

# EL ESTRÉS EN LAS PLANTAS

Noelia Hernández Ortiz

## INTRODUCCIÓN

Estrés: Presencia de un factor externo a la planta provocado por el medio ambiente cambiante, que ejerce una influencia negativa sobre su desarrollo óptimo.

Es un concepto relativo ya que una determinada situación medioambiental puede resultar estresante para una especie y no para otras. La inmovilidad ha podido influir en que las plantas hayan adquirido y perfeccionado a lo largo de la evolución mecanismos de autodefensa. Hay que tener en cuenta que los diferentes tipos de estrés no se dan de forma aislada.

A lo largo de su ciclo vital, están expuestas a un gran número de condiciones o factores estresantes que pueden dividirse en:

- Factores bióticos: Por la acción de seres vivos.
  - o Grandes y pequeños animales
  - o Otras plantas
  - o Insectos
  - o Bacterias, hongos y virus
  - o Nematodos
- Factores abióticos: Físicos y químicos.
  - o Sequía (estrés hídrico)
  - o Exceso de sales en el suelo (estrés salino)
  - o Calor, frío y congelación (estrés por temperaturas extremas)
  - o Luz
  - o Encharcamiento e inundación (estrés por anaerobiosis)
  - o Estrés por contaminantes medioambientales (CFC, ozono, herbicidas, metales...)
  - o Deficiencia en elementos minerales (estrés nutricional)
  - o Viento, suelo compacto... (estrés mecánico)
  - o Lesiones o heridas

En este caso nos vamos a centrar sobre todo en el estrés producido por deshidratación o déficit hídrico. Para hacer frente a esta situación, las plantas han desarrollado mecanismos como:

1. Enrollamiento foliar
2. Acumulación de osmóticos
  - o Alto peso molecular: Fructanos y RFOs (oligosacáridos de la familia de la rafinosa)
  - o Bajo peso molecular: Prolina, sacarosa y poliaminas.
3. Deshidrinas

## 1. ENROLLAMIENTO FOLIAR EN SITUACIONES DE ESTRÉS

Reduce la transpiración, la deshidratación y el área expuesta a la luz en las hojas de diferentes especies como el arroz, el maíz o el trigo y no solo viene dado como respuesta al déficit hídrico si no también como respuesta a:

- Altas y bajas temperaturas: En el arroz, el enrollamiento es directamente proporcional con el potencial osmótico de la hoja y su temperatura. En el género *Rhododendron* ocurre a bajas temperaturas, por encima del punto de congelación del tejido.
- Irradiación: En *Triticum aestivum*, las hojas aparecen enrolladas de 11 de la mañana a 2 de la tarde en días soleados. También ocurre cuando plantas adaptadas a vivir en zonas sombrías son expuestas al sol.
- Insectos: Bien para protegerse de su ataque o bien para que ellos se protejan.
- Virus, hongos y bacterias: Acompañado de otros síntomas debidos a la infección, como por ejemplo cambio de color en las hojas.
- Otros factores descubiertos recientemente:
  - Herbicidas
  - Metales pesados como el cadmio o el cobre
  - Ozono
  - Niveles bajos de ciertos minerales como el cobre y sulfuros

### Cambios asociados al enrollamiento foliar

Para entender cómo las plantas reaccionan a situaciones de estrés ambiental, se utilizan moléculas señal, una de las cuales es el ácido salicílico. Aplicado en las concentraciones adecuadas, causa de forma temporal un ligero estrés oxidativo (dispara la oxidasa alternativa) que aumentará la capacidad antioxidante de las plantas y ayudará a inducir la síntesis de compuestos protectores.

No hay datos suficientes acerca de la relación entre el ácido salicílico y el enrollamiento foliar durante el estrés hídrico pero si se ha detectado:

- Una relación positiva entre el contenido de ácido salicílico endógeno y el enrollamiento foliar en *Ctenanthe setosa*.
- La aplicación exógena de ácido salicílico retrasa el enrollamiento foliar por la inducción de sistemas antioxidantes y cambios bioquímicos durante el estrés hídrico.

### **Cambios en iones y ácidos orgánicos**

No existen suficientes estudios basados en cambios en las concentraciones iónicas durante el enrollamiento foliar pero se sabe que tienen un papel importante en el ajuste del potencial osmótico en plantas. Se sabe que:

- Existe una acumulación en el citoplasma de iones sodio (que contribuye a las relaciones hídricas de las plantas) y calcio (que tiene un papel vital tanto nutricional como fisiológico en el metabolismo de las plantas).
- Se produce una disminución de potasio y cloruro en el citoplasma.

Las concentraciones de malato y citrato aumentan durante el enrollamiento foliar. La acumulación de malato y citrato en la vacuola contribuye al ajuste osmótico en el citoplasma.

### **Fotosíntesis**

Se ve directamente afectada por la deshidratación. El enrollamiento foliar durante situaciones de estrés hídrico disminuye la superficie de la hoja expuesta a la energía solar y, junto con el cierre de los estomas, disminuye la transpiración. Esto provocará una disminución de la entrada de CO<sub>2</sub> en las células (descenso de CO<sub>2</sub> intercelular) y una baja eficiencia en el uso de la luz, induciéndose un mecanismo de inactivación del sistema fotosintético. Por tanto el enrollamiento foliar será inversamente proporcional al contenido en clorofilas. Cuando la luz es intensa, además se produce una acumulación de carotenoides como respuesta adaptativa.

### **Regulación génica**

Recientemente se han identificado genes responsables del enrollamiento foliar:

- En el arroz, el gen OsAGO7 codifica para una proteína perteneciente a la familia AGO, cuando este gen se sobreexpresa provoca que las hojas se curven hacia arriba.
- En maíz, el gen RLD1 (rolled leaf 1) codifica para una proteína de la familia HD-ZIPIII que controla el enrollamiento de la hoja.

