

# PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE PEROXIDASAS, CATALASAS, SUPERÓXIDO DISMUTASAS Y PROTEINAS TOTALES EN PLÁNTULAS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill) SOMETIDAS A ESTRÉS DE TEMPERATURAS

Marilyn Florido<sup>✉</sup>, Marta Alvarez, Regla M. Lara, Dagmara Plana y Aymara García

**ABSTRACT.** The research work was aimed at finding electrophoretic polymorphic bands that can be used as genetic markers to select tomato accessions with heat stress tolerance. An electrophoresis analysis of peroxidases, catalases, superoxide dismutases and total proteins of control samples and those treated at 40°C for 90 minutes was performed in four accessions with different heat tolerance degrees: Nagcarlang, L-103, Campbell-28 and HC 3880. Isoenzymatic patterns of peroxidases and catalases were not affected by heat stress; however, electrophoretic bands of superoxide dismutase isoenzymes showed a reduced activity compared to the control at the heat susceptible accessions Campbell-28 and HC 3880. Also a new band of 100 kDa was observed in all heat stressed genotypes.

*Key words:* heat stress, tomato, electrophoresis, HSP, enzymes

**RESUMEN.** El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de detectar perfiles electroforéticos polimórficos, que puedan ser utilizados como marcadores genéticos para asistir la selección de accesiones de tomate tolerantes al calor. Para el desarrollo del trabajo se efectuó un análisis electroforético de peroxidasas, catalasas, superóxido dismutasas y proteínas totales de muestras controles y tratadas a 40°C durante 90 min. de cuatro accesiones con diferente grado de tolerancia a altas temperaturas: Nagcarlang, L-10-3, Campbell-28 y HC 3880. Se pudo observar que los patrones isoenzimáticos de peroxidasas y catalasas no se afectaron por el estrés de calor; no obstante, los perfiles electroforéticos de isoenzimas superóxido dismutasas mostraron una disminución de actividad en las accesiones Campbell-28 y HC 3880, susceptibles al calor con respecto al control. Se evidenció además la inducción de una banda de 100 kDa, ante la presencia del estrés de temperatura en las cuatro accesiones evaluadas.

*Palabras clave:* estrés térmico, tomate, electroforesis, HSP, enzimas

## INTRODUCCIÓN

En el cultivo del tomate, las altas temperaturas provocan serias afectaciones en los rendimientos y la calidad de los frutos, limitándose el cultivo a los meses de invierno; de ahí que sea necesario obtener nuevas variedades que se adapten a las condiciones estresantes que provoca este factor abiótico(1, 2).

Es por ello que resulta de suma importancia en los programas de mejoramiento del cultivo, el poder contar con marcadores genéticos que puedan ser usados para asistir la selección y permitan identificar genotipos con alto grado de adaptabilidad al calor.

En este sentido, se ha informado la posibilidad de relacionar la respuesta de la planta en condiciones no óptimas de cultivo con la respuesta inducida en presencia de estrés en condiciones *in vitro*, lo que permite seleccionar diferentes genotipos con respuesta extrema ante el estrés en cuestión.

Al respecto, diversos autores (3, 4, 5, 6) han señalado que ante la presencia de estrés abiótico y fundamentalmente de calor, se induce en las plantas la expresión de un grupo conservado de genes que codifican para proteínas de choque térmico (*HSP*), que se caracterizan por la síntesis de un pequeño grupo de proteínas de alto peso molecular (*HMM*) y un grupo complejo de bajo peso molecular (*LMW*); asimismo se ha informado (7, 8, 9, 10) ante condiciones de estrés inducido, la presencia de cambios isoenzimáticos, fundamentalmente en enzimas relacionadas con el mecanismo antioxidante, que pueden ser utilizados como indicadores en estas condiciones.

Ms.C. Marilyn Florido, Investigador Agregado; Dr.C. Marta Álvarez, Investigador Titular; Regla M. Lara, Especialista; Ms.C. Dagmara Plana y Ms.C. Aymara García, Investigadoras del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

✉ mflorido@inca.edu.cu

Teniendo en cuenta lo antes planteado se realizó el presente trabajo, con el objetivo de buscar bandas polimórficas en los sistemas de peroxidases, catalasas, superóxido dismutasas y proteínas totales, que puedan ser utilizados como marcadores genéticos en la selección de genotipos de tomate tolerantes al calor.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se tomaron plántulas de 20 días de edad de las accesiones Nagcarlang y L-10-3, ambas tolerantes a altas temperaturas (2, 11) y las variedades Campbell-28 y HC-3880, las cuales presentan bajos rendimientos cuando se cultivan fuera de la época óptima<sup>1</sup>.

