

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN/RESEARCH ARTICLE

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE CULTIVOS CELULARES DE (*Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*) *fouquieriaceae* BAJO ESTRÉS HÍDRICO

Assessment of (*Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*) Cell Cultures Response Under Water Stress

Leonor Angélica GUERRERO ZÚÑIGA¹, Angélica RODRÍGUEZ DORANTES².

¹ Instituto Mexicano Del Petróleo, Eje Central Lázaro Cárdenas 152, San Bartolo Atepehuacan, 07730 Ciudad de México, CDMX.

² Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Ciudad de México, CDMX.

For correspondence. rodorantes@yahoo.com.mx

Received: 27nd September 2016, **Returned for revision:** 3rd February 2017, **Accepted:** 23rd February 2017.

Associate Editor: John Donato Rondón.

Citation/Citar este artículo como: Guerrero Zúñiga LA, Rodríguez Dorantes A. Evaluación de la respuesta de cultivos celulares de (*Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*) *Fouquieriaceae* bajo estrés hídrico. *Acta biol. Colomb.* 2017;22(2):165-174. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n2.60320>

RESUMEN

Los cultivos de células vegetales son sistemas experimentales homogéneos altamente controlables que permiten el estudio de adaptaciones bajo condiciones de estrés hídrico, sin la interferencia de los diferentes tejidos y estados del desarrollo vegetal. Una aproximación para comprender esas adaptaciones, es la aparición de proteínas inducidas, resultado de la alteración en la expresión génica. El presente trabajo analizó la respuesta de cultivos de células de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*, expuestos a ácido abscísico (ABA), mediante la caracterización electroforética en cantidad y calidad de las proteínas inducibles de estrés. Se registraron polipéptidos de bajo peso molecular (< 35kDa), comunes bajo la exposición a 10 mM, seguida la asociación con 20 y 30 mM de ABA, quedando aislada la respuesta de la condición de células en cultivo sin la presencia de éste.

Palabras clave: cultivos *in vitro*, electroforesis, proteínas inducibles.

ABSTRACT

Plant cell cultures are homogenous experimental systems, highly controllable that allow the study of short and large water stress adaptations without the interference of the different tissues and development of plants. An approach to understand these adaptations is through the presence of induced proteins; as a result of changes in genetic expression. This work analyze the response of *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora* cell cultures exposed to abscisic acid (ABA), through the electrophoretic characterization of quantity and quality of stress induced proteins. There were recorded low molecular weight polypeptides (< 35kDa), common in experiments under ABA 10mM, followed by the association with 20 and 30mM ABA conditions, with a particularly response of cell cultures without the stress agent.

Keywords: electrophoresis, *in vitro* cell cultures, induced proteins.



INTRODUCCIÓN

La familia Fouquieriaceae DC. se distribuye en las zonas áridas de México y el suroeste de Estados Unidos, está compuesta por pequeños árboles, arbustos leñosos y especies suculentas con reservorios de agua en el xilema esparcidos ampliamente; se distingue por una serie de adaptaciones xeromórficas, dentro de las cuales el desarrollo foliar se ve influenciado por la presencia y cantidad de agua disponible (Henrickson, 1969). Los tallos de *Fouquieria*, permanecen sin hojas la mayor parte del tiempo, pero después de una lluvia abundante, aparecen hojas inmaduras en las yemas axilares las cuales se desarrollan rápidamente, formando una pequeña roseta foliar en cada nodo. Es sabido que *Fouquieria splendens* Engelm. (“ocotillo”), se encuentra bien adaptada no sólo en edad madura, sino también en estado de plántula, para mantenerse bajo condiciones de sequía, aparentemente más extrema y florece en habitats bajo las mismas condiciones (Henrickson, 1972).

Los estudios detallados del patrón de crecimiento celular y la formación de cúmulos o agregados celulares, son de un enorme potencial, ya que permiten analizar a los organismos fisiológica, bioquímica y morfogenéticamente. Los cultivos de células en suspensión se consideran como una simplificación de los mecanismos complejos involucrados en la respuesta de las plantas a cambios ambientales, entre ellos al estrés hídrico y representan un sistema experimental homogéneo altamente controlable, que permite el estudio de adaptaciones a períodos cortos y largos al estrés ambiental a nivel celular, sin la interferencia de los diferentes tejidos y estados de desarrollo vegetal (Rodríguez, 2006). Se ha observado con frecuencia que en condiciones de estrés hídrico, las plantas y los cultivos celulares presentan una activación simultánea en la síntesis de proteínas específicas y una inhibición general del crecimiento celular; así como la represión en la síntesis de algunas proteínas celulares constitutivas; no obstante el resultado final de estos mecanismos puede dirigirse en forma preferencial a la síntesis de las llamadas proteínas de estrés (Singh *et al.*, 1987; Skriver y Mundy, 1990; Vilardell *et al.*, 1990; Jiang y Huang, 2002; Wang *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Al-Khayri *et al.*, 2012) y con ello, el perfil electroforético de proteínas tanto cualitativos como cuantitativos se puede detectar durante el estrés hídrico (Riccardi *et al.*, 1998). El empleo de los cultivos *in vitro* para estudiar las respuestas al estrés se basa en el hecho de que los cultivos de células se comportan de manera similar a las células de las plantas intactas sujetas a tales condiciones (Newton *et al.*, 1989; Attree *et al.*, 1991). Más aún, especies que difieren en la tolerancia a la sequía a nivel de la planta completa también muestran usualmente diferencias en la tolerancia a la sequía en los cultivos celulares (Santos-Díaz y Ochoa-Alejo, 1994). La aplicación exógena de ácido abscísico induce un buen número de proteínas similares a las dehidrinas: familia de proteínas que se acumulan en una amplia variedad de especies vegetales

bajo condiciones de estrés de deshidratación, cuyo intervalo de pesos moleculares va de 9 KDa a 200KDa (Close, 1996; Han *et al.*, 1997; Pelah *et al.*, 1997). Investigaciones sobre el efecto del ácido abscísico y la respuesta al estrés hídrico, empleando cultivos de células en suspensión, analizan la respuesta al estrés hídrico y la adaptación rápida o lenta de las células (Skriver y Mundy, 1990; Leone *et al.*, 1994). Así mismo, se han realizado algunos estudios fisiológicos encaminados al estudio de la respuesta de *F. splendens* ssp. *breviflora* Engelm. *in toto*, para evaluar la producción de elementos traqueales y condición foliar sometida a condiciones también particulares de estrés hídrico, no solamente con ácido abscísico (ABA); sino también con polietilenglicol, los que han servido de marco antecedente y comparativo (Rodríguez *et al.*, 2003; Rodríguez-Dorantes y Muñoz-Sánchez, 2006).

