

PATRONES ELECTROFORETICOS DE DOS NIVELES DE ORGANIZACION DE *Brassica* COMO RESPUESTA A ESTRES HIDRICO Y SALINO

LUZ MARINA MONTOYA HENAO¹

RESUMEN

*Se llevó a cabo un ensayo con el fin de comparar la respuesta frente al estrés hídrico y salino de material vegetal de varios taxa del género *Brassica* con diferentes niveles de organización a saber: plántulas y callos.*

El estrés hídrico fué inducido utilizando polietilenglicol 6.000 (PEG 6.000) en concentraciones crecientes y adicionándolo al medio MS. De igual forma el estrés salino se indujo adicionando al medio concentraciones crecientes de cloruro de sodio (NaCl). Se presentó una banda de proteínas de un peso molecular de aproximadamente 50 KDa cuando se utilizaron plántulas y cuando se observó el patrón electroforético de callos crecidos en condiciones salinas; cuando se utilizó la máxima concentración de sal (300 mM NaCl) se presentó una banda de proteínas de aproximadamente 45 KDa que no se presentó en callos mantenidos por medio control, ni en los crecidos en las otras concentraciones de NaCl.

Palabras clave: salino, hídrico, estrés, Brassica, patrón protéico.

1 Profesora Asociada. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Apartado 568.

ABSTRACT

ELECTROPHORETIC PATTERNS OF TWO Brassica ORGANIZATION LEVELS IN RESPONSE TO DROUGHT AND SALINITY STRESS.

It was developed a study in order to compare the response to drought and salinity stress on several Brassica's taxa and different organization levels (callus and seedlings) in relation to protein electrophoretic pattern.

Protein pattern showed a protein band (45 KDa) in callus grown under the strongest salinity stress (300 mM NaCl). Another 50 KDa protein band, present in control, moderate and low salinity stress disappeared in the strongest salinity stress.

Under induced water stress using the maximum PEG concentration a 45 KDa polypeptide band was presented, and a 50 KDa polypeptide band disappeared.

Key words: salinity, drought, stress, Brassica, protein pattern.

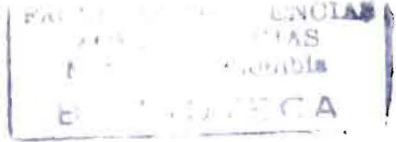
REVISION DE LITERATURA

El estrés ha sido definido de varias formas. Levitt (1980) lo define como cualquier modificación del medio ambiente que es potencialmente desfavorable al crecimiento y/o desarrollo de la planta, en tanto que Kramer (1983) lo ha definido como cualquier factor que altere el funcionamiento normal del organismo.

Las plantas superiores están sometidas a distintos tipos de estrés ya sean de origen ambiental o biológico y estas condiciones adversas pueden interferir en el normal crecimiento y desarrollo de cultivos y ocasionar menor producción y de más baja calidad (Sachs y Ho, 1986).

Como respuesta al estrés las plantas muestran cambios genotípicos, morfológicos y metabólicos significativos que pueden concebirse como respuestas adaptativas y en muchos casos los cambios son complejos y difíciles de evaluar (Singh *et al.*, 1985).

El estudio de los fenómenos de estrés de los mecanismos de tolerancia desarrollados por las plantas ha ocupado la atención de los fisiólogos vegetales y fitomejoradores, quienes se han propuesto la tarea de obtener



plantas mejor adaptadas a estas condiciones. Dentro de estos estudios, muchos se enfocan hacia el análisis de la expresión génica frente al estrés (Sachs y Ho, 1986).

Tanto el estrés hídrico como el salino son de importancia en la agricultura. La mayoría de las plantas están sometidas a estrés hídrico en algún estado de su ontogenia y puede variar desde pequeñas fluctuaciones en la humedad atmosférica y en la radiación neta en habitats con mediana humedad, hasta déficits hídricos extremos y baja humedad en las zonas áridas (Morgan, 1984). El problema agronómico de la salinidad es la baja tolerancia de muchos cultivos, a pesar de que existan plantas superiores tolerantes a sales (Wyn Jones, 1981).