### **Las células como causantes del enrollamiento foliar**

Células buliformes: Se encuentran en la epidermis de la región adaxial de la hoja. Actúan como motor del enrollamiento de hojas en especies como el arroz, maíz y trigo. Cuando las células están turgentes, las hojas mantienen una posición plana, en el caso contrario provocan el enrollamiento foliar. Mutaciones que presentaban células buliformes pequeñas presentaron un mayor enrollamiento foliar.

Células de la hipodermis: En algunas especies como *C. setosa*, realizan la misma función que las células buliformes.

Células del esclerénquima: En el arroz, mutantes que presentaban células esclerenquimáticas defectuosas presentaron un enrollamiento foliar intenso. En el maíz, dependiendo de cómo esté el esclerénquima distribuido, el enrollamiento foliar será diferente. Las esclereidas son células de paredes fuertemente lignificadas que se entremeten entre las células parenquimatosas y en los bordes foliares para aumentar la resistencia mecánica del tejido. Por tanto, es lógico que a menor número de esclereidas corresponda mayor flexibilidad (mayor enrollamiento)

### **Alteraciones en el sistema antioxidante**

El funcionamiento de la maquinaria metabólica aeróbica genera y consume, de forma continua y controlada, una amplia variedad de especies de oxígeno reactivas (ROS). Sin embargo, bajo una alta intensidad de luz asociada a un déficit hídrico, se produce un exceso de excitación de los fotosistemas, así como una restricción de la difusión del CO<sub>2</sub> atmosférico al interior de la hoja. Ello reduce la proporción CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> en el interior del cloroplasto, lo que favorece la fotorreducción de O<sub>2</sub> por el fotosistema I. Como consecuencia, se forman ROS que producen daños oxidativos en la célula. Algunas ROS:

- Anión superóxido
- Peróxido de hidrógeno
- Radicales hidroxilo
- Oxígeno en estado de singlete

Reaccionan muy fácilmente con las macromoléculas biológicas más importantes desencadenando procesos destructivos oxidativos que son capaces de bloquear el metabolismo celular. Por ello se generan:

- Antioxidantes enzimáticos: Catalasa, peroxidasas, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa...
- Antioxidantes no enzimáticos: Glutathion y ascorbato

Se han detectado cambios a nivel de estas enzimas durante el enrollamiento foliar incrementándose la actividad de algunas de ellas.

### Conclusiones

Entender el mecanismo fisiológico y molecular de este fenómeno podría ser un área de investigación interesante en el futuro. El aislamiento e identificación de genes que controlan el enrollamiento foliar podría ser beneficioso para crear cultivos con las características deseadas, incluida la tolerancia al estrés. Sustituiría a la aplicación exógena de solutos compatibles, reguladores del crecimiento, compuestos antioxidantes y sales inorgánicas.

**Beatriz Linillos Pradillo**

## RELACIÓN ENTRE EL ENROLLAMIENTO DE LAS HOJAS Y LAS ENZIMAS DEL CICLO ASCORBATO-GLUTATIÓN SUJETOS AL ESTRÉS POR SEQUÍA

### Introducción: ROS, estrés oxidativo y mecanismos de defensa

La producción y consumo de oxígeno son funciones esenciales para la vida de las plantas. Sin embargo, en ellas el metabolismo del oxígeno da lugar también a la formación de sustancias altamente tóxicas. Todas las situaciones de estrés que afecten al balance hídrico de las plantas, como la sequía, van a inducir un cierre de estomas para limitar la pérdida de agua por transpiración. El cierre de estomas rápidamente va a provocar una reducción en la asimilación del CO<sub>2</sub> por parte del cloroplasto. Esto ralentiza las reacciones del ciclo de Calvin, lo que conlleva a un menor consumo de NADPH y ATP. Esta respuesta se traduce en una falta de regeneración de aceptores de electrones (NADP<sup>+</sup>, NAD<sup>+</sup>, FAD), facilitando la cesión de electrones de la cadena de transporte electrónico al oxígeno, dando lugar a una mayor generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en el cloroplasto, como radicales superóxido y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por tanto, como consecuencia del estrés por sequía que sufre la planta se incrementa la producción de ROS y pueden provocar daños oxidativos tanto en orgánulos como en el citoplasma.

Para evitar que estas produzcan daños, las plantas han desarrollado en el curso de la evolución una serie de mecanismos de defensa. Cuando estos mecanismos son desbordados se produce una situación conocida como estrés oxidativo que puede

producir graves daños llevando incluso a la muerte de la planta. Sin embargo, también hay que considerar que niveles adecuados de ROS son importantes porque pueden funcionar como moléculas bio-señalizadoras.

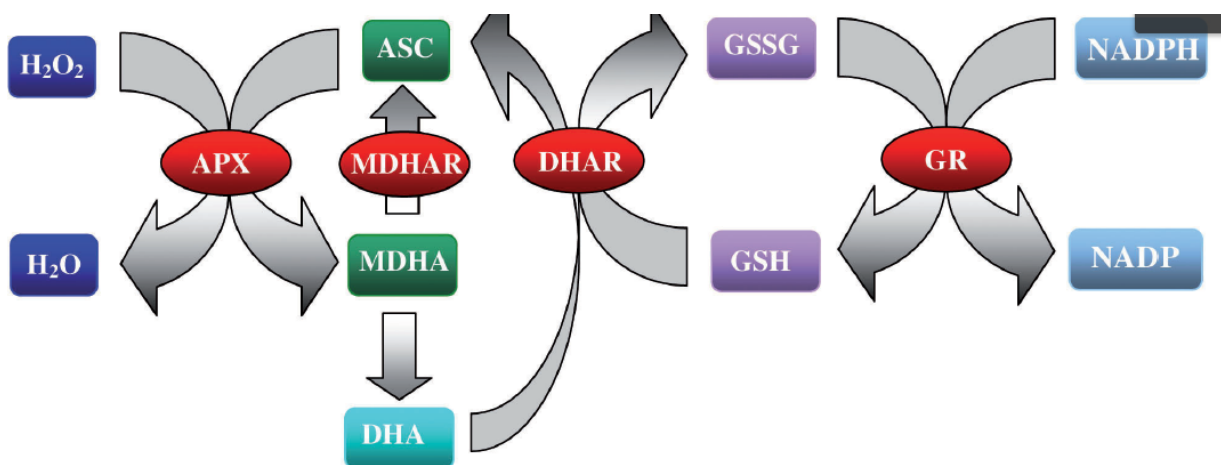
El estrés oxidativo es el estado en el cual se encuentra alterada la óxido-reducción intracelular, es decir el balance entre oxidantes y reductores de una planta. Este desequilibrio se debe a una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes de la planta, conduciendo a daño celular.

