

00346
3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EFEECTO DEL DÉFICIT HÍDRICO DURANTE
EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DEL FRIJOL
(*Phaseolus vulgaris* L.)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)

P R E S E N T A

CLAUDIA ALEJANDRA MERGOLD VILLASEÑOR

DIRECTORA DE TESIS DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ

MÉXICO, D.F.

AGOSTO DE 2003.



A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

OFICIO FCIE/DEP/0121/03

ASUNTO: Asignación de Sinodales.

DRA. GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ
PRESENTE.

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(a) de Tesis del(a) **BIÓL. CLAUDIA ALEJANDRA MERGOLD VILLASEÑOR**, quien desarrolló el trabajo de tesis titulado: *Efecto del déficit hídrico durante el crecimiento y desarrollo del frijol (Phaseolus vulgaris L.)*.

Asimismo comunico que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas en su sesión celebrada el día 10 de febrero del año en curso, ha designado a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de **MAESTRO(A) EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)**.

CARGO	GRADO	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	: DRA.	GLADYS ILIANA CASSAB LÓPEZ
VOCAL	: DRA.	IRMA OFELIA BERNAL LUGO
SECRETARIO	: DRA.	GEORGINA PONCE ROMERO
SUPLENTE	: DR.	GUILLERMO LAGUNA HERNÁNDEZ
SUPLENTE	: DRA.	ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., 26 de febrero del 2003
JEFE DE LA DIVISIÓN

DRA. DENI CLAUDIA RODRÍGUEZ VARGAS



DCRV/ASR/

RESUMEN

El déficit hídrico induce respuestas como la modificación en la proporción de proteínas de la pared celular. Dicha modificación juega un papel muy importante y poco entendido. Se estudiaron dos clases de proteínas de la pared celular: HRGP (glicoproteínas ricas en hidroxiprolina) y PRP2 (proteínas ricas en prolina). Se cuantificó y cualificó el entrecruzamiento de las HRGP-PRP de la pared celular de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de déficit hídrico usando cinéticas para el crecimiento y desarrollo examinando seis zonas en plantas maduras: nódulo, raíz primaria, raíz secundaria, tallo-raíz, tallo e internodo y cuatro regiones anatómicas en plántulas: división-elongación, elongación, intermedia y madura. Durante el crecimiento y usando impresión de tejidos, se observó que el déficit hídrico indujo la mayor frecuencia de la HRGP e intensidad a la reacción inmune (IRI) incrementada y la nula de la PRP2. Durante el desarrollo, HRGP con alta frecuencia e IRI disminuida alcanzando un máximo a los 15 d, la AGP disminuyó al 50% la frecuencia. Durante el crecimiento, usando inmunolocalización se observó que el déficit hídrico indujo HRGP incremente IRI y PRP2 lo disminuye. Durante el desarrollo, el déficit hídrico determina incremento de IRI de HRGP a 15 d y de PRP2 a 22 d. Durante el crecimiento y usando Western blot, se observó: incremento en frecuencia y solubilidad de HRGP, indujo a 1 h el incremento o disminución de solubilidad y/o frecuencia, indujo mayor frecuencia y alta solubilidad en las regiones de elongación, intermedia y madura, determinó mayor frecuencia, baja solubilidad y proteínas de bajo PM en las regiones división-elongación, intermedia y madura. Durante el desarrollo, se observó: HRGP incrementó frecuencia y solubilidad, el tiempo de incremento de solubilidad para HRGP fue de 8 d y para PRP2 de 15 d, HRGP es mayoritaria en las zonas de nódulos, tallo e internodo, PRP2 es mayoritaria en las zonas de nódulos, raíz primaria, raíz secundaria y tallo. Durante el crecimiento y usando determinación de proteínas totales y de hidroxiprolina hubo alta frecuencia de modificaciones en proteínas con prolina hidroxiladas solubles e insolubles en la región de división-elongación. Durante el desarrollo, el déficit hídrico indujo el incremento de solubilidad de proteínas con prolina hidroxiladas y de la fracción total, donde raíz primaria y raíz secundaria tuvieron mayor frecuencia con solubilidad incrementada de las proteínas con prolina hidroxiladas. Los resultados sugieren que la HRGP funciona como proteína estructural que entrecruza temporal y tejido-específicamente a la pared celular. La PRP2 además de tener una función estructural, especulativamente puede funcionar como molécula señal. Comparaciones de secuencias de aminoácidos y perfiles hidropáticos sugirieron, por un lado, un mecanismo de acción parecido al que usan algunos virus vegetales en la difusión de la infección, usando propiedades de interacción para su transporte con componentes orgánicos como citoesqueleto, chaperonas, cofactores de reconocimiento; y por otro lado, el transporte a través de plasmodesmos abiertos y dilatados de regiones fotosintéticamente inactivas, donde el mecanismo puede ser regulado por actina, miosina, calreticulina, centrina y una proteína cinasa dependiente de calcio. Este trabajo se realizó con el apoyo de los proyectos DGAPA IN206694 y CONACYT 1888-N9212.

DEDICATORIA

A María del Carmen Villaseñor Martínez y Gustavo Mergold Sámano

Por que este trabajo de investigación fue en su momento, un reto, una meta por alcanzar...y dicho objetivo solo pude lograrlo con su apoyo, consejos y alientos constantes.

A mi amado esposo Leonardo

Por mostrarme nuevamente el camino siendo mi luz y la mano que me levanto tantas veces, gracias por tus palabras, paciencia y amor incondicional en el reinicio de la escritura de esta Tesis.

A mis pequeños hijos Abraham y Omar

Por que el saber de su llegada a Nuestro hogar, me dió el coraje y la energia para culminar aquella meta... y ahora es éste el regalo que hago para Ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

*Por ponerme a prueba, dándome las herramientas para salir adelante,
concediéndome la vida y la de los seres a los que tanto amo.*

A Gladys I. Cassab López

*Por su confianza y apoyo incondicional: antes, durante y después de la finalización del trabajo de
investigación en su laboratorio y fuera de él.*

A todos los compañeros y amigos en el Laboratorio

Por que fueron parte importante en mi crecimiento personal y profesional... mi segunda familia.

A todos

*Por cada momento, palabra y/o acción que cada uno realizó,
para facilitarme las cosas y salir adelante.*

INDICE GENERAL

Oficio de asignación del Jurado	1
Título	2
Resumen.....	3
Dedicatoria	4
Agradecimientos	5
Introducción	11
Estrés biótico y abiótico.....	11
Potencial hídrico y presión osmótica.....	11
¿Qué es la pared celular vegetal?.....	13
Componentes de la pared celular.....	14
Antecedentes sobre extensina.....	14
Otras proteínas estructurales.....	16
Insolubilización.....	17
Crecimiento y desarrollo.....	18
Justificación.....	21
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	22
Material y métodos	23
Material vegetal.....	23
Condiciones de crecimiento.....	23
Impresión de tejidos.....	24
Inmunocitoquímica para microscopía de luz.....	24
Extracción de proteínas de la pared celular.....	25
Extracción de proteínas totales.....	25
Determinación de proteínas totales.....	25
Determinación de hidroxiprolina.....	26
Electroforesis de geles de poli(acrilamida)-SDS.....	27
Transferencia de geles de poli(acrilamida)-SDS.....	27
Electroforesis de geles catiónicos neutrales.....	27
Transferencia de geles catiónicos neutrales.....	27
Western blot.....	28

Crecimiento	29
Método cualitativo	29
Impresión de tejidos.....	29
Región de división-elongación (E1).....	30
Región de elongación (E2)	31
Región intermedia.....	31
Región madura.....	32
Análisis por inmunolocalización.....	34
Región de división-elongación (E1)	34
Región de elongación (E2)	34
Región intermedia.....	34
Región madura.....	35
Electroforesis y Western blot.....	37
Región de división-elongación (E1)	37
Región de elongación (E2)	39
Región intermedia.....	40
Región madura.....	41
Método cuantitativo	44
Análisis de la determinación de proteínas totales y de hidroxiprolina.....	44
Región de división-elongación (E1)	44
Región de elongación (E2).....	45
Región intermedia.....	46
Región madura.....	47
Herida.....	49
Región de división-elongación (E1)	49
Región de elongación (E2).....	49
Región intermedia.....	50
Región madura.....	50
Desarrollo	52
Método cualitativo	52
Impresión de tejidos.....	52
Zona del Nódulo (N)	54
Zona de la Raíz secundaria (RS).....	54
Zona de la Raíz Primaria (RP).....	54
Zona del Tallo-Raíz (TR).....	55
Zona del Tallo (T).....	55
Zona del Internodo (I)	56
Análisis por inmunolocalización	58
Zona del Nódulo (N)	58
Zona de la Raíz secundaria (RS)	58
Zona de la Raíz Primaria (RP)	60
Zona del Tallo-Raíz (TR)	60
Zona del Tallo (T)	60

Zona del Internodo (I)	61
Electroforesis y Western blot	62
Zona del Nódulo (N)	62
Zona de la Raíz secundaria (RS)	62
Zona de la Raíz Primaria (RP)	63
Zona del Tallo-raíz (TR)	63
Zona de Tallo (T)	65
Zona del Internodo (I)	65
Método cuantitativo	67
Análisis de la determinación de proteínas totales y de hidroxiprolina	67
Zona del Nódulo (N)	67
Zona de la Raíz secundaria (RS)	68
Zona de la Raíz Primaria (RP)	69
Zona del Tallo-raíz (TR)	70
Zona del Tallo (T)	71
Zona del Internodo (I)	72
Análisis computacional	73
Comparación del perfil hidropático de la PRP2 con otras proteínas.....	73
Función alterna: exportación de la PRP2	79
Los plasmodesmos	80
Modo de acción de la proteína del movimiento de virus vegetales	85
Movimiento de macromoléculas a través de plasmodesmos	86
Modelos	89
Conclusiones	95
1-7	95
8-15.....	96
Perspectivas.....	97
Referencias bibliográficas.....	98

APÉNDICE A

Bonilla I., C. Mergold-Villaseñor, M. E. Campos, N. Sánchez, H. Pérez, L. López, L. Castejón, F. Sánchez y G. I. Cassab. 1997.

Las paredes celulares aberrantes de los nódulos de la raíz de frijoles deficientes de boro no forman uniones covalentes entre las proteínas ricas en hidroxiprolina/proteínas ricas en prolina. *Plant Physiol.* 115:1329-1340..... 105

APÉNDICE B

Fig. 1b. Secuencia de la proteína del movimiento de la coliflor.....	106
Fig. 2b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con la proteína del movimiento del virus del mosaico de la coliflor (cepa CM-1841).....	107
Fig. 3b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con la proteína del movimiento del virus del mosaico del clavel.....	107
Fig. 4b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con el precursor de la glicoproteína 1 de superficie celular (capa S) (proteína B de la capa externa) de <i>Clostridium</i>	108
Fig. 5b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con el precursor de la cadena alfa del fibrinógeno de lamprea... ..	109
Fig. 6b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con nodulina LENO2 de lupina	109
Fig. 7b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con la involucrina.....	110
Fig. 8b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con la glutenina	110
Fig. 9b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con el precursor de la proteína del antígeno S de <i>Plasmodium</i> ...	111
Fig. 10b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con proteína hipotética de gene 2 del virus del canal del pez gato	111
Fig. 11b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con proteína del movimiento del virus del mosaico de la higuera	112

Fig. 12b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con proteína defectiva del córion FC106 de <i>Drosophila</i>	112
Fig. 13b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con el gene USO1 de <i>Saccharomyces</i>	113
Fig. 14b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con la cortactina de gallo	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Aminoácidos mayoritarios de la extensina.....	16
Fig. 2. Las posibles estructuras de un compuesto tetramérico basado en tirosina	18
Fig. 3. Plántula crecida en la oscuridad durante 6 días.....	24
Fig. 4. Diagrama de extracción proteínas totales de hipocotilos sometidos a déficit hídrico.....	25
Fig. 5. Esquema anatómico representativo observado en la región madura que muestra las diferentes zonas anatómicas seccionadas en las plántulas del frijol	29
Fig. 6. Western blot de proteínas de la pared celular durante el crecimiento.....	38
Fig. 7. Determinación de hidroxiprolina/proteína durante el crecimiento.....	46
Fig. 8. Western blot de proteínas de la pared celular en plántulas con herida durante el crecimiento.....	51
Fig. 9. Esquema de los tejidos observados en tres de las zonas anatómicas representativas seccionadas de las plantas del frijol.	52
Fig. 10. Western blot de proteínas de la pared celular durante el desarrollo.....	65
Fig. 11. Determinación de hidroxiprolina/proteína durante el desarrollo.....	69
Fig. 12. Modelo esquemático de un plasmodesmo	81

Fig. 13. La transición sink-source es acompañada por un cambio estructural de las formas simple a ramificada de los plasmodesmos	83
Fig. 14. Ilustración esquemática del sistema vascular vegetal que funciona como un sistema de comunicación Inter-órgano	85
Fig. 15. Esquema general de exportación de la proteína del movimiento de virus vegetales.....	87
Fig. 16. Modelo sugerido de exportación de la proteína rica en prolina (PRP2) de la pared celular del frijol.....	92
Fig. 17. Modelo de tráfico de macromoléculas a través de plasmodesmos por medio de chaperonas	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cinética inmunogénica usando la técnica de impresión de tejidos para observar proteínas de la pared celular de plantas en condiciones de déficit hídrico durante el crecimiento.....	30
Tabla 2. Inmunolocalización de proteínas de la pared celular en plantas bajo condiciones de déficit hídrico durante el crecimiento.....	36
Tabla 3. Cinética inmunogénica usando la técnica de impresión de tejidos para observar proteínas de la pared celular de plantas en condiciones de déficit hídrico durante el desarrollo.....	53
Tabla 4. Inmunolocalización de proteínas de la pared celular en plantas bajo condiciones de déficit hídrico durante el desarrollo.	60
Tabla 5. Análisis comparativo de diversas proteínas con la PRP2...	74
Tabla 6. Análisis comparativo de diversas proteínas con la PRP2...	76
Tabla 7. Diferencias entre apoplasta y simplasma	84
Tabla 8. Tipos de carga del floema.....	84

INTRODUCCIÓN

ESTRES BIÓTICO Y ABIÓTICO

El estrés se define usualmente como aquel factor externo que ejerce un efecto desventajoso en un sistema. Harris (1981), usó el término estrés como sinónimo del estatus hídrico. El concepto de potencial o estatus hídrico tiene dos principales usos. Primero, el potencial hídrico gobierna la dirección del flujo del agua a través de las membranas y en consecuencia a través de órganos y tejidos. El segundo uso es para medir el estatus hídrico de la planta. El déficit hídrico conduce a cambios fisiológicos como la inhibición del crecimiento de la planta disminuyendo la síntesis de proteínas, la síntesis de proteínas de la pared celular y la expansión celular, y la fotosíntesis (cierra estomatal y acumulación de solutos y ABA) (Taiz et al., 1991).

En un contexto biológico, "estrés" debe tener una definición biológica, más que una simple ecuación. Así en el caso de las plantas, se puede medir por sus efectos en el crecimiento o en procesos primarios de asimilación, como la fijación del CO_2 o la captación de minerales (Taiz et al., 1991).

Las plantas en vida natural o las crecidas en procesos agrícolas están constantemente sometidas a múltiples formas de estrés, tanto biótico como abiótico. Dentro de los estreses bióticos podemos mencionar principalmente los causados por patógenos como virus, bacterias, diversos protozoarios, nemátodos, hongos, insectos e incluso los causados por el ganado o el mismo hombre.

En cuanto a los estreses abióticos, podemos mencionar aquellos como la sequía, la salinidad, la carencia o exceso de nutrientes minerales, las variaciones extremas de temperatura y pH, la presencia de metales pesados, los insecticidas, daño mecánico o químico, etc.; lo que limita considerablemente su desarrollo (Colmenero-Flores, 1997).

POTENCIAL HÍDRICO Y PRESIÓN OSMÓTICA

Se han utilizado diferentes parámetros para designar el estado hídrico de una planta siendo uno de los más aceptados el potencial hídrico, el cual se define en términos del potencial químico del agua.

El potencial químico del agua es una expresión cuantitativa de la energía libre asociada con el agua. En termodinámica, la energía libre representa un potencial para realizar un trabajo. Un punto importante es que el potencial químico es una cantidad relativa, expresada como la diferencia entre el potencial de una sustancia en un estado determinado y el potencial de la misma sustancia en condiciones estándar. Por razones históricas y prácticas, en el área de la fisiología vegetal se ha utilizado el potencial hídrico.

Así, los factores principales que contribuyen al potencial hídrico están representados en la ecuación

$$\Psi = P - \pi$$

dónde Ψ es el potencial hídrico, que está directamente relacionado con el potencial químico del agua; depende de la concentración, ya que a mayor concentración mayor potencial hídrico; presión osmótica, que está asociada con soluciones de diferentes concentraciones; y gravedad cuyo efecto depende del peso o densidad del agua.

P , es la presión osmótica y representa el efecto de la concentración de solutos en el agua. Durante el estrés por déficit hídrico, se produce una elevación en la concentración de solutos intracelulares que permite que el potencial hídrico sea más negativo que el del suelo, y el potencial osmótico se hace más positivo, lo que permite a la planta la absorción de agua del suelo.

Finalmente π , expresa el efecto de la presión hidrostática en el potencial hídrico de una solución. Las células vegetales tienen una pared celular rígida, lo que les proporciona una presión hidrostática interna positiva, llamada presión de turgor (Taiz and Zeiger, 1991).

Si ponemos nuestra atención a definiciones operacionales aplicables a las diferentes clases de estrés que pueden ser impuestas a un organismo por un potencial hídrico desfavorable, consideremos dos tipos de situaciones. Una, la menos ambigua de las dos, es el estrés agudo, que se da cuando un organismo que está totalmente adaptado a un potencial hídrico es expuesto a otro. El organismo deberá ajustarse físicamente para sobrevivir. La otra situación es el estrés crónico, que se presenta cuando un organismo está completamente adaptado a un ambiente que es inhibitorio en virtud de su potencial hídrico, pero crece en él. Si el organismo en estas circunstancias está o no bajo estrés es menos obvio que en un estrés agudo (Brown 1990).

Es la norma para cualquier organismo, que tenga un óptimo en cualquier variable fisicoquímica y el potencial hídrico no es la excepción. Cualquier organismo, especialmente los que crecen en el suelo, deben considerarse afortunados si están en un ambiente óptimo. La gran mayoría de los organismos tienen un óptimo, definido por su índice de crecimiento, el cuál está por abajo de 1.0 (y menor a 0 MPa). Con valores menores, la respuesta al crecimiento varía ampliamente en los organismos más sensibles. Estos valores pueden deberse a incrementos en la salinidad provocando resistencia o tolerancia. Hay diferencias entre especies, pero en general tienen la habilidad de adaptarse a un amplio rango en el estatus hídrico (Brown 1990).

Específicamente, el alargamiento de la célula vegetal es afectado grandemente con bajos potenciales hídricos. El desarrollo de los tejidos florales, expansión de hojas y elongación de los tallos responden a una disminución en el potencial hídrico antes que las raíces (Bozarth, et al. 1987). Estas diferencias pueden ser usadas para investigar el efecto que produce una modificación del potencial hídrico y por lo tanto de la presión de turgor, en el posible entrecruzamiento de proteínas de pared celular en plantas.

Cuando se crecen plántulas en la oscuridad y con bajos potenciales hídricos, las raíces crecen rápidamente mientras que el crecimiento del los tallos se inhibe. La inhibición es seguida por la acumulación de solutos que mantienen el turgor cercano a un valor constante (Cavaleri and Boyer., 1982; Bozarth et al., 1987), pero posteriormente este aumenta considerablemente sus valores de presión. Por lo tanto, es posible que la disponibilidad de los sustratos y el aumento en la presión del turgor pudieran estar implicados en la inhibición del crecimiento del tallo cuando una plántula es sometida a condiciones de estrés hídrico. Se aumenta la posibilidad de que puedan estar ocurriendo cambios bioquímicos en las paredes celulares ya que la extensibilidad de las paredes es controlada metabólicamente y puede ser modificada después de largos periodos de estrés osmótico (Matthews et al., 1984; Iraki et al., 1989).

