análisis electroforético reveló el mismo patrón polipeptídico entre los dos cultivos; las bandas principales poseen un peso molecular entre 8 y 34 kDa de los cuales la banda con peso molecular de 8.8 kDa es la que se presenta con mayor intensidad en la línea T7 (Figura 7).



**Figura 5. Patrón electroforético de las proteínas de la pared celular solubilizadas por la acción de detergentes en geles de poliacrilamida-SDS . (A) Paredes celulares tratadas con SDS al 2%, (a) 30 mg y (b) 15 mg de peso seco de paredes de cultivos sensibles; (c) 15 mg y (d) 5 mg de peso seco de paredes celulares de la línea T7. (B) Paredes celulares tratadas con Triton X-100, (a) y (b) 30 mg de peso seco de paredes celulares de cultivos sensibles y de la línea T7. Los números indican la migración de los marcadores de peso molecular conocido. Los geles se tiñeron con nitrato de plata.**



**Figura 6. Patrón electroforético de proteínas de la pared celular extraídas con urea.** (a) 30 mg de peso seco de paredes celulares de los cultivos no seleccionados y (b) 20 mg de paredes celulares de los cultivos resistentes a 15% de PEG, fueron tratados con 1 ml de urea 6M. Las proteínas extraídas fueron analizadas en geles de poliacrilamida-SDS al 12% y teñidos con nitrato de plata. A la derecha se indica la migración de los marcadores de peso molecular conocido.



**Figura 7. Patrón electroforético de las proteínas de la pared celular extraídas con  $\beta$ -mercaptoetanol.** (a) 30 mg de peso seco de paredes celulares de los cultivos no seleccionados y (b) 30 mg de paredes celulares de los cultivos resistentes a 15% de PEG, fueron tratados con 1 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol al 10%. Las proteínas solubilizadas se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS y se tiñeron con nitrato de plata. A la derecha se indica la migración de los marcadores de peso molecular conocido.

### **5.3.2 Digestión enzimática.**

La pared celular es una organela muy compleja compuesta por celulosa, glucanos y probablemente otros polímeros complejos. Para conocer las especies proteicas que se encuentran unidas por enlaces covalentes a la celulosa y/o al glucano se utilizaron enzimas comerciales como celulasa y liticasa, de *Trichoderma viride* y de *Arthrobacter luteus* respectivamente.

#### **5.3.2.1 Celulasa.**

La celulosa es un homopolímero lineal constituido por glucosas unidas por enlaces  $\beta$ ,1-4 que puede ser hidrolizado por la celulasa.

Con el objetivo de conocer si la estructura de la pared celular incluye la asociación covalente de proteínas a la celulosa, las paredes celulares se incubaron con una solución de celulasa (2mg/ml) a pH de 5.5 y a 37°C durante 2.5 hrs, posteriormente se centrifugaron a 12 000 rpm y el material extraído se analizó en geles de poliacrilamida-SDS. Para poder eliminar aquellas bandas pertenecientes a la preparación enzimática comercial de celulasa, se corrió paralelamente un testigo (Figura 8a).

El patrón electroforético reveló la aparición de 3 bandas con pesos moleculares entre 11 y 20 kDa presentes tanto en la pared celular de los cultivos ST, como en la línea T7. La diferencia entre ellos se basó principalmente en la expresión de una proteína de 10 kDa presente únicamente en la pared celular de la línea T7 (Figura 8c).

#### **5.3.2.2 Liticasa.**

Se ha descrito que la pared celular dentro de su compleja estructura contiene glucanos, los cuales son polímeros de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ ,1-3. Para conocer si algunas proteínas están asociadas a esta estructura se trataron 30 mg de paredes celulares con una solución de liticasa (2mg/ml). Esta enzima presenta su máxima actividad a un pH de 7.5 y a una temperatura de 25°C. Las paredes celulares de los cultivos ST y la línea T7 (30 mg) se incubaron en estas condiciones por 2.5 hrs. Con el fin de eliminar las bandas pertenecientes a la preparación enzimática comercial de liticasa, se corrió un testigo de la enzima (Figura 9a) tratado exactamente igual que las muestras.