En todos los casos, las corridas electroforéticas para los sistemas isoenzimáticos se efectuaron en geles de poliacrilamida al 10 % con *buffer Tris-HCl* 0.375M pH 8.9 y *buffer Tris-Glicina* 0.025-0.019M pH 8.3 en los compartimentos, mientras que para proteínas totales se utilizó el sistema *SDS-PAGE* (12), con concentraciones del 12 y el 4 % para los geles separador y concentrador respectivamente, utilizando en este último caso marcadores de diferentes pesos moleculares: 12.3 kDa (citocromo C), 17 kDa (mioglobulina), 30 kDa (anhidrasa carbónica), 42.7 kDa (ovoalbúmina), 66.2 kDa (albúmina) y 78 kDa (ovotransferina), para conocer la ubicación de las posibles nuevas bandas.

El tiempo de corrida en cada caso estuvo determinado por el desplazamiento de la banda de Kolrhauch hasta aproximadamente 6 cm del inicio. Se utilizó en todos los casos una intensidad de corriente constante de 25 mA para isoenzimas y 35 mA para proteínas totales, en una cámara de electroforesis vertical *Mini Protean II* de *Bio Rad*.

Para la preparación de los extractos se tomaron muestras de 0.3 g de tejido foliar, las que fueron sometidas a tratamientos de temperatura de 40°C durante 90 minutos, previamente establecidos (13) y las muestras control fueron mantenidas a 25°C para posteriormente efectuar las corridas electroforéticas. Para ello las muestras se homogeneizaron en frío con *buffer* que contenía *Tris-HCl* 0.05M a pH 7.2, sacarosa 10 % y 14 µM de ditriotritol en proporción 1:2. El extracto fue centrifugado a 12 000 rpm a 0°C durante 10 minutos, sometiéndose entonces el sobrenadante a electroforesis en los sistemas de proteínas totales (12) e isoenzimas peroxidases, catalasas (14) y superóxido dismutasas (15).

Los fenotipos proteicos e isoenzimáticos de cada individuo en estudio fueron establecidos sobre la base del número, la posición e intensidad relativa de tinción de cada banda, esta última atendiendo a la escala de cuatro grados propuesta por Brewbaker y Hasegawa (15). Se realizaron seis lecturas réplicas en cada sistema electroforético analizado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados bioquímicos obtenidos del análisis de los sistemas enzimáticos analizados no revelaron variaciones apreciables en los patrones electroforéticos de los sistemas peroxidases y catalasas (Foto 1 y Figura 1) al ser expuestos al estrés; sin embargo, el sistema superóxido dismutasa sufrió modificaciones en sus patrones de bandas.