¿QUÉ ES LA PARED CELULAR VEGETAL?

En contraste con las células de muchos eucariontes, las células vegetales están rodeadas por una pared celular (Varner and Linn, 1989).

La pared celular es un componente importante e intrínsecamente complejo con características únicas relacionadas con el estado de crecimiento, desarrollo, tipo celular e interacciones ambientales (Fry, 1994). Más aún, la función de cada célula está ampliamente definida por su pared. Por lo tanto, las paredes celulares, colectivamente, son responsables directas de la forma y estabilidad de la planta como un todo y modularmente de la forma de los diferentes órganos y tejidos con una fuerza mecánica colectiva. Está determinada por el patrón de depósito de los componentes de la pared celular durante los eventos de división, crecimiento y maduración celular, así como por los procesos de diferenciación que se dan conjuntamente durante el crecimiento y desarrollo de las plantas (Walbot, 1985; Cassab and Varner, 1988).

La pared celular se divide generalmente en primaria y secundaria. La pared celular primaria es una pared o capa compuesta de un esqueleto microfibrilar, el cual es formado mientras la pared celular está creciendo (con un incremento del volumen irreversible). En la pared celular secundaria las microfibrillas son colocadas después de cesado el crecimiento (Fry, 1994).

Concerniente al significado biológico, las paredes celulares primarias: 1) evitan la explosión osmótica de los protoplastos; 2) limitan la expansión de la célula (y así el crecimiento de la planta); 3) son una barrera a la penetración por patógenos (en interacciones planta-microbio); 4) median la adhesión de células adyacentes con un tejido; 5) contienen formas latentes de moléculas señalizadoras endógenas (oligosacáridos); 6) su función es importante durante el desarrollo de la planta (nuevos tejidos); y 7) son los más definitivos componentes de distinción de los tipos celulares (Fry, 1994; Showalter, 1983).

COMPONENTES DE LA PARED CELULAR

La pared celular primaria es una fábrica extraprotoplásmica compuesta de varios homo- y heteropolisacáridos estructurales, pequeñas cantidades de (glico)proteínas estructurales y algunas veces lignina (Fry, 1994; Showalter, 1983).

Las paredes celulares primarias contienen del 5-10% de proteína y 2% de hidroxiprolina (Hyp). El contenido de proteínas en la madera es muy bajo, pero en escleridas de la testa de semillas de soya es del 20% (tienen paredes celulares muy engrosadas), donde la extensina o HRGP representa el 7% del peso seco de las células (Cassab et al., 1985).

En general, las paredes celulares están compuestas de celulosa, hemicelulosa, compuestos pécticos, lignina, suberina, proteínas (estructurales y enzimas), algunos micronutrientes (calcio y boro) y agua.

Las tres clases mayoritarias de proteínas estructurales de la pared celular son: HRGP (o extensinas), proteínas ricas en prolina (PRP) y proteínas ricas en glicina (GRP).

Las extensinas son una familia de glicoproteínas con forma de rodillo, son relativamente ricas en senna, valina, tirosina, lisina e histidina. Presentan un pentapéptido repetido llamado Ser-(Hyp)_n, y un patrón de glicosilación en los residuos de serina e hidroxiprolina. La mayoría están O-glicosiladamente unidos a cortas cadenas de arabinosa (de una a cuatro), mientras que las serinas están O-glicosiladamente unidas a una sola unidad de galactosa. Se cree que después de la secreción hacia la pared celular, las extensinas rápidamente se insolubilizan formando entrecruzamientos intermoleculares de di-isoditrosina (Showalter, 1993).

Las PRP son proteínas de la pared celular y casi todas miembros que contienen hidroxiprolina. Hay dos subclases: los componentes normales de la pared celular y las de las nodulinas (se producen en respuesta a la infección de bacterias fijadoras de nitrógeno) y forman parte de la pared celular del nódulo. Todas tienen repetidos Pro-Pro dentro de una variedad de unidades repetidas más largas. Las PRP no tienen carbohidratos o muy poco glicosilados con cantidades equimolares de Pro y Hyp. Están involucradas en varios aspectos del desarrollo, desde la germinación hasta estadios tempranos de nodulación. La expresión puede ser regulada por heridas, elicitors endógenos o fúngicos, etileno, cultivo celular y luz. Tienen un patrón de expresión tejido y célula específico (Showalter, 1993).

Las GRP se caracterizan por su estructura primaria repetitiva, con un 70% de glicina arreglado en su corta unidad repetida de aminoácidos: Gly-X donde X es generalmente Gly pero también Ala o Ser. Tiene una cierta homología con las citoqueratina. Se expresan en respuesta al desarrollo (de la pared celular) y condiciones estresantes (las citoplásmicas). Generalmente las GRP colocalizan con las PRP, las cuales generalmente se encuentran en haces vasculares (elementos del xilema) y particularmente con tejidos que van a ser lignificados (Showalter, 1993).

En las paredes celulares del coleoptilo de maíz, el 24% de la prolina pertenece a hidroxiprolina y el resto a prolina (Carpita, 1986). También contienen grandes cantidades de aminoácidos aromáticos comparados con prolina o hidroxiprolina (el 0.3 y 1.2% del peso de la pared celular en coleoptilos de 2 y 4 días). Por otro lado, se había observado que la hormona vegetal auxina no tiene ningún efecto en la incorporación de aminoácidos en ninguna fracción citoplásmica o de la pared celular en ningún estadio de desarrollo. Lo anterior fue sugerido porque la incorporación de material en la pared celular ocurría después de la elongación celular y así los aminoácidos aromáticos participaban en el entrecruzamiento de la pared celular durante la diferenciación.

Los modelos tridimensionales de la pared celular aún no son lo suficientemente detallados en cuanto a la organización de sus diferentes componentes así como en la participación de agentes de entrecruzamiento (Carpita, 1986; Cooper and Vamer, 1983; Fry, 1982; Fry, 1983; Lampport and Epstein, 1983; Markwalker and Neukom, 1976; Scalbert et al., 1985).

ANTECEDENTES SOBRE EXTENSINA

Aparentemente, Tupper-Carey y Prestly (1924) fueron los primeros en reportar la presencia de proteínas en la pared celular primaria de células meristemáticas (Preston, 1974). De las tres clases mayoritarias de proteínas estructurales de la pared celular la mejor caracterizada es la extensina, una glicoproteína rica en hidroxiprolina, componente importante de la pared celular primaria. Se ha sugerido que este polímero integral de la pared es importante en el control del crecimiento y que juega su papel en la arquitectura de la pared celular. Sin embargo, no hay una elucidación total del papel que juega en la arquitectura celular. Lampport y Northcote (1960) y Dougall y Shimabayashi (1960), descubrieron que Hyp era el componente aminoácido mayor de hidrolizados en paredes celulares de cultivos de tejido. La evidencia de que estos aminoácidos estaban en una unión peptídica ha sido reseñada. Lampport (1965, 1980), asumió que la función de las proteínas que contienen hidroxiprolina estaba relacionada con la extensibilidad de la pared celular y les llamaron extensinas.

Por muchos años, lo que se conocía de las extensinas era por extrapolaciones de la caracterización de otras glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y de péptidos obtenidos por digestión

enzimática e hidrólisis parcial de paredes de tomate, las cuales contienen arabinosa, galactosa, Hyp y otros amino ácidos (valina, serina, treonina, lisina y tirosina) (Fig 1). A través de hidrólisis alcalina, se pudieron recobrar hyp-O-arabinósidos, confirmando la unión glicosídica con el 4-OH del aminoácido (Lamport, 1969). Lamport (1974) realizó la primera secuencia de aminoácidos de la extensina de la pared celular fue fallida, con lo que se concluyó que era característicamente insoluble en la pared. Chrispeels (1970) fue el primero en identificar una proteína que contenía Hyp extraíble con sales en raíces de zanahoria y sugirió que esta podía ser el precursor de una extensina covalentemente unida a la pared celular. La síntesis y secreción de extensina en raíces de zanahoria se mostró que era aumentada por la obtención de rebanadas y aereación del tejido, con lo que se sugirió que estos fenómenos estaban involucrados en la reformación estructural de la pared o como una forma de resistencia a las enfermedades seguidas de una herida.

Stuart y Vamer (1980), fueron los primeros en purificarla de diferentes plantas. Con todo esto, las únicas funciones fisiológicas que se le han atribuido a la extensina son en la protección del ataque de patógenos, la desecación en heridas superficiales, la morfogénesis y el control del crecimiento, aunque su papel en la estructura de la pared celular y función se mantiene especulativo y controversial. Estudios en la inversión de *Volvox*, fueron los que apoyaron la idea de que esta proteína está bajo un estricto control por desarrollo, pues observaron que se sintetizaba en menos de 10 min, de las 48 h del ciclo de vida de *Volvox* (Schipfenbacher et al., 1986).

Tal vez el mejor ejemplo de su función estructural fue el realizado con paredes celulares de *Clamydomonas* en las cuales los componentes estructurales mayoritarios son varias HRGP. Evolutivamente, las HRGP de las *Clamydomonas* son antecesoras de las HRGP de plantas superiores y además ambas muestran insolubilización durante el depósito de pared celular usando el entrecruzamiento de isoditrosinas, mecanismo postulado para la dirección de la insolubilización en plantas (Waffenschmidt et al., 1993; Brady et al., 1996). Las *Clamydomonas* elaboran dos tipos de pared celular durante el ciclo celular: gamético/Vegetativo (V) y zigótico (Z), las cuales se insolubilizan después del ensamblaje. Las paredes V están compuestas de dos capas: externa soluble en sal (W6) y la interna insoluble extraíble con SDS/ β -mercaptoetanol (W2). De estas, la W6 es de particular interés por que se reensambla con un arreglo cristalino. El sistema para estudiar este ensamblaje fue a través del monitoreo de monómeros W6 por fluorescencia de FITC-estreptavidina y observado con microscopio electrónico, siendo múltiples los sitios de nucleación para el reensamblaje (Goodenough et al., 1986; Cassab and Vamer, 1988).

Otro antecedente fue el investigado por Bradley et al. (1992) quienes enfocaron la atención a los cambios rápidos en la pared celular como una forma de activación por defensa. Reportaron que elicitores causaban un rápido entrecruzamiento de proteínas ricas en (hidroxi)prolina (p33 y p100) mediado por H_2O_2 (insolubilización completa a los 2 min) y precedían a la activación de defensas dependientes de la transcripción, demostrando que este entrecruzamiento está bajo control del desarrollo. Mostraron que heridas locales inducían una rápida insolubilización en la región inmediata (5 mm alrededor), parcial extraíbilidad en regiones adyacentes y sin perturbaciones a mayores distancias. Finalmente concluyeron que el insolubilización dependiente de un estímulo es una forma nueva de regulación celular con funciones potencialmente importantes en la flexibilidad de las paredes celulares en la arquitectura final de la planta durante el desarrollo y el endurecimiento rápido de las paredes celulares en estadios iniciales de defensa.

La transcripción de los genes de extensina se regula durante el desarrollo de forma tejido-específica. Concluyó que la HRGP se expresaba fuertemente en tejidos meristemáticos y en algunas de estas células podían estar bajo condiciones de estrés (Ye and Vamer, 1991). Una expresión

mayor de extensina se ha observado con estimulación mecánica (Tiré et al., 1994), herida (Showalter et al., 1991; Sauer et al., 1990) e infección (Niebel et al., 1993; Corbin et al. 1987).

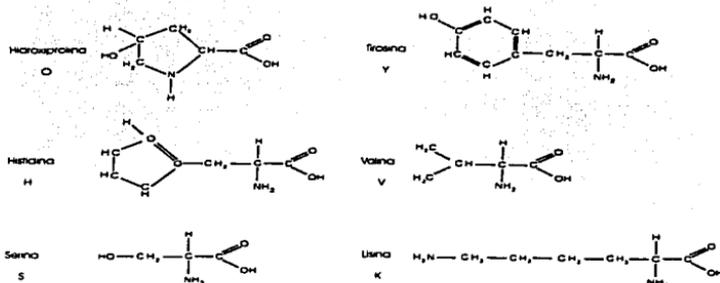


Fig 1. Nombre y estructura química de los aminoácidos mayoritarios de la extensina.

OTRAS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

La extensina no es la única proteína mayoritaria estructural de la pared celular, sino como se mencionó al principio, también son proteínas mayoritarias las PRP y las GRP. Sin embargo, aquí solo se profundizará con las PRP.

Las PRP son proteínas ricas en prolina. El análisis proteico de algunas PRP (SbPRP1, SbPRP2 y DcPRP1) han mostrado que el 50% de sus prolinas son hidroxiladas y que la hidroxilación ocurre específicamente en el segundo residuo de las prolinas en los motivos repetidos pentaméricos (PPVEK, PPVYK, PPVHK) (Averyhart-Fullard et al., 1988; Kleis-San Francisco and Tiemey, 1990; Lindstrom and Vodkin, 1991; Bradley et al., 1992; Millar et al., 1992).

Debemos tomar en cuenta que, al menos para leguminosas, varios productos génicos ricos en prolina clonados eran genes de nodulinas tempranas (por ejemplo, ENOD2 y ENOD12) que se expresan tempranamente en el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno (Franssen et al., 1987; Scheres et al., 1990).

Lo anterior sugiere que los resultados de análisis cuantitativos de hidroxiprolina pueden incluir algunos componentes de las diferentes familias génicas de PRP y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, incluyendo a las nodulinas así como a las llamadas "PRP-like" y "HRGP-like", y posiblemente otras.

Se ha pensado que las PRP forman esqueletos covalentemente entrecruzados pero las propiedades estructurales y significado funcional de estos esqueletos no está bien entendido. Tal vez, las altas concentraciones de PRP en nódulo regulan la arquitectura molecular del esqueleto de una manera que permita nuevos destinos en el desarrollo para las células e infección por *Rhizobium*

(Wilson et al., 1994). Sin embargo, debe tenerse en cuenta la participación de los carbohidratos que rodean a una proteína, por ejemplo, Kjellbom et al. (1997), demostraron que cuando se agregaba H_2O_2 y peroxidasa a fracciones parcialmente purificadas de dos subfamilias de AGP (82 y 97 kDa), se generaban complejos de 170 kDa *in vitro* y de 110 y 210 kDa *in vivo*, lo que sugería que las formas con masas moleculares mayores aparecían como el resultado de un entrecruzamiento e incluso sugería que las concentraciones usadas eran similares a las acumuladas en presencia de elicitores; por otro lado encontraron un control por desarrollo en el entrecruzamiento, es decir, que las hojas maduras tenían más complejos entrecruzados que las hojas jóvenes, patrón similar al que presentan las PRP y HRGP en las paredes celulares del frijol (Bradley et al., 1992).

INSOLUBILIZACIÓN

Los constituyentes poliméricos, excepto la lignina y la celulosa, son solubles en agua después de su extracción, pero dentro la pared se entrecruzan por enlaces covalentes y no covalentes. La extensina extraíble con sales es la mejor caracterizada.

Las extensinas poseen un bloque de tetrahidroxiprolina que está decorado con arabinosa para darle rigidez (Van Holtz and Vamer, 1984; Williamson, 1996). Otras repeticiones comunes en la secuencia pueden actuar como sitios de reconocimiento para entrecruzamiento, por enzimas que glicosilan o por áreas de interacción iónica con otras proteínas y polisacáridos (Kieliszewski and Lampert, 1994).

Esta proteína altamente básica se une rápidamente al esqueleto de polisacáridos presentes en la pared celular, y tras algunas horas, estos se han unido covalentemente y son inextraíbles de la pared celular (Cooper and Vamer, 1983).

Cuando se produce la elicitación por infección con hongos patógenos, hay un incremento en la expresión de extensina acompañado posteriormente por el entrecruzamiento acelerado de esta (Bradley et al., 1992; Brisson et al., 1994).

Según Brisson et al. (1994) y Bradley et al. (1992), los constituyentes de la paredes celulares son alterados cuando los tejidos sufren alguna herida o cuando su índice de crecimiento cambia (Cassab et al., 1985; Iraki et al., 1989; Hiroshi and Boyer, 1990). Lo anterior ha sugerido que la inhibición del crecimiento del tallo bajo condiciones de estrés hídrico pudiera deberse a cambios ocurridos en las proteínas de la pared celular (insolubilización).

Estudios involucrados en el análisis de péptidos derivados de tripsina en la pared celular revelaron la presencia de un asa intrapolipeptídica, que formaban la Idt de las dos tirosinas en la secuencia Tyr-Lys-Tyr. Idt en esta forma no está entrecruzada con otros polipéptidos y no contribuye directamente a la formación del esqueleto de extensina (Brady et al., 1996). En base a lo anterior, Brady et al. (1996), aislaron un nuevo aminoácido: di-isoditrosina, el cual está compuesto de dos moléculas de Idt unidas por una unión bifeníl. Basados en su estructura, existe la posibilidad de que pueda formar uniones intra o interpolipeptídicas, lo que sería de interés en la arquitectura de la pared, pues podría atrapar otros polímeros de la pared, como las pectinas o permitiría la concatenación interpolipeptídica.

Así, una probable causa de la insolubilización covalente de la extensina resulta de la formación de un compuesto formado por cuatro tirosinas acopladas oxidativamente llamada di-isoditrosina ya que el dímero ditrosina no se presenta en plantas, siendo la isoditrosina (Idt) la que ocurre *in vivo* y a través de este intermedio es como se forma esta estructura tetramérica (Fry, 1982; Brady et al., 1996) (figura 2). Se había sugerido que un acoplamiento de residuos de tirosina mediado por peroxidasa, forman la Idt, que puede servir para entrecruzar diferentes polipéptidos

de extensina, formando un esqueleto de extensina (Fry, 1988). Se ha sugerido que las familias de proteínas ricas en prolina y en glicina, contienen cantidades apreciables de tirosina, que pueden insolubilizarse en la pared *via* entrecruzamiento derivado de tirosina (Showalter, 1993; Brisson et al., 1994).

El entrecruzamiento directo interpolipéptico formado por di-isoditrosina, dentro o entre las tres familias de proteínas ricas en tirosina, pudiera tener una función en el ensamblaje o endurecimiento de la pared celular. Así, la cantidad y la cualidad de los polímeros individuales y de los entrecruzamientos son lo que definen las propiedades físicas y biológicas de la pared celular (Fry, 1994).

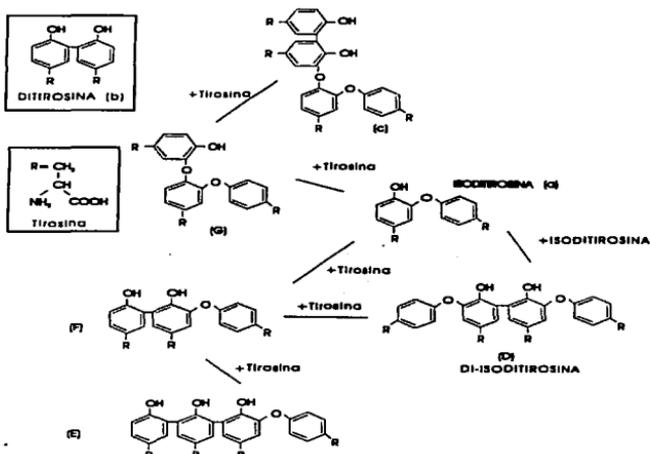


Fig. 2. Las posibles estructuras de un compuesto tetramérico basado en tirosina. La estructura D es el compuesto de cuatro tirosinas acopladas oxidativamente dando lugar a la di-isoditrosina.

CRECIMIENTO Y DESARROLLO

El término crecimiento toma una gran variedad de sentidos. En el ámbito individual, usualmente involucra incrementos en masa seca de un organismo (o parte de uno), ya sea que vaya acompañado por un aumento en tamaño o no (diccionario).