El análisis electroforético del material proteico liberado reveló diferencias cualitativas (Figura 9). En las paredes celulares de los cultivos ST se presentaron 9 bandas polipeptídicas con pesos moleculares comprendidos entre 8 y 48 kDa (Figura 9b) mientras que en los cultivos T7 aparecieron solo 4 bandas; la banda de 10 kDa parece ser específica de los cultivos resistentes a PEG. Los resultados sugieren que esta proteína de 10 kDa podría estar involucrada en los mecanismo de adaptación de la célula al PEG. De



acuerdo a los resultados, esta especie podría estar interactuando de manera covalente con la celulosa, y con el glucano  $\beta$ ,1-3. Otra observación es la ausencia de algunas proteínas en la línea T7 en relación al cultivo ST (Figura 9a y 9b). Esto sugiere que existen proteínas asociadas al glucano  $\beta$ ,1-3 en la pared celular de los cultivos ST que disminuyen su expresión al estar en contacto con el estrés hídrico.

### **5.3.2.3 Autólisis.**

Otra estrategia para analizar las proteínas asociadas a los polímeros de la pared celular se basó en el proceso de autólisis. A fin de favorecer la autodigestión de las proteínas de la pared celular por las enzimas presentes en esta estructura, 30 mg de las paredes celulares se incubaron en una solución amortiguadora de acetatos durante 24 hrs.

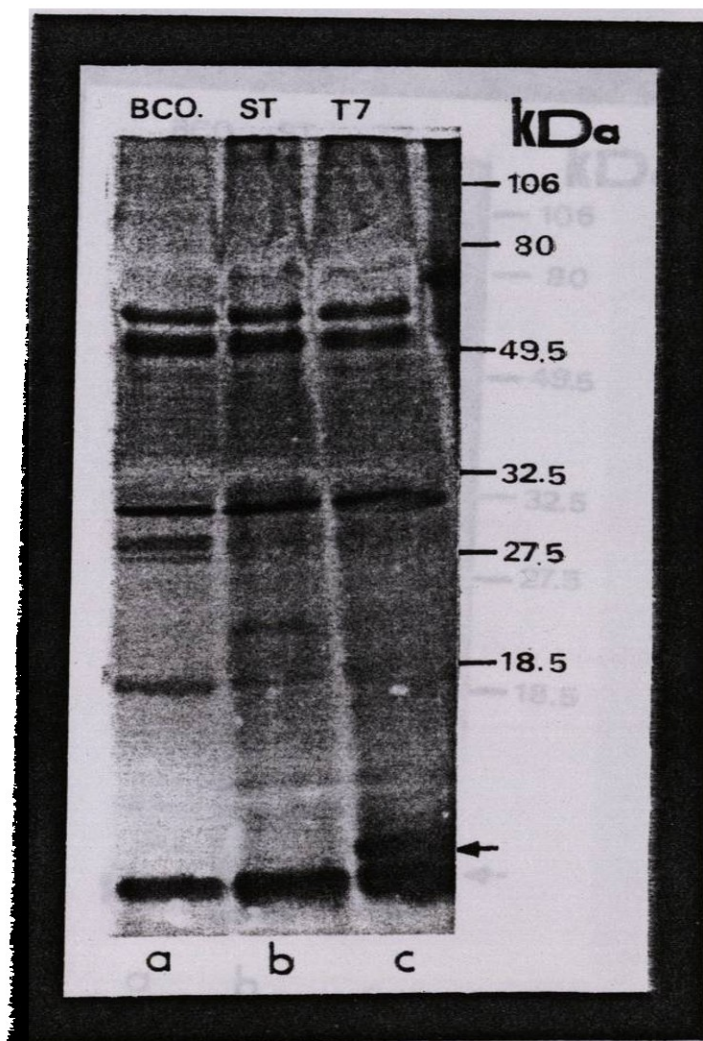
El análisis electroforético reveló algunas diferencias cualitativas; en los cultivos ST se observaron catorce bandas polipeptídicas con pesos moleculares entre 8 y 56 kDa, mientras que en la línea T7 se presentaron doce bandas, tres de las cuales (34.3, 10 y 8.6 kDa) se asocian específicamente a la estructura de la pared celular de esta línea (Figura 10). Los resultados mostraron que existe una disminución en la expresión de algunas especies proteicas en condiciones de estrés, además de la participación de otras actividades hidrolíticas distintas a las de celulasa y  $\beta$ (1-3)glucanasa.