Existe una correlación entre estrés hídrico y salino ya que el estrés hídrico en suelos o medios salinos es la consecuencia de la disminución del potencial hídrico, el cual es disminuído a su vez por la presencia de solutos. De esta forma el potencial de agua intracelular debe decrecer ya sea aumentando la concentración de solutos o aumentando la capacidad de retención de agua. En ausencia de tales respuestas el tejido perderá presión de turgencia y se deshidratará (Wyn Jones, 1981). De otro lado se considera que existe estrés salino cuando la concentración de sales en el medio es tan alta como para disminuir apreciablemente el potencial hídrico (0.5-1.0 bar).

El hecho permite correlacionar estrechamente el estrés hídrico con el estrés salino (Tal, 1983).

Como respuesta a las condiciones de estrés se han encontrado cambios en los patrones de síntesis de proteínas y se han encontrado además varias proteínas inducidas como respuesta al ambiente alterado a las cuales se les denomina proteínas de estrés o proteínas de choque (Sachs y Ho, 1986).

Muchas de estas proteínas son una respuesta inmediata del organismo a la alteración del ambiente (temperatura, anoxia, estrés osmótico y heridas) y no se tiene certeza si muchas de ellas están asociadas con el aumento de crecimiento y la supervivencia de las plantas en el medio ambiente (Ramagopal, 1987; Singh *et al.*, 1987).

Se sabe sí que el choque osmótico conlleva a la síntesis de nuevas proteínas y a la liberación extracelular de varias de ellas (Singh *et al.*, 1985; Vartanian *et al.*, 1987).

Singh *et al.* (1985) en experimentos con células adaptadas a crecer en medios con altos niveles de polietilenglicol (PEG) o cloruro de sodio (NaCl) encontraron que se produjeron varias bandas nuevas de polipéptidos y otras se aumentaron. La intensidad de algunas de estas bandas (pesos moleculares

de 58.37, 35.5, 34, 26, 21, 19.5 y 18 KDa) aumentó con el aumento de los niveles de adaptación a NaCl, mientras que la intensidad de otras bandas (54, 52, 17.5 y 16.5 KDa) disminuyó. Los niveles elevados en polipéptidos de 43 y 26 KDa estuvieron presentes en células adaptadas tanto a estrés salino como hídrico pero no se observaron en células no adaptadas.

MATERIALES Y METODOS

Los estudios se llevaron a cabo en seis taxa del género *Brassica*, tres de ellos espontáneos y tres cultivados y se estudiaron dos niveles de organización en cultivo aséptico. Los niveles de organización fueron plántulas y callos.

Para la desinfección superficial de semillas, éstas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 30 minutos en recipiente hermético y con agitación constante. Después se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril.

Las semillas fueron sembradas en medio MS sólo (para la obtención de plántulas y posteriormente obtención de callos) y en medio adicionado con concentraciones crecientes de PEG (estrés hídrico) y NaCl (estrés salino). Las concentraciones de sal utilizadas fueron 0.75 mM, 150 mM 300 mM y las de PEG 0.10%, 20% y 30%.

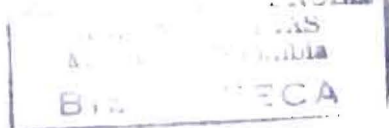
En todos los casos el pH del medio se ajustó a 5.8 y se utilizó agar para gelificar el medio.

Para la obtención de callos se utilizó como explante hoja de plántula con incisiones y al medio MS se adicionaron 2 mg/l de 2.4 D y 0.1 mg/l de kinetina y una vez obtenidos los callos se hicieron crecer en medios adicionados con PEG y NaCl en las mismas concentraciones que las plántulas.

Tanto los callos como las plántulas se crecieron en cámara de crecimiento marca Koxka, a una temperatura constante de 25°C, una intensidad lumínica de 5.000 luxes y un fotoperíodo de 16 horas de luz.

Para la visualización de proteínas se utilizó la técnica de electroforesis de proteínas geles de poliacrilamida.

Las electroforesis monodimensionales en geles SDS de poliacrilamida y en medio desnaturante se realizaron según el método Laemmli (1970), los geles fueron preparados en un aparato Bio-rad modelo 220, su espesor fué de 1.5 mm.