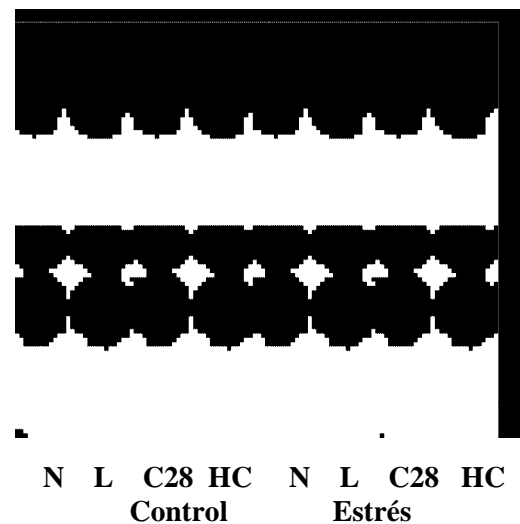


Foto 1. Isoenzimas peroxidases

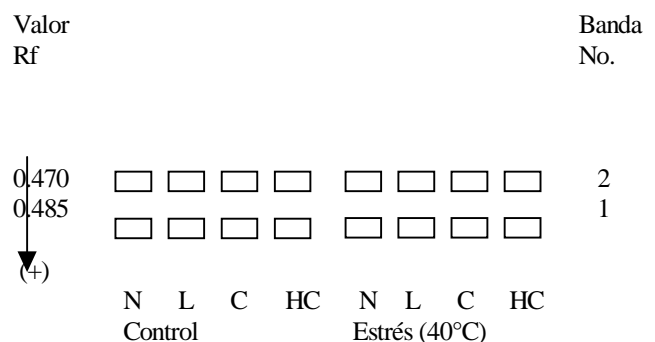
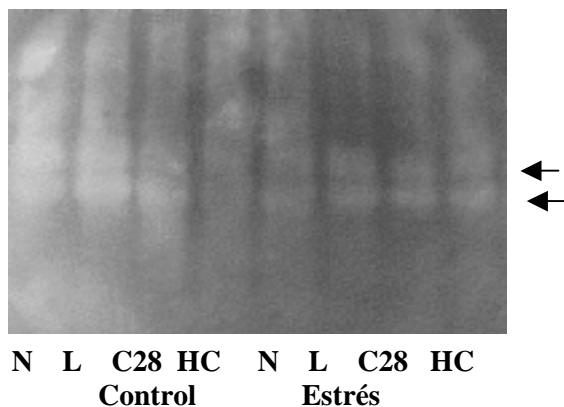


Figura 1. Zimograma catalasa

Así, como se puede apreciar en la Foto 2, se constató la existencia de diferencias en la actividad superóxido dismutasa de accesiones tolerantes y susceptibles al estrés de temperatura. De este modo, las accesiones tolerantes mostraron el mismo patrón de bandas que el control cuando fueron expuestos a tratamientos estresantes, mientras que los susceptibles presentaron una disminución en la actividad de esta enzima, lo que se observó como bandas menos gruesas que el resto. No se apreció, sin embargo, la inducción de nuevas bandas en las accesiones de tomate ante este estrés ambiental.

<sup>1</sup> Gómez y Moya, comunicación personal, 1999.



**Foto 2. Isoenzimas superóxido dismutasas**

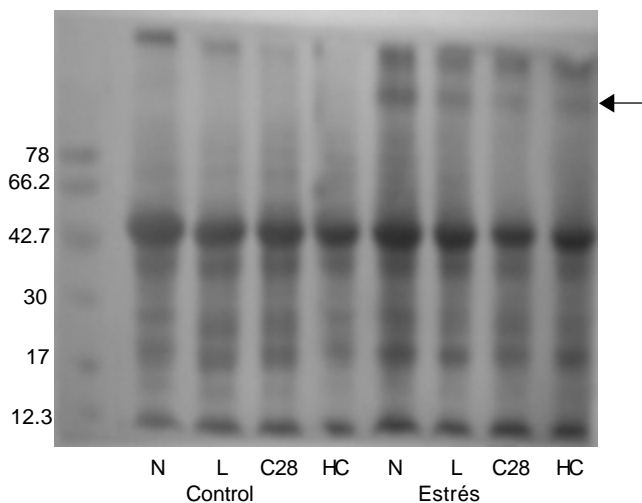
Estos resultados corroboraron lo planteado por diversos autores (16, 17, 18) en estudios realizados en trigo y tomate respectivamente, los cuales informaron disminuciones apreciables de esta enzima en variedades susceptibles al calor, a pesar de que a diferencia de lo aquí observado en muchos casos, dichos autores encontraron correlaciones tanto positivas como negativas de la actividad superóxido dismutasa con otros sistemas oxidantes como catalasas y peroxidadas.

En particular, cabe significar que la no existencia de variabilidad isoenzimática pudiera atribuirse a que el tratamiento de calor impuesto al tejido foliar, no afectó a los loci involucrados en la expresión de los sistemas isoenzimáticos; de hecho, se han encontrado trabajos que informan disminuciones o incrementos en las actividades de determinadas enzimas, que no alteran su patrón electroforético (9, 19).