De los resultados descritos previamente a lo largo de este trabajo, podemos concluir que existen diferencias cualitativas y cuantitativas en las proteínas asociadas a la pared celular de los cultivos resistentes con respecto a los sensibles a PEG.

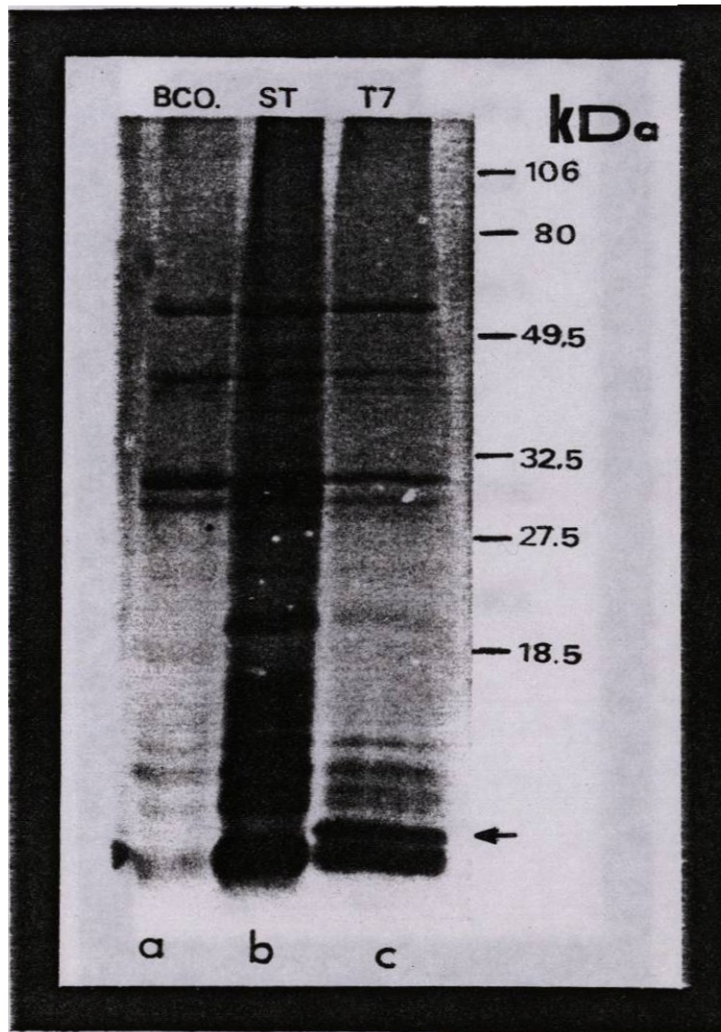
Nuestros resultados coinciden con lo reportado previamente por otros autores, en estos trabajos se describe la existencia de proteínas nuevas asociadas específicamente a aquellas plantas sometidas a estrés. Sin embargo, no es posible hacer una comparación directa de los patrones aquí obtenidos con los reportados por otros autores, debido a que en estos trabajos el material biológico, la fracción subcelular analizada y las técnicas de purificación empleadas fueron distintas. Bozarth y cols (1987), reportaron que en plantas de soya sometidas a déficit hídrico se expresan dos proteínas en la pared celular con pesos moleculares de 28 y 70 kDa; los autores sugieren que estas especies proteicas podrían estar involucradas en los procesos de maduración y crecimiento de la planta. Resultados similares se han descrito en plantas de frijol sometidas a déficit hídrico (García y cols, 1994); en este trabajo se describió la existencia de dos proteínas glicosiladas con pesos moleculares de 33 y 36 kDa, que probablemente están relacionadas con el proceso de adaptación a la sequía. Por otro lado Perez-Molphe y cols, (1991) empleando diferentes variedades de plántulas de arroz, resistentes a la

sequía detectaron, por métodos de electroforesis bidimensional, cambios en la expresión y represión de algunas especies proteicas.