El objetivo de este trabajo fue comparar la respuesta de cultivos *in vitro* de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora* expuestos a ácido abscísico a través del análisis electroforético de proteínas inducidas, que sugieren la modulación de su expresión, bajo este agente de estrés hídrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material biológico y obtención del tejido calloso

El sitio de colecta, se ubica a 3 Km al sur de la localidad de Peña Blanca, Municipio de Peña Miller, en el Estado de Querétaro (21°00'47" N y 99°44'33" W, con una altitud de 1300-1350 m s.n.m.). Se realizó una colecta del material vegetal de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora* en el mes de marzo del 2015, en temporada de sequía. Se realizaron las mediciones *in situ* de humedad relativa atmosférica (28,5 %) y de temperatura (31 °C, y la colecta de los tallos de esta especie, se realizó tomando muestras de diferentes ejemplares, seleccionados carentes de material foliar. Se colectaron 25 varas de 1m de longitud, que se cortaron de la planta madre, transportaron al laboratorio en seco envueltas en papel, y ya en el invernadero se colocaron éstas con aporte de agua directo y bajo condiciones controladas, (temperatura +/-, 28 °C/15 °C y una humedad relativa de 35 %, con fotoperíodo de 12:12), para su hidratación, hasta el desarrollo de los brotes axilares para la obtención de los explantes foliares.

La obtención de tejido calloso a partir de los explantes foliares obtenidos se realizó bajo condiciones de esterilidad, tomando fracciones foliares que se lavaron con agua corriente y jabón, este material se desinfectó con hipoclorito de sodio al 10 % estéril por diez minutos. Se enjuagó el material con agua destilada estéril con tres cambios de cinco minutos cada uno y este material se seccionó en fracciones de 1 cm², depositando de tres a cuatro fracciones foliares por frasco de cultivo con tapas Magenta (Sigma, Chemical Co.) que contenía 30 mL de medio sólido MS (Murashige y

Skoog, 1962) modificado por Franco y García (1995), con ½ de sales con 1 mg /L de ácido naftalen acético (ANA) y 10 mg /L de bencil-amino purina (BAP).

Los cultivos se dejaron bajo condiciones de iluminación con fotoperíodo de 16: 8, a 28 °C por 30 días.

Establecimiento de cultivos de tejido caloso y células en suspensión de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*

Una de las condiciones *in vitro* que se establecieron para evaluar el efecto de un agente condicionante de estrés hídrico, fue el cultivo de tejido caloso en medio sólido, para ello, se tomó 1 mL de inóculo de un cultivo de células en suspensión en fase exponencial, se depositó en frascos de vidrio con tapa de baquelita de 15 mL de capacidad y conteniendo 5 mL de medio sólido MS 25 % de sales y la adición de ácido abscísico (ABA) (SIGMA, Chemical Co.) en las concentraciones de 10 mM, 20 mM y 30 mM y como condición testigo el medio de cultivo sin el agente de estrés; se incubaron a 36 °C, con fotoperíodo de 12:12, mantenidos bajo estas condiciones por 40 días. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

La primera fase del establecimiento de la segunda condición de crecimiento *in vitro*, para el cultivo de células en suspensión de la especie vegetal, consistió en la obtención de un cultivo de células a partir de los callos obtenidos; de estos se tomó 0,5 g de biomasa que se disgregó en fracciones transferidas a matraces Erlenmeyer de 50 mL con 25 mL de medio líquido MS con 25 % de sales con ANA (1 mg/L) y BAP (10 mg/L); se mantuvieron en agitación a 3,8 rpm a 36 °C y oscuridad, por 15 días, realizando subcultivos cada ocho días para el mantenimiento de las líneas celulares. Así mismo, se realizó la determinación de la curva de crecimiento de las células en suspensión empleando matraces nefelométricos, con 15 mL de inóculo celular que contenían 30 mL de medio líquido MS 25 % de sales más fitohormonas; la determinación de la curva de crecimiento se realizó por 27 días, con mediciones cada tercer día evaluando la turbidez de los cultivos en un Fotocolorímetro Klett-Summerson con filtro azul No. 42 y tomando alícuotas de 5 mL del cultivo, para la determinación de peso fresco (g) y la cuantificación de proteína total, a través del método convencional de Lowry *et al.* (1954).

La exposición al agente estresante sobre las células en cultivo de *F. splendens* ssp. *breviflora*, se realizó en matraces Erlenmeyer de 50 mL, que contenían 25 mL de medio MS 25 % de sales con ANA y BAP en las concentraciones antes mencionadas, con la adición de ABA a las concentraciones de 3 mM, 7 mM y 15 mM y como condición testigo el medio de cultivo sin el agente de estrés. Se adicionaron a cada matraz 10 mL de inóculo celular de los cultivos de células en suspensión en fase exponencial; los experimentos se realizaron por cuadruplicado y se mantuvieron durante un mes, bajo condiciones de oscuridad a 36 °C y en agitación continua a 3,8 rpm.

Evaluación del efecto del agente estresante sobre las células de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*

Después del tiempo de exposición ante el ABA en ambas condiciones de cultivo *in vitro*, se obtuvo la biomasa celular de cada experimento y se extrajeron las proteínas totales homogenizando la biomasa en homogenizador de tejidos (Potter), con regulador HEPES-NaCl 30 mM pH 7,5, +

0,1 mL de PVP + 0,1 mL de β-mercaptoetanol. El material homogenizado se centrifugó a 6,400 g a 4 °C por 15 minutos; eliminándose el precipitado celular y se guardó el sobrenadante que contenía las proteínas totales celulares para su cuantificación, por el método convencional de Lowry *et al.* (1954). Se realizaron también observaciones de los cultivos de células con su tinción directa con azul de metileno, empleando un Microscopio Nikon, Labophot-2.

A los resultados obtenidos de cuantificación de proteína total, se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA), empleando el paquete estadístico GraphPad Instat Ver. 3,10.

Análisis electroforético de las proteínas totales extraídas del material celular de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*

Para el análisis electroforético de las proteínas extraídas; se tomó una alícuota de 1 mL de éstas y se precipitaron con la adición de cinco gotas de ácido tricloroacético frío al 20 %, se centrifugó la muestra y el precipitado se resuspendió en regulador de corrimiento electroforético. La electroforesis se realizó en un sistema discontinuo de poliacrilamida-SDS al 4 y 12 % (Hames, 1987). El corrimiento se realizó utilizando regulador Tris-Glicina (Tris 0,6 g y Glicina 2,88 g /L) pH 8,3, a 120 Volts, durante dos horas. Al término, los geles se sumergieron en ácido tricloroacético frío al 10 % por diez minutos para fijar las proteínas al gel y éstas se tiñeron con Azul de Coomassie G-250. Se determinó la movilidad relativa de las proteínas resueltas de cada patrón obtenido, con base en la tasa de migración de los estándares; y los pesos moleculares se estimaron a partir de una curva de calibración con los marcadores de pesos moleculares empleados (SIGMA, Chemical Co.), los cuales fueron: β-galactosidasa (135 kDa), albúmina (85 kDa), ovoalbúmina (47 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), tripsina (22 kDa), β-lactoalbúmina (19 kDa) y aprotinina (6,6 kDa). Se analizaron los perfiles electroforéticos en un densitómetro (Chromatogram Densitometer D50 Heidelberg) leyendo la absorbancia a 595 nm, que corresponde al pico característico de la tinción convencional con azul de Coomassie G-250, para la caracterización de los polipéptidos resueltos con base en el porcentaje de proteína de cada uno.