La composición de los geles separador y concentradores utilizada fue la siguiente:

Gel separador:

Acrilamida 12.5 %	
Agua desionizada	4.0 ml
Tampón tris HCl 1M pH 8.8	7.5 ml
Solución de acrilamida y Bis (30% y 8%, respectivamente)	8.4 ml
SDS (20%)	100.0 ml
TMED	10.0 ul
Persulfato amónico (10%)	64.0 ul

Gel concentrador:

Acrilamida 3%	
Agua desionizada	15.1 ml
Tampón tris HCl 1M pH 6.8	2.5 ml
Solución de acrilamida y Bis (28% y 1.6%, respectivamente)	2.0 ml
SDS (20%)	100.0 ul
TMED	20.0 ul
Persulfato amónico (10%)	200.0 ul

La electroforesis se efectuó a 25 mA en tampón Tris-glicina-SDS, hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel.

La visualización de las proteínas se realizó mediante tinción con azul de Coomassie.

Para la determinación de pesos moleculares se utilizaron las siguientes proteínas:

Lisozina	14.400 KDa
Inhibidor de tripsina (de soya)	21.500 KDa
Anhidrasa carbónica	31.000 KDa
Ovoalbúmina	42.698 KDa
Seroalbúmina bovina	66.200 KDa
Fosforilasa B	97.400 KDa

Una vez finalizada la electroforesis el gel fué sumergido en solución de azul de coomassie al 5% y mantenido en agitación durante 20 minutos. Posteriormente se cambió el gel a una solución decolorante donde fué mantenido en agitación, hasta la completa visualización de todas las bandas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos a partir de extractos de proteínas totales separados en geles SDS-poliacrilamida y teñidos con azul de coomassie, mostraron variaciones en cuanto al patrón de proteínas totales en plántulas de los distintos taxa de una misma especie crecidas en medio salino, como en el caso de *B. oleracea* espontánea, cuando se comparó con *B. oleracea* var Capitata y *B. oleracea* var Botrytis, ya que en *B. oleracea* espontánea se presentó una banda de proteínas de aproximadamente 65 KDa, que no fué observada en los dos últimos taxa (Figura 1). A este nivel no fue posible

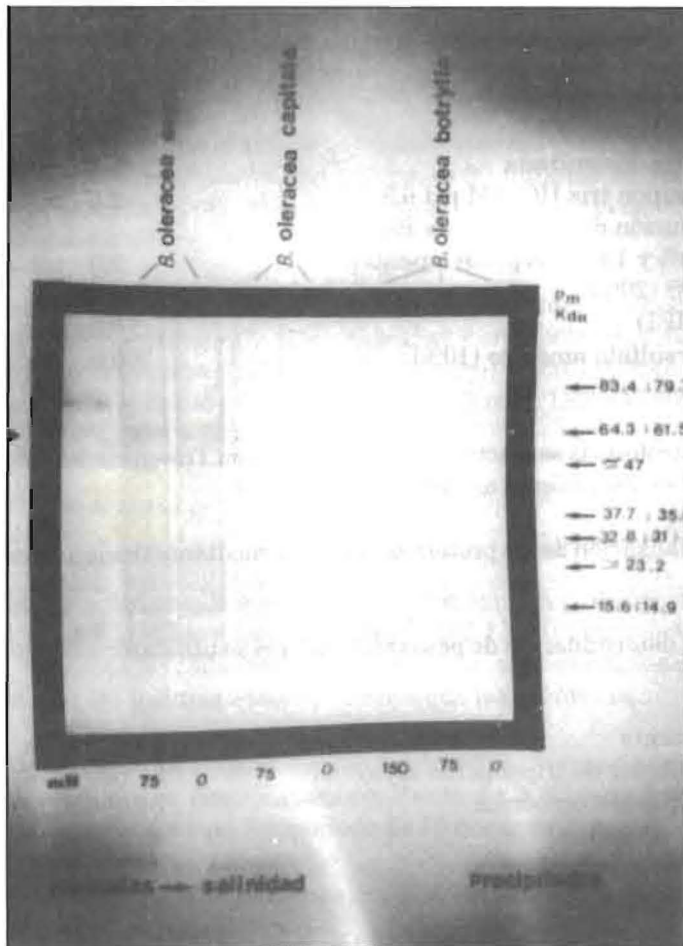
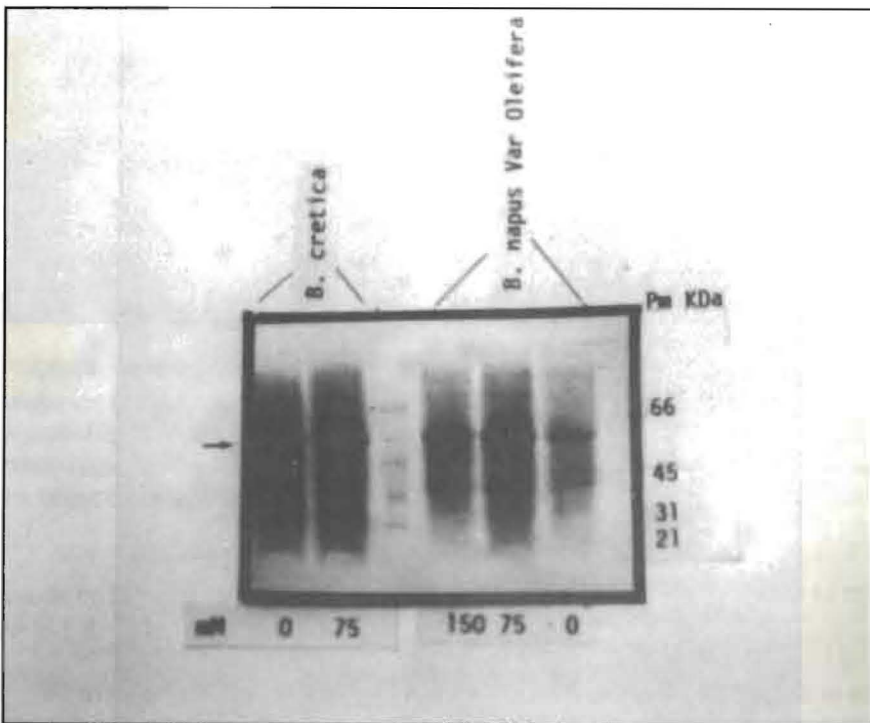