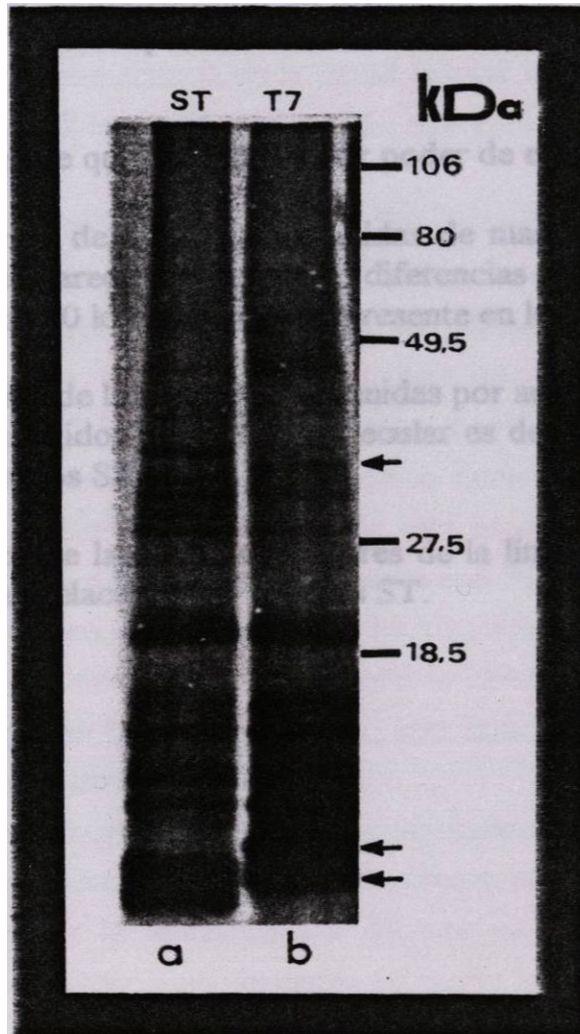
El efecto de la sequía en la síntesis de proteínas constituye una primera aproximación hacia el entendimiento de los mecanismos de respuesta de la planta a nivel molecular, para luego tratar de integrar esta información y conocer el mecanismo global de respuesta. Una intensa investigación es necesaria para determinar la participación de las proteínas en el mecanismo de tolerancia al déficit de agua.



**Figura 8. Patrón electroforético de las proteínas de la pared celular extraídas con Celulasa.** (a) testigo. (b) 30 mg de paredes celulares de los cultivos no seleccionados y (c) 30 mg de paredes celulares de los cultivos resistentes a 15% de PEG, fueron tratadas con 1 ml de solución de celulasa (2 mg/ml). Las proteínas extraídas fueron analizadas en geles de poliacrilamida-SDS al 12% y teñidas con nitrato de plata. A la derecha se indica la migración de los marcadores de peso molecular conocido. La flecha señala la proteína específica de la línea T7.



**Figura 9. Patrón electroforético de las proteínas extraídas de la pared celular con liticasa.** (a) testigo. (b) 30 mg de peso seco de paredes celulares de los cultivos no seleccionados y (c) 30 mg de paredes celulares de los cultivos resistentes a 15% de PEG, fueron tratadas con 1 ml de solución de 2 mg/ml de liticasa. Las proteínas extraídas fueron analizadas en geles de poliacrilamida-SDS al 12% y teñidas con nitrato de plata. A la derecha se indica la migración de los marcadores de peso molecular conocido. La flecha señala la proteína específica de la línea T7.