En un organismo, el crecimiento es la expansión irreversible (plástica) del tamaño de la pared celular y se acompaña por la combinación: división celular y alargamiento celular. La división celular no constituye, propiamente, el crecimiento ya que este puede ocurrir sin incrementar el tamaño de las estructuras implicadas. El alargamiento celular implica absorción de agua, pero por sí solo, tampoco constituye un crecimiento, lo que es evidente en plantas en las que hay un considerable aumento neto del tamaño celular en regiones maduras. No obstante, con pocas excepciones, el crecimiento continuo requiere la producción de nuevas células y su alargamiento, y estos dos procesos están cercanamente asociados en espacio y tiempo (Steeves and Sussex, 1989).

Hay que tomar en cuenta que el índice de crecimiento y su límite varía entre especies e individuos, pero las bases moleculares de estas variaciones aún no están determinadas (Doonan J., 1996). Doerner et al., 1996 sugieren que el índice de división celular es un factor crucial, al menos en las plantas, para la determinación del índice de crecimiento.

El crecimiento vegetal depende de las actividades de los meristemas primarios, agrupaciones de células indiferenciadas en las extremidades de las raíces y de la región apical. La proliferación proporciona a las células el mantenimiento del meristema y la construcción de nuevos tejidos diferenciados (Doerner et al., 1996).

En teoría (Lockhart, 1965), el crecimiento celular se logra cuando la pared celular se expande bajo el estrés de una presión interna (turgor, Ψ_p). La absorción de agua de las células en expansión es determinada principalmente por el gradiente del potencial hídrico y la conductividad hidráulica entre la célula y el medio externo ($\Delta\Psi$).

La alta sensibilidad del crecimiento expansivo con rápidas variaciones en el potencial hídrico (Ψ) sugiere que, el efecto inicial de un Ψ reducido sobre la expansión es físico y está mediado por Ψ_p (Green et al., 1971; Acevedo et al., 1971). Esto implica que las hojas de las plantas que pueden adaptarse a bajos Ψ y mantener su crecimiento, lo hacen manteniendo el Ψ_p necesario para el crecimiento y $\Delta\Psi$ para la toma de agua. Un mecanismo adaptativo es el ajuste osmótico, en el cual una fuente baja de Ψ es compensado por un bajo potencial de solutos en el tejido (Ψ_s) (Meyer and Boyer, 1972). El ajuste osmótico ha sido observado en hojas maduras y en crecimiento de varias especies (Hsiao et al., 1976; Matsuda and Riaz, 1981; Michelina and Boyer, 1982), pero en algunos de estos estudios el crecimiento foliar se inhibió sin una pérdida aparente de Ψ_p en la zona de crecimiento (Matsuda y Riaz, 1981; Michelina and Boyer, 1982; Matthews et al., 1984). Otro ejemplo fue realizado en hojas de uva, donde cambios rápidos en la relación Ψ_p -crecimiento ocurrieron por cambios en turgor (Shackel et al., 1987). Esto implica que factores como Ψ_p limitan el crecimiento y que esta relación depende del ambiente.

El crecimiento en sí no forma un cuerpo organizado, pero sí, al menos en teoría, al ensamblaje homogéneo de las células. La formación de un cuerpo organizado, implica que células y grupos de células en diferentes regiones del cuerpo sean estructural y funcionalmente distinguibles. Los cambios que ocurren en estas células y grupos de células y la forma en las que podemos distinguirlas constituye lo que se conoce como diferenciación. Hay ocasiones en las cuales el crecimiento ocurre sin diferenciación o la diferenciación sin crecimiento, pero casi siempre es cierto que ambos fenómenos ocurren en íntima asociación.

El destino celular en el desarrollo puede estar determinado por la posición, lo cual está definido por las células vecinas. Por ejemplo, durante la formación de los pelos radicales, la identidad celular es determinada solamente después de que toda actividad mitótica ha cesado y son fuertemente influenciadas por las células de la capa adyacente. El tejido diferenciado puede superponerse que funciona como template del cual, las células menos maduras son inducidas a seguir un destino particular (Doerner et al., 1996).

De esta forma, el desarrollo de un cuerpo organizado depende entonces de la actividad integrada del crecimiento y la diferenciación. En el sentido limitado, el desarrollo abarca numerosos procesos, como la división celular, el alargamiento celular, la síntesis de proteínas, la elaboración de materiales para la pared celular, las alteraciones cuantitativas y cualitativas en los organelos celulares, entre muchas otras. Por lo tanto, es importante reconocer dos importantes aspectos del desarrollo y analizar sus procesos en términos estas dos categorías: el crecimiento y la diferenciación (Steeves and Sussex, 1989).

Volviendo a la pared celular, la complejidad y diversidad de células en una planta es debida, en parte, a la composición de estas. Como es bien sabido, da fuerza y forma a toda la planta. Así, la diferenciación de las paredes celulares forma una variedad de tipos celulares especializados. Desde el descubrimiento de las proteínas de las paredes celulares, se ha propuesto que su estructura está determinada, en parte, por la expresión a través del desarrollo de la planta. Por ejemplo, Shirsat, et al. (1991) mencionan que el gen de la extensina está probablemente expresado en distintas localizaciones celulares y órgano-específicas que contribuyen con la habilidad de la planta de responder a ambientes específicos y del desarrollo.

Analicemos el desarrollo de una planta vascular. La planta vascular, como todo organismo que se reproduce sexualmente, inicia su existencia como una simple célula, el huevo fertilizado o cigoto. La proliferación de estas células forma un embrión, dentro del cual, en estadios tempranos, órganos y tejidos comienzan a ser formados. En la embriogénesis temprana, dos regiones distintivas se separan, aproximadamente en los polos opuestos, que subsiguientemente retienen la capacidad de crecimiento continuo. Uno es el llamado meristemo apical de las partes aéreas, que produce un sistema aéreo en expansión por la formación continua de tejidos y el inicio de una sucesión de hojas y primordios. El otro, es el meristemo apical de la raíz, que similarmente forma un sistema de raíces en expansión. De esta forma, el desarrollo de estos sistemas de terminación abierta es repetitivo, ya que la misma clase de tejidos y órganos es producida en una sucesión continua (Steeves and Sussex, 1989).

La actividad de los meristemos apicales produce un cuerpo en elongación, llamado cuerpo primario. En muchos casos, este cuerpo primario constituye a toda la planta. En otros casos, particularmente en plantas con un ciclo de vida largo, hay un componente adicional del desarrollo que aumenta el radio de los ejes. Estos resultados de la actividad de dos meristemos adicionales iniciados en el estadio postembrionario: el cambium vascular, contribuye a la adición de células al sistema de conducción y el cambium de "corcho", que produce el tejido protector que reemplaza a la epidermis original. Estos meristemos y los tejidos que producen, constituyen el cuerpo secundario de la planta. El cuerpo secundario no constituye toda la planta, sino que está compuesta de unos cuantos tipos de tejidos sin incluir órganos. En algunos casos, puede constituir la mayor parte del cuerpo de la planta. Más aún, específicamente la pared celular vegetal, que es una estructura dinámica y capaz de alterar su composición a través del desarrollo, es capaz de responder a estreses externos como son el ataque de patógenos o la sequía (Shirsat, et al. 1991).

En los párrafos anteriores, se ha usado deliberadamente la palabra desarrollo sin precisar su significado. Así, el desarrollo es la suma total de eventos que contribuyen a la elaboración progresiva del cuerpo de un organismo involucrándose influencias ambientales y genéticas. Por ello, se deben incluir todos o la mayoría de los procesos fisiológicos de los organismos vivos. Es especialmente cierto en plantas, que todos los fenómenos fisiológicos llevados a lo largo de la vida de un organismo, están encaminados a la elaboración progresiva de su cuerpo (diccionario, Steeves and Sussex, 1989).

JUSTIFICACIÓN

La Biotecnología, en nuestros tiempos, juega un papel protagonista con un gran impacto benéfico en la sociedad. Específicamente, uno de los paradigmas biotecnológicos en el que contribuiríamos con este proyecto de investigación es en el área de Biotecnología vegetal, con la caracterización molecular parcial de una variedad de frijol sometida a condiciones de sequía y su efecto durante el crecimiento y desarrollo.

La sequía es una condición ambiental cíclica, recurrente e impredecible que aqueja a la humanidad. Según Hernández (1996), la sequía comenzó a ser estudiada cuando se convirtió en un problema social y dejó de verse como un fenómeno natural, por lo cual se carecen de estudios actualizados y antecedentes históricos para prevenir sus consecuencias. Por ello, muchos proyectos de investigación se han enfocado a obtener variedades vegetales resistentes a plagas, a salinidad y a sequía. Sin embargo, dicha obtención ha sido por métodos genéticos sin tomar en cuenta la caracterización y la sistematización a nivel molecular de estas y otras variedades.

Por otro lado, a nivel molecular generalmente se realiza la caracterización de un gen y análisis de su expresión diferencial en diversos órganos y tejidos de una planta bajo ciertos estímulos. Sin embargo, dada la regulación del estatus hídrico en distintas regiones anatómicas, órganos y tejidos, fué que se consideró el estudio sistematizado del entrecruzamiento de proteínas de la pared celular durante el crecimiento y desarrollo del frijol. Por lo anterior, se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos.

HIPÓTESIS

El déficit hídrico es un modulador temporal (crecimiento-desarrollo) y espacial (regiones-tejidos) del entrecruzamiento de proteínas de la pared celular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto del déficit hídrico durante el crecimiento y desarrollo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

OBJETIVOS PARTICULARES

Investigar el efecto del déficit hídrico en las diferentes regiones de la plántula y zonas anatómicas de la planta adulta mediante:

1. Determinación cualitativa de proteínas de la pared celular (localización con anticuerpos específicos).
2. Determinación cuantitativa de proteínas de la pared celular (relación hidroxiprolina/proteína soluble, hidroxiprolina insoluble y proteína soluble).
3. Análisis temporal de solubilidad de proteínas de la pared celular bajo condiciones de déficit hídrico (intensidad de reacción a un anticuerpo y entrecruzamiento de proteínas) usando cinéticas cortas y largas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El índice de crecimiento, puede ser un indicador que puede llevar a conclusiones erróneas del comportamiento fisiológico. Los bajos potenciales hídricos normalmente tienden a bajar la velocidad de las reacciones bioquímicas y a disminuir los índices de crecimiento en organismos que pueden o no estar "estresados" (Brown 1990). Sin embargo, varios estudios indican que el déficit hídrico modifica diversas funciones biológicas, por ejemplo inhibe la expansión foliar en un rango de tiempo desde minutos hasta meses, pero comúnmente días (Hsiao, 1973; Schultz and Matthews, 1993). Así, la sensibilidad del crecimiento al déficit hídrico puede cambiar diurna y estacionalmente, aunque el entendimiento de la naturaleza de la inhibición es limitado. Por todo lo anterior, fue que se diseñaron los métodos que permitieran tener un panorama completo desde diferentes puntos de vista.

MATERIAL VEGETAL

Semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Negro Jamapa fueron esterilizadas en su superficie con alcohol e hipoclorito de sodio al 5% (v/v), enjuagadas abundantemente y embebidas en agua destilada estéril durante 1 h, colocadas sobre toallas de papel húmedo en charolas y finalmente cubiertas con papel aluminio (Lara et al., 1984).

CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Se realizaron dos tipos independientes de experimentos, aquellos en los que se analizó la etapa de crecimiento y otros en los que la etapa de desarrollo fue analizada.

Para la etapa de crecimiento, las charolas con las semillas fueron mantenidas a 25°C durante 3 días en la oscuridad. Las plántulas fueron transplantadas a macetas con vermiculta, previamente pesada, esterilizada y saturada con agua (control: 5 ml/gr) o solo humedecida (déficit: 1/12 del volumen control). Las plántulas transplantadas se mantuvieron en la vermiculta durante 5 min, 30 min, 12 h, 18 h, 24 h y 36 h. Los hipocotilos de las plántulas se disectaron con una navaja de rasurar en cuatro diferentes regiones: región de división o E1 (zona inmediata al cotiledón de 2-3 mm de longitud, contiene células en división y en elongación), región de elongación o E2 (corresponde a la zona que forma el gancho, de 5-8 mm), región intermedia (células diferenciadas, zona de 7-10 cm) y región madura (células totalmente diferenciadas, zona de 1 cm).

Para los experimentos correspondientes a la etapa del desarrollo, las plántulas de 5 días crecidas en la oscuridad se transplantaron a macetas de plástico con vermiculta, previamente pesada, esterilizada y humedecida con la misma cantidad de agua que para los experimentos anteriores. Previamente van Holst et al. (1980) y van Holst (1981) probaron que los hipocotilos crecidos bajo estas condiciones son suficientemente homogéneos para permitir estudios

relacionados con el índice de elongación celular y de la composición de las paredes celulares primarias. Cada plántula (Fig. 3) fué inoculada con *Rhizobium tropici* (cepa CIAT 899). Las plantas fueron cultivadas en invernadero con luz natural a 25°C durante el día y a 20°C durante la noche.

Las macetas se pesaron y regaron diariamente para mantener las condiciones de déficit hídrico. Las plantas fueron cosechadas a diferentes tiempos después del trasplante: 7, 15 o 21 días. Se disecaron seis tejidos: internodo, tallo, tallo-raíz, raíz primaria, raíz secundaria y nódulos.



Fig 3. Plántula de frijol crecida en la oscuridad durante 5 días.

IMPRESIÓN DE TEJIDOS

El análisis por impresión de tejidos fué realizado como se describió previamente (Cassab et al., 1987). Después del trasplante de las plántulas a los medios experimentales durante los tiempos determinados, se disecaron según la región o tejido usando navajas de rasurar. La muestra de tejido se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa, previamente tratada con cloruro de calcio 0.2 M, presionando ligeramente unos segundos. La membrana con la impresión dejada por el tejido, fué tratada como Western-blot, usando anticuerpos policlonales dirigidos contra PRP (sbPRP2 de soya) o HRGP (extensina de soya).

INMUNOCITOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA DE LUZ

La inmunolocalización muestra la localización de antígenos usando anticuerpos, que pueden ser proteínas u otros componentes celulares, generalmente en forma insoluble. Muestras de todos los tejidos disecados se fijaron por 24 h en paraformaldehído y 1% glutaraldehído en PBS a 4°C. Después de tres cambios del buffer, los tejidos se deshidrataron con diferentes porcentajes de etanol (10, 30, 50, 70, 90, 96 y 100%), por 30 min en cada cambio. Las secciones fueron cortadas a mano con una navaja de rasurar y montadas en los portaobjetos previamente cubiertos con L-lisina. La inmunocitoquímica fué hecha con la técnica para Western-blot, excepto que la concentración de los anticuerpos primarios fué 1:25 y se incubaron toda la noche. Se lavaron con tris borato de sodio (TBS, Tris 20 mM, cloruro de sodio 0.5 M, pH 7.5) y el segundo anticuerpo fué incubado 1 h. Las muestras se revelaron con buffer AP (Tris HCl ph 9.71, cloruro de magnesio 10 mM y aforado a 10 ml con agua), 33 ml de BCIP y 44 ml de NBT, por un tiempo máximo de 30 min. La reacción se detuvo con agua. Las micrografías fueron tomadas con una película Kodak Ektapress ASA 100. El control fué hecho usando suero preinmune y no se observó ninguna señal en las muestras.

DETERMINACIÓN DE HIDROXIPROLINA

La determinación de Hyp se realizó por el método de Drozd et al. (1976). Cantidades conocidas de las muestras (deshidratadas o en solución) fueron hidrolizadas con 6N HCl, a 120°C por 3 h. Los hidrolizados se secaron en una bomba de vacío con una trampa de NaOH. Las muestras se resuspendieron en un volumen conocido de H₂O. Algunas muestras se centrifugaron 2 min en una microcentrifuga para eliminar el "humus". Con un volumen conocido de las muestras se realizó el ensayo colorimétrico. Estos ensayos se hicieron, por lo menos tres veces. Con la solución estándar de Hyp (5 mg/ml disuelto en H₂O) se realizó la curva de calibración. A cada muestra y a cada estándar de Hyp (0.5 mg y 0.05 mg en 100 ml, de un stock de 5 mg/ml) se le adicionaron 60 ml de buffer de citratos fresco (0.05 g cloramina T, 0.5 ml H₂O, 1.0 ml solución citrato-acetato pH 6.3, 5.7 g NaAcetato·3H₂O, 3.75 g Na₂citrato·3H₂O en 38.5% isopropanol-). Diez min después, se adicionaron 120 ml de buffer 2 (0.5 ml ácido perclórico y 2.5 ml solución p-dimetil amino benzaldehído 5% en isopropanol). Los tubos se colocaron inmediatamente en un baño de agua caliente a 60°C por 20 min. La concentración de hyp de las muestras solubles se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$[\text{Hyp}] = \frac{(\text{O.D. } 560 \text{ muestra})}{a} \cdot 1/b$$

donde

$$1/b = \frac{\log \left[\frac{\text{estándar alto } - 0.5 \text{ mg}}{\text{estándar bajo } - 0.05 \text{ mg}} \right]}{\frac{\text{O.D. } 560 \text{ estándar alto}}{\text{O.D. } 560 \text{ estándar bajo}}}$$

y

$$a = \frac{(\text{O.D. } 560 \text{ estándar alto})}{[\text{Hyp estándar alto}]}$$

La concentración de hyp por microgramo de peso seco de las muestras insolubles fué calculada de acuerdo con la siguiente regla de tres:

$$\begin{array}{l} \text{YYYY } \mu\text{g peso seco} \\ 1 \mu\text{g} \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{WWWW } \mu\text{g hyp} \\ ? \end{array} = \text{ZZZZ } \mu\text{g hyp} / \mu\text{g peso seco}$$

La concentración de hyp por microlitro de solución de las muestras en solución fué calculada con esta regla de tres:

$$\begin{array}{l} \text{Vol usado para la determinación [Hyp]} \\ (\text{fórmula}) = \text{AAAA } \mu\text{g Hyp} \\ 1 \mu\text{l} \end{array} \quad \begin{array}{l} (\text{CCCC } \mu\text{l}) \\ ? \end{array} = \text{BBB } \mu\text{g Hyp} / \mu\text{l CaCl}_2$$

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS

Se armaron las cámaras de electroforesis. Usando guantes, se realizó la mezcla para el gel de corrida al 10% de acrilamida. Con una micropipeta se transfirió la mezcla a la cámara. Se agregó un poco de n-butanol sobre la superficie expuesta del gel. Se dejó polimerizar 1 h. El gel se lavó con agua destilada. Los peines se colocaron. Se preparó la mezcla para el "stacking gel" y se transfirió con una micropipeta. Se dejó polimerizar 30 min. Se quitaron los peines y se lavó perfectamente. Las muestras se hirieron durante 6 min con una solución (2X "magic mix") (1.25 ml 1.5 M Tris pH 6.8, 4 ml 10% SDS, 2 ml glicerol, 1 ml β -mercaptoetanol y 20 ml azul de bromofenol). Un volumen calculado para cada muestra se colocó en cada carril. La cámara se llenó con buffer de corrida 1X (10X :3% Tris, 14.4% glicina y 1% SDS) y se corrieron a 10 mA por 5 h. Algunos geles se tiñeron con plata ("Kit silver stain") según las instrucciones del fabricante (Sigma) y otros con Coomassie (0.4 g azul de Coomassie R-250, 100 ml metanol, 100 ml agua destilada y 14 ml ácido acético glacial). Para los geles teñidos con Coomassie, se usó una solución desteñidora (100 ml agua destilada, 100 ml metanol y 20 ml ácido acético glacial) que se cambió regularmente hasta obtener la definición deseada en las bandas.

TRANSFERENCIA DE SDS-PAGE

Papel filtro y membranas de nitrocelulosa se midieron y se cortaron (7.5 X 9.0 cm). La unidad de transferencia semihúmeda se llenó con buffer de transferencia (1.5 g tris, 7.2 g glicina, 100 ml metanol y aforado a 1 l). El papel filtro, la nitrocelulosa y los geles se embebieron en el buffer 2 min. Se hizo un sandwich para cada gel dentro de la cámara colocando papel filtro, nitrocelulosa, gel y papel filtro. La cámara se tapó y se conectó a la fuente de poder. Los geles se corrieron a 150 mA-50 V por 3 h.