Análisis de los resultados

Se realizó el análisis numérico comparativo de las dos condiciones de cultivo *in vitro*, empleando los datos obtenidos de los electroferogramas analizados con el densitómetro, y basados en la cuantificación de las bandas;

datos relacionados con la presencia de polipéptidos en los diferentes tratamientos de las dos condiciones; se utilizó el programa NTSyS-PC versión 2,11 T (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), para la aplicación del índice de distancia. Una vez obtenidos los valores de distancia de los coeficientes aplicados en ambos casos, se construyó el fenograma respectivo utilizando el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Averages) para los casos analizados. También se estableció la veracidad y confianza de los fenogramas obtenidos a través de la obtención del coeficiente de correlación producto-momento de Pearson.

RESULTADOS

Respuesta y análisis de los cultivos *in vitro* de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*, expuestos a ácido abscísico

Los cultivos de células de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*, mostraron un conjunto celular muy homogéneo en esta

condición de estrés (Figs. 1a,1b, 1c y 1d), característico de la curva de crecimiento de un cultivo: células alargadas o tubulares, isodiamétricas y gigantes, repartidas en cada fase; primero células tubulares (o elongadas) en la fase inicial, a partir de las cuales se inician los subcultivos celulares; hacia el final de la fase lag, se encuentran células muy grandes isodiamétricas y en la fase temprana de la exponencial, se comienzan a formar agregados celulares (Street,1977; Herrera-García *et al.*, 2008).

La cantidad de proteína celular obtenida fue mayor en la condición de los cultivos de callo sometidos a las concentraciones más altas de ABA: testigo, ABA 10mM, 20 mM y 30 mM con $0,117 \pm 0,005$; $1,73 \pm 0,002$; $0,372 \pm 0,002$ y $0,279 \pm 0,002$, respectivamente; comparados con los resultados de las células en suspensión con concentraciones mayores: testigo, ABA 3, 5 y 7 mM con $0,024 \pm 0,0005$; $0,024 \pm 0,0005$; $0,71 \pm 0,005$ y $0,47 \pm 0,005$, respectivamente; sin diferencias significativas entre las condiciones experimentales ($p < 0,05$).

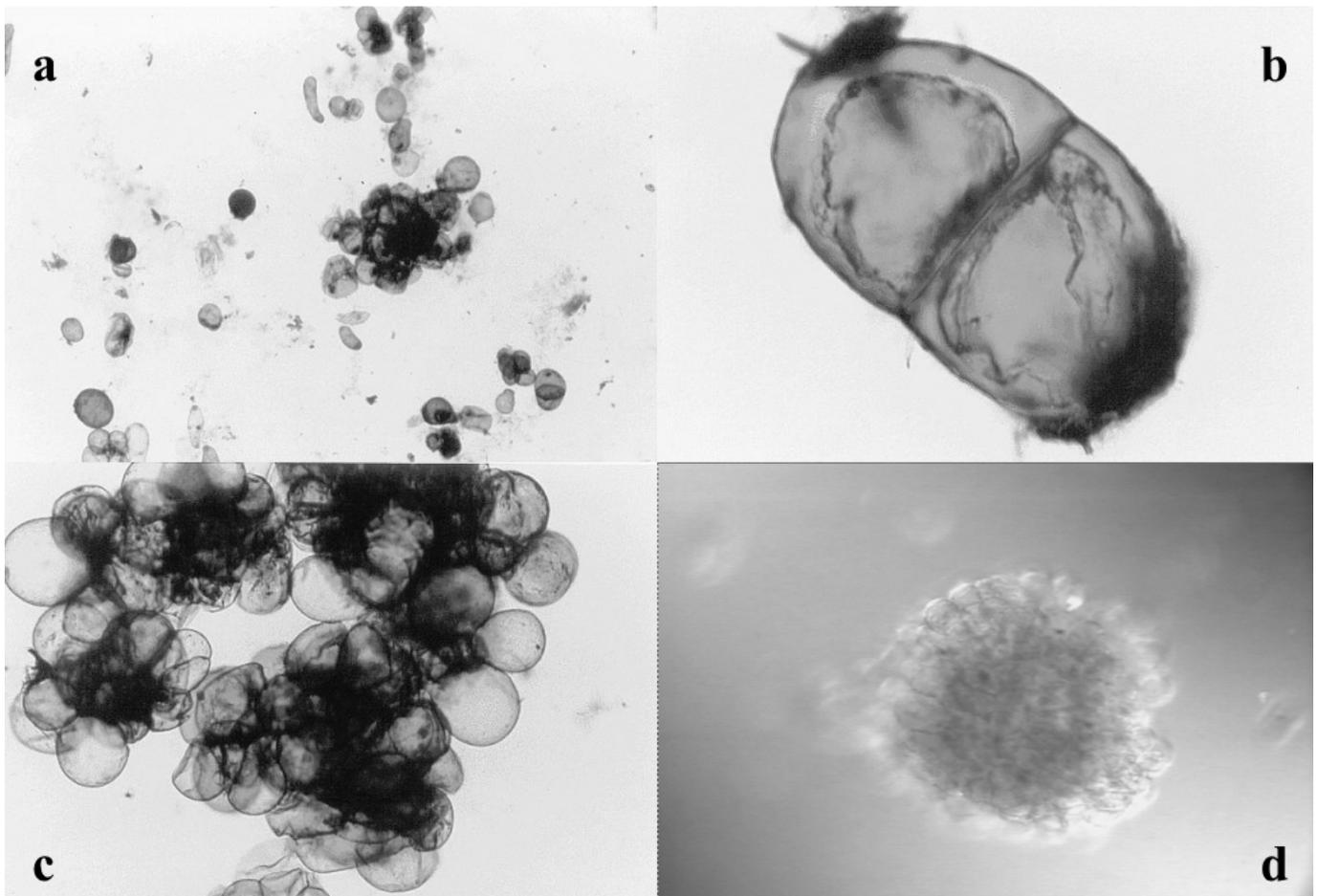


Figura 1. a. Población celular en cultivos en suspensión de *F. splendens* ssp. *breviflora*, (200x), b. Célula en división de un cultivo de células en suspensión (1740x), c. Detalle de células isodiamétricas (428x), d. Formación de agregados celulares homogéneos, con células esféricas (428x).