**Figura 10. Patrón electroforético de las proteínas de la pared celular extraídas por Autólisis.** (a) 30 mg de peso seco de paredes celulares obtenidas de los cultivos no seleccionados y (b) 30 mg de paredes celulares de los cultivos resistentes a 15% de PEG, fueron sometidas a condiciones que favorecen su autodigestión. Las proteínas extraídas fueron analizadas en geles de poliacrilamida-SDS al 12% y teñidas con nitrato de plata. A la derecha se indica la migración de los marcadores de peso molecular conocido. Las flechas señalan las proteínas específicas de la línea T7.

## **VI. CONCLUSIONES**

- 1. El análisis electroforético de las proteínas unidas de manera no covalente a la estructura de la pared celular mostró diferencias cuantitativas pero no cualitativas. Estos datos indican que hay una sobreexpresión de proteínas en la línea T7 en relación a las células no seleccionadas debido probablemente a un mecanismo de respuesta de las células al déficit de agua.**
- 2. El SDS al 2% fué el agente químico con mayor poder de extracción.**
- 3. El análisis electroforético de las proteínas unidas de manera covalente (tratamientos con celulosa y liticasa) a la pared celular, mostró diferencias cualitativas. En la línea T7 se encontró un polipéptido de 10 kDa que no está presente en los cultivos ST.**
- 4. El análisis electroforético de las proteínas obtenidas por autólisis de la línea T7, mostró la existencia de tres polipéptidos con pesos molecular es de 34.3, 10 y 8.6 kDa, que no están presentes en los cultivos ST.**
- 5. La digestión enzimática de las paredes celulares de la línea T7 mostró la disminución de algunos polipéptidos en relación a los cultivos ST.**

## **PERSPECTIVAS DEL TRABAJO**

La identificación de proteínas específicas sintetizadas de *novο* e inducidas por la exposición de las células en condiciones de estrés, representan un modelo muy útil para entender los mecanismos de respuesta de las plantas.

El análisis proteico comparativo de la pared celular de la línea tolerante al déficit hídrico con respecto a la sensible reveló que existen diferencias cualitativas y cuantitativas en el patrón electroforético.

Uno de los resultados más relevantes, fué la aparición de tres polipéptidos expresados específicamente de *novο* en la línea resistente a la sequía, destacándose la presencia de una proteína mayoritaria de 10 kDa solubilizada de la pared celular por la acción hidrolítica de liticasa y celulasa. Una estrategia importante para determinar si la expresión de la proteína de 10 kDa está relacionada específicamente con la resistencia al déficit de agua, sería el transferir las células de la línea T7 a medio MS sin PEG; esperando con este procedimiento la ausencia de esta especie en la pared celular y su presencia en esta estructura al desafiarlas nuevamente con PEG.

La asociación específica de la proteína de 10 kDa a la pared celular de la línea T7, resistente a concentraciones de 15% de PEG, podría confirmarse al analizar el patrón electroforético de la pared celular de la línea T6, esta línea presenta la característica de crecer aún a concentraciones de un 25% de PEG.

Por otro lado, la obtención de anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína de 10 kDa representan una herramienta útil para conocer la localización subcelular de la proteína, además de permitir la identificación de esta especie en la pared celular de cultivos de chile sometidos a otro tipo de estrés tal como la salinidad, o bien, en plantas adaptadas de manera natural a ambientes secos. La metodología que nos permitiría llevar a cabo lo anterior consiste en la inmunotransferencia de las proteínas solubilizadas de la pared celular a soportes de nitrocelulosa y su inmunoreacción con el anticuerpo anti-p10.

La identificación, aislamiento y caracterización de proteínas asociadas específicamente a la pared celular de células resistentes a la sequía, podrían dar información sobre una parte del complejo mecanismo global de resistencia que presentan las plantas en respuesta al estrés osmótico.