ELECTROFORESIS EN GELES CATIÓNICOS NEUTRALES

Se realizó la mezcla para el gel de corrida (1.94 ml 40% acrilamida, 2 ml buffer de separación pH 6.8 :4X (89.16 g MOPS, 6.6 g KOH, aforado a 500 ml, 1.18 ml de 2% bis-acrilamida, 2.94 ml agua destilada, 40 ml 10% APS, 4 ml TEMED). La mezcla se transfirió y se agregó n-butanol. Se dejó polimerizar. El gel se lavó. Los peines se colocaron. Se preparó la mezcla para el pregel (1.02 ml glicerina, 1.29 ml buffer de staking pH 8.0:4X {1.32 g KOH, 5.27 g MOPS y aforado a 100 ml} -, 0.41 ml 40% acrilamida, 2.05 ml 2% bis-acrilamida, 20.5 ml 10% APS, 6.83 ml TEMED). Se dejó polimerizar. Se quitaron los peines y se lavó el gel. Las muestras se mezclaron con buffer de corrida (0.1 ml β -mercapto etanol, 0.2 ml 20% glicerol, 0.5 ml buffer de apilamiento:4X {0.2 ml agua y 0.015% pironina Y}) y se colocaron los volúmenes calculados por carril. La cámara se llenó con buffer de electrolitos fresco (1X) pH 6.8 (1.552g histidina, 0.42% MOPS) Los geles se corrieron a 10 mA y se tiñeron.

TRANSFERENCIA DE GELES CATIÓNICOS NEUTRALES

La unidad de transferencia semi-húmeda se llenó con buffer de transferencia (10% metanol, 23.28 g histidina, 6.9 g MOPS y aforado a 1500 ml). El papel filtro, la nitrocelulosa y los geles se embebieron en el buffer 2 min. Se hizo un emparedado para cada gel dentro de la cámara. Los geles se corrieron a 150 mA-50 V por 3 h.

WESTERN BLOT

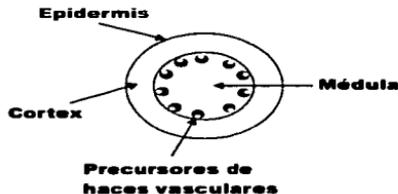
La técnica de Western blot se realizó como lo describe Towbin et al., (1979). Después de realizar la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, la membrana se sumergió en agua y se hirvió 4 min. Se colocó en buffer de bloqueo 1 h a 42°C con agitación. Se lavó con TBS. Se agregó el buffer de bloqueo con anticuerpo policlonal primario a una dilución de 1:10000 (anti-extensina) o de 1:1000 (anti-SbPRP2) y se dejó durante 3 h con agitación. Se lavó con TBS y se agregó buffer de bloqueo (10 ml) con el anticuerpo secundario (anti-conejo) durante 1 h. Se lavó con tris borato de sodio (TBS). Se reveló con buffer AP. La reacción se detuvo con agua.

CRECIMIENTO

MÉTODO CUALITATIVO

IMPRESIÓN DE TEJIDOS

Para conocer la localización de forma rápida y tejido-específica de las proteínas solubles de la pared celular (PRP2 y HRGP) bajo condiciones control y de déficit hídrico, se usó la técnica sencilla y rápida de impresión de tejidos (similar al western blot), en la que se usan cortes de tejidos que se presionan sobre membranas de nitrocelulosa tratadas con cloruro de calcio y el contenido de las células cortadas se transfiere pudiendo localizar de forma tejido-específica, ácidos nucleicos, ciertos carbohidratos y proteínas. (Reid and Pont-Lezica, 1992).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 5. Esquema anatómico representativo de una plántula de frijol seccionada en la región madura que muestra las diferentes zonas anatómicas analizadas.

Para el análisis por impresión de tejidos, las plántulas fueron transplantadas a vermiculita (bien regada o con 1/12 del volumen de agua control) durante diferentes tiempos (0, 1, 24 o 36 h); las plántulas fueron seccionadas en cuatro regiones (división-elongación E1, elongación E2, intermedia y madura). Anticuerpos anti-SbPRP2 y anti-extensina fueron utilizados para visualizar la intensidad de reacción inmune (i.r.i.). Los resultados observados sobre las tiras de nitrocelulosa tratadas con los anticuerpos para las diferentes regiones del hipocotilo se resumen en la tabla 1 (para identificación de tejidos ver fig. 5).

Proteína	t (h)	Región E1 (división-elongación)							
		epidermis		cortex		p.h.v.		médula	
		ctl	def	ctl	def	ctl	def	ctl	def
PRP2	0	-	-	-	++h	-	-	-	-
HRGP	0	+	+	+	+	++h	++h	+	+
	1	-	-	+	+	++h	++h	+	+
	24	+	++p	+	-	++	++	+	+
	36	++	+	+	++	++h	++	++	-
Región E2 (elongación)									
		epidermis		cortex		p.h.v.		médula	
		ctl	def	ctl	def	ctl	def	ctl	def
PRP2	0	+	+	-	-	++h	++p	+	-
HRGP	0	+	+	+	+	++p	++h	+	+
	1	+	+	+	+	++h	++h	+	+
	24	+	+	+	+	-	++	+	+
	36	-	-	-	-	++p	++p	-	+
Región Intermedia									
		epidermis		cortex		p.h.v.		médula	
		ctl	def	ctl	def	ctl	def	ctl	Def
PRP2	0	-	-	-	-	++h	++h	+	-
HRGP	0	-	+	+	+	++h	++p	+	+
	1	+	++h	++	++	++h	++h	+	+
	24	++h	-	-	+	-	++p	+	+
	36	-	-	-	+	++p	-	+	+
Región Madura									
		epidermis		cortex		p.h.v.		médula	
		ctl	def	ctl	def	ctl	def	ctl	Def
PRP2	0	-	-	-	-	++h	++h	-	-
HRGP	0	+	+	+	+	++h	++	+	+
	1	+	++h	++	++	++h	++p	-	-
	24	+	+	+	+	++	++p	-	-
	36	-	-	-	+	++	++p	-	-

Tabla 1. Cinética inmunogénica por impresión de tejidos para observar proteínas solubles de la pared celular durante el crecimiento. Zonas anatómicas en las que hubo reacción inmune a los anticuerpos anti-SbPRP2 o anti- α -extensina en condiciones control (ctl) o de déficit hídrico (def) a diferentes tiempos. El número de determinaciones realizadas para cada punto fue de cuatro repeticiones como mínimo. La intensidad a la reacción inmune (i.r.i.) se expresó en unidades arbitrarias: (-) sin reacción, (+) poca i.r.i., (++) mediana i.r.i. y (+++) alta i.r.i. h = halus, p = reacción inmune puntual, p.h.v. = precusores de haces vasculares.

REGIÓN DE DIVISIÓN-ELONGACIÓN (E1)

Los datos en general, mostraron que para la PRP2 de la región E1, al tiempo 0 hubo un aumento de solubilidad en los p.h.v. de los controles así como en el cortex de los que estaban en condiciones de déficit hídrico, posiblemente por una relocalización desde los p.h.v. como una posible señal de alerta.

En el caso de las HRGP al tiempo 0 y 36 h no se observaron cambios significativos en la i.r.i. ni en los controles ni en los de déficit. Después de 1 h, el patrón es el mismo que los controles aunque hay una alta insolubilización en la epidermis. A las 24 h con déficit hídrico se

observó un incremento de i.r.i. a mediana y puntual en la epidermis y p.h.v., posiblemente por una relocalización de dichas proteínas a este tejido como una posible forma de acción ante la falta de agua; tal vez por eso también la HRGP en cortex se encuentra totalmente insolubilizada.

REGIÓN DE ELONGACIÓN (E2)

En la región E2 las plántulas control y las de déficit hídrico, mostraron para las PRP2 a tiempo 0 una sola variación del i.r.i.: de bajo a nulo en médula bajo condiciones de déficit. Además, la mediana solubilidad en los p.h.v. y la baja i.r.i. en la epidermis pudiera implicar una relocalización. En el caso de las HRGP se observó la presencia con baja i.r.i. en la región del cortex y médula mientras que las PRP2 no. También el aumento a mediana i.r.i. en p.h.v. fue observado en ambas condiciones.

Para las HRGP después de 1 h se observó una disminución a nulo i.r.i. en la epidermis de los de déficit hídrico, lo que implica una mayor insolubilidad a tiempos cortos y un aumento, con respecto al tiempo 0, a mediana i.r.i. para los controles en p.h.v. A las 24 h se observó una disminución de la solubilidad en los p.h.v., con respecto al tiempo anterior, en ambos puntos el control estuvo totalmente insoluble y el de déficit con poca solubilidad. Al parecer, este tiempo de tratamiento está en el límite de lo que la planta puede usar como recurso para sobrevivir, debido a que puede observarse un marchitamiento fuerte y en ocasiones necrosis en esta región; a las 36 h disminuye el i.r.i. en la epidermis aunque aumenta moderadamente en los p.h.v. y se observa la presencia de un halo.

REGIÓN INTERMEDIA

Las PRP2 no mostraron ninguna diferencia del déficit hídrico con respecto al control. Se observó una mediana solubilidad en los p.h.v. bajo ambas condiciones. Las HRGP a tiempo 0 mostraron un ligero aumento de la solubilidad en la epidermis de las plántulas con déficit. Con respecto a las PRP2 se observó un leve aumento a baja solubilidad en cortex y médula y una disminución en p.h.v.

Después de 1 h de déficit hídrico, las HRGP mantuvieron la tendencia aumentar la solubilidad en la epidermis de las plántulas y, además, con un halo. El cortex y p.h.v. también aumentaron la solubilidad con respecto al tiempo 0 (a mediana para ambas condiciones en el cortex y alta con halo para los controles y mediana con halo para los de déficit de los p.h.v.). Es posible que ese incremento y la presencia de otros componentes celulares faciliten la redistribución de las proteínas solubles en los tejidos que van a la periferia del hipocotilo. Sin embargo, el déficit hídrico induce una ligera insolubilización observada en p.h.v. solo después de un lapso de tiempo como el usado en esta cinética.

A las 24 h se observó en epidermis una disminución de la solubilidad de la HRGP en las plántulas con déficit y la presencia de un halo en los controles; lo anterior sugiere una respuesta adelantada e incrementada cuando las condiciones de crecimiento de la plántula no son las óptimas en el caso de este tejido. El cortex y p.h.v. mostraron una disminución de la solubilidad en ambas condiciones con respecto al tiempo anterior (nula i.r.i. en ambos casos), pero mayor para los controles y ligeramente mayor solubilidad en las plántulas con déficit hídrico.

Finalmente, a las 36 h de tratamiento se observó que la insolubilización se mantuvo en la epidermis de ambas condiciones, correlacionando con la misma observación del tiempo anterior, incluso para los p.h.v. El cortex también se mantuvo con baja solubilidad de proteínas. El caso de la médula fue constante en todos los tiempos en esta región independientemente del tratamiento. No hubieron diferencias significativas en estos tejidos a los tiempos de tratamiento.

REGIÓN MADURA

En la región M al tiempo 0 se observó que las PRP2 se mantuvieron con el mismo patrón que en la región intermedia. En cuanto a las HRGP se observó una baja solubilidad en casi todos los tejidos, tanto controles como en déficit, excepto en los p.h.v. de los controles (mediana i.r.i. y halo).

Después de 1 h, las HRGP mostraron un incremento de solubilidad en los p.h.v.; alta y con halo en los controles y mediana y puntual en los de déficit. Esto indica que la solubilidad disminuye ligeramente en las plántulas con déficit. En la médula disminuyó la intensidad (nula) con respecto al tiempo 0, en el caso de los otros tejidos, se mantuvo la misma tendencia que en el tiempo anterior.

A las 24 h deja de observarse el halo que tenían las plántulas en déficit pero se mantiene la misma respuesta. En el cortex de los controles disminuye a nula solubilidad mientras que los de déficit se mantienen con la misma respuesta con respecto al tiempo anterior. Los p.h.v. de los controles disminuyen su solubilidad de alta a mediana (con respecto a 1 h). En esta zona se ven las mayores diferencias (0-36 h) entre los controles y los de déficit hídrico con respecto a la solubilidad; la insolubilización paulatina en los controles posiblemente se deben al proceso del mismo crecimiento pues en condiciones de déficit hídrico la mediana solubilidad se mantiene sin variaciones durante toda la cinética, indicando que en esta zona anatómica permanecen proteínas en forma soluble como una respuesta a condiciones inadecuadas de agua.

Finalmente, a las 36 h las condiciones se igualan en la epidermis el cortex y la médula. Los p.h.v. mostraron un aumento de insolubilidad en las plántulas control mientras que las de déficit se mantuvieron con el mismo comportamiento que a 1 h y a las 24 h.

En general puede resumirse que al tiempo 0 la PRP2 en E1 de las plántulas con déficit hídrico es mayoritaria y muestra halus en cortex, lo que sugiere que dicha localización es resultado de otro tipo de estrés (herida) dando lugar a movimientos transversales hacia regiones más externas como posible señal de alerta. En E2 nuevamente es mayoritaria en p.h.v. para ambas condiciones hídricas, solo que el déficit hídrico deja de mostrar halus indicando que esta condición modifica la solubilidad de los componentes del halus pero no de las proteínas de la pared celular; la epidermis muestra baja solubilidad sugiriendo que su presencia es debida al proceso del crecimiento además que a las condiciones hídricas. Cabe mencionar que la mayor variación en cuanto a solubilidad se observó en la región de elongación, posiblemente debido a la mayor importancia que tiene esta región por ser en la que se están requiriendo proteínas de la pared celular, entre otros. En I y M se observa mayoritariamente en p.h.v. independientemente de las condiciones hídricas.

Para la HRGP en condiciones de déficit hídrico se observa en E1 un incremento transitorio de la solubilidad en la epidermis a las 24 h que no se observa en los controles, sugiriendo una regulación del crecimiento por este tejido; los p.h.v. mostraron un lento decremento de la solubilidad indicando que a mayor tiempo de exposición en estas condiciones la insolubilización se retrasa (con respecto a los controles); el cortex y la médula se mantuvieron sin mucha variación en la solubilidad a lo largo de la cinética. En E2 de los de déficit hídrico en p.h.v. se observa mediana solubilidad con halus casi toda la cinética mientras que en los controles sólo fue un incremento transitorio lo que sugiere que una condición hídrica desfavorable modifica los procesos de insolubilización de la HRGP. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que para los tiempos finales este tejido tiende a la necrosis coincidiendo con el aumento de insolubilidad a las 24 h. De forma comparativa, Ye y Varner (1991) realizaron investigaciones examinando los niveles de mRNA y de las proteínas HRGP y GRP durante el desarrollo de tejidos en soya por medio de tissue printing inmunoblot y tissue printing RNA blots. Disectaron los hipocotilos de plántulas de 3 días en internodos (1° y 2°, elongación; 4° y 6°, células diferenciadas), desde la punta hasta la base. En el primer internodo (0.5 cm) encontraron una alta expresión de la HRGP en las células del cambium y epidermis al igual que la proteína. En el segundo internodo (2 cm), los mRNA de la HRGP se localizaron en cambium y en pocas capas de células del córtex rodeando el floema primario y en algunas células del parénquima alrededor del xilema primario pero no en la epidermis; la proteína desapareció de la epidermis pero se mantuvo coincidiendo con el cambium y las capas del cortex alrededor del floema primario. En general, la HRGP soluble fue abundante en las regiones apicales del hipocotilo y de las raíces jóvenes. Comparando con nuestros resultados, observamos la presencia de la proteína en ambos tejidos en la región E1 en baja proporción al igual que médula pero muy aumentada en p.h.v., lo que coincide en parte con lo encontrado por dichos autores en el segundo internodo, ya que E2 mostró baja deposición en cortex y p.h.v., aunque difiere con aparición en epidermis. Las diferencias en deposición de la proteína pueden deberse a que los anticuerpos no tengan acceso a las HRGP o que se encuentren diluidas por el mismo crecimiento o no puedan ser detectadas o que existan diferencias con respecto a las especies utilizadas o a las condiciones en que se realizaron los ensayos, dando lugar a procesos de insolubilización de las proteínas en la pared celular.

En I de los de déficit hídrico se observa en epidermis un incremento de solubilidad de la HRGP de 0-1 h indicando que la alta solubilidad a tiempos cortos es dirigida por el déficit hídrico mientras que durante el crecimiento esta condición se retrasa. En p.h.v. la máxima solubilidad se observa a 1 h pero en menor proporción que los controles, lo que sugiere que esta condición hídrica induce a una baja insolubilización de la HRGP con respecto a los controles (alta solubilidad), pero la presencia del halus parece ser una condición dirigida por el crecimiento. Cabe mencionar que a tiempos más largos este tejido tiende al marchitamiento que coincide con el aumento de la insolubilidad a las 24 h. En la región M de los de déficit hídrico se observa en epidermis la presencia de halus a 1 h indicando que el déficit hídrico induce la presencia de otros componentes celulares y en consecuencia que el proceso de crecimiento toma vías alternas para la sobrevivencia celular. En p.h.v. se observa un incremento que se mantiene hasta 36 h mientras que los controles muestran un incremento transitorio con halus lo que indica que esta condición hídrica inhibe la presencia del halus e induce a una baja insolubilización donde la presencia del halus parece ser una condición dirigida por el crecimiento. Comparando con los resultados de Ye y Varner (1991), del 4° y 6° internodos, el mRNA HRGP se expresaba solamente en células del cortex al igual que la proteína aunque en algunas ocasiones también se localizó en algunas células del parénquima alrededor del xilema primario, alrededor del floema secundario y epidermis. Lo anterior coincide con nuestros resultados en I al tiempo 0, pues se observó reacción inmune en cortex y p.h.v. aunque no en epidermis. Sin embargo en M, si hubo la presencia de HRGP al tiempo 0 en epidermis, cortex, médula y mayormente en p.h.v.

ANÁLISIS POR INMUNOLocalIZACIÓN

Dado que muchas de las proteínas de la pared celular se insolubilizan debido al manejo y al proceso natural de crecimiento, entonces se debía determinar la localización y comportamiento de las proteínas de la pared celular, tanto solubles como insolubles, bajo condiciones control y de déficit hídrico durante este proceso, por lo que se usó la técnica de inmunolocalización de proteínas. Para el análisis por inmunolocalización, las plántulas fueron transplantadas a vermiculita (bien regada o con un volumen menor de agua). Se cosecharon a diferentes tiempos (0, 1, 24 o 36 h); se fijaron en FAA para después cortarse transversalmente; se utilizaron anticuerpos anti-SbPRP2 y anti-extensina. Los resultados de intensidad de la reacción antigénica de los dos anticuerpos, en función del tiempo para las diferentes regiones del hipocotilo, se resumen en la tabla 2 (las mismas zonas anatómicas de la figura 5 fueron analizadas aquí).

REGIÓN DE DIVISIÓN-ELONGACIÓN (E1)

Los datos en general, muestran que los controles de la región E1 tienen una i.r.i. máxima en cortex y p.h.v. para ambas proteínas a las 24 h de tratamiento que después disminuye. En condiciones de déficit hídrico, la PRP2 tiene su máximo a las 36 h en p.h.v. cuando la HRGP lo alcanza después de 1 h manteniéndolo hasta las 24 h con la misma localización tisular, aunque también se observó que hubo un aumento de i.r.i. en cortex y médula en los mismos tiempos.

Aparentemente, los datos indican que la mayor i.r.i. en la PRP2 está en los p.h.v. desde tiempos muy cercanos a cero pero aparentemente, con un alargamiento (retraso) de la respuesta hasta las 36 h con respecto a los controles. Las HRGP muestran un acortamiento (adelanto) de la respuesta en el mismo tejido y condiciones de crecimiento pero aumentando al cortex en esta respuesta. Lo anterior sugiere un mayor efecto en la respuesta en p.h.v. y posiblemente una mayor participación de la HRGP en esta región a tiempos más cortos que la PRP2.