Respuesta molecular al estrés hídrico en *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*: caracterización electroforética de las proteínas presentes en los cultivos *in vitro* expuestos a ácido abscísico

En la condición de cultivo de tejido calloso de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora* en medio sólido, el número de polipéptidos evidenciados en los electroferogramas analizados con el densitómetro (Fig. 2), fueron: testigo con 28 (polipéptidos principales de 82 y 48 kDa con 34 y 30,6% de proteína, respectivamente), ABA 10 mM con 10 (polipéptidos principales de 58 y 110 kDa, con 25 y 54,16 % de proteína, respectivamente), ABA 20 mM con 20 (con tres polipéptidos menores a 35 kDa, con 50, 79 y 38, 09 % de proteína) y ABA 30mM con 22 (con tres polipéptidos presentes, uno de 80 kDa y dos menores a los 35 kDa cada uno con 25, 27, 10, 98 y 12, 08 % de proteína, respectivamente). En la condición de cultivo de células en suspensión, el número de polipéptidos evidenciados fue el siguiente: testigo con 14 (con tres polipéptidos principales de 40, 90 y un polipéptido menor a 35 kDa, con 20, 68, 20, 68 y 24,13 % de proteína, respectivamente), ABA 3 mM con 15 (con dos polipéptidos de 43 y uno menor a 35 kDa, con 10,15 y 70, 31 % de proteína, respectivamente), ABA 7 mM con 13 (con dos polipéptidos uno de 64 y otro menor a 35 kDa, con 69, 63 y 19, 89 % de proteína) y finalmente ABA 15 mM con 13 (con tres polipéptidos presentes, uno de 64 kDa y dos menores a los 35 kDa, con 16, 22 y 32 % de proteína, respectivamente).

Análisis numérico y comparación de los polipéptidos presentes en las dos condiciones de cultivo *in vitro* de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*

Las dos condiciones de cultivo se analizaron a través de un índice numérico que asociara los polipéptidos presentes

con relación a su concentración (como una medida directa de la expresión de cada uno de ellos), dadas las diferentes condiciones, lo anterior permitió ver las similitudes entre los tratamientos con ABA y su condición de cultivo. Se presentan los resultados de dos agrupaciones, los polipéptidos asociados a los tratamientos con ABA en los cultivos de callo (Fig. 3) y los polipéptidos asociados a los tratamientos con ABA en los cultivos de células en suspensión (Fig. 4).

El fenograma de las condiciones de cultivo de callo, muestra dos grupos bien definidos de manera inicial (Grupo I), donde se tiene un polipéptido abundante solamente en los tratamientos testigo y ABA 20 mM, el segundo grupo (Grupo II) que incluye al resto de los polipéptidos analizados, también está constituido a su vez por dos; uno de ellos único por presentarse este polipéptido solamente en el tratamiento con ABA 20 mM, y un Grupo III que agrupa al resto de los polipéptidos con los grupos III 1a y III 1b, que asocia los polipéptidos comunes de los tratamientos Testigo y ABA 30 mM y de Testigo y 10 mM, respectivamente. Los Grupos III 2a solamente está constituido por los polipéptidos característicos en los tratamientos ABA 10 y 20 mM y el III 2b con los polipéptidos presentes en el tratamiento con ABA 30 mM. Para los cultivos de células en suspensión, se conformó inicialmente en el fenograma, la distribución de los grupos como sigue: Grupo I, con polipéptidos asociados al tratamiento de las células expuestas a ABA 3 mM, con la mayor concentración de proteína, seguido del Grupo II, que concentra al resto de los polipéptidos evidenciados. Este a su vez tiene un solo grupo constituido por los polipéptidos comunes en los tratamientos Testigo y ABA 3 y 15 mM; y un Grupo III que se asocia en el Grupo III 1a con los polipéptidos presentes en los tratamientos de ABA 3 mM y 7 mM. El Grupo III 1b asocia los polipéptidos

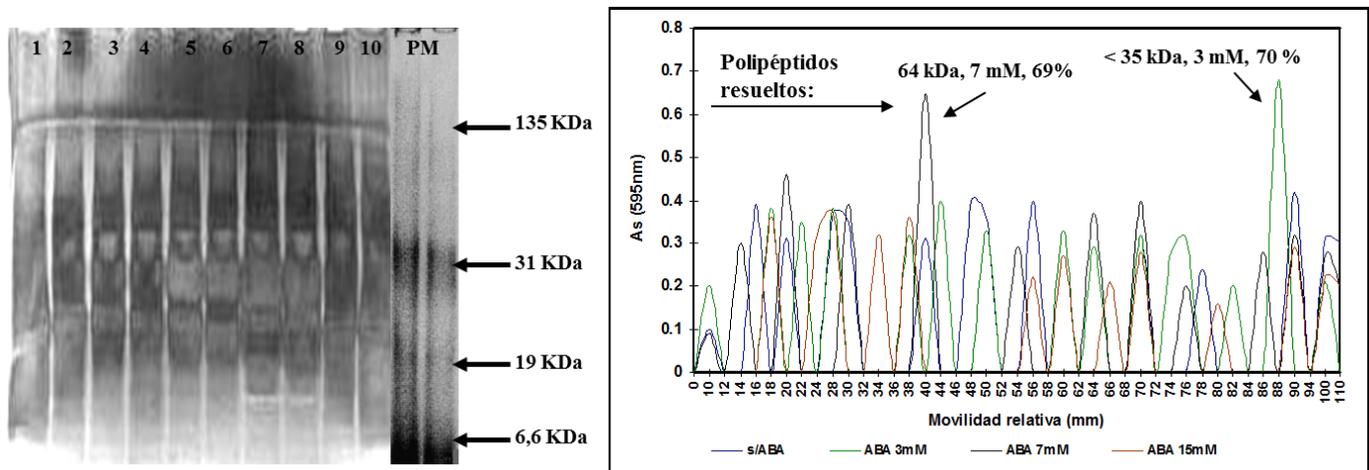


Figura 2. Electroferograma de los polipéptidos presentes en las células en cultivo en suspensión de *F. splendens* ssp. *breviflora* (carriles: 1, 9 y 10: Testigo; 2, 3 y 4: 3 mM; 5, 6 y 7: 7 mM; 8, 9 y 10: 15 mM; PM: pesos moleculares: b-galactosidasa (135 kDa), albúmina (85 kDa), ovoalbúmina (47 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), tripsina (22 kDa), a-lactoalbúmina (19 kDa) y aprotinina (6,6 kDa).