## BIBLIOGRAFIA

- Andrade, A.** (1974). El desierto Mexicano. Testimonio del Fondo (Ed). 24-25.
- Bray, E.A.** (1993). Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040.
- Begg, J.E.** (1980). Morphological adaptations of leaves to water. En Turner, N.C., P.J. Kramer (Eds) *Adaptations of Plants to Water and High Temperature Stress*. Wiley Interscience Publications. New York. 32-42.
- Borowitzka, L.J.** (1981). Solute accumulation and regulation of cell water activity. En Paleg, L.G., D. Aspinall (Eds) *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Academic Press. New York 97-130.
- Bozarth, C.S., Mullet, J.E. y Boyer, J.S.** (1987) Cell wall proteins at low water potentials. *Plant Physiol.* 85: 261-267.
- Bressan, R.A., Handa, A.K., Handa, S. y Hasegawa, P.M.** (1982). Growth and water relations of cultured tomato cells after adjustment to low external water potentials. *Plant Physiol.* 70: 1303-1309.
- Casas, A.M., Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M.** (1991). Cell growth and water relations of the halophyte *Atriplex nummularia* in response to NaCl. *Plant Cell Rep.* 10: 81-84.
- Cloutier, Y.** (1993). Changes in the electrophoretic patterns of the soluble proteins of winter wheat and rye following cold acclimation and desiccation stress. *Plant Physiol.* 71:400-403.
- Delgadillo-Silva, P.** (1994). El enigma del desierto. En *Universitarios potosinos* 2:7-10.
- Deulaney, A.J. y Verna, D.P.S.** (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4: 215-223.
- Elorza, M.V; Mormeneo, S; García de la Cruz, R.F; Gimeneo, C. y Sentandreu, R.** (1989). Evidence for the formation of covalent bonds between macromolecules in the domain of the wall of *Candida albicans* mycelial cells. *Bioch. and Bioph. Research Communications.* 162 (3): 1118-1125.
- Elorza, M.V; Murgui, A y Sentandreu, R.** (1985). Dimorphism in *Candida albicans*: Contribution of Manoproteins to the Architecture of Yeast and Mycelial Cell Walls. *Journal of Microbiology.* 131: 2209-2216.
- Enciclopedia de México.** (1978). Ed. mexicana. 585-586. Tomo 12.
- Enciclopedia Hispánica.** (1991). Tomo 4. 153-154. Tomo 5 143-145.
- Fernandez-Bolaños, J. y Heredia, A.** (1993). Plant cell wall fragments as elicitors. *Revista Especializada de Ciencia, Tecnología y Alimentos.* 33 (6): 578-594.



- García, B; Ayala, J.W; Hernandez, H; Garcíarrubio, A y Covarrubias, A.A. (1994).** Caracterización de proteínas de pared celular que se inducen por déficit hídrico en plantulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). XX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Zacatecas, Zac.
- Hanson, A.D. y W.D. Hitz. (1982).** Metabolic responses of mesophytes to plant water deficit. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 163-203.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Handa, S. y Handa, K. (1984).** Cellular mechanisms of tolerance to water stress. *Hort Science* 19(3):7-13.
- INEGI (1993).** Agenda Estadística de los Estados Unidos Mexicanos.
- Kandpall, R.P. y Appaji Rao, N. (1985).** Alterations in the biosynthesis of proteins and nucleic acids in finger mullet (*Fleucine caracana*) seedlings during water stress and the effect of proline on protein biosynthesis. *Plant Sci.* 40: 73-79.
- Keller, B. (1993).** Structural cell wall proteins. *Plant Physiol.* 101:1127-1130.
- Kriedermann, P.E., Loveys, B.R., Fuller, G.L. y Leopold, A.C. (1972).** Abscisic acid and stomatal regulation. *Plant Physiol.* 49: 842-847.
- Kummerow, J. (1980).** Adaptations of roots in water stressed native vegetation. In Turner, N.C. Kramer, P.J. (Eds) *Adaptations of Plants to Water and High Temperature Stress.* Wiley Interscience Publications. New York. 57-76.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T. *Nature* 227:680.
- La Rosa, P.C, Singh, N.K, Hasegawa, P.M y Bressan, R.A. (1989).** Stable NaCl tolerance of tobacco cells is associated with enhanced accumulation of osmotin. *Plant Physiol.* 91: 855-861.
- Lawlor, D.W. (1969)** Absorption of polyethylene glycols by plant and their effects on plant growth. *New Phytol.* 69: 501-513.
- Lurie, S., Klein, J.D. y Fallik, E. (1994).** Cross protection of one stress by another: strategies in postharvest fruit storage. En Cherry, J.H. (Ed). *Biochemical and Cellular Mechanisms of stress Tolerance in Plants.* Springer-Verlag. Berlín 201-212 .
- McMichael, B.L., Jordan, W.R. y Powell, R.D. (1972).** An effect of water stress on ethylene production by intact cotton petioles. *Plant Physiol.* 49: 658-660.
- Medellín-Leal, F. (1978).** La Desertificación en México. Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la U.A.S.L.P. 35.
- Mendieta, R., Garcíarrubio, A. y Covarrubias, A. (1991).** Efectos del déficit de agua sobre la fisiología y expresión genética del frijol (*Phaseolus vulgaris*, CACAHUATE 72). *Memorias V Reunión de Bioquímica de Plantas.* Saltillo Coahuila.