En estas condiciones la planta pone en marcha una serie de mecanismos o defensas enzimáticas (como la catalasa, superóxido dismutasa o peroxidasas) y no enzimáticas para protegerse contra estos daños oxidativos y llevar a cabo la destoxificación de las especies reactivas del oxígeno.

Centrándonos en los antioxidantes no enzimáticos juegan un papel muy importante todas las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión cuya función es la de eliminar  $H_2O_2$  y regenerar los antioxidantes no enzimáticos más importantes, que son el ascorbato y glutatión.

#### Ciclo ascorbato-glutatión

El ciclo ascorbato-glutatión está constituido por cuatro enzimas, siendo la más abundante la ascorbato peroxidasa (APX), que requiere ascorbato para reducir el  $H_2O_2$  a  $H_2O$ . El monodeshidroascorbato (MDHA) puede ser reducido a ascorbato de nuevo por la monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), que requiere NADH, o bien puede convertirse a ascorbato y deshidroascorbato (DHA). A continuación, la deshidroascorbato reductasa (DHAR) regenera el ascorbato a partir de deshidroascorbato (DHA) utilizando el glutatión reducido (GSH) como reductor. El ciclo se completa con la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) mediante la actividad de la glutatión reductasa (GR) que necesita NADPH producido por la glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH).



#### Antioxidantes no enzimáticos

El ascorbato es uno de los antioxidantes no enzimáticos más poderosos y quizá el más importante en las plantas, ya que puede neutralizar ROS de forma directa: radicales



hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), oxígeno singlete ( $\text{O}\cdot$ ), pero también puede reparar moléculas orgánicas oxidadas. El ascorbato se encuentra presente en el cloroplasto, vacuola y el espacio apoplástico de las células de las hojas en elevada concentración. El ácido ascórbico se encuentra en su forma reducida, lo que representa el 90% del ascorbato total, en hojas y cloroplastos. La concentración intracelular de este compuesto se encuentra en el rango de 20 mM en el citosol, y entre 20 y 300 mM en el estroma del cloroplasto. Como ya hemos comentado antes, puede regenerarse fácilmente por la acción de reductasas específicas y con ayuda de otras moléculas como el NADH, el NADPH o el glutatión reducido en el ciclo Ascorbato-Glutatión.

El glutatión es un tripéptido no proteínico que se deriva de los aminoácidos. Contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato. Se trata de un compuesto abundante en los tejidos de las plantas y se encuentra virtualmente en todos los compartimentos celulares: citosol, retículo endoplasmático, vacuola y mitocondria. Participa directamente en la neutralización de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS). El glutatión se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida, ya que la enzima que vuelve de su forma oxidada, la glutatión reductasa, es constitutivamente activa e inducible por estrés oxidativo. De hecho, la proporción de glutatión reducido a glutatión oxidado dentro de las células a menudo se utiliza científicamente como una medida de la toxicidad celular. El papel esencial del glutatión en la defensa antioxidante se debe a la capacidad que tiene este compuesto de regenerar otro poderoso antioxidante soluble en agua, el ascorbato.

### Relación ciclo ascorbato-glutatión con el enrollamiento de las hojas

Por tanto, podemos deducir, que en presencia de un estrés oxidativo como causa la sequía, hay un aumento de las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión para producir los antioxidantes enzimáticos, el ascorbato y el glutatión, y tratar de combatir el efecto deletéreo de las especies ROS. Aparte de disminuir la pérdida de agua con el cierre de los estomas, las plantas para evitar los efectos de la sequía, también ocasionan el enrollamiento de sus hojas, lo que disminuye la superficie evaporativa ayudado por la plasticidad y serosidad de las cutículas de las mismas.

Los estudios realizados muestran que el ciclo de las enzimas ASC – GSH se indujeron en una forma diferente de ROS en la hoja y pecíolo. Por esta razón, los niveles de antioxidantes (GSH y ASC) y las actividades de enzimas antioxidante en el pecíolo no eran más altos que los de la hojas, a pesar de que la disminución del contenido relativo de agua del pecíolo fue mayor que en la hoja durante el período de balance. Las diferencias de estos sistemas antioxidantes en la hoja y en el pecíolo se deben a que la hoja se enrolla mientras que el pecíolo no.

Todas estas enzimas del ciclo ASC- GSH que conduce a la detoxificación de ROS puede tener un papel protegiendo los componentes celulares de los daños oxidativos generados por la sequía, y también influyen en el control de enrollamiento de las hojas. Por otra parte, la hoja de laminación proporciona una protección no sólo para la hoja, también para el pecíolo al disminuir la pérdida de agua a través de superficies de las hojas.

**Ana Tablero Nieto**

## **2. ACUMULACIÓN DE OSMÓTICOS**

### **2.1 Osmóticos de alto peso molecular: Fructanos multifuncionales y oligosacáridos de la familia de la rafinosa**

#### Definición

La sacarosa es un compuesto fundamental en el metabolismo de las plantas, ya que es el primer azúcar terminal formado durante la fotosíntesis y el compuesto que transporta los esqueletos de carbono desde su lugar de origen a los tejidos. También es el sustrato para la síntesis de diferentes tipos de oligosacáridos derivados de la sacarosa, entre ellos los fructanos y los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFOs), que son las dos clases de oligosacáridos solubles en agua más importantes del reino vegetal. Los fructanos pueden estar clasificadas por el tipo de enlaces que tengan (el  $\beta$  (1,2), el  $\beta$  (2,6) o ambos).