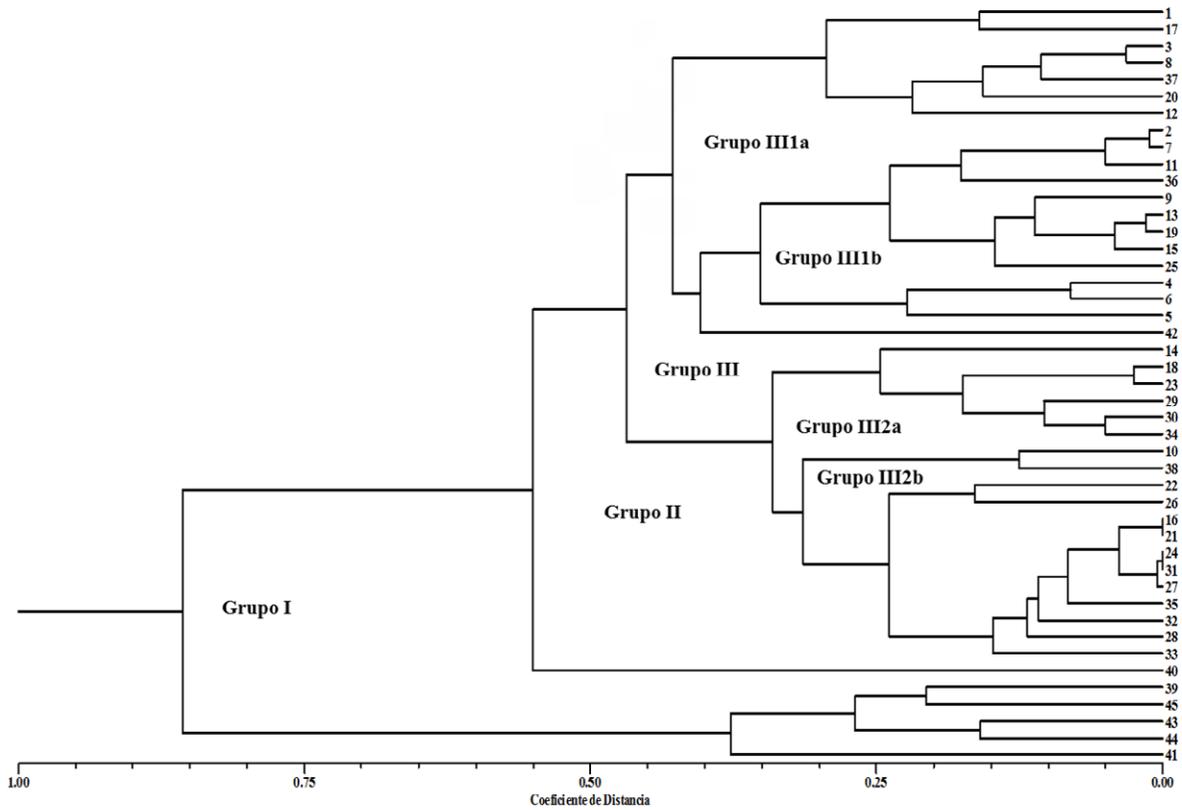


Figura 3. Comparación del agrupamiento de los polipéptidos presentes en los cultivos de tejido caloso de *F. splendens* ssp. *breviflora* bajo los diferentes tratamientos ($r=0.88$).

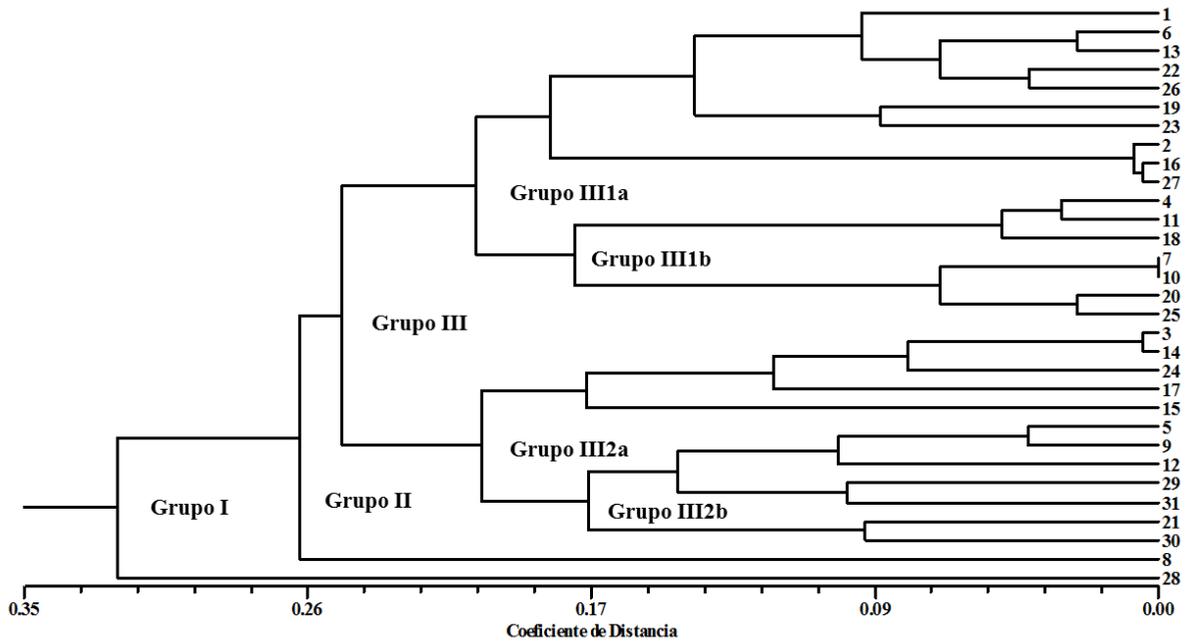


Figura 4. Comparación del agrupamiento de los polipéptidos presentes en los cultivos de células en suspensión de *F. splendens* ssp. *breviflora* bajo los diferentes tratamientos ($r=0.76$).

comunes en el tratamiento de ABA 15 mM y el Grupo III 2 conformado por III 2a con los polipéptidos comunes de los tratamientos Testigo, ABA 3 y 15 mM, y el Grupo III 2b con los tratamientos Testigo, ABA 7 y 15 mM.

DISCUSIÓN

Naturaleza de los cultivos *in vitro* de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*

Gibson (2002), menciona que en los representantes de la familia Fouquieriaceae, durante los períodos de sequía se caen las hojas pequeñas y debajo de ellas se forma una serie de hojas inmaduras de más de 1,5 mm de longitud, conformando un brote cónico sobre el meristemo lateral. Después de una lluvia, las hojas internas reducidas, rápidamente se elongan y forman un fascículo de hojas maduras, dentro de las primeras 48 horas.