FIGURA 1. Patrones electroforéticos de proteínas separadas en geles SDS- poliactilamida y teñidos con azul de Coomassie, de plántulas de tres taxa de *Brassica* crecidas en medio salino.

detectar diferencias en el patrón electroforético de proteínas originadas por la adición de las distintas concentraciones de NaCl utilizadas. En plántulas no fue posible obtener suficiente cantidad de proteínas, en las concentraciones de PEG y NaCl más altas, que permitiera su visualización.

Lo que si se presentó fue una banda de polipéptidos intensa, constante en todos los taxa, cuyo peso molecular es de aproximadamente 50 KDa (Figura 2).



FACTORES DE TIENDA
AGROPECUARIAS
Medellin - Colombia
BIBLIOTECA

FIGURA 2. Patrones electroforéticos de proteínas separadas en geles SDS- poliacrilamida y teñidos con azul de Coomassie, de plántulas de dos taxa de *Brassica* crecidos en medio salino.

Cuando se observó el patrón electroforético de los callos crecidos en condiciones salinas, donde sí se obtuvo el material necesario para los ensayos en las condiciones más altas de estrés (300 mM NaCl), se vió que a esta máxima concentración utilizada, se presentaba una banda de proteínas de aproximadamente 45 KDa muy marcada y que no estuvo presente en callos mantenidos en medio control, ni en las otras concentraciones de sal ensayadas.

Ocurrió además otra modificación en callos crecidos en la más alta concentración de sal y fue la desaparición de un polipéptido de aproximadamente 50 KDa, cuya presencia se detectó en callos mantenidos en medio control o con grados de estrés bajo y moderado (Figura 3).