Los RFOs "clásicos" son solubles, no reductores, productos de  $\alpha$  (1,6) galactosil transferasa (Gal) formando extensiones de Sac. El trisacárido rafinosa (Raf) es el más pequeño y un RFO omnipresente en el reino vegetal, además de la elongación con residuos de Gal que conduce a la estaquirosa DP4 (Sta). Mientras Raf y Sta están presentes en todas partes de la planta en acumuladores genuinos de RFO, el homólogo superior se restringe generalmente a los órganos de almacenamiento. A menudo Sta es el carbohidrato cuantitativamente dominante en dichos órganos de almacenamiento.

#### Funciones ante situaciones de estrés:

Dado que las membranas y proteínas de membrana son uno de los objetivos principales de lesión por congelación y desecación en células, los efectos protectores de membrana se han dedicado a fructanos, así como a las RFOs.

Las FEHs (fructanos exo-hidrolasas) liberan rápidamente cantidades masivas de fructosa, disminuyendo el potencial osmótico y contribuyendo al flujo del agua y la floración. Los fructanos parecen tener funciones adicionales en la sequía y la tolerancia a la congelación de las plantas. Esto se ve apoyado por el hecho de que las plantas que acumulan fructanos son especialmente abundantes en zonas de clima templado y árido con las heladas estacionales o los períodos de sequía, y están casi ausentes en las regiones tropicales. En especies vegetales que poseen fructanos, éstos se acumulan en mayor medida en situaciones de frío y sequía. De hecho, se ha observado que en plantas transgénicas para fructanos, se sintetizan fructanos en situaciones de tolerancia al estrés.

Similar a los fructanos, y en contraste con almidón, RFOs son osmóticamente flexibles, ya que su dominio proteico puede cambiar fácilmente, y con ello la presión osmótica. Las especies que utilizan sacarosa como reserva de hidratos de carbono (Ej: remolacha azucarera, caña de azúcar) sólo pueden doblar la presión osmótica en la hidrólisis.

Los experimentos *in vitro* han evidenciado esta habilidad, lo que demuestra que ambos, tanto fructanos como RFOs contribuyen a una mayor estabilidad de la membrana durante la congelación y la deshidratación celular mediante la inserción profunda entre cabezas lipídicas, tanto en mono y como en bicapas. Como tal, también están bien posicionados para eliminar los radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) que podrían originarse en tonoplastos asociados a actividades peroxidasa de clase III.

Entre las especies reactivas de oxígeno biológicamente relevantes (ROS:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$  y  $\text{OH}^\cdot$ ), los radicales hidroxilo son las especies más reactivas y peligrosas. El  $\text{OH}^\cdot$  se sabe que reacciona con casi todos los tipos de biomoléculas ya que se producen en las reacciones de difusión controlada.

Mientras que los fructanos son candidatos obvios para la estabilización y protección de los tonoplastos, los RFOs que se sintetizan en el citosol son candidatos para proteger la membrana plasmática.

Se ha demostrado recientemente que Raf (trisacárido rafinosa) se puede importar en cloroplastos y por lo tanto, podría funcionar como un protector. Como se ha explicado anteriormente para los fructanos y otros osmolitos (el término osmolitos se refiere a osmóticos de naturaleza mineral, pero también pueden ser orgánicos), se puede especular que la capacidad de eliminación de  $\text{OH}^\cdot$  por Raf contrarresta el daño producido en la membrana y las proteínas, lo que contribuye a la estabilidad de la membrana tilacoidal del cloroplasto y la integridad bajo estrés.

En conclusión, se destacan dos nuevos papeles emergentes. En primer lugar, los fructanos y los RFOs pueden contribuir en la homeostasis de especies reactivas celulares de oxígeno (ROS) por procesos específicos eliminadores de ROS en las proximidades de las membranas de los orgánulos (por ejemplo, vacuolas, cloroplastos,). En segundo lugar, se plantea la hipótesis de que los fructanos de menor tamaño y los RFOs actúan como compuestos de señalización móvil floemática en situaciones de estrés. Se especula que estos mecanismos de señalización activan a antioxidantes y oligosacáridos, que contribuyen a la prevención de enfermedades en plantas, así como en los animales y en los seres humanos.

**Francisco Javier Brea Corral**

## **2.2 Osmóticos de bajo peso molecular: Poliaminas y prolina en el estrés por sequía.**

Se realizó un experimento en plantas de tabaco para estudiar el papel de las poliaminas y la prolina en el estrés por sequía y el estrés combinado de sequía y calor (Milena Cvikrova et al, 2013).

Las poliaminas son importantes durante el ajuste osmótico en respuesta a la deshidratación, para el mantenimiento de estructura de la membrana plasmática y para realizar un barrido de radicales libres, como iones u otras moléculas libres (sacáridos...). Sin embargo, no está del todo clara su función durante la sequía. En



estudios anteriores con *Arabidopsis*, se conoció que plantas con altos niveles de prolina, así como de poliaminas fueron más resistentes a la sequía.

Asimismo, las fitohormonas como el ABA, median en los canales iónicos que inducen al cierre estomático y la activación de las vías de defensa frente al estrés por sequía. Recientemente se ha descubierto que las citoquininas y auxinas, importantes en el crecimiento y el desarrollo, juegan roles importantes durante el estrés.

Durante este estrés por sequía, la exposición a la sequía y altas temperaturas provocan la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), reactivos potencialmente muy dañinos a la célula, en respuesta las plantas producen enzimas de barrido y se realizan el ajuste osmótico para mantener el potencial hídrico, para ello acumulan iones como calcio, azúcares o potasio, así como prolina, que acumulan sintetizándola de novo.