Rodríguez y Muñoz (2006) estudiaron la respuesta bioquímica del desarrollo de los brotes foliares de *F. splendens* ssp. *breviflora* y concluyeron que esta especie presenta respuestas fisiológicas adaptativas consideradas evidencia de los primeros mecanismos que se dan como respuesta a las condiciones de estrés hídrico, considerándola una especie poikilohídrica. En este estudio, la obtención de material foliar bajo condiciones de invernadero, fue abundante, lo que se atribuye a una respuesta de disponibilidad de agua, lo que indujo la producción de brotes. Lo que se corrobora con lo reportado por Lloyd (1905), quién menciona que los tallos de ocotillo se cubren de hojas rápidamente sin el beneficio del transporte de agua desde las raíces. Los estudios de segmentos de tallos reportados por Killingbeck (1990) indicaron de forma clara que este género *Fouquieria* no requiere de nutrientes o fitohormonas y la disponibilidad de agua en los tallos, limita la producción foliar. El manejo de plantas leñosas en cultivo de tejidos vegetales, resulta difícil dado el crecimiento secundario que presentan. En esta especie, el tejido parenquimatoso foliar, con el aporte adecuado de hormonas vegetales: BAP y ANA, desarrolló el crecimiento de tejido calloso, de acuerdo también con lo reportado por Franco (1997).

La respuesta morfológica de las células crecidas en medio sólido para los experimentos testigo, así como en los experimentos con tratamientos de ABA, generaron la formación de tejido calloso después del tiempo de exposición. Este tejido calloso, solo bajo las condiciones de adición de ABA determinó un proceso de diferenciación con la formación de brotes; muy similar a las condiciones que se tenían en otras experiencias para la obtención de embriones somáticos (Angoshtari *et al.*, 2009).

En este caso, se puede considerar que las condiciones impuestas por el ABA, fueron las inductoras para que se desencadenaran los procesos de diferenciación del brote, y con ello, asociar que el aporte de agua y/o la presencia de las fitohormonas desempeñan un papel importante en el desarrollo *in vitro* de las plantas de esta especie, como parte

de la respuesta a las condiciones de estrés hídrico en las que se encuentra en forma natural esta especie vegetal.

Respuesta molecular al estrés hídrico en *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*: inducción de proteínas en condiciones de cultivo *in vitro*

Las condiciones de estrés de cualquier índole, pueden provocar cambios en el metabolismo y respuesta de las plantas. El estrés hídrico, entre otras condiciones, es uno de los eventos que promueven la inducción de proteínas que se sugiere, participan en el desarrollo de mecanismos adaptativos a la baja provisión de agua (Rodríguez *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006). No se conoce nada acerca de la respuesta molecular de *Fouquieria* a las condiciones de baja provisión de agua, tanto *in toto* como *in vitro*.

En este estudio, en los sistemas de cultivos de células en medio sólido y líquido tratado con ABA, se reportan polipéptidos comunes entre los tratamientos; dentro de ellos se tienen los de: 68, 72 y 90 kDa, que pueden considerarse como constitutivos y no inducibles; según Bray (1990) clasificados dentro de la categoría de los no alterados por déficit de agua, con pesos moleculares relativamente mayores (entre 60 y 200 kDa).

Comparando los resultados obtenidos en los cultivos de células con los reportados por Rodríguez-Dorantes y Muñoz-Sánchez (2006) en los brotes foliares de esta especie, se tienen los siguientes polipéptidos de 41, 43, 48, 54, 64, 82, 100 y 120 kDa; resaltando como particular el de 120 kDa que se presentó en el cultivo de células en medio sólido con ABA 20 mM así como también en los tratamientos de brotes foliares con ABA 0,1 mM y polietilenglicol (PEG 8000) al 3 % , y el de 135 kDa, presente en los cultivos de células en medio sólido con ABA 30 mM y reportado también en el tratamiento de los brotes de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora* tratados con ABA 0,1 mM.

La aplicación de la técnica electroforética, revela la presencia de heterogeneidad en los perfiles de las bandas de proteínas; ya que los patrones electroforéticos difieren con respecto al número, movilidad e intensidad de las bandas, con lo que esta técnica se ha empleado para caracterizar la respuesta de las plantas bajo diversas condiciones (Leone *et al.*, 1994; Sarker *et al.*, 1996; Abas y Latif, 2005; Beltagi, 2005; Ehsanpour y Razavizadeh, 2005).

Se tiene como evidencia que se presentan cambios en la expresión de genes como respuesta al estrés de desecación y que se sintetizan polipéptidos únicos durante este tipo de estrés (Bray, 1988; Mundy y Chua, 1988). Los cambios en la expresión de genes durante el estrés de sequía, pueden generar cambios significativos en procesos metabólicos de la planta, que promueven la sobrevivencia al estrés hídrico o puede representar un daño como respuesta al estrés. La tasa de polipéptidos acumulados inducidos por la desecación y la pérdida de éstos durante la recuperación de las plantas, pueden ser indicadores importantes de la función de

proteínas; conjuntamente con esto, la abundancia de estos polipéptidos puede proveer también de información importante sobre su función. Uno de los papeles que posee el ABA es la modulación de productos génicos específicos (Guerrero y Mullet, 1986; Bray *et al.*, 1997) y en suma la coordinación de la respuesta al estrés (Hanson y Hitz, 1982).

Las proteínas separadas electroforéticamente de los cultivos en suspensión de *F. splendens* ssp. *breviflora* tratados con ABA, comparados con testigos, revelaron lo siguiente: una disminución cuantitativa de ciertas proteínas, un incremento en los niveles de otras proteínas, algunas proteínas permanecieron sin cambios y la inducción *de novo* de proteínas específicas. Los tratamientos con ABA para esta especie fueron particulares en el caso de polipéptidos de 82 kDa y 48 kDa para 15 mM, lo mismo que para 3 mM con los de 68 kDa, 43 kDa y tres de menos de 35 kDa.

Estos resultados comparados con los obtenidos en el estudio realizado por Jiang y Huang (2002) con cultivos de *Festuca arundinacea* L. (Southeast 6 Rebel Jr.), donde se reporta que se acumularon varios polipéptidos de 20, 29 y 35 kDa y que la intensidad de sus bandas se incrementó durante el estrés de sequía en ambos cultivares de manera específica; el polipéptido de 35 kDa se acumuló solamente en las plantas sometidas al estrés de sequía con o sin la adición de ABA en los tratamientos de ambos cultivares. Así mismo, estudios con *Sesbania sesban* var. *bicolor*, reportan que se presentó un polipéptido de 66 kDa que se indujo bajo condiciones de estrés de desecación y con la aplicación exógena de ABA 1 mM (Purty *et al.*, 2005).

Se ha reportado que los mecanismos por los cuales el estrés hídrico y la adición exógena de ABA afectan la tolerancia a la desecación son numerosos y complejos; estos pueden incluir la inducción de algunos polipéptidos y proteínas similares a las dehidrinas (Han *et al.*, 1997), y que se asume que juegan un papel importante en la tolerancia al estrés hídrico. Jiang y Huang (2002) encontraron la acumulación de un polipéptido de 35kDa que se presentó bajo condiciones de desecación y otros dos polipéptidos de 20 y 29 kDa que se presentaron con mayor concentración en las plantas con estrés a la desecación para ambos cultivares. Estos autores mencionan que el estrés de desecación induce cambios en la síntesis de proteínas de *F. arundinacea* L., de tal forma que los efectos de promoción del ABA sobre el potenciamiento de las actividades fisiológicas bajo estrés de sequía paralelamente fallaron en la inducción de la síntesis de proteínas en esta especie.