El sistema superóxido dismutasa, como se sabe, ha sido implicado en la protección de plantas contra daños causados por el estrés, fundamentalmente medioambientales, en diversos cultivos, lo que se demuestra mediante estudios de esta enzima, realizados en presencia de estrés de temperatura y salinidad en tomate (17, 18); asimismo, en presencia de estrés salino se ha encontrado respuesta diferenciada en los patrones electroforéticos superóxido dismutasas de variedades de limón resistentes y susceptibles (20). De igual forma, se ha informado que el estrés hídrico puede provocar incremento de la actividad de la enzima en cultivos como maíz, trigo y boniato (7, 8, 10, 21).

Estos resultados pudieran indicar que las variedades tolerantes a estrés abiótico y particularmente las altas temperaturas, presentan una fuerte correlación entre la capacidad de regular el sistema de defensa antioxidante y, en general, la capacidad de producir altos rendimientos en condiciones de estrés al calor, ya que muchas de las respuestas enzimáticas, sobre todo las características del metabolismo de estrés, son también respuestas adaptativas que favorece una protección inespecífica de los daños celulares causados por los factores estresantes (9, 17, 22).

Los resultados en la composición de proteínas totales, por su parte, presentaron diferencias en el número de bandas entre tratamientos controles y estresados (Foto 3).



**Foto 3. Electroforesis de proteínas totales**

De hecho, ante el estrés de calor, todas las accesiones estudiadas presentaron una nueva banda de aproximadamente 100 kDa; sin embargo, en el patrón de bandas no se observó ninguna proteína de bajo peso molecular.

Es posible, que estas bandas estén asociadas con mecanismos de termotolerancia que se presentan a temperaturas subletales (3). En este caso, aunque aparece de manera constitutiva en presencia del estrés, se debe recordar que las variedades Campbell-28 y HC 3880, a pesar de ser sensibles al calor, crecen y se desarrollan en condiciones tropicales y, por lo tanto, deben tener ciertos mecanismos que le provoquen cierta termoprotección, aunque esta protección debe ser por un tiempo de exposición al calor menor.

Al respecto, se ha demostrado que un amplio rango de especies sintetiza una familia de proteínas en el cloroplasto de alrededor de 100 kDa (*HSP/Clp*), tanto constitutivas como inducibles por el calor. Estas proteínas son las que tienen similitud antigénica con HSP104 de levaduras (3, 4, 5, 6); además, estas *HSPs* son requeridas durante la sobrevivencia en corto tiempo a temperaturas extremas (5, 6), por lo que se sugiere que la actividad "chaperona" de las *HSPs* ayuda a prevenir la agregación y/o desnaturalización de proteínas a altas temperaturas, facilitando la resolubilización de agregados de proteínas dañadas por el calor y, por lo tanto, ayuda a limitar los daños inducidos en las células por el calor, pudiendo este ser un factor involucrado en la estabilidad de la membrana celular (4, 6, 23).

Ahora bien, la ausencia de *HSP* de bajo peso molecular (*LMW HSP*) se puede deber a que las condiciones de corrida en *SDS-PAGE 1-D* (24) no sean capaces de detectar estas proteínas, lo cual pudiera indicar que es cuantitativa la expresión de los genes que controlan la síntesis de *HSP*. En este trabajo se demostró que

solamente por SDS-PAGE 2-D se detectaban correlaciones entre HSP de bajo peso molecular y tratamientos al calor, las cuales se generaban tanto en cultivares tolerantes como sensibles al calor. Ahora bien, aunque se sabe muy poco acerca del mecanismo celular y molecular involucrado en la inducción de la síntesis (traducción de la señal), se ha sugerido que las señales oxidativas pueden jugar un papel central en la respuesta celular al estrés.

De manera general, se debe señalar que, en respuesta a cambios en las condiciones ambientales, las plantas superiores son capaces de activar o inhibir la expresión de genes específicos o acumulación de un grupo de proteínas como las inducidas por el estrés, las cuales podrían ser utilizadas en los programas de mejora en la selección de genotipos tolerantes al calor, siempre y cuando se encuentre una respuesta diferenciada entre individuos tolerantes y resistentes, que se herede en las poblaciones segregantes.