La síntesis de prolina y la de poliaminas, poseen varios intermediarios en común. Durante el experimento, se utilizaron plantas normales con fenotipo salvaje, WT, así como P5CS, mutantes para la sobreexpresión de biosíntesis de prolina. Impiden inhibición por concentraciones altas de prolina, para poder evaluar directamente como afectan altos niveles de prolina al estrés por sequía y al metabolismo de poliaminas. Asimismo, se evaluaron los niveles de poliaminas (putrescina-put-, espermidina-spd- y espermina-spm-), así como de las enzimas necesarias tanto para su síntesis, vía descarboxilación de ornitina (ODC) o vía descarboxilación de arginina (ADC), como para su oxidación (diamino oxidasa DAO, o poliamino oxidasa, PAO) en ramas altas, bajas y en las raíces, para estudiar además si la sequía afecta de la misma manera a las distintas partes de la planta.

Al examinar los datos obtenidos, se observaron los siguientes resultados:

- Caída del peso fresco y el contenido relativo de agua.
- En sequía, aumentan los niveles de prolina en ambos genotipos.
- El retorno a los niveles normales de prolina era más rápido en WT
- Aumentó la actividad de ODC, tras el período de sequía, que se puede asociar con la producción de PAs. En ambos genotipos, más acentuado en las raíces.
- Asimismo, aumentaron también los niveles de ADC, aunque aumentaron más tras el período de rehidratación comparados con el ODC, en ambos genotipos. Casi un 25% por encima de los niveles de control tras rehidratación.
- Los niveles de SAMDC aumentaron significativamente, niveles que persistieron tras rehidratación.

Estos aumentos se pueden asociar a la síntesis de poliaminas.

Las reducciones en los niveles de actividad de DAO y PAO se observan en las raíces sobretodo. En la rehidratación, aumentan los niveles de PAO y DAO, las reducciones afectan más a los mutantes. La caída de los niveles de amino-oxidasas, DAO y PAO, se corresponde con un aumento de los niveles de poliaminas. Sin estrés, los niveles de PAs son superiores en los mutantes. El estrés por sequía produce:

- Disminución de put y spd.
- Aumento de spm y dap (diaminopropano).
- El spd, podría haberse consumido en la síntesis de spm o durante la oxidación de poliamina oxidasa para formar dap.
- Durante la rehidratación: los niveles de put y spd se recuperan rápidamente, así como la actividad de síntesis de poliaminas aumenta considerablemente.

En definitiva, los resultados del estudio indican que los elevados niveles de prolina y poliaminas en plantas de tabaco tienen leves pero positivos efectos en la tolerancia al estrés abiótico.

Las ramas altas, parecen más protegidas, demostrando así la eficacia de los mecanismos naturales de defensa de las plantas al daño oxidativo, protegiendo los tejidos jóvenes y reproductores.

**Daniel Cano Pulido**

### **3. DESHIDRINAS**

El grupo 2 de proteínas LEA (abundantes en la embriogénesis tardía), llamados deshidrinas, se encuentran principalmente en las plantas. Se localizan también en diferentes tejidos vegetativos durante el crecimiento bajo condiciones normales, y se acumulan sustancialmente en las células de todos los tejidos aunque normalmente bajo condiciones de estrés que conducen a la deshidratación celular se acumulan en los tejidos vegetales deshidratados tales como en las semillas en desarrollo durante su maduración, o en tejidos vegetativos sometidos a un estrés ambiental tales como la sequía, la baja temperatura y la salinidad y durante los procesos de deshidratación naturales que se producen durante la maduración de la semilla.

La acumulación de estas proteínas hidrofílicas es uno de los componentes importantes de adaptación de las plantas a condiciones ambientales severas. Las deshidrinas se distribuyen en una amplia gama de organismos, incluyendo plantas superiores, algas, levaduras y cianobacterias.

El rasgo distintivo de todos DHNs es que tienen un dominio rico en lisina con 15 aminoácidos, EKKGIMDKIKEKLP, denominado el segmento K. Se encuentra generalmente presente cerca del C-terminal. Otras características típicas de las deshidrinas son: una cadena de residuos de Ser (el segmento S), un motivo de consenso, T / VDEYGNP (el segmento Y), ubicado cerca del extremo N-terminal, y regiones menos conservadas, por lo general ricas en aminoácidos polares (el segmentos  $\Phi$ ). Los  $\Phi$ -segmentos no se conservan y muestran una considerable variación entre las diferentes DHNs. El K-segmento es el único segmento presente en todas las deshidrinas. Según la similitud de secuencia de aminoácidos y sus características estructurales, las deshidrinas se pueden dividir en diferentes tipos.

No existe una correlación entre el tipo de deshidrina y localización del tejido. Varios tipos DHN pueden ser localizados en el mismo tejido .

#### **Funciones**

## 1. Unirse a lípidos

El segmento K presente en todas las DHNs se asemeja al segmento  $\alpha$  – helicoidal, que une lípidos anfipáticos de clase A2. Si el segmento K forma una estructura  $\alpha$  - helicoidal similar a la del segmento anfipático A2, una de sus funciones sería las interacciones hidrofóbicas con las membranas y las proteínas desnaturalizadas.

Existe una evidencia en los experimentos *in vitro* de que DHNs tienen una propensión a participar en interacciones hidrófobas *in vitro* que puede implicar la formación de  $\alpha$  - hélices anfipáticas por el segmento K.

El análisis de espectros de dicroísmo circular de deshidrina de caupí (*Vigna unguiculata*) reveló que en presencia de SDS la proteína formaba hélices  $\alpha$ -anfipáticas, y que en su ausencia carecía de una estructura secundaria bien definida.