REGIÓN DE ELONGACIÓN (E2)

La PRP2 de las plántulas control y las de déficit hídrico, en la región E2 mostraron una i.r.i. máxima en cortex, p.h.v. y médula después de 1 h. La HRGP tuvo su máxima i.r.i. tanto para la de los controles como para los de déficit hídrico en médula y p.h.v. a las 24 h. La i.r.i. máxima solo fue observada bajo déficit hídrico y predominantemente en p.h.v. y en menor proporción en médula y cortex.

Los resultados anteriores sugieren una mayor participación de la PRP2 a tiempos cortos (desde el tiempo cero hasta las 24 h) en p.h.v., cortex y médula como un evento de la misma elongación más que por el tratamiento hídrico, mientras que la presencia de la HRGP altamente reactiva sólo se observa bajo el tratamiento de 24 h de déficit hídrico en los mismos tejidos que para la PRP2.

REGIÓN INTERMEDIA

La región I no mostró la presencia de PRP2 en ninguna zona anatómica sino hasta las 24 h. A diferencia de las regiones anteriores, se observó la participación de la epidermis como tejido en el que se encontraron bajos niveles de PRP2, aparentemente con un retraso en la respuesta en condiciones de déficit. El mismo retraso (alargamiento) en la respuesta de los de déficit fue observado para los demás tejidos. La presencia de HRGP en las plántulas con déficit hídrico

mostró un aumento de baja a mediana i.r.i. en p.h.v., de nula a mediana i.r.i. en médula y de nula a baja i.r.i. en cortex; respuestas que se mantuvieron desde las 24 h.

En ensayos previos, se había observado la participación intensa de la PRP2 a tiempos muy cercanos a cero (5 s) en la región de elongación (E2) (datos no mostrados), lo que sugiere que la epidermis funciona como un tejido de control del crecimiento, ya que después de este tiempo de tratamiento se observaba la desaparición de las proteínas y hasta las 24 h se observaba nuevamente una participación (disminuida) de la PRP2 en la epidermis con respecto a la otra región.

REGIÓN MADURA

En esta región se observó la participación de la PRP2 la epidermis, con un retraso de su aparición bajo condiciones de déficit pero con un adelanto de la respuesta en la médula. Los p.h.v. mostraron una solubilidad que fue en aumento transitorio cuando estaban en déficit hídrico iniciando a 1 h, con un máximo a las 24 y terminando a las 36 h; en condiciones control solo se observó una baja i.r.i. constante desde las 24 h. La HRGP mostró diferencias para los de déficit hídrico en la médula (mediano y aumento transitorio) y el cortex (bajo aumento puntual) a las 24 h.

Esta región y la anterior tienen cantidades similares de estas proteínas, lo que sugiere que estas regiones tienen un mayor control del crecimiento a tiempos mayores a 24 h de tratamiento así como la participación de la PRP2 en este control por medio de la epidermis.

En general, la PRP2 se encuentra presente a tiempos cortos en las regiones no diferenciadas pero con mayor intensidad en p.h.v. de E1 (en déficit hídrico se retrasa la respuesta) ya que en E2 la respuesta parece deberse al proceso de elongación más que al déficit hídrico. La región I y M muestran un aumento de i.r.i. a partir de las 24 h, retrasado en I y adelantado en M en condiciones de déficit. Las HRGP muestran una mayor i.r.i. después de 1 h de tratamiento con déficit hídrico en las regiones con células no diferenciadas, específicamente en cortex y p.h.v. La región I muestra la presencia de proteína en p.h.v. y médula mientras que las diferencias en M fueron en médula y cortex. En conclusión, lo anterior sugiere que la localización de la PRP2 en regiones no diferenciadas es una señal inmediata en respuesta a condiciones poco favorables ya que los p.h.v. son las vías de comunicación a toda la planta mientras que la HRGP responde tardíamente y conjuntamente con la PRP2 en tejidos diferenciados, por lo que su función estructural es consecuencia de la posible presencia inicial de la PRP2 en las mismas regiones de la plántula.

		Región E1 (división-elongación)							
		epidermis				cortex			
Proteína	t (h)	cti		def		cti		def	
PRP2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	+	+	-	+
	24	-	-	++	-	+++	+	-	-
	36	-	-	+	-	+	+++	-	+
HRGP	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	+	+	-	-
	24	-	-	++	++	+++	++	++	-
	36	-	-	-	-	++	++	-	-
		Región E2 (elongación)							
		epidermis				cortex			
		cti		def		cti		def	
PRP2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	+	+	++	++	+	+
	24	-	-	+	+	+	+	-	+
	36	-	-	-	-	-	-	-	+
HRGP	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	+	-	-
	24	-	-	-	++	+	+++	+	++
	36	-	-	-	-	-	+	-	-
		Región Intermedia							
		epidermis				cortex			
		cti		def		cti		def	
PRP2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	++	+	++	+	++	-
	36	-	-	+	-	-	-	-	+
HRGP	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	+	+	++	-	++
	36	-	-	-	+	+	++	-	++
		Región Madura							
		epidermis				cortex			
		cti		def		cti		def	
PRP2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	+	++	+	+
	36	+	+	-	+	+	+	-	+
HRGP	0	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	+	+	+	-	++
	36	-	-	-	-	+	+	-	++

Tabla 2. Inmunolocalización de proteínas de la pared celular durante el crecimiento. Zonas anatómicas en las que hubo reacción inmune a los anticuerpos anti-SbPRP2 o anti-estaxarina en condiciones control (cti) o de déficit hídrico (def) a diferentes tiempos. El número de determinaciones realizadas para cada punto fue de cuatro repeticiones como mínimo. La intensidad a la reacción inmune (I.r.) se expresó en unidades arbitrarias: (-) sin reacción, (+) poca I.r., (++) mediana I.r. y (+++) alta I.r. h = halusa, p = reacción inmune puntual, p.h.v. = precursores de haces vasculares.

ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT

Para revelar el comportamiento de las proteínas de la pared celular en condiciones de déficit hídrico durante el crecimiento a nivel molecular, alícuotas de la fracción de proteína total y de la fracción de proteína de la pared celular (ver fig. 4), fueron corridas en geles de SDS o catiónicos neutrales (por la naturaleza positiva de la HRGP). Después de la transferencia, los geles se revelaron usando anticuerpos policlonales anti-SbPRP2 o anti-*extensina* (Towbin et al., 1979). Algunos geles fueron teñidos con Azul de Coomassie y otros con plata. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.

REGIÓN DE DIVISIÓN-ELONGACIÓN (E1)

Los datos mostraron que la HRGP total en plántulas control aumentó transitoriamente de solubilidad (de nula a baja i.r.i.) entre 0-1 h y después dicha fracción dejó de extraerse además de apreciarse una segunda banda de menor PM (ambas bandas con PM determinados entre los 30 y 40 kDa). Bajo condiciones de déficit hídrico también hubo un aumento transitorio a los mismos tiempos pero mucho mayor (de nula a alta i.r.i.) y se observó una banda intensamente teñida a 1 h de tratamiento. La fracción de la pared celular control se mostró insoluble durante toda la cinética mientras que las condiciones de déficit hídrico mostraron el mismo comportamiento que en la fracción total. Los resultados anteriores indican que el déficit hídrico induce la alta solubilidad de las HRGP después de 1 h de tratamiento mientras que el proceso de crecimiento solo requiere baja solubilidad de proteínas totales después del mismo tiempo de tratamiento. El tratamiento sostenido por más de 1 h da como resultado la insolubilización de las HRGP en ambas condiciones.

La PRP2 total en plántulas control mostró una banda que aumentó ligeramente de solubilidad entre 1 y 24 h (nula-baja a baja i.r.i.) mientras que en déficit hídrico hubo la presencia de dos bandas a partir de 1 h de tratamiento con un incremento transitorio mayor a 1 h (nula-baja a baja-media i.r.i.) y un decremento de solubilidad a las 24 h (a baja i.r.i.) que se mantuvo hasta el final de la cinética. Las plántulas de la fracción de la pared mostraron dos bandas al tiempo inicial con tendencia a la insolubilización: mayor para la de bajo PM.

Los resultados anteriores indican que el déficit hídrico induce la alta solubilidad de las HRGP después de 1 h de tratamiento mientras que el proceso normal de crecimiento solo requiere baja solubilidad de proteínas totales después del mismo tiempo de tratamiento. El tratamiento sostenido por más de 1 h da como resultado la insolubilización de las HRGP en ambas condiciones. La aparente contraposición de los resultados obtenidos para las PRP2 indican por una parte, que el déficit hídrico induce un incremento transitorio de solubilidad de las PRP2 después de 1 h de tratamiento y la presencia de otros miembros de la familia de menor PM en la fracción total mientras que el proceso de crecimiento requiere baja solubilidad de proteínas totales a tiempos largos y la presencia de miembros de bajo PM a tiempos menores a 1 h. Por otro lado, la presencia de dos bandas no solo puede indicar que se trata de miembros de la misma familia de la PRP2, aunque hay evidencia previa que así lo sugiere y porque coincide con el rango de pesos moleculares con los de las proteínas P33 y P36. También cabe especular que la segunda proteína de menor PM podría deberse a una proteólisis inducida por el déficit hídrico (constante) o por el proceso de crecimiento (transitoria) (Villanueva, M.A. comunicación personal).

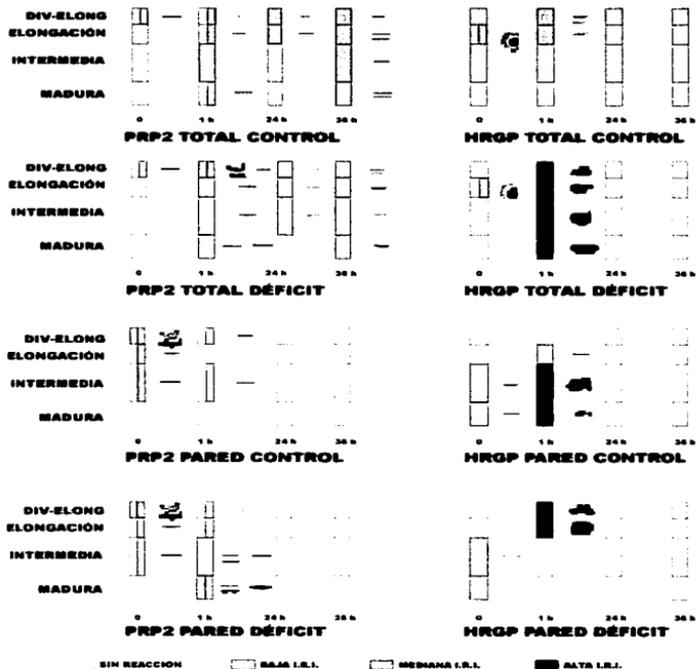


Fig. 4. Western blot de proteínas de la pared celular durante el crecimiento. Esquema en forma de rectángulo del hipocóndrio con las cuatro regiones anatómicas disectadas que muestran la reacción inmune a los anticuerpos anti-DBPRP2 o anti-esterina de las fracciones de proteína total o proteína de la pared celular en condiciones control o de déficit hídrico a diferentes tiempos (0, 1, 24, 36 h). La intensidad a la reacción inmune (I.R.I.) se expresó en unidades arbitrarias. Recuadro sin color = sin reacción inmune, recuadro amarillo = baja I.R.I., recuadro azul = mediana I.R.I., recuadro rojo = alta I.R.I. Las líneas y/o mancha junto a cada recuadro corresponden con las bandas representativas obtenidas de los Western blot para cada región anatómica y tratamiento hídrico.

REGIÓN DE ELONGACIÓN (E2)

La HRGP en la fracción total mostró una banda que incrementó de intensidad (de nula-baja a baja i.r.i.) y se insolubilizó después de 1 h de tratamiento; en condiciones de déficit hídrico, la banda de 1 h incrementó notablemente su solubilidad (de nula-baja a alta i.r.i.) pero a tiempos más largos se insolubilizó. En el caso de la HRGP de la pared celular, bajo condiciones control se observó una banda que tuvo un bajo incremento de solubilidad a 1 h de tratamiento (de nula a baja i.r.i.) y posteriormente se insolubilizó; en condiciones de déficit hídrico se observó el mismo comportamiento pero con un incremento de nula a alta solubilidad en tiempos cortos de tratamiento.

Los datos mostraron una banda para la PRP2 de la fracción total control y de déficit en 1 y 24 h y dos bandas a las 36 h de tratamiento, todas de baja solubilidad, aunque en apariencia, la solubilidad aumentó ligeramente. En el caso de la fracción de la pared celular, la única banda tendió a la insolubilización a tiempos menores de 1 h, mientras que en condiciones de déficit hídrico la insolubilización se observó después de 1 h de tratamiento. Lo anterior muestra que para la PRP2 la fracción citoplásmica se mantiene con baja solubilidad después de 1 h de tratamiento y hasta las 36 h hay la aparición de una segunda proteína de bajo peso molecular, mientras que en la fracción de la pared celular la PRP2 se insolubiliza a tiempos cortos (como máximo 1 h, para el caso del déficit hídrico), lo que significa que una fracción no observable en el citoplasma se mantiene con baja solubilidad y que la proteína que se observa en la fracción no proveniente de la pared celular no corresponde a proteína de la pared y en consecuencia es proteína sintetizada *de novo*. Así, tanto el proceso de crecimiento como el de déficit hídrico muestran gran similitud en el comportamiento proteico para la región de elongación. Para el caso de la HRGP, los datos muestran un comportamiento muy similar tanto en la fracción total como en la de la pared celular pero en los de déficit hídrico hay un incremento muy significativo de la solubilidad después de 1 h de tratamiento. Esto significa que el proceso de crecimiento requiere de baja solubilidad de las HRGP en E2 mientras que el déficit hídrico induce a la alta solubilidad de estas proteínas tanto en la fracción total como en la pared celular, siendo así el tiempo 1 h o menor, un momento crucial para la planta puesto que a mayor tiempo el marchitamiento y necrosis son evidentes en esta región.

Comparando con la región anatómica anterior, la fracción total control de la HRGP mostró que la fracción total control incrementó la solubilidad desde el tiempo inicial pero no se observó la presencia de la segunda banda que muestra E1, la insolubilización se observó en ambas regiones desde las 24 h. En condiciones de déficit hídrico, también se observó el incremento en la solubilidad para E2 desde el tiempo inicial y el mismo incremento de alta solubilidad a 1 h de tratamiento. En cuanto a la fracción de la pared celular, los controles mostraron un incremento de nula a baja solubilidad después de 1 h en E2 mientras que en condiciones de déficit hídrico se observó exactamente el mismo comportamiento para ambas regiones. Para la PRP2 se observó un comportamiento muy similar para ambas regiones, excepto que hubo insolubilización al tiempo inicial y la aparición de una segunda banda a las 36 h de tratamiento, mientras que en condiciones de déficit hídrico hubo un decremento significativo después de 1 h de tratamiento y la presencia de una banda a las 36 h en E2 mientras que en E1 esta segunda proteína de bajo PM se observó desde 1 h de tratamiento y hasta el final de la cinética. En cuanto a la fracción de la pared celular, la PRP2 mostró un decremento de solubilidad al tiempo inicial y después de 1 h se observó otro decremento de solubilidad manteniéndose insoluble hasta el final de la cinética; las plántulas con déficit hídrico

mostraron el mismo decremento en la solubilidad que en los controles pero la nula-baja solubilidad se mantuvo hasta 1 h en ambas regiones.

REGIÓN INTERMEDIA

La HRGP total control se mantuvo insoluble todo el tiempo mientras que en déficit se observó un gran aumento de la solubilidad a 1 h de tratamiento para posteriormente insolubilizarse. La HRGP control de la fracción de la pared celular mostró un aumento de baja a alta solubilidad entre el tiempo inicial y 1 h, después se insolubilizó; en el caso del déficit hídrico hubo una insolubilización a tiempos menores a 1 h. Los resultados obtenidos indican que el crecimiento induce la alta solubilidad proteica en la pared celular mientras que de forma inversa el déficit hídrico induce la alta solubilidad en las proteínas totales mientras que las de la pared celular se insolubilizan, lo que sugiere el entrecruzamiento y agregación en la pared celular de la PRP2 como de la HRGP, pueden funcionar como indicadores de muerte celular próxima en base a condiciones hídricas desfavorables.

La PRP2 total control mostró fluctuaciones entre nula y baja solubilidad durante la cinética. La PRP2 total de las plántulas con déficit hídrico mostró un aumento de nula a baja solubilidad que se mantuvo desde 1 h y hasta el final de la cinética aunque aparentemente la solubilidad parece disminuir con respecto al tiempo. La PRP2 control de la fracción de la pared celular mostró baja solubilidad hasta 1 h e insolubilización después de 24 h. Finalmente, la PRP2 de la fracción de la pared celular con déficit hídrico mostró un aumento transitorio que, después de 1 h tendió a la insolubilización así como la presencia en algunas muestras de una segunda proteína de bajo PM a 1 h. Aparentemente, esta proteína tiene mayor solubilidad. Los resultados indican un ligero aumento de la solubilidad de las proteínas totales en función del tiempo y por otro lado una disminución de la solubilidad de las proteínas de la pared celular en función del tiempo. También se observa que cuantitativamente hay más proteínas solubles bajo condiciones de déficit hídrico que en los controles. Así, durante el crecimiento hay baja solubilidad de proteínas totales y una tendencia a la insolubilización en la fracción de la pared celular mientras que el déficit hídrico mantiene un incremento sostenido de baja solubilidad en la fracción total. Adicionalmente, la fracción de la pared incrementa ligeramente la solubilidad y hace aparecer la proteína de bajo PM a 1 h que después se insolubiliza.

Comparando con la región anatómica anterior, la fracción total control de la HRGP se mantuvo insoluble todo el tiempo, mientras que en déficit se observó un gran aumento de la solubilidad a 1 h de tratamiento para posteriormente insolubilizarse. La HRGP control de la fracción de la pared celular mostró un aumento de baja a alta solubilidad y después la proteína se insolubilizó, pero en el caso de las de déficit hídrico hubo una insolubilización a tiempos menores a 1 h. Los resultados obtenidos indican que el crecimiento induce la alta solubilidad proteica en la pared celular mientras que el déficit hídrico induce la alta solubilidad en las proteínas totales y que las proteínas de la pared celular se insolubilizan. Por otro lado, la PRP2 de la fracción total se mantuvo insoluble al tiempo inicial, incrementó de nula-baja a baja solubilidad a 1 h pero disminuyó de baja a nula solubilidad a las 24 h y no se observó la presencia de la segunda proteína de bajo PM a las 36 h, mientras que en condiciones de déficit hídrico el comportamiento fue muy similar con respecto a E2 con excepción de que no hubo la presencia de la segunda banda a las 36 h. En cuanto a la fracción de la pared celular control, la PRP2 mantuvo el mismo comportamiento al tiempo inicial que en E2 pero mantuvo la baja-nula solubilidad hasta 1 h mientras que en E2 la proteína ya estaba insolubilizada; el

resto de la cinética tuvo el mismo comportamiento para ambas regiones; las plántulas con déficit hídrico mostraron la misma baja solubilidad al tiempo inicial en E2 e I, pero a 1 h de tratamiento I mostró un incremento de nula-baja a baja solubilidad y la presencia en algunas muestras de la segunda proteína de bajo PM.

REGIÓN MADURA

En la región M se observó que la HRGP total en plántulas control se mantuvo insoluble a lo largo de la cinética pero con déficit hídrico se observó una banda que pasó de estar insoluble a alcanzar una notable solubilidad a 1 h de tratamiento. En la fracción de la pared celular, los controles mostraron una banda que aumentó de forma transitoria su solubilidad en la primera hora de tratamiento normal pero en condiciones de déficit hídrico se observó que la única banda se insolubilizó. Así, durante el proceso de crecimiento las proteínas localizadas en la fracción total están insolubles o en cantidades muy pequeñas por lo que no se observan pero en la fracción de la pared celular se observa un incremento en la solubilidad, lo que sugiere que el crecimiento induce el debilitamiento de los enlaces de las proteínas de la pared celular en la primera hora de tratamiento. Por otro lado, el déficit hídrico induce la alta solubilidad de la HRGP en la fracción total después de una hora de tratamiento, pero este incremento no proviene de proteínas *in muro*, sino sintetizadas *de novo*, ya que en la fracción de la pared celular la proteína se insolubiliza a tiempos menores a 1 h, lo que físicamente coincide con el hecho de que la raíz sea más fibrosa.