## REFERENCIAS

- Gómez, O.; Casanova, A.; Laterrot, H.; Anaïs, G. Mejora genética y manejo del cultivo del tomate para la producción en el Caribe. La Habana. Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova", 2000. 159 p.
- IIHLD. Memorias 25 aniversario. La Habana. Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova", 1997.
- Pareck, A.; Singla, S. L.; Grover, A. Immunological evidence for accumulation of two high molecular weight (104 and 90 kDa) HSPs in response to different stresses in rice and in response to high temperature stress in diverse plant genera. *Plant Mol. Biol.*, 1995, vol. 29, p. 293-301.
- Lee, G. J.; Vierling, E. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactive a heat denatured protein. *Plant Physiol.*, 2000, vol. 122, p. 189-198.
- Gurley, W. HSP101: A key component for the acquisition of thermotolerance in plants. *Plant Cell.*, 2000, vol. 12, p. 457-460.
- Schirmer, E. C.; Ware, D. M.; Queitsch, C.; Kowal, A. S.; Lindquist, S. L. Subunit interactions influence the biochemical and biological properties of HSP104. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, vol. 98, no. 3, p. 914-919.
- Li, L.; Staden, J.; Jäger, A. K. Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regulations*, 1998, vol. 25, no. 2, p. 135-141.
- Li, L.; Staden, J. Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in callus of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regulations*, 1998, vol. 24, no. 1, p. 74-75.
- Wu, G.; Wilen, R. W.; Robertson, A. J.; Gusta, L. V. Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. *Plant Physiol.*, 1999, vol. 120, p. 513-520.
- Hwang, S. Y.; Lin, H. W.; Chern, R. H.; Lo, H. F.; Li, L. Reduced susceptibility to waterlogging together with high-light stress is related to increases in superoxide dismutase and catalase activities in sweet potato. *Plant Growth Reg.*, 1999, vol. 27, no. 3, p. 167-172.
- Rick, C. M. Download TGRC Stock list (<http://tgrc.ucdavis.edu>). 2001.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, p. 680-685.
- Florido, M.; Lara, R. M.; Plana, D.; Álvarez, M. Establecimiento de un método eficiente para evaluar la tolerancia al calor en tomate. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 2, p. 69-73.
- Iglesias, L. Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glycine max* L. Merrill). Tesis de Grado (Dr. en Ciencias Agronómicas). INCA. La Habana. 1986, 232 p.
- Wendel, J. F.; Weeden, N. F. Visualization and interpretation of plant isozymes. En: *Isozymes in Plant Biology*. New York. Dioscorides Press., 1989, p. 5-34.
- Zhang, J.; Kirkham, H. Drought stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.*, 1994, vol. 35, no. 5, p. 785-791.
- Rainwater, D. T.; Gossett, D. R.; Millhollon, E. P.; Hanna, H. I.; Banks, S. W.; Lucas, M. C. The relationship between yield and the oxidant defense system in tomatoes grown under heat stress. *Free Radic Res.*, 1996, vol. 25, no. 5, p. 421-435.
- Lutfur Rahman, S. M.; Navata, E.; Domae, Y.; Sakuratani, T. Effects of water stress and temperature on sod activity, growth and yield of tomato. *Acta Hort.*, 2000, vol. 516, p. 41-48.
- Echenique, C. V.; Polci, P. A. Cambios isoenzimáticos inducidos por estrés hídrico y de temperatura en pasto llorón. *Turrialba.*, 1994, vol. 44, no. 1, p. 10-17.
- Piqueras, A.; Hernández, J. M.; Olmos, E.; Hellín, E.; Sevilla, F. Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 1996, vol. 45, no. 1, p. 53-60.
- Sairam, R. K.; Deshmukh, P. S.; Saxena, D. C. Role of antioxidant systems in wheat genotype tolerance to water stress. *Biol. Plantarum.*, 1998, vol. 41, no. 3, p. 387-394.
- Iglesias, L. Revisión sobre diversos aspectos relacionados con la tolerancia al estrés de calor en plantas. *Cultivos Tropicales*, 1994, vol. 15, no. 2, p. 99-107.
- Frova, C.; Gorla, M. S. Quantitative expression of maize HSPs: genetic dissection and association with thermotolerance. *Theor. Appl. Genet.*, 1993, vol. 86, p. 213-220.
- AVRDC. Expressions of heat shock proteins in tomato. *AVRDC Progress Report*. 1993, p. 223-226.

Recibido: 24 de marzo del 2000

Aceptado: 28 de noviembre del 2001