Las deshidrinas *in vivo* pueden contener estructuras  $\alpha$  - helicoidales capaces de una unión a lípidos y tienen una conformación en espiral al azar en el estado nativo. Se sugirió que la estructura de espiral al azar puede formar una capa cohesiva con otras estructuras y tienen la capacidad para retener el agua. A partir de estos hallazgos, las DHNs parecen proteger a las células de plantas contra la deshidratación por medio de su estructura en espiral aleatoria, que mantiene la estructura proteica y se une al agua. Variedades de caupí con esa DHN mostraron una tolerancia mejorada a la refrigeración durante un momento de emergencia, lo que no se observó en variedades que carecen de esta proteína, a pesar de que no hay diferencia en el escape del electrolito que fue observado, lo que indica que esta diferencia no es debido a una protección específica de la membrana plasmática. Se demostró otra evidencia más directa de la capacidad de deshidrinas de unir lípidos gracias a los estudios sobre la deshidrina DHN1 del maíz (*Zea mays*), aislado a partir de semillas maduras. Como se muestra, DHN1 se une *in vitro* a vesículas de lípidos que contienen ácidos fosfolípidos, y se vio que esta unión era más favorable con vesículas de pequeño diámetro (SUV) preparados a partir de carga negativa fosfolípida que contiene ácido fosfatídico (PA), fosfatidil -Ser (PS) y fosfatidilglicerol (PG). El análisis por dicroísmo circular demostró que esa proteína adoptaba estructuras  $\alpha$  – helicoidales cuando se unía a vesículas derivadas de PA. Las proteínas por tanto pueden sufrir cambios conformacionales relacionados con la estabilización de vesículas u otras estructuras endomembranales bajo condiciones de estrés.

## 2. Capacidad antioxidante

La deshidrina de *Citrus unshiu*, tiene una mayor tolerancia al frío en plantas transgénicas de tabaco y pueden prevenir *in vitro* la peroxidación de liposomas. La peroxidación de lípidos es un proceso de degradación mediada por radicales libres que implican ácidos grasos poliinsaturados y los resultados en la formación de radicales de lípidos. Esta deshidrina facilita la aclimatación al frío, al actuar como proteína antioxidante para proteger los sistemas de membrana bajo estrés por frío. La peroxidación lipídica es inducida por los radicales libres (autooxidación), fotooxidación en presencia de oxígeno singlete, o reacción de la enzima (lipoxigenasa , ciclooxigenasa). En una membrana de ácidos grasos insaturados, los radicales hidroxilo inducen un proceso que conduce a la formación de radicales de lípidos. La peroxidación causa una pérdida de ácidos grasos insaturados y disfunción de la

membrana a través de modificaciones en la fluidez, lo que afecta el transporte de iones, la permeabilidad selectiva, la actividad enzimática y la disponibilidad del receptor. Se demostró que esta deshidrina tenía la capacidad para eliminar los radicales hidroxilo y peroxilo gracias a su unión con los residuos de glicina, histidina y lisina que posee esta deshidrina. Esta deshidrina es una proteína captadora de radicales hidroxilo que puede reducir el daño oxidativo inducido por el estrés hídrico en las plantas. Los hidroxilos radicales son generados por un sistema de metal/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la deshidratación celular, y como se ha visto son extremadamente citotóxicos.

### 3. La actividad de unión de metal

La deshidrina del cidro se demostró que poseía una actividad de unión a metal y se identificó cual era el dominio específico de unión a metal en la secuencia de la proteína. La propiedad de unión a metal de la deshidrina CuCOR15 se probó mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC). La afinidad más alta se detectó por Cu<sup>2+</sup>. La deshidrina fue capaz de ligar a 16 iones Cu<sup>2+</sup>. Se identificó una secuencia central vinculante de Cu<sup>2+</sup>, HKGEHHS GDHH, que se localizó cerca del extremo N-terminal. A partir de estos resultados, los autores concluyeron que esta deshidrina funciona como radical carroñero, reduciendo la toxicidad de los metales en las células vegetales bajo condiciones de estrés por agua. Esta actividad antioxidante puede ser una función crucial de las deshidrinas en condiciones que conducen a la generación de radicales hidroxilo en las plantas. Por tanto, esta función de unión a metales confirma la función de protección hacia las membranas contra la peroxidación de lípidos y la desestabilización de su función (como ya se vio en la función anterior). También se informó que una ITP deshidrina (proteína de transporte de hierro) de las semillas de ricino (*Ricinus communis*) podría participar en el transporte de hierro, y que la deshidrina de *Arabidopsis* y la del apio están implicados en la unión de calcio, que es dependiente de la fosforilación de las proteínas.

### 4. Actividad crioprotectora

Algunas deshidrinas presentan actividad crioprotectora hacia enzimas sensibles a congelación. En las plantas cultivadas en condiciones no estresadas, las deshidrinas con esta actividad se localizan principalmente en los tejidos vasculares de órganos que transportan (raíces, tallos), los tejidos vasculares de hojas, las puntas de las raíces y la parte apical de los brotes. Bajo estrés al frío, las proteínas se acumulan en las células de todos los tejidos, pero la acumulación más importante se encontró en los tejidos vasculares y en las células circundantes. Su acumulación en respuesta a baja temperatura se correlaciona con la capacidad de las plantas para aclimatarse al frío y desarrollar una tolerancia a la congelación. El sistema vascular y los meristemos apicales son cruciales para el crecimiento y supervivencia de las plantas y por eso las deshidrinas se requieren para la protección de los mecanismos de transporte para el agua y moléculas hacia las células que crecen y se dividen en las zonas apicales. Durante la congelación, la formación intercelular de cristales de hielo se inicia tanto en los vasos subepidérmicos como perivasculares. Comprensiblemente, las células que bordean estas regiones son más propensas a ser afectadas por la deshidratación y un mayor estrés iónico, resultado de la migración del agua hacia el crecimiento de los cristales de hielo extracelular. Por lo tanto, parece ser razonable suponer que la

tolerancia de las plantas al estrés abiótico se basa principalmente en la capacidad para proteger el área vascular contra la deshidratación.