Sin embargo, el incremento en la tolerancia a la desecación, resultado de la aplicación de ABA puede no estar relacionado de manera directa con la acumulación de un alto contenido o tipo específico de dehidrinas; finalmente la respuesta entre los dos cultivares no difirió en su respuesta al ABA. En este estudio, no obstante que no se caracterizó de manera particular la masa relativa de los polipéptidos encontrados de < de 35 kDa; se obtuvo

la presencia de polipéptidos inducidos bajo condiciones de estrés con ABA de manera independiente. De estos, de manera particular como respuesta, el polipéptido de 68 kDa se presentó en el tratamiento con ABA 3mM, lo mismo que dos polipéptidos de menos de 35 kDa, uno en ABA 3mM y el otro en ABA 7mM.

La demostración de la ambigüedad en los cambios observados en la expresión de proteínas, podría contribuir a la sobrevivencia de las plantas; donde solo algunas de estas proteínas están involucradas en la tolerancia al estrés y es posible que en algunos casos la síntesis de proteínas indique la sensibilidad a un agente estresante más que estar formando parte de un mecanismo de tolerancia. Se presentaron algunos polipéptidos cuyo porcentaje de proteína fue mayor; tal es el caso de los polipéptidos de 64 kDa, ABA 7 mM, con 69, 6 % y uno de < de 35 kDa , ABA 3 mM, con 70, 3%. Si se compara esta respuesta con los estudios realizados con cultivos de células en suspensión de algunos autores (Leone *et al.*, 1994), los polipéptidos inducidos por la presencia de ABA, fueron 16.

En este trabajo, se registró la presencia de polipéptidos inducidos bajo condiciones de estrés, de manera independiente. Lo que sugiere la presencia de proteínas cuya expresión fue análoga a la obtenida en los experimentos con células de *Solanum tuberosum*. En este estudio, los resultados obtenidos reflejaron que los polipéptidos presentes en ambas condiciones de cultivo fueron en su mayoría menores a 35 kDa (casi el 50 % del total de ambas condiciones y sus tratamientos); lo que se sugiere que éstos pueden ser considerados polipéptidos inducidos por la presencia de ABA, como los reportados por Leone *et al.* (1994), Singh *et al.* (1987) y Kuwabara *et al.* (1999), en cultivos celulares de *Solanum tuberosum* y *Nicotiana tabacum*, donde las proteínas obtenidas de 18 a 24 kDa se reportan inducidas bajo condiciones de estrés hídrico, algunas de estas relacionadas con la deshidratación (Close, 1996; Close, 1997).

De acuerdo con la organización de los polipéptidos presentes en las condiciones experimentales analizadas y representados en el análisis numérico; se tiene que los polipéptidos comunes que se presentaron en los cultivos de tejido calloso en sus cuatro tratamientos, se asociaron directamente con la condición de células en suspensión expuestas a ABA 10 mM, seguida la asociación con ABA 20 y 30 mM, quedando aislada la respuesta de la condición de células en suspensión sin la presencia de ABA (Testigo).

CONCLUSIONES

Las condiciones de estrés de cualquier índole, provocan cambios en el metabolismo y respuesta de las plantas; el estrés hídrico, entre otras condiciones, es uno de los eventos que promueven la inducción de proteínas, las cuáles se sugiere, participan en el desarrollo de mecanismos adaptativos a la baja disponibilidad de agua. El desarrollo foliar de esta especie, es un proceso que puede analizarse

muy fácilmente, sin necesidad de tener a la planta con su sistema radical, ya que se favorece el transporte de agua y sales a través del tallo, dando el aporte suficiente para desencadenar una respuesta de diferenciación en la zona de las yemas axilares. No se conoce nada acerca de la respuesta molecular del género *Fouquieria* bajo condiciones de estrés en cultivos *in vitro*. En este estudio, el manejo de cultivos celulares, evidenció la presencia de polipéptidos inducidos bajo déficit hídrico; esta respuesta manifestó la posibilidad del manejo de sistemas *in vitro*, como referencia de una simplificación de los mecanismos complejos que deben estar involucrados en la respuesta de las plantas a la sequía; ya que son sistemas controlables y homogéneos que permiten el análisis bajo condiciones ambientales a nivel celular; dentro de estos cambios se observó la expresión diferencial de algunos polipéptidos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero otorgado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional al Proyecto de Investigación SIP-IPN: 20151927, para la realización de este trabajo y también a la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas (COFAA, I.P.N.), EDI (Estímulo al Desempeño de los Investigadores, I.P.N.) y al Sistema Nacional de Investigadores (SNI-CONACYT).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCIAS

- Abass SM, Latif HH. Germination and protein patterns of some genotypes of two species of Jute as affected by NaCl stress. *Pak J Biol Sci.* 2005;8:227-234. Doi:10.3923/pjbs.2005.227.234
- Al-Khayri JM, Al-Bahrany AM. Effect of abscisic acid and polyethylene glycol on the synchronization of somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Biotechnology.* 2012; 11: 318-325. Doi: 10.3923/biotech.2012.318.325
- Angoshtari R, Tavakkol-Afshari R, Kalantari S, Omidi M. Effects of abscisic acid on somatic embryogenesis and induction of desiccation tolerance in *Brassica napus*. *Asian J Plant Sci.* 2009;8:276-284. Doi:10.3923/ajps.2009.276.284
- Attree SH, Moore D, Sawhney VK, Fowke LC. Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos: effects of a non-plasmolysing water stress and abscisic acid. *Ann Bot.* 1991;68:519-552. Doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a088291
- Beltagi MS. Phytotoxicity of lead (Pb) to SDS-PAGE protein profile in root nodules of *Faba* bean (*Vicia faba* L.) plants. *Pak J Biol Sci.* 2005;8:687-690. Doi:10.3923/pjbs.2005.687.690
- Bray EA. Drought- and ABA-induced changes in polypeptide and mRNA accumulation in tomato leaves. *Plant Physiol.* 1988;88:1210-1214. Doi:10.1104/pp.88.4.1210
- Bray EA. Drought-stress-induced polypeptide accumulation in tomato leaves. *Plant Cell Environ.* 1990;13:531-538. Doi:10.1111/j.1365-3040.1990.tb01069.x
- Bray EA, Cohen A, Plant AL, Moses MS, Imai R, Griffiths A. Regulation of gene expression by endogenous ABA in tomato plants. *Acta Physiol Plant.* 1997;19:405-418. Doi:10.1007/s11738-997-0037-2
- Close TJ. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant.* 1996;97:795-803. Doi:10.1111/j.1399-3054.1996.tb00546.x
- Close TJ. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant.* 1997;100:291-296. Doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb04785.x
- Ehsanpour AA, Razavizadeh R. Effect of UV-C on drought tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) callus. *Am J Biochem Biotech.* 2005;1:107-110. Doi:10.3844/ajbb.2005.107.110
- Franco RJ, García CMT. Ensayo demostrativo sobre la propagación de violeta africana *Saintpaulia ionantha* Wendl. por cultivo de tejidos. *Ann Esc Nac Sci Biol.* 1995;40:107-115.
- Franco RJ. Informe Técnico Final del Proyecto de Investigación: "Cultivo *in vitro* de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*", 1997; DEPI 963712. I.P.N., México, D.F.
- Gibson CA. Ocotillo and the bojum tree. *Mildred Mathias Botanical Garden (MEMBG).* 2002;3:491-500.
- Guerrero F, Mullet JE. Increased ABA biosynthesis during plant dehydration requires transcription. *Plant Physiol.* 1986;80:588-591. Doi:10.1104/pp.80.2.588
- Hames DB. Peptide mapping by mild proteolysis using SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: Hames BD and Rickwood D, eds. *Gel electrophoresis of proteins (a practical approach)* 6° reprinting. IRL Press, Oxford, Washington. 1987.
- Han B, Hughes DW, Galau GA, Bewley JD, Kermod AR. Changes in late-embryogenesis-abundant (LEA) messenger RNAs and dehydrins during maturation and premature drying of *Ricinus communis* L. seeds. *Planta.* 1997;201:27-35. Doi:10.1007/BF01258677
- Hanson AD, Hitz WD. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann Rev Plant Physiol.* 1982;33:163-203. Doi:10.1146/annurev.pp.33.060182.001115
- Henrickson J. Anatomy of periderm and cortex of *Fouquieriaceae*. *Aliso.* 1969; 7:97-126.
- Henrickson J. A taxonomic revision of the *Fouquieriaceae*. *Aliso.* 1972;7:439-537.

- Herrera García M, Rodríguez Dorantes AM, Guerrero Zúñiga LA. Evaluación del crecimiento, actividad de hemoperoxidasas y remoción de fenantreno de los cultivos celulares de *Fouquieria splendens* y *Fouquieria fasciculata*. Polibotánica. 2008; 25: 101-119.
- Jiang Y, Huang B. Protein alterations in tall fescue in response to drought stress and abscisic acid. Crop Sci. 2002;42:202-207. Doi:10.2135/cropsci2002.0202
- Killingbeck KT. Leaf production can be decoupled from root activity in the desert shrub ocotillo (*Fouquieria splendens* Engelm.). Am Midl Nat. 1990; 124: 124-129. Doi: 10.2307/2426085
- Kuwabara Ch, Arakawa K, Yoshida Sh. Abscisic acid-induced secretory proteins in suspension-cultured cells of winter wheat. Plant Cell Physiol. 1999;40:184-191. Doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029526
- Lee SC, Lee MY, Kim SJ, Jun SH, An G, Kim SR. Characterization of an abiotic stress-inducible dehydrin gene, OsDhn1, in rice (*Oryza sativa* L.). Mol. Cells. 2005; 19: 212-218.
- Leone A, Costa A, Tucci M, Grillo S. Comparative analysis of short- and long term changes in gene expression causes by low water potential in potato (*Solanum tuberosum*) cell-suspension cultures. Plant Physiol. 1994;106:703-712. Doi:10.1104/pp.106.2.703
- Lloyd FE. The artificial induction of leaf formation in the ocotillo. Plant World. 1905; 8:56-59.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol phenol reagent. J Biol Chem. 1954;193:265-275.
- Mundy J, Chua NH. Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. EMBO J. 1988; 7: 2279-2286.
- Murashige T, Skoog A. A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Physiol Plantarum. 1962;15:473-497. Doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Newton RJ, Sen S, Puryear JD. Solute contribution to osmotic potential loblolly pine (*Pinus taeda* L.) callus. J Plant Physiol. 1989;134:746-750. Doi:10.1016/S0176-1617(89)80038-0
- Pelah D, Wang W, Altman A, Shoseyov O, Bartels D. Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. Physiol Plantarum. 1997;99:153-159. Doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb03443.x
- Putry RS, Agrawal V, Gupta SC. Induction of a novel boiling stable protein in response to desiccation and ABA treatments in *Sesbania sesban* var. bicolor leaves. Biol Plantarum. 2005;49:137-140. Doi:10.1007/s00000-005-7140-1
- Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D, Zivy M. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Plant Physiol. 1998;117:1253-1263. Doi:10.1104/pp.117.4.1253
- Rodríguez DA. Análisis molecular y fisiológico de la respuesta al estrés hídrico de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora*. Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N., México, D.F. 2006.
- Rodríguez-Dorantes A, Muñoz-Sánchez JL. Biochemical changes and development of leaf tracheary elements of a desert plant *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora* exposed to water stress. Physiol Plantarum. 2006;127:650-657. Doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00694.x
- Rodríguez-Dorantes AM, García-Castañeda MT, Muñoz-Sánchez JL. Análisis bioquímico y fisiológico de *Fouquieria splendens* ssp. *breviflora* bajo la acción de agentes de estrés hídrico. Polibotánica. 2003;16:49-62.
- Santos-Díaz MS, Ochoa-Alejo N. PEG-tolerant cell clones of chillipepper: growth, osmotic potentials and solute accumulation. Plant Biol Plantarum. 1994;48:105-108.
- Sarker RH, Haque AKMK, Hoque MI. Study of isozyme markers in characterizing Jute germplasm. Bangladesh J Bot. 1996;25:139-145.
- Singh NK, La Rosa PC, Handa AK, Hasegawa PM, Bressan RA. Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1987;84:739-743. Doi:10.1073/pnas.84.3.739
- Skriver K, Mundy J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. Plant Cell. 1990;2:503-512. Doi:10.1105/tpc.2.6.503
- Street HE. Cell suspension cultures techniques. In: H.E. Street (ed.) Plant tissue and cell culture. 2° edition. Botanical Monographs. Chapter 4, Vol. 11. Blackwell Scientific. 1977. 614 p.
- Vilardell J, Goday A, Freire MA, Torrent M, Martínez MC, Torné JM, Pagés M. Gene sequence, developmental expression, and protein phosphorylation of RAB-17 in maize. Plant Mol Biol. 1990;14:423-432. Doi:10.1007/BF00028778
- Wang Z, Huang B, Xu Q. Effects of abscisic acid on drought responses of Kentucky bluegrass. J Amer Soc Hort Sci. 2003;128:36-41.