La PRP2 total de los controles mostró una banda que incrementó la solubilidad y a las 36 h además, se observó una segunda banda; en condiciones de déficit hídrico se observó una banda que aumentó transitoriamente a 1 h de tratamiento y nuevamente a las 36 h. En cuanto a la PRP2 de pared en plántulas control se observó una total insolubilización, pero con déficit hídrico se observó una o dos bandas que incrementaron transitoriamente de solubilidad a 1 h de tratamiento. Los resultados anteriores indican que el proceso del crecimiento requiere, en general, de baja solubilidad de la PRP2 de la fracción total y solo hasta después de 36 h de tratamiento es que se requiere la presencia de una segunda proteína de bajo PM pero las proteínas localizadas en la pared celular se mantienen insolubles, sugiriendo que las proteínas solubles en citoplasma se sintetizaron *de novo* y su origen no es proveniente de la pared celular. De forma similar, el déficit hídrico, requiere de una baja solubilidad en la fracción citoplásmica, pero no se observa la participación de una segunda proteína de bajo PM, aunque la fracción de la pared celular muestra un incremento importante en la solubilidad a 1 h de tratamiento; lo anterior sugiere que el déficit hídrico induce una alta solubilidad de la PRP2 a tiempos cortos como indicador de la poca cantidad de agua en el suelo y que con el tiempo dará como resultado una insolubilización generalizada.

Comparando con la región anatómica anterior, todas las fracciones de la HRGP mostraron el mismo comportamiento que esta región. La fracción total control de la HRGP mostró insolubilización desde el tiempo inicial. En condiciones de déficit hídrico, se observó insolubilización al tiempo inicial y un incremento a alta solubilidad de una banda a 1 h de tratamiento. En cuanto a la fracción de la pared celular, los controles mostraron una banda con baja solubilidad al tiempo inicial y un incremento de esta a alta solubilidad a 1 h; y en condiciones de déficit hídrico, se observó una banda con baja solubilidad inicial e insolubilización el resto de la cinética.

Para la PRP2, la fracción total control mostró una banda que disminuyó de solubilidad a 1 h y el resto de la cinética se mantuvo con la misma tendencia, excepto que, se observó la presencia de la segunda proteína de bajo PM a las 36 h. En condiciones de déficit hídrico, el comportamiento fue muy similar, solo que a las 24 h hubo insolubilización de la única banda. En cuanto a la fracción de la pared celular control, la PRP2 mostró insolubilización de la banda desde el tiempo inicial mientras que la región anterior mantuvo una banda hasta 1 h de tratamiento; las plántulas con déficit hídrico mostraron insolubilización al tiempo inicial; pero a 1 h de tratamiento, se observaron una o dos bandas que incrementaron la solubilidad, pero la segunda proteína de bajo PM mostró un incremento diferencial con mayor solubilidad que la banda de alto PM.

Resumiendo, durante el crecimiento la PRP2 total tiene una nula o baja solubilidad en la región E1 y conforme se va alejando, tiende a la insolubilización. Después de 1 y 36 h se incrementa cualitativamente la solubilidad; además, en E2 y M hay la presencia de una proteína de bajo PM a las 36 h. Por otro lado, la PRP2 localizada en la pared celular se insolubiliza a tiempos mayores a 1 h, excepto en E2 en donde se insolubilizó a tiempos menores a 1h y M que se mantuvo insoluble todo el tiempo. Cabe mencionar la presencia de una segunda banda de bajo PM e incrementada diferencialmente con respecto a la de mayor PM en E1 al tiempo inicial. Lo anterior sugiere que el crecimiento mantiene soluble a la PRP2 total porque es sintetizada *de novo* y podría transportarse e insolubilizarse rápidamente en la pared celular, o bien, moverse de las regiones maduras hacia las inmaduras M₁ como se observa a 1 h y 24 h de tratamiento. En cuanto a la PRP2 de la pared celular, el crecimiento la mantiene soluble sólo al tiempo inicial, y mayormente, en la región E1, en donde se observa una segunda proteína de bajo PM con alta solubilidad, pero a tiempos mayores hay insolubilización. En cuanto a la HRGP, hay una tendencia a la insolubilización a tiempos cortos. Durante el crecimiento, la HRGP se mantiene soluble hasta 1 h.: la fracción total sólo es soluble en la región indiferenciada (E1 y E2), mientras que la pared celular muestra solubilidad de la proteína en la región diferenciada (I y M), mostrando incluso un incremento en la solubilidad a 1 h en estas regiones. Lo anterior sugiere que el crecimiento favorece la alta solubilidad de la pared celular en la región diferenciada en la primera hora de tratamiento y la proteína no proveniente de la pared celular sintetizada en bajas cantidades muy posiblemente es transportada totalmente a la pared celular en donde se insolubiliza.

En condiciones hídricas desfavorables, la PRP2 muestra un incremento en la solubilidad citoplásmica a 1 h de tratamiento en todas las regiones y la presencia de la proteína de bajo PM en la región E1 a partir de 1 h y hasta el final de la cinética. En la fracción de la pared celular también hay la presencia de la proteína soluble pero solo hasta la primera hora de tratamiento y posteriormente se insolubiliza en todas las regiones. Además, la presencia de la proteína de bajo PM sólo se observa en I y M con una solubilidad cualitativamente mayor que la de alto PM. Lo anterior es indicativo de que el déficit hídrico induce a la insolubilización de la PRP2 de la pared celular después de 1 h de tratamiento, así como de la proteína de bajo PM en E1 desde tiempos cortos en la fracción total y en la fracción de la pared celular de I y M. En el caso de la HRGP, el tiempo es un factor importante para la solubilidad de la proteína. La HRGP durante condiciones de déficit hídrico mostró un incremento importante en la solubilidad de la proteína citoplásmica de todas las regiones en la primera hora mientras que la pared celular sólo incremento la solubilidad en igual magnitud en E1 y E2 mientras que las regiones restantes tendieron a la insolubilización.

MÉTODO CUANTITATIVO

ANÁLISIS DE LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y DE HIDROXIPROLINA

Para conocer la cantidad de las proteínas ricas en hidroxiprolina (PRP2 y HRGP) en función de las proteínas totales y de la cantidad de proteínas de la pared celular en forma insoluble, se hizo la determinación de proteínas totales y de hidroxiprolina. Las plántulas fueron sometidas por diferentes tiempos a condiciones controladas hídricamente o con déficit hídrico, los hypocotilos se cortaron en las diferentes regiones y el tejido se homogeneizó, centrifugó y lavó exhaustivamente, para el caso de las proteínas de la pared celular. En el caso de las proteínas totales, el tejido homogeneizado se centrifugó una vez y en ambos casos se separó el sobrenadante de la pastilla (pellet), el primero se guardó a -70°C y el segundo se secó para conocer el peso seco de las (pellet), realizó la determinación de proteínas totales según el método de Bradford (Bradford, 1976) y la determinación de hidroxiprolina (Hyp) por el método de Drozd et al. (1976). Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 595 nm o a 560 nm de absorbancia con luz visible para uno u otro método (Fig. 4). Finalmente se hicieron los cálculos necesarios para conocer las cantidades de proteína total o de la pared celular (μg proteína o Hyp/ μg peso seco o μg de proteína o Hyp/ μl CaCl_2), y finalmente la relación hidroxiprolina/proteína. Los datos fueron agrupados en cuatro rangos arbitrarios de solubilidad (insoluble, baja, mediana y alta solubilidad) y tres tipos de resultados: 1) relación hidroxiprolina/proteína soluble total y de la pared celular, 2) hidroxiprolina insoluble de la pared, y 3) proteína soluble total y de la pared, cada uno para las condiciones control y de déficit hídrico. Los datos del tipo 3 indican la solubilidad (en función de la cantidad) y localización de las proteínas totales (citoplásmicas y de la pared celular) o de la pared celular. Al hacer la relación hidroxiprolina/proteína, los datos del tipo 1 indican cuánta de la proteína total obtenida (tipo 3) se encuentra como proteína hidroxilada (PRP2 y/o HRGP) en cada una de las regiones del hypocotilo. Finalmente, los datos del tipo 2 nos indican cuánta proteína hidroxilada está insoluble en la pared y el tipo de enlaces que tiene, por lo que la alta solubilidad indicará enlaces fuertes pero hidrolizables y la mediana solubilidad indicará un tipo de enlaces más fuertes (menos hidrolizables). Así, los datos del tipo 2 y 3 son comparables con los del tipo 1. Los resultados obtenidos en este experimento se resumen en la figura 7.

REGIÓN DE DIVISIÓN-ELONGACIÓN (E1)

Los datos control y con déficit hídrico del tipo 3 de la fracción total no mostraron cambios en la solubilidad de proteínas con respecto al tiempo. La fracción de la pared celular control mostró un aumento a baja solubilidad después de 24 h de tratamiento mientras que este aumento no se observó con déficit hídrico. Los datos control del tipo 1 en la fracción total mostraron insolubilidad mientras la fracción de la pared mostró una baja solubilidad que a las 24 h disminuyó y a las 36 h volvió a aumentar. En cuanto a las plántulas con déficit hídrico se observó en la fracción total un aumento transitorio hasta mediana solubilidad a las 24 h y su

posterior disminución mientras que en la fracción de la pared celular se observó un aumento sostenido a mediana solubilidad desde 1 h de tratamiento. Los datos control del tipo 2 mostraron una disminución transitoria de la extraibilidad de proteínas insolubilizadas en la pared celular después de 1 h de tratamiento pero después se mantienen con alta solubilidad hasta las 36 h; en el caso de los datos obtenidos con déficit hídrico se observó una alta solubilidad a lo largo de todo el tiempo.

Los datos en general, muestran que en la región E1 las proteínas solubles de la pared celular están insolubles cuando perciben el déficit hídrico (no hay aumento en la solubilidad a las 24 h como en los controles). En la relación hyp/prot, el déficit hídrico disminuye la insolubilidad de las proteínas solubles totales de forma transitorio (máxima solubilidad a las 24 h) y después aumenta (baja solubilidad) mientras que la fracción de la pared muestra un aumento más rápido (desde 1 h del tratamiento) y la mantiene hasta las 36 h. Lo anterior sugiere que las proteínas hidroxiladas en condiciones de déficit hídrico son del tipo HRGP mientras que durante el crecimiento hay una participación conjunta de HRGP como de PRP2 (fig. 6, HRGP pared déficit, HRGP pared control y PRP2 pared control). Los resultados de hyp insoluble control indican que una fracción importante de la proteína soluble se insolubiliza y cambia el tipo de enlace por uno más fuerte durante el crecimiento; mientras que durante el déficit hídrico el aumento en la hidroxiprolina soluble no tiene efecto en la extraibilidad de la hyp insoluble. Posiblemente las modificaciones observadas para los datos del tipo 2 en condiciones control son eventos de la misma fisiología de la pared celular durante el crecimiento pero cuando las condiciones hídricas son desfavorables dichos eventos se ven alterados (fig. 7; ver como complemento la tabla 2).

REGIÓN DE ELONGACIÓN (E2)

Las plántulas control en la región E2 mostraron para los datos del tipo 3 de la fracción total una baja solubilidad inicial y después su insolubilización, mientras que la fracción de la pared celular también mostró baja solubilidad inicial, después insolubilización, y a las 24-36 h, nuevamente baja solubilidad. En la relación del tipo 1 total se observó una constante insolubilidad, mientras que en la fracción de la pared celular se observó insolubilidad hasta 1 h y después un aumento a baja solubilidad. Para los datos del tipo 2 se observó una alta solubilidad a lo largo de la cinética.

Las plántulas con déficit hídrico mostraron para los datos del tipo 3 y 1 de la fracción total y de la pared celular la misma tendencia que los controles. Para los del tipo 2 se observó una mediana solubilidad inicial y después un incremento de esta a lo largo de la cinética.

Los datos en general, muestran que en la región E2 las proteínas solubles y las hidroxiladas de la fracción total y de la pared celular tienen el mismo comportamiento durante el crecimiento normal que en condiciones de déficit hídrico. Lo anterior sugiere el déficit hídrico no es un factor que dé lugar a cambios cuantitativos proteínicos, sino más bien, dichos cambios son inducidos por las condiciones del mismo crecimiento. Los resultados de hyp insoluble indican que una fracción importante de la proteína soluble se insolubiliza y tiene un tipo de enlace inicial más fuerte con relación a los tiempos siguientes en la cinética; posiblemente estas modificaciones también son parte de la misma fisiología de la pared celular durante el crecimiento en esta región anatómica (fig. 7).

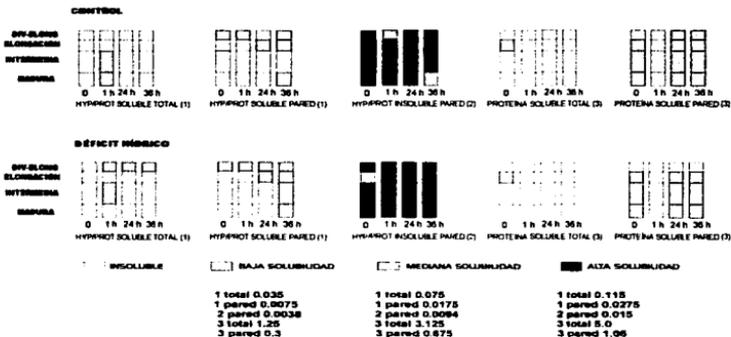


Fig. 7. Determinación de la relación hidrosiprotina/proteína durante el crecimiento. Esquema en forma de rectángulo del hipocotilo con las cuatro regiones anatómicas diseccionadas que muestran la solubilidad obtenida para las fracciones de proteína total y de la pared celular tanto solubles como insolubles de plantas sometidas por tiempos diferentes (0, 1, 24, 36 h) a condiciones control o de déficit hídrico. La solubilidad se expresó en $\mu\text{g hipuril CaCl}_2$ para las relaciones hiproprot soluble total (1) y las fracciones de proteína soluble (3) y en $\mu\text{g hipuril}$ peso seco para las relaciones hiproprot insolubles de la pared celular (2). Recuadro sin color = insoluble, recuadro amarillo = baja solubilidad, recuadro azul = mediana solubilidad, recuadro rojo = alta solubilidad. Los rangos de los datos de cada tipo (1, 2, 3) se muestran debajo del recuadro al que corresponde su solubilidad.

REGIÓN INTERMEDIA

Las plántulas control en la región I mostraron para el tipo 3 insolubilización todo el tiempo mientras que la fracción de la pared celular también mostró igual comportamiento que Para E2. En la relación tipo 1 de la fracción total se observó una insolubilización inicial con un incremento transitorio a mediana solubilidad a la primera hora de tratamiento y después disminuyó mientras que para la fracción de la pared se observó una constante insolubilización. También para los datos del tipo 2 se observó una constante alta solubilidad.

Las plántulas con déficit hídrico mostraron para los datos del tipo 3 de la fracción total y de la pared celular la misma tendencia que para la región anatómica anterior. Para la relación tipo 1 de la fracción total se observó insolubilización inicial con un aumento transitorio a baja solubilidad e insolubilización en los tiempos restantes de la cinética. Para la fracción de la pared celular se observó insolubilización sostenida hasta las 24 h y a las 36 h un incremento a

baja solubilidad. Para los datos del tipo 2 se observó una alta solubilidad a lo largo de la cinética (fig. 7).

Los datos en general, muestran que la región I se comporta de forma muy similar a la región E2 y a las proteínas solubles e hidroxiladas insolubles de los controles. Lo anterior sugiere que ni el déficit hídrico ni la región anatómica son factores que modifiquen cuantitativamente las proteínas durante el crecimiento. Los resultados de hyp insoluble no indican variaciones con respecto al tiempo de tratamiento.

REGIÓN MADURA

Las plántulas control en la región M mostraron para los datos del tipo 3 de la fracción total una insolubilización constante mientras que la fracción de la pared celular también mostró igual comportamiento que para E2 e I. En la relación tipo 1 de la fracción total se observó insolubilidad inicial con un aumento transitorio a 1 h y después una disminución mientras que para la fracción de la pared se observó insolubilidad constante. Para los datos del tipo 2 se observó una constante alta solubilidad y después una disminución a mediana solubilidad después de 36 h de tratamiento.

Las plántulas con déficit hídrico mostraron para la relación del tipo 3 de la fracción total y de la pared celular las mismas tendencias que para las regiones anatómicas E2 e I así como para las condiciones controladas. En la relación tipo 1 de la fracción total se observó insolubilidad constante y para la fracción de la pared celular se observó insolubilización sostenida hasta las 24 h, y a las 36 h, un incremento a baja solubilidad. Para los datos del tipo 2 se observó el mismo comportamiento que para I.

Los datos en general, muestran que la región M se comporta de forma muy similar a la región E2 y a las proteínas solubles e hidroxiladas solubles de la pared durante el crecimiento. Lo anterior sugiere un comportamiento uniforme en función del tiempo que no es debido al déficit hídrico. El aumento en la solubilidad de proteínas hidroxiladas de los controles sugieren que este se debe al crecimiento. Finalmente, los resultados de hyp insoluble muestran variaciones en la solubilidad después de 36 h cuando las condiciones hídricas son favorables, pero cuando no son favorables esta variación no se presenta, lo que sugiere que el crecimiento es el que afecta la cualidad en los enlaces de las proteínas hidroxiladas a tiempos cortos pero no así cuando las condiciones hídricas son desfavorables (fig. 7).

El análisis de la determinación de proteínas totales y de hidroxiprolina fué usado para conocer la cantidad de proteínas ricas en hidroxiprolina (PRP2 y HRGP) en función de las proteínas totales y de la cantidad de proteínas de la pared celular en forma insoluble. En resumen, se observó que la proteína soluble de la fracción total tiende a estar insoluble o a insolubilizarse (región E2) independientemente del tratamiento hídrico. La fracción de la pared tendió a la insolubilización en E1 y a la baja solubilidad en las demás regiones excepto en los controles, donde se observó una baja solubilidad en todas las regiones anatómicas entre las 24 y 36 h. En la relación hyp/prot se observaron variaciones en la solubilidad debidas al déficit hídrico, como fueron la disminución de ésta después de 1 h de tratamiento en la fracción total de las regiones diferenciadas y el aumento transitorio en E1. La fracción de la pared mostró un aumento paulatino en la solubilidad bajo condiciones de déficit hídrico en todas las regiones anatómicas. Finalmente, los datos de las proteínas hidroxiladas insolubles en la pared celular indicaron que el déficit hídrico afectó la cualidad en los enlaces entre estas proteínas ya que se observaron cambios en la solubilidad bajo condiciones controladas hídricamente. Los datos sugieren que las proteínas hidroxiladas que tienen mayor participación en condiciones de déficit hídrico son HRGP, mientras que en condiciones hídricas controladas, la participación es conjunta para la HRGP y la PRP2 (ver fig. 5), donde aparentemente el crecimiento es el que tiene el mayor efecto sobre la estructura final de las proteínas de la pared celular. Sin embargo, las variaciones en la solubilidad parecen estar ligadas en mayor proporción con el déficit hídrico que con el crecimiento.

Otra forma de explicar las diferencias en cantidad de proteínas hidroxiladas fue sugerida por Carpita (1986), quien menciona que en coleoptilos de maíz de 2 y 4 días, donde las cantidades de prolina, fenilalanina y tirosina a las 12 h de haberlos marcado con aminoácidos- C^{14} eran muy similares y los aminoácidos aromáticos mostraban una mayor incorporación en secciones de coleoptilos viejos mientras que en la región de elongación era reducida. Ambos aminoácidos se acumulaban a índices más rápidos de los que podían ser usados, lo que posiblemente pudo deberse a un incremento artificial en la pozas citoplásmicas que podrían inducir una vía de "detoxificación" alternativa además de la incorporación a material no identificado.