La deshidrina de *Citrus unshiu* se vio que protegía la catalasa y la lactato deshidrogenasa contra la inactivación por congelación, y que era más efectiva que los solutos compatibles, tales como sacarosa, betaína glicina y prolina , o BSA.

Análisis del espectro de dicroísmo circular mostró que la estructura secundaria importante de esta deshidrina en la solución es una espiral al azar. Es probable que la estructura de espiral aleatoria de deshidrinas pueda desempeñar un papel importante en la protección de enzimas sensibles al congelamiento. Bajas temperaturas reducen la actividad de las proteínas oligoméricas debido a que las disocian en subunidades. Esta estructura en espiral al azar podría hacer capas cohesivas con la superficie de los oligómeros, y prevenir la disociación de las formas activas, es decir impedir la inactivación de estas enzimas.

Análisis funcionales de la actividad crioprotectora y anticongelante también se han observado para la deshidrina de *Prunus persica* y para la de *Betula pubescens*. La de *Prunus persica* conservó *in vitro* la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa después de varios ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido. Las deshidrinas de *Betula pubescens*, mejoraban la actividad  $\alpha$  - amilasa en presencia de polietilenglicol. Estos test *in vitro* sugieren que algunas deshidrinas pueden proteger enzimas *in vivo* bajo condiciones pequeñas de estrés térmico.

##### 5. Contribución a tolerar del estrés

Muchos estudios informaron una correlación positiva entre la acumulación de transcritos de deshidrina o proteínas y la tolerancia a la congelación, la sequía, y salinidad. Las plantas transgénicas y expresiones heterólogas en genes de levadura sobreexpresados también se han utilizado para elucidar el papel potencial de las deshidrinas en la tolerancia al estrés. La sobreexpresión del gen de *Citrus* en el tabaco provocó una ligera disminución de la fuga de iones durante la refrigeración y la congelación. Recientemente se obtuvieron datos sobre la sobreexpresión de múltiples genes que codificaban para deshidrinas en *Arabidopsis* y se vio que producían un aumento de la tolerancia a la congelación y la mejora de la supervivencia en exposición a bajas temperaturas, lo que demuestra que las deshidrinas contribuyen a la tolerancia a la congelación (refuerza la función mencionada anteriormente). También en condiciones de deshidratación celular durante la maduración de la semilla, pueden proteger también a moléculas contra la pérdida de agua por eso en este caso se acumulan en las células embrionarias de las semillas.

**David Arancón García**

Las deshidrinas son proteínas específicas expresadas en plantas y cuya cantidad aumenta de forma considerable cuando descende el contenido hídrico de la misma. Se han detectado en plantas superiores, tanto en gimnospermas como en angiospermas. Son proteínas hidrofílicas con alta proporción en glicina. Se encuentran tanto en el citoplasma como en el núcleo. Las deshidrinas pertenecen a la familia de proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), un grupo heterogéneo de proteínas descritas por primera vez por su acumulación durante el desarrollo de la semilla en

algodón. Se cree que las proteínas LEA están involucradas en el alivio del impacto negativo del estrés ambiental.

Todas las deshidrinas contienen al menos una copia del segmento K, el cual consiste en un fragmento de quince aminoácidos altamente conservados y ricos en lisina, que es diferente en gimnospermas y en angiospermas. Normalmente, se encuentra en la región C-terminal. Los segmentos K pueden estar involucrados en la formación de hélices anfipáticas alfa tipo A2, lo que permite que puedan interactuar con componentes lipídicos de la membrana y con regiones hidrofóbicas de proteínas desnaturalizadas parcialmente.

Las deshidrinas también pueden tener segmentos S y segmentos Y. El segmento S es un fragmento de residuos de serina contiguos que pueden ser fosforilados. Por su parte, el segmento Y presenta homología con dominios de unión de nucleótidos presentes en chaperonas. Este segmento únicamente ha sido identificado en deshidrinas de angiospermas hasta el momento.

Las deshidrinas poseen otras regiones menos conservadas ricas en glicina y aminoácidos polares llamadas  $\Phi$ -segmentos.

En función de la combinación de segmentos que presentan en la secuencia de aminoácidos las deshidrinas han sido clasificadas en 5 grupos: YnSKn, YnKn, SKn, Kn y KnS. Las deshidrinas pertenecientes al grupo YnSKn se conocen como deshidrinas alcalinas y están relacionadas con situaciones de privación del agua disponible para la planta, mientras que las deshidrinas SKn se conocen como deshidrinas ácidas y son responsables del mantenimiento ante el estrés hídrico y ante las bajas temperaturas, al igual que las pertenecientes al grupo YnKn.

Las deshidrinas se consideran generalmente genes de expresión tardía en la respuesta al estrés y se han descrito varias funciones en las que podrían estar implicadas. Una de ellas sería la de protección, estabilizando membranas mediante interacciones hidrofóbicas con los segmentos K. En algún caso se ha descrito actividad chaperona, impidiendo la agregación de proteínas. Las deshidrinas también podrían tener la capacidad de unión a moléculas de agua que a su vez podría influir en la protección de enzimas, como por ejemplo la alfa amilasa durante estrés por frío, al mantener una adecuada concentración de agua a nivel local y reduciendo con ello los daños provocados por los cristales de hielo durante la congelación. Algunas deshidrinas nucleares están involucradas en la protección de la maquinaria de transcripción durante la desecación asociada a la formación de la semilla. Podrían tener un papel clave en este proceso y su abundancia estaría directamente relacionada con la viabilidad y longevidad de la semilla.

Recientes estudios han demostrado que las deshidrinas YnSK en su forma fosforilada pueden proteger al citoesqueleto de las células, asociándose con la red de microfilamentos de actina.

Otras deshidrinas podrían presentar una función como antioxidantes debido a su capacidad unir iones metálicos libres. Esto previene de una excesiva formación de ROS (radicales libres de oxígeno). No obstante, a pesar de que sus funciones han sido frecuentemente investigadas y revisadas en los últimos años, especialmente en angiospermas, el mecanismo por el cual las llevan a cabo aún está sin esclarecer.