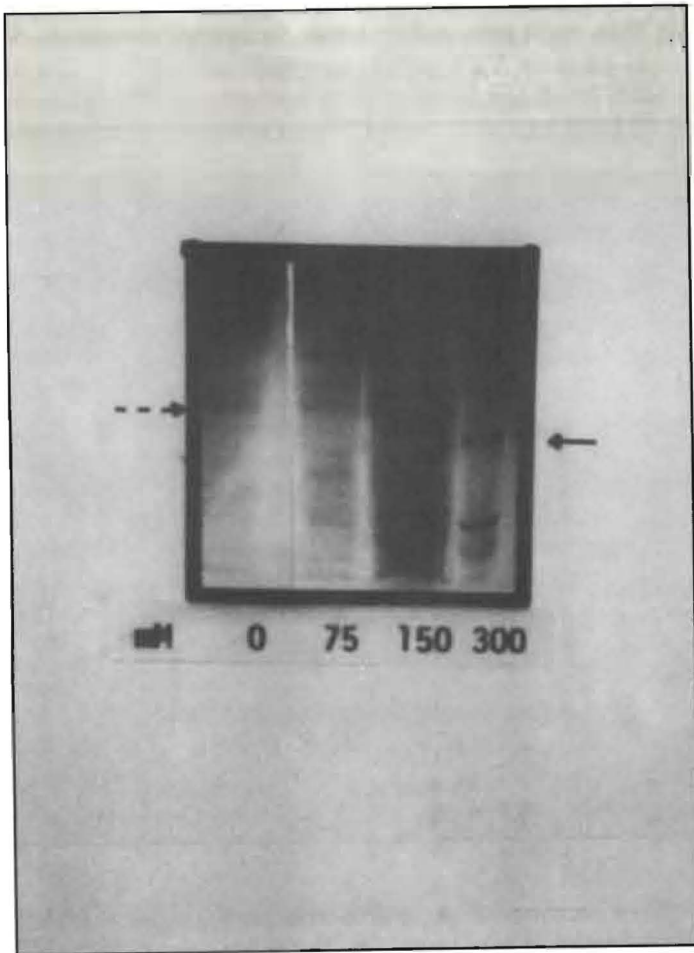


FIGURA 3. Patrones electroforéticos de proteínas separadas en geles SDS- poliacrilamida y teñidos con azul de Coomassie de callos de *B. napus* var. *Oleifera* crecidos durante un mes bajo condiciones de estrés salino. Flecha punteada: indica la desaparición de la banda a 300 mM NaCl. Flecha continua: la aparición de otra banda a la misma concentración.

En callos sometidos a estrés hídrico inducido por concentraciones crecientes de PEG, se observó un patrón electroforético similar (Figura 4),

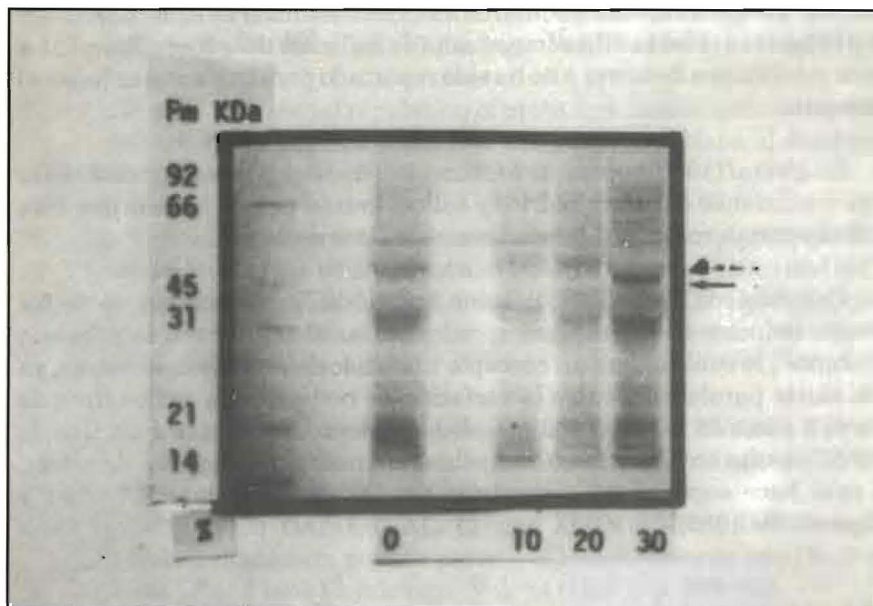
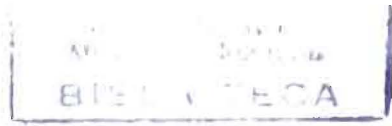


FIGURA 4. Patrones electroforéticos de proteínas separadas en geles SDS- poliacrilamida y teñidos con azul de Coomassie de callos de *B. cretica* crecidos durante un mes bajo condiciones de estrés hídrico inducido por concentraciones crecientes de PEG (0% a 30%). Flecha punteada: indica la desaparición de la banda a 30% de PEG. Flecha continua: la aparición de otra banda a la misma concentración.

donde en la máxima concentración aparece una banda de polipéptido de 45 KDa y desaparece una de 50 KDa.