HERIDA

Un estrés biótico o abiótico ejerce un efecto desventajoso en el crecimiento de las plantas. Las heridas al igual que la sequía u otros factores ambientales son un estrés abiótico que altera el crecimiento y desarrollo de las plantas (Colmenero-Flores, 1997). El diseño de este experimento se realizó por la sospecha de que las raíces de las plántulas crecidas en la oscuridad al ser trasplantadas a la vermiculita podían haber sufrido algún tipo de herida y los resultados que observábamos eran efecto de la herida más que del déficit hídrico. Así, plántulas de frijol crecidas en la oscuridad y seccionadas hasta la raíz principal con la ayuda de una navaja, luego las plántulas fueron trasplantadas a vermiculita (bien regada o con 1/12 del volumen de agua control) durante diferentes tiempos (0, 1, 12 h); las plántulas fueron seccionadas en cuatro regiones (división-elongación E1, elongación E2, intermedia I y madura M). Se realizó el protocolo para western blot. Anticuerpos anti-SbPRP2 fueron utilizados para visualizar las bandas. Los resultados observados sobre las tiras de nitrocelulosa tratadas con los anticuerpos para las diferentes regiones del hipocotilo se muestran en la figura 8 (para identificación de tejidos ver figura 5).

REGION DIVISIÓN-ELONGACIÓN (E1)

La figura 8 muestra que en plántulas control hay una tendencia al incremento en la solubilidad de las proteínas totales mientras que las proteínas de la pared celular tienden a la insolubilización, primero de las proteínas de bajo PM y posteriormente a las de alto PM. Durante el déficit hídrico, la tendencia es hacia el incremento rápido (1 h) en la solubilidad de las proteínas totales así como a la presencia de proteínas de bajo PM. En el caso de las proteínas de la pared celular, la tendencia es la misma que durante el crecimiento. En condiciones de herida la tendencia es hacia la rápida solubilidad y posterior insolubilización en las proteínas totales mientras que las proteínas de la pared celular tienden a la alta solubilidad y a la insolubilización diferencial: primero las de bajo PM y después las de alto PM.

REGIÓN ELONGACIÓN (E2)

Los datos de la región E2 mostraron que durante el crecimiento hay una tendencia al incremento en la solubilidad de las proteínas totales mientras que las proteínas de la pared celular tienden a una rápida insolubilización. Durante el déficit hídrico, la tendencia es hacia el incremento sostenido de la solubilidad de las proteínas totales; en el caso de las proteínas de la pared celular, la tendencia es a una lenta insolubilización. En condiciones de herida la tendencia es hacia la rápida solubilidad (en los primeros minutos) y a la posterior insolubilización de las proteínas totales mientras que las proteínas de la pared celular se mantuvieron insolubilizadas.

REGIÓN INTERMEDIA (I)

Los datos de la región I mostraron que durante el crecimiento hay un incremento transitorio en la solubilidad de las proteínas totales mientras que las proteínas de la pared celular tienden a la insolubilización. Durante el déficit hídrico, la tendencia es hacia el incremento sostenido de la solubilidad de las proteínas totales mientras que las proteínas de la pared celular muestran un incremento transitorio con su máxima solubilidad a 1 h y posteriormente se insolubiliza. En condiciones de herida, la tendencia es mantener la insolubilización de las proteínas totales e insolubilizar las proteínas de la pared celular.

REGIÓN MADURA (M)

Los datos de la región M mostraron para las tres condiciones nula i.r.i. en la fracción de proteínas totales y de la pared celular. Los datos mostrados en la figura 7 indican que durante el crecimiento hay un incremento transitorio en la solubilidad de las proteínas totales mientras que las proteínas de la pared celular se mantienen insolubles. Durante el déficit hídrico, la tendencia es hacia el incremento transitorio y ligeramente mayor que durante el crecimiento en la solubilidad de las proteínas totales, mientras que las proteínas de la pared celular muestran un incremento transitorio mayor que las proteínas totales con su máxima solubilidad a 1 h y la presencia alternativa de una o dos bandas que posteriormente se insolubilizan. En condiciones de herida la tendencia es mantener la insolubilización de las proteínas totales y de la pared celular.

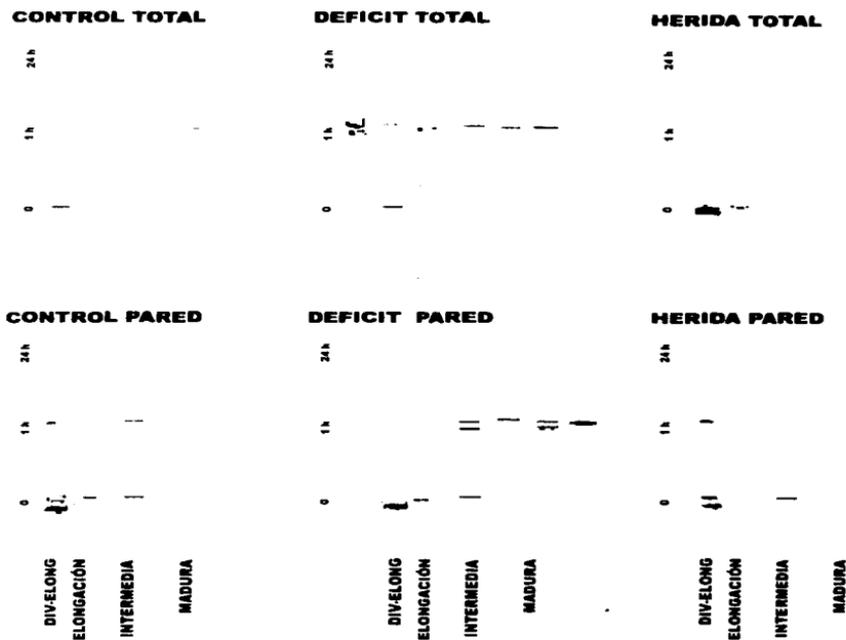


Fig. 8. Western blot de proteínas de la pared celular con herida. Se muestra la reacción inmune a los anticuerpos anti-SbPRP2 de las fracciones de proteína total y de la pared celular en condiciones control (ct), de déficit hídrico (déf) o después de provocar una herida (h) al nivel de la raíz principal y mantenidas en esta condición por diferentes tiempos (0, 1, 24 h). Las líneas y/o manchas corresponden con las bandas obtenidas de los Western blot para cada región anatómica y tratamiento hídrico.

DESARROLLO

MÉTODO CUALITATIVO

IMPRESIÓN DE TEJIDOS

Para conocer la localización de forma rápida y tejido-específica de la HRGP soluble de la pared celular y de una proteína arabinogalactana (AGP) bajo condiciones control o con déficit hídrico durante el desarrollo se usó la técnica de impresión de tejidos. Esta técnica fué la misma que en la sección de crecimiento, solo que para este análisis se utilizaron plantas adultas, primero transplantadas a vermiculita (bien regada o con 1/12 del volumen de agua que para los controles) e inoculadas con *Rhizobium tropici* para producir nódulos. Los resultados se analizaron después de 8, 15 o 21 días. Las plantas fueron seccionadas en cinco-seis zonas anatómicas: nódulo (después de 15 días), raíz secundaria, raíz primaria, tallo-raíz, tallo e internodo. Se utilizaron anticuerpos anti-Jim5 y anti-extensina para visualizar la intensidad de reacción inmune (i.r.i.) en cada tejido. El anticuerpo Jim5 reconoce carbohidratos específicos en las proteínas arabinogalactanas (AGP), el cual fue usado para conocer la relación de las proteínas de la pared celular con otros componentes de la misma (entrecruzamiento de macromoléculas), de la membrana plasmática, de la matriz extracelular (identidad celular y en la comunicación célula-célula -Kreuger and van-Holst, 1996-) o con gomas y exudados (excretadas durante la producción de heridas -halus-), y su regulación durante el desarrollo y en condiciones de déficit hídrico. Las AGP también son proteínas ricas en hidroxiprolina. Los resultados observados sobre las tiras de nitrocelulosa tratadas con los anticuerpos para los diferentes tejidos de la planta se resumen en la tabla 3 (para identificación de regiones ver fig. 9).



Fig. 9. Esquema de los tejidos observados en tres de las zonas anatómicas representativas seccionadas de las plantas del frijol.

Prot	t (días)	NÓDULO (N)						Prot	t (días)	TALLO-RAÍZ (TR)										
		Cortex		Tej. Vasc.		Tej. Infect.				Epidermis		Cortex		Endodermis		H. Vasc.				
		Ctl	Déf	Ctl	Déf	Ctl	Déf			Ctl	Déf	Ctl	Déf	Ctl	Déf	Ctl	Déf			
AGP	8	Sn	Sn	Sn	Sn	Sn	Sn	AGP	8	-	-	+	-	+	++	-	-			
	15	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd		15	-	-	-	-	-	++	-	+			
	21	+	-	+	+	-	+		21	+	-	+	-	+	+	-	-			
HRGP	8	Sn	Sn	Sn	Sn	Sn	Sn	HRGP	8	+	+	-	-	++	++h	+	+			
	15	+++	++	++	+	+	-		15	+	++	+	++h	+	++	++	+			
	21	+++	+++	++	+++	++h	++h		21	+	+	+	-	++	++	+	-			
RAÍZ SECUNDARIA (RS)								TALLO (T)												
		Epidermis		Cortex		Endodermis		H. Vasc.				Epidermis		Cortex		H. Vasc.		Médula		
		Ctl	Déf	Ctl	Déf	Ctl	Déf	Ctl	Déf			Ctl	Déf	Ctl	Déf	Ctl	Déf	Ctl	Déf	
AGP	8	-	-	-	-	-	-	-	-	AGP	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-		15	-	-	-	-	++	++	+	+	
	21	-	-	+	-	-	-	-	-		21	-	-	-	++h	+	++	-	-	
HRGP	8	+	+++	-	-	++	-	-	-	HRGP	8	-	-	-	-	++h	++h	-	-	
	15	+	-	+	-	-	++	-	-		15	-	+	+	+	+	++	+	+	
	21	++	-	++	++h	+	-	++h	++h		21	-	-	-	++h	++	++	+	-	
RAÍZ PRIMARIA (RP)								INTERNODO (I)												
		Epidermis		Cortex		Endodermis		H. Vasc.				Epidermis		Cortex		H. Vasc.		Médula		
		Ctl	Déf	Ctl	Déf	Ctl	Déf	Ctl	Déf			Ctl	Déf	Ctl	Déf	Ctl	Déf	Ctl	Déf	
AGP	8	-	-	-	-	++	-	-	-	AGP	8	+	+	-	+	++	+	-	-	
	15	-	-	+	-	-	+	-	-		15	+	-	+	-	+	+	-	-	
	21	-	+	-	-	+	+	-	-		21	-	-	-	-	++	+	-	-	
HRGP	8	-	+	-	-	++	+	+	+	HRGP	8	-	+	+	+	++h	++	+	+	
	15	+	+	++h	-	+	+	+	+		15	-	+	++h	++h	++	+	-	-	
	21	+	++	+	++h	++	++	+	++		21	+	+	-	+	++	++	-	-	

Tabla 3. Cinética inmunogénica por impresión de tejidos para observar proteínas solubles de la pared celular durante el desarrollo. Regiones anatómicas en las que hubo reacción inmune a los anticuerpos anti-Jim5 (AGP) o anti-extendedina (HRGP) en condiciones control o de déficit hídrico a diferentes tiempos. La intensidad a la reacción inmune (i.r.i.) se expresó en unidades arbitrarias: (-) sin reacción, (+) poca i.r.i., (++) mediana i.r.i. y (+++) alta i.r.i. sn = sin nódulos, nd= no determinado, h = halus, p = reacción inmune puntual, Tej. Vasc. = tejido vascular, Tej. Infect. = tejido infectado formando bacteroides, H. Vasc. = haces vasculares.

ZONA DEL NÓDULO (N)

La AGP de las plantas control mostró nula-baja solubilidad en cortex, baja solubilidad en tej. vasc. y nula en tej. infect., mientras que en las plantas con déficit hídrico se mostró una disminución a nula solubilidad en cortex y nula-baja en tej. vasc. y un incremento en tej. infect. a los 22 días de tratamiento. En el caso de la HRGP se observó en los controles una disminución desde alta hasta baja solubilidad en cortex, tej. vasc. y tej. infect., respectivamente, y en las plantas con déficit hídrico se observó la misma disminución pero desde mediana hasta nula i.r.i. en los mismos tejidos. Después de 22 días de tratamiento, se observó el mismo patrón para el cortex y tej. vasc. que en el tiempo anterior y un incremento a mediana i.r.i. con halus en tej. infect. en los controles pero no así para los de déficit hídrico, los cuales mostraron un incremento en los tres tejidos con respecto al tiempo anterior. Sin embargo en comparación con los controles solo en tej. vasc. se observó un aumento que posiblemente se debe al tratamiento.

Los datos en general, mostraron que la HRGP en N es la proteína de mayor presencia en forma soluble, sobre todo en la región del cortex y con una visible disminución conforme el tejido tiene una localización más interna. Por otro lado, la presencia de halus en el tejido infectado a los 22 días es indicativo de la presencia de otros componentes celulares o del propio tejido infectado, el cual aparece por las condiciones del desarrollo y no del déficit hídrico.

ZONA DE LA RAÍZ SECUNDARIA (RS)

Las plantas control y las de déficit hídrico, mostraron para la AGP en todos los tejidos una nula i.r.i. y solo a los 22 d una sola variación del i.r.i. de nulo a bajo en el cortex de los controles. Para las HRGP se observó un aumento de la i.r.i. en función del tiempo en la epidermis y el cortex de los controles; la endodermis y los h. vasc. Mostraron un bajo y lento incremento de la i.r.i. Para las plantas con déficit hídrico se observó en epidermis y endodermis una disminución importante en la i.r.i. (de alta a nula). El cortex y h. vasc. mostraron la misma tendencia al incremento pero más lento (de nula a nula-baja) y con la presencia de halus a los 22 días.

En general se observa una total insolubilización de la AGP a lo largo del tiempo en todos los tejidos mientras que la HRGP tiene comportamientos similares en epidermis-endodermis y cortex-h. vasc., tanto de los controles, como de los de déficit hídrico aunque con localizaciones de solubilidad diferentes en cada caso. Esto sugiere que esta zona anatómica es muy sensible a los cambios hídrico dando como resultado una acumulación de proteínas de la pared celular en forma altamente soluble con poca solubilidad mientras que en condiciones control, la acumulación es debida al propio desarrollo.

ZONA DE LA RAÍZ PRIMARIA (RP)

La AGP mostró un comportamiento similar al de la zona anatómica anterior con pequeñas diferencias, sobre todo en la endodermis donde se observó un ligero aumento a nula-baja i.r.i. en los controles a los 22 días, mientras que los de déficit hídrico mostraron una mediana i.r.i. y una disminución y aumento de nula a baja i.r.i. La HRGP mostró para los controles incrementos similares con respecto al tiempo en epidermis-cortex y disminución e incremento de la i.r.i. en endodermis-h. vasc. En las plantas con déficit hídrico se observó una disminución y aumento de la i.r.i. en la epidermis y h. vasc. mientras que en el cortex y endodermis se observó un incremento de la i.r.i. y además para el primero la presencia del halus.

En general, la AGP parece variar poco en la RP excepto en endodermis. Los controles de la HRGP mostraron similitud en la solubilidad proteica para algunos tejidos, aunque dichas

similitudes no se comparten entre las plantas control y las de déficit hídrico, lo que indica que dichas variaciones son debidas al déficit hídrico detectado tempranamente provocando un retraso en la respuesta como el observado para la solubilidad de las proteínas en epidermis y cortex o total modificación de los procesos del desarrollo.

ZONA DEL TALLO-RAÍZ (TR)

La AGP de los controles y plantas con déficit hídrico mostró nula i.r.i. en epidermis-h. vasc. El cortex-endodermis de los controles mostró una disminución y aumento de la i.r.i. en función del tiempo mientras que en condiciones de déficit hídrico se observó un nulo i.r.i. en el cortex pero una disminución de mediana a baja i.r.i. en la endodermis. La HRGP de las plantas control mostró una disminución y aumento de la i.r.i. en epidermis-endodermis mientras que en cortex se observó un incremento constante con respecto al tiempo (de nula a baja i.r.i.) y los h. vasc. mostraron un incremento de baja a mediana i.r.i. y disminución a baja. Las plantas en condiciones de déficit hídrico mostraron un aumento y disminución de la i.r.i. en epidermis-cortex mientras que la endodermis mostró un i.r.i. constante (con halus a los 8 días) y h. vasc. mostraron una disminución de baja a nula i.r.i. entre los 15 y 22 días.

De la zona TR se concluye que la AGP tiene una participación importante en la endodermis, sobre todo en condiciones de déficit hídrico, lo que indica que el estado hídrico de la planta estimula la solubilidad de la AGP de forma temprana pero diferente al que produce el desarrollo en el mismo tejido. Para la HRGP se observa que el déficit hídrico es un factor que modifica la solubilidad de dicha proteína, sobre todo después de 15 días de tratamiento se observan las mayores diferencias en cuanto al incremento, disminución o presencia de halus.

ZONA DEL TALLO (T)

Para la AGP, los controles mostraron un incremento de nula a mediana i.r.i. y disminución a baja en h. vasc. y en médula se observó un incremento transitorio a baja i.r.i. En condiciones de déficit hídrico se observó un incremento a mediana i.r.i. con halus en cortex y en h. vasc. se observó un incremento de nula a mediana i.r.i. mientras que médula y epidermis tuvieron el mismo comportamiento que los controles. Los controles de la HRGP mostraron nula i.r.i. en epidermis, un incremento de nula a nula-baja y disminución y a baja i.r.i. en cortex, una disminución de mediana i.r.i. con halus a baja y un incremento a mediana i.r.i. en h. vasc. y finalmente un ligero incremento de nula a nula-baja i.r.i. en médula. Las plantas en condiciones de déficit hídrico mostraron en la epidermis un ligero aumento de nula a nula-baja i.r.i., el cortex mostró un incremento constante en la cinética de nula a nula-baja a baja i.r.i. en h. vasc. se observó una mediana i.r.i. a lo largo del tiempo (con halus a los 8 días, al igual que el control), y la médula mostró un pequeño aumento de nula a nula-baja i.r.i. y disminución a nula a los 22 días.

En general se observa que la AGP participa en cortex y mayormente en h. vasc. bajo condiciones limitantes de agua, lo que sugiere que cuando esta condición se mantiene por largos periodos de tiempo (22 días) provoca los cambios en solubilidad de dicha proteína e incluso la participación de otras (halus). La HRGP mostró ligeras diferencias entre los controles y los de déficit hídrico, siendo el más importante el de la presencia de halus en el cortex después de 22 días de tratamiento normal, lo que sugiere que la falta de agua por periodos prolongados en este tejido de la zona T estimula la solubilidad de esta proteína de la pared y de otras de menor peso molecular.

ZONA DEL INTERNODO (I)

En los controles de la AGP se observó una disminución de baja a nula i.r.i. en la epidermis; el cortex mostró un incremento de nula a baja i.r.i. y posterior disminución, en h. vasc. se observó una disminución de mediana a baja i.r.i. y un incremento nuevamente a mediana. La médula se mostró con nula i.r.i. Las plantas en déficit hídrico mostraron una disminución de baja a nula i.r.i. en la epidermis y cortex, en h. vasc. se observó una baja i.r.i. constante y médula con nula i.r.i. constante. Los controles de la HRGP mostraron un leve incremento de nula a nula-baja i.r.i. en epidermis; en cortex se observó un incremento de baja a baja-medía i.r.i. con halus y una disminución a nula i.r.i. Los h. vasc. mostraron un incremento de baja i.r.i. puntual con halus a mediana y en médula se observó una disminución de baja a nula i.r.i. En las plantas bajo condiciones de déficit hídrico se observó una disminución de baja a baja-nula i.r.i. en epidermis; se observó un incremento de baja a baja con halus (igual que el control) y una disminución a nula-baja i.r.i. en el cortex. Los h. vasc. mostraron una disminución de mediana a baja i.r.i. y nuevamente un incremento a mediana i.r.i. y la médula mostró el mismo comportamiento que los controles.