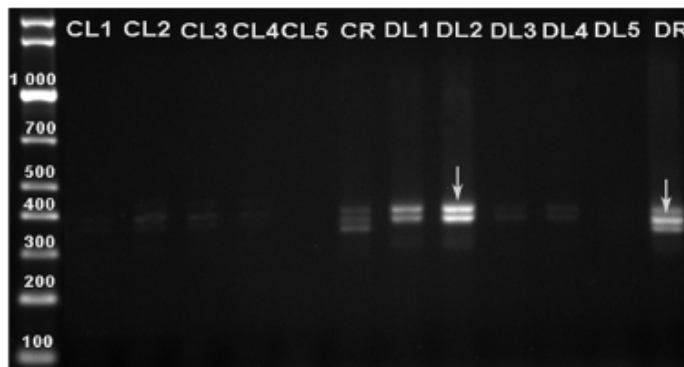
Para centrarnos en el papel de las deshidrinas en situación de estrés hídrico vamos a utilizar el estudio realizado por Irina Ivanova Vaseva, Iwona Andersa, y Urs Feller sobre la expresión de las deshidrinas en la especie *Trifolium repens* ante situaciones de privación de agua. La finalidad de este estudio es comparar la cantidad de deshidrinas en plantas que se encontraban privadas de agua con aquellas que se encontraban en una situación normal, y la distribución diferente de las mismas en la planta. Se trabajó con dos grupos de plantas, uno de ellos se utilizó como control y se mantuvo en condiciones normales de temperatura y fotoperiodo. El otro grupo fue sometido a la privación parcial del agua disponible durante un periodo de catorce días.

A continuación, se procedió a la extracción del mRNA que codifica para los diferentes tipos de deshidrinas de células de la raíz de las hojas de los diferentes grupos. Después, los fragmentos de mRNA obtenidos fueron sometidos a PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) con el fin de amplificar y purificar dichas secuencias.

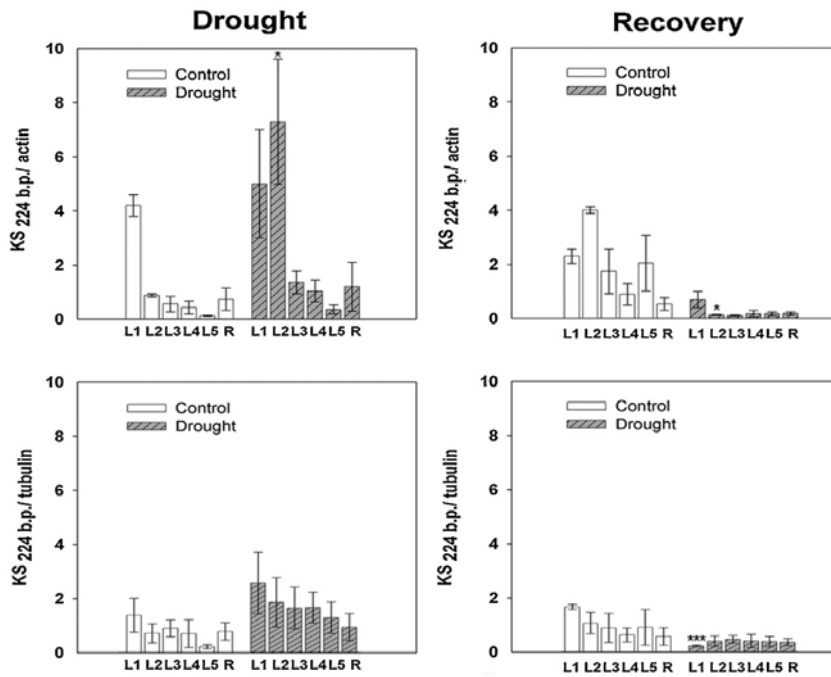
Se observó un aumento significativo de los transcritos de estos mRNA en las muestras de las hojas y raíces de aquellas plantas que habían estado sometidas a condiciones de estrés hídrico, lo cual indica un aumento de la transcripción de los genes responsables de la producción de deshidrinas. Los transcritos de la deshidrina Y3SK2 se encontraron de forma mucho más abundante en aquellos individuos sometidos a la sequía, lo que sugiere que podría utilizarse como molécula indicadora del estrés hídrico.

En concreto, las deshidrinas de tipo YnSKn se encontraron de forma mucho más abundante en las plantas privadas de agua.

La técnica de PCR con transcriptasa inversa permitió conocer las secuencias de ADN de las diferentes clases de deshidrinas, demostrando que están codificadas por muy pocos genes, que sufren un proceso de splicing alternativo. De esta forma se pueden producir múltiples deshidrinas diferentes a partir de un solo gen.



En esta imagen se muestran los resultados de la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa), para los transcritos de la deshidrina KS en las muestras control (C) y en las muestras sometidas a estrés hídrico (D) para las hojas (L) y para las raíces (R). Los niveles más altos de los transcritos se han detectado en las hojas secundarias (DL2) y las raíces (DR) de las muestras sometidas a estrés hídrico.



Esta gráfica indica el cociente entre los transcritos obtenidos para la deshidrina KS 224 con los transcritos obtenidos para las proteínas de actina y tubulina, en hojas (L) y raíces (R) de plantas sometidas a estrés hídrico y de plantas en condiciones normales. Los datos presentados demuestran que las deshidrinas juegan un papel importante en la adaptación de las plantas a condiciones de estrés hídrico. Existe un aumento significativo de la cantidad de deshidrinas en aquellas plantas sometidas a la privación de agua, en comparación a aquellas que se encuentran en condiciones normales en las que la expresión de estas proteínas es más bien escasa. Los órganos en los que se ha detectado una mayor acumulación de deshidrinas ante situaciones de estrés hídrico son las raíces y las hojas jóvenes.