Al nivel en que se realizaron los ensayos no fue posible distinguir si se trataba del mismo polipéptido, pero en la actualidad se están llevando a cabo separaciones bidimensionales para identificar su punto isoeléctrico y ver si existe coincidencia, lo cual sería indicativo de una proteína inducida a altas concentraciones de ambos tipos de agentes inductores de estrés.

Diferentes autores Singh *et al* (1985), Ramagopal (1987) han descrito la inducción de un polipéptido de 26 KDa en condiciones de estrés salino y en ocasiones inducido por ácido abscísico, en distinto material vegetal.

En este sentido utilizando tinción con azul de Coomassie, no ha sido posible identificar este polipéptido, lo cual no descarta su posible visualización utilizando otras metodologías de mayor resolución. Sin embargo merece la pena destacar la existencia del polipéptido de 45 KDa, que a estos niveles de detección se acumula en el mayor grado de estrés hídrico y salino. Lo

anterior que fue detectado en diferentes especies a nivel de callo, podría ser una respuesta característica importante de los callos del género *Brassica* a estas condiciones de estrés y no ha sido reportado por otros autores hasta el momento.

Singh *et al* (1985) encontraron acumulación de un polipéptido de 43 KDa bajo condiciones de estrés hídrico y salino, lo cual parece indicar que ésta podría ser una respuesta general a ambos tipos de estrés.

Coincide con Levitt (1980) quien sugirió la “existencia de un factor común inductor de tolerancia parcial a varias clases de estrés primario diferente”, lo cual sugiere un concepto unificado de resistencia a estrés, ya que existe paralelismo entre la variación de resistencia a varios tipos de estrés y casos en los cuales el acondicionamiento de plantas a un tipo de estrés, resulta en un aumento de resistencia a otras condiciones de estrés, lo cual hace suponer un mecanismo similar de resistencia (Cloutier y Siminovitche 1982, Tal 1984).

BIBLIOGRAFIA

- CLOUTIER, Y. and SIMINOVITCH, D., Correlation between cold and drought induced frost hardiness in winter wheat rye varieties. *En: Plant Physiology*. Vol. 69 (1982); p. 250-255.
- KRAMER, P.J. Water relations of plant. New York: Academic Press, 1983, 489 p.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *En: Nature*. Vol. 227 (1970); p. 679-685.
- LEVITT, J. Responses of plants to environmental stresses. 2ed. New York: Academic Press, 1980. 606 p.
- MORGAN, J. Osmoregulation and water stress in higher plants. *En: Annual Review of Plant Physiology*. Vol. 35 (1984); p. 299-319.
- RAMAGOPAL, S. Salinity stress induced tissue-specific protein in barley. *En: Plant Physiology*. Vol. 84 (1987); p. 324-331.
- SACHS, M.M. and HO, T.D. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. *En: Plant Physiology*. Vol. 37 (1986); p. 363-376.

SINGH, N. *et al.* Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *En: Plant Physiology*. Vol. 79 (1985); p. 126-137.

SINGH, N. *et al.* Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells. *En: Proceedings of Natural Academy of Sciences*. Vol. 84 (1987); p. 739-743.

TAL, M. Physiological genetics of salt resistance in higher plants: studies on the level of the whole plant and isolated organs, tissues and cells. p. 301-320. *En: STAPLES, R.C. and TOENNIENSEN, G. ed. Salinity tolerance in plants: strategies for crop improvement*. New York: Wiley Interscience, 1984.

_____. Selection for stress tolerance. p.461-488. *En: EVANS, D. et al., ed. Handbook of plant cell culture*. London: McMillan, 1983.

VARTANIAN, N.C.; DAMERVAL, C. and DE VIENNE, D. Drought induced changes in protein pattern of *Brassica napus* var. Oleifera roots. *En: Plant Physiology*. Vol. 84 (1987); p. 989-992.

WYN JONES, R.G. Salt tolerance. p. 271-292. *En: JOHNSON, C.B. ed. Physiological processes limiting plant production*. London: s.n., 1981.