En resumen, la AGP se localiza mayoritariamente en los haces vasculares y al parecer hay diferentes cambios en la solubilidad debidos al proceso del desarrollo o al estado hídrico del suelo, por lo que tienden a la insolubilización en condiciones de déficit hídrico y a la alta solubilidad durante el desarrollo. La HRGP mostró mayores diferencias en la solubilidad de esta proteína en h. vasc., los datos indican la participación temprana de otras proteínas (halus) durante el desarrollo que no se presentan cuando las condiciones hídricas son desfavorables, lo que sugiere que el déficit hídrico inhibe o bloquea dichas proteínas provenientes de T o bien desviándolas hacia RS, en donde se acumula a tiempos tardíos del desarrollo provocando modificaciones de esta zona y en general de toda la planta.

De estos resultados podemos analizar de forma general que N es la zona de mayor presencia en forma soluble de la HRGP. Aquí podría realizar su papel estructural y además de protección, aparentemente retardado por las condiciones de déficit hídrico. La RS parece tener poca participación de ambas proteínas en forma soluble, especialmente de la AGP que muestra una mayor sensibilidad a la insolubilización o entrecruzamiento por el déficit hídrico y el desarrollo posiblemente debida a una cadena de tratamientos extra e intracelulares (comunicación célula-célula). Por otro lado, pareciera que el déficit hídrico es el disparador para la acumulación de la HRGP en forma soluble en epidermis y endodermis, sobre todo después de 8 días de tratamiento. Esto sugiere que estos tejidos tienen una función reguladora temprana durante el desarrollo, pues los controles indican un incremento de dicha proteína mientras que en déficit se observa una total insolubilización. En cuanto a los demás tejidos de RS, se observa una tendencia al incremento de la solubilidad en función del tiempo en el caso de los controles, mientras que en las plantas con déficit hídrico esta solubilidad tiende a retrasarse y presentarse en menor proporción. Esto indica que la solubilidad de esta proteína y su proporción son condiciones importantes para el correcto desarrollo de esta zona anatómica. La RP tiene un comportamiento similar a la RS y TR de la AGP, excepto que la endodermis es el tejido que muestra mediana solubilidad a tiempos cortos de estimulación hídrica desfavorable. La HRGP muestra una tendencia a aumentar la solubilidad con respecto al tiempo en todos los tejidos, siendo mayor en la epidermis, endodermis y h. vasc. en plantas con déficit hídrico, lo que sugiere que estos tejidos son importantes para mantener la porción no aérea de la planta en buen estado hídrico. La presencia del halus en el cortex de todas las zonas anatómicas parece ser una constante y en consecuencia indica la participación de componentes celulares altamente solubles diferentes a la AGP (exudados excretados durante la producción de heridas), con localización tejido-específica y con un efecto o función que aún queda por determinar, pues su presencia adelantada o retrasada está determinada tanto por el desarrollo como por el tratamiento. El TR y T mostraron para la HRGP, una tendencia a la insolubilización en todos los tejidos, excepto en la endodermis donde la mediana solubilidad se mantuvo constante a lo largo de la cinética, lo anterior indica que la solubilidad y la localización son factores importantes para la función, tanto de la AGP como de la HRGP. En el T se observó, a diferencia de las anteriores zonas anatómicas, que la AGP aumentó la solubilidad en función del tiempo en los h. vasc. durante el déficit hídrico. Así, los resultados indican un papel diferente en función del tiempo, de la zona anatómica y del estado hídrico dominante (transporte a otras células como una vía de modificar la pared celular resultando una nueva ruta de desarrollo) (Kreuger and van Hoist, 1996). Finalmente, el I mostró una mayor participación de la AGP soluble en la epidermis y h. vasc., determinada principalmente por el desarrollo ya que el déficit hídrico disminuye la solubilidad en estos tejidos. Para la HRGP se observó una ligera tendencia al aumento de la solubilidad en la epidermis, cortex y h. vasc. durante el déficit hídrico lo que indica que dicho tratamiento es el que da lugar a estos cambios en la solubilidad y posiblemente a su efecto.

En investigaciones realizadas por Ye y Vamer (1991) examinando las proteínas HRGP y GRP y los niveles de mRNA durante el desarrollo de tejidos en soya por medio de tissue printing y RNA blots, encontraron que en tallos maduros (6-10 días), los genes de HRGP se expresaban en células del cortex y en pocas capas de las células del cortex que rodean el floema primario. En general, la HRGP soluble de tejidos maduros se encontraba solamente en pocas capas de células del cortex rodeando los haces vasculares. Comparando con los resultados de T a los 8 días, solo coincide con la presencia de HRGP en h. vasc. ya que en cortex no hubo ninguna reacción inmune.

ANÁLISIS POR INMUNOLocalIZACIÓN

Para este análisis, plantas fueron transplantadas a vermiculita (bien regada o con un 1/12 del volumen control de agua) y crecidas por 8, 15 o 22 días; los tejidos se fijaron en FAA para después cortarse transversalmente; se utilizaron anticuerpos anti-SbPRP2 y anti-extensina. La localización de los anticuerpos y la intensidad de la reacción antigénica en función del tiempo para las diferentes regiones del hipocotilo, se resumen en la tabla 4 (se analizaron las mismas zonas anatómicas y tejidos esquematizados en la figura 9).

ZONA DE NÓDULOS (N)

La PRP2 de las plantas control mostraron a lo largo de la cinética en el cortex nula actividad; en tej. vasc. y en tej. infect. un incremento para la primera de nula a baja i.r.i. y para la segunda de nula a media i.r.i. Para las plantas en déficit hídrico se observó un incremento mayor en cortex y tej. vasc. a los 22 días de tratamiento. La HRGP de las plantas control mostraron a los 22 días baja i.r.i. en cortex y tej. vasc. y mediana i.r.i. en tej. infect. Las plantas con déficit hídrico, mostraron una disminución de alta a baja i.r.i. en cortex y de alta a mediana i.r.i. en tej. vasc. pero un incremento de mediana a alta en tej. infect. a lo largo de la cinética.

Los datos en general, muestran que la HRGP tiene una menor cantidad a los 15 días de crecimiento normal en cortex y tej. vasc., la cual aumenta a los 22 días pero de forma inversa en tej. infect. lo que sugiere que en condiciones de déficit hídrico la HRGP tiende a disminuir en función del tiempo en tejidos cercanos a la superficie. El incremento de i.r.i. en tej. infec. puede deberse al aumento en número de bacteroides en este tejido. Sin embargo, la mayor disminución de los otros tejidos sugiere la senescencia como proceso de desarrollo del nódulo y podría también dar lugar a dicho decremento en la cantidad. A diferencia de la anterior, la PRP2 muestra la mayor solubilidad en cortex y tej. vasc. durante el déficit hídrico, lo que sugiere que el desarrollo normal modifica su cantidad y posiblemente su función en la arquitectura del nódulo.

ZONA DE LA RAÍZ SECUNDARIA (RS)

La PRP2 de las plantas control mostró un incremento de nula a baja i.r.i. entre los 8 y 15 días en epidermis; el cortex mostró una disminución de baja a nula i.r.i. entre los 15 y 22 días, la endodermis y h. vasc. mostraron la misma tendencia: máxima intensidad de reacción a los 15 días y después una disminución importante. En cuanto a las plantas con déficit hídrico también se observó un incremento en epidermis de nula a baja i.r.i. y de nula a mediana en h. vasc., mientras que cortex y endodermis se mantuvieron con la misma i.r.i. a lo largo de la cinética. La HRGP de las plantas control mostró un incremento de nula a baja i.r.i. en cortex entre los 15 y 22 días; en cortex se mantuvo con nula i.r.i. y en endodermis y h. vasc. se observó una disminución de mediana a nula i.r.i. entre los 15 y 22 días. Para las plantas con déficit hídrico se observó mediana i.r.i. en epidermis y baja i.r.i. en los demás tejidos.

En general, se observa que el déficit hídrico podría estimular la solubilidad de la PRP2 en cortex, y haces vasculares mientras que la HRGP siempre mostró menor cantidad en todos los tejidos observados. Cabe mencionar que en condiciones de desarrollo normal se observó una mayor cantidad de la PRP2 a los 15 días en endodermis y h. vasc. y un poco menor para la HRGP en los mismos tejidos, lo que sugiere un posible movimiento de estas proteínas a otras zonas anatómicas, en especial la PRP2 que es más soluble.

Prot	t (días)	NÓDULO (N)								Prot	t (días)	TALLO-RAIZ (TR)																												
		Cortex				Tej. Vasc.						Tej. Infect.				Epidermis				Cortex				Endodermis				h. vasc.												
		Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf			Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf													
PRP2	15	-	-	-	-	-	-	-	-		PRP2	8	-	-	-	-	+	+	+++	++	+	-	15	nd	+++	nd	+++	nd	+++	nd	+++	nd	++							
	21	-	+	+	++	++	++					21	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	21	+	+	-	-	-	+	+	-	-								
HRGP	15	nd	+++	nd	+++	nd	++				HRGP	15	+	+	+	+	+++	+++	++	++			HRGP	15	+	+	+	+	+++	+++	++	++								
	21	+	+	+	++	++	+++					21	-	-	+	-	+++	+++	++	++	21	-	-	+	-	+++	+++	++	++											
		RAIZ SECUNDARIA (RS)										TALLO (T)																												
		Epidermis				Cortex				Endodermis				h. vasc.						Epidermis				Cortex				h. vasc.				Médula								
		Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf							
PRP2	8	-	-	+	+	-	-	+	-				PRP2	8	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	+	nd	+	nd	+++	nd	+++	nd				15	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+				15	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+			
	21	+	+	-	+	-	-	+	++				21	-	-	-	-	++	+++	+	-	-				21	-	-	-	-	++	+++	+	-	-					
HRGP	15	-	nd	-	nd	++	nd	++	nd			HRGP	15	-	-	+	++	-	-	+	++			HRGP	15	-	-	+	++	-	-	+	++							
	21	+	++	-	+	-	+	-	+				21	++	-	+	-	+++	+++	++	+				21	++	-	+	-	+++	+++	++	+							
		RAIZ PRIMARIA (RP)										INTERNODO (I)																												
		Epidermis				Cortex				Endodermis				h. vasc.						Epidermis				Cortex				h. vasc.				Médula								
		Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf	Cti	Déf							
PRP2	8	-	-	+	-	+++	++	-	-			PRP2	8	-	-	-	+	++	+++	-	-			PRP2	8	-	-	-	+	++	+++	-	-							
	15	-	+++	+	+++	+++	+++	++	++				15	-	-	-	+	++	+++	-	-				15	-	-	-	+	++	+++	-	-							
	21	-	+	-	+	-	+	-	+				21	-	+	-	+	++	++	+	+				21	-	+	-	+	++	++	+	+							
HRGP	15	-	-	+	++	+++	+++	++	+++			HRGP	15	-	-	-	++	+++	+++	+	++			HRGP	15	-	-	-	++	+++	+++	+	++							
	21	-	-	+	+	+	-	+	+				21	-	-	+	+	+++	+++	+	++				21	-	-	+	+	+++	+++	+	++							

Tabla 4. Inmunolocalización de proteínas de la pared celular durante el crecimiento. Zonas anatómicas en las que hubo reacción inmune a los anticuerpos anti-SbPRP2 o anti-extendedina en condiciones control o de déficit hídrico a diferentes tiempos. La intensidad a la reacción inmune (I.r.i.) se expresó en unidades arbitrarias: (-) sin reacción, (+) poca I.r.i., (++) mediana I.r.i. y (+++) alta I.r.i. h = halus, p = reacción inmune puntual, nd= no determinado.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ZONA DE LA RAÍZ PRIMARIA (RP)

La PRP2 de los controles se mostró sin cambio en la epidermis a lo largo de la cinética; el cortex mostró una disminución de baja a nula i.r.i. entre los 15 y 22 días; la endodermis y los h. vasc. mostraron la misma tendencia que en la zona RS. Para los de déficit hídrico se observó un incremento y disminución de nula a alta y a baja i.r.i. en epidermis y cortex, mientras que en endodermis y h. vasc. se observó la misma tendencia que los controles. La HRGP de los controles mostró nula i.r.i. en la epidermis y baja i.r.i. en cortex a lo largo de la cinética; una disminución de alta a nula i.r.i. en endodermis y de alta a baja en h. vasc. En los de déficit hídrico se observó la misma tendencia que los controles para la epidermis y endodermis, una disminución de mediana a baja i.r.i. en cortex y de alta a baja i.r.i. en h. vasc.

En general se observa una tendencia a una posible mayor solubilidad de la PRP2 a los 15 días de déficit hídrico en epidermis y cortex mientras que para la HRGP fue en cortex y h. vasc. Lo anterior indica que este tiempo de tratamiento es importante en la localización de ambas proteínas lo que sugiere que cada proteína tiene una actividad y localización tiempo y tejido específica.

ZONA DEL TALLO-RAÍZ (TR)

La PRP2 de las plantas control mostró un incremento de nula a baja i.r.i. en epidermis, el cortex y h. vasc. Mostraron una disminución de baja a nula i.r.i. y endodermis de alta a nula. Los de déficit hídrico mostraron una i.r.i. máxima a los 15 días de estímulo en todos los tejidos. La HRGP de los controles mostró una disminución de baja a nula i.r.i. en epidermis, mientras que en los demás tejidos mantuvieron la i.r.i. a lo largo de la cinética: baja en cortex, alta en endodermis y mediana en h. vasc. Para los de déficit hídrico se observó la misma tendencia que los controles en epidermis, endodermis y h. vasc. Mientras que cortex mostró una disminución de baja a nula i.r.i.

Los datos en general sugieren que al igual que RS y RP, el déficit hídrico podría estimular la alta solubilidad de la PRP2 en esta zona después de 15 días de tratamiento y una posible movilización de esta proteína como parte de los procesos biológicos de la planta. La localización de la HRGP es muy similar a RP, solo que se mantiene ausente por más tiempo en endodermis y h. vasc. Tanto en condiciones control como de déficit hídrico, lo que indica que la posible solubilización se debe a los eventos del mismo desarrollo y no a los producidos por el déficit hídrico.

ZONA DEL TALLO (T)

La PRP2 de los controles mostró una disminución de baja a nula i.r.i. en la epidermis entre los 8 y 15 días; el cortex mostró un incremento transitorio de nula a baja i.r.i. en h. vasc. se observó una disminución de baja a nula i.r.i. y un aumento a mediana i.r.i. en médula se mantuvo una baja i.r.i. Las plantas con déficit hídrico mostraron la misma tendencia que los controles en la epidermis y muy similar en h. vasc., una disminución de baja a nula i.r.i. en cortex entre los 8 y 15 días, y entre los 15 y 22 días para la médula. La HRGP de los controles mostró un incremento de nula a mediana i.r.i. en epidermis, de nula a alta en h. vasc. y de baja a mediana en médula. Para los de déficit hídrico se observó nula i.r.i. en epidermis, una disminución de mediana a nula i.r.i. en cortex y de mediana a baja en médula, y para h. vasc. se observó un incremento igual que los controles.

Los datos en general muestran una posible tendencia a la insolubilización de la epidermis y cortex tanto de la PRP2 como de la HRGP y una tendencia similar para h. vasc. y médula. Esto sugiere que el tallo es una zona anatómica que tiene poca dinámica en cuanto a la solubilidad de estas proteínas con respecto a las zonas previas, aunque siguen siendo los h. vasc. donde

podría haber mayor solubilidad de estas proteínas solo que a tiempos más prolongados de crecimiento normal.

ZONA DEL INTERNODO (I)

La PRP2 de los controles mostró nula i.r.i. en la epidermis y el cortex y mediana i.r.i. en h. vasc. durante el crecimiento normal y un incremento de nula a baja i.r.i. en médula. Las plantas con déficit hídrico mostraron la misma tendencia que los controles en la médula, un incremento de nula a mediana i.r.i. en epidermis, y una disminución de alta a mediana i.r.i. en h. vasc. entre los 15 y 22 días y la misma i.r.i. que los controles en médula. La HRGP de los controles mostró nula i.r.i. en epidermis, un incremento de nula a baja i.r.i. en cortex, alta i.r.i. en h. vasc. y baja en médula. Para los de déficit hídrico también se observó nula i.r.i. en epidermis, y alta en h. vasc. y una disminución de mediana a baja i.r.i. en cortex y médula.

Los datos en general sugieren que el déficit hídrico induce pocos cambios en la solubilidad de ambas proteínas, aunque se observan diferencias en la cantidad de la PRP2 del cortex y h. vasc. hasta los 22 días pero muy pocas para la HRGP: médula y cortex solo a los 15 días, lo que sugiere que el internodo al igual que el tallo son zonas anatómicas diferenciadas con pocas posibilidades para una dinámica de estas proteínas.

En general, los datos sugieren en N una mayor participación de la HRGP en forma soluble que de la PRP2 con una mayor solubilidad a los 15 días y después con una disminución en los tejidos vascular e infectado. Al parecer, en RS y RP, la PRP2 es la que tiene mayor solubilidad, sobre todo a los 15 d, condición similar para la HRGP pero en menor proporción; lo anterior sugiere que el tiempo de tratamiento es un factor importante para la movilización de ambas proteínas sobre todo en h. vasc. y endodermis. En el caso de TR, se observa mayor cantidad de la PRP2 entre los 8 y 15 d con déficit hídrico y entre los 15 y 22 d para la HRGP, lo que sugiere que un mismo tratamiento produce efectos de movilización temporal y espacial diferentes para cada una de las proteínas estudiadas. En T se observa mayor cantidad en h. vasc. para la PRP2 después de 22 d pero para la HRGP el incremento parece que es debida al proceso normal de desarrollo en esta zona. Finalmente, I muestra alta i.r.i. para ambas proteínas en h. vasc. a lo largo de la cinética, pero para la PRP2 muy probablemente debida a las condiciones hídricas mientras que para la HRGP no pues mantiene la misma tendencia que los controles. Lo anterior indica que el déficit hídrico es un factor que determina la localización y posible movilización por redistribución de la PRP2 mientras que el proceso normal de desarrollo lo determina para la HRGP.

ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOT

Para revelar el comportamiento a nivel molecular y la proporción de las fracciones de proteínas totales y de la pared celular en condiciones de déficit hídrico durante el desarrollo, alícuotas de la fracción de proteína total y de la pared celular, fueron analizadas por geles de SDS o catiónicos neutrales (por la naturaleza positiva de la HRGP) y Western blot con anticuerpos policlonales anti-SbPRP2 o anti-extensina. Los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie o con plata. Los resultados en conjunto provenientes de la electroforesis se muestran en la figura 10.

ZONA DE NÓDULOS (N)

La fracción total de la PRP2 no mostró diferencias debidas al déficit hídrico, solo un incremento transitorio a los 15 días de nula a baja-media i.r.i. La fracción de la pared mostró el mismo incremento transitorio también a los 15 días pero los controles tuvieron una i.r.i. media y los de déficit hídrico una baja-mediana i.r.i. La fracción total de la HRGP control mostró un incremento sostenido a mediana i.r.i. entre los 15 y 22 días mientras que los de déficit hídrico mostraron un incremento constante de baja-nula a alta i.r.i. a lo largo de la cinética. La fracción de la pared mostró para los controles un incremento transitorio de alta a mediana-alta i.r.i. durante la cinética, pero las plantas con déficit hídrico mostraron un solo incremento a los 22 días de nula a baja i.r.i.

Los datos en general, muestran pocas diferencias debidas al déficit hídrico para la PRP2 tanto de la fracción total como de la pared celular. Sin embargo, la fracción de la pared muestra una mayor solubilidad en los