- Milburn, J.A.** (1979). Properties of water. In water flow in Plants. Longman Group Limited. Londres. 1-21.
- Mora, C.** (1976). Tampiqueño-74 nuevo cultivar de chile serrano en México. Folleto, Centro de Investigaciones Agrícolas de Tamaulipas. Campo Agrícola Experimental las Huastecas.
- Murashige, T. y Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15:473-497.
- Oliver, M.J. y Bewley, J.D.** (1984). Plant disecation and protein synthesis. RNA synthesis, stability and recruitment of RNA into protein synthesis during desiccation and rehydration of the desiccation-tolerant moss, *Tortula ruralis*. *Plant Physiol.* 74: 21-25.
- Peña-Valdivia, C.B., Larqué-Saavedra, A. y Nava-Sánchez, T.** (1991). Efecto del déficit hídrico en *Phaseolus vulgaris* L. Memorias V Reunión de Bioquímica de Plantas. Saltillo Coahuila.
- Perez-Molphe Bach, E.M.** (1991). Identificación de proteínas inducidas por déficit hídrico y salinidad en diferentes variedades de arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis de Maestría. CINVESTAV del IPN. Irapuato, México.
- Sadka, A., Himmeloch, S. y Zamir, A.** (1991). A 150 kilodalton cell surface protein is induced by salt in the halotolerant green alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 95: 822-833.
- Santos-Díaz, M.S.** (1992). Obtención y caracterización de cultivos en suspensión de especies con diferente tolerancia al déficit hídrico, y de líneas celulares de *Capsicum annuum* resistentes a polietilenglicol. Tesis de Doctorado. CINVESTAV del IPN. Irapuato, México.
- Santos-Díaz, M.S. y Ochoa-Alejo, N.** (1994). PEG- tolerant cell clones of chili pepper: Growth, osmotic potentials and solute accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 37: 1-8.
- Singh, N.K y Handa, A.K.** (1989). Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiol.* 90: 1096-1101.
- Showalter, A.M.** (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The plant cell.* 5: 9-23.
- Simpson, B.B y Solbrig O.T.** (1977). Introduction. In Simpson, B.B. (Ed) Mesquite: Its Biology in Two Dessert Ecosystems. Dowden Hutchinson and Ross Inc. Pensilvania 15-17.
- Turner, N.C. y J.E. Begg.** (1981). Plan-Water relations and adaptations to stress. In Monteith, J. y C. Webb (Eds) Soil, Water and Nitrogen in mediterranean-Type Enviroments. Najhoff W. Junk Publishers. Hague. 97-131.

- Valentin, E; Herrero, E; Pastor, F.L.J; Sentandreu, R. (1984).** Solubilization and Analysis of Mannoprotein Molecules from the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*. 130: 1419-1428.
- Wayne, W., Boulikas, T., Wray, V.P. y Hancock, R. (1981).** Silver staining of proteins in poliacrilamida gels. *Anal. Biochem*. 118: 197-203.
- Woodward, L (1989).** Plants, water and climate. *New Scientist*. 18: 1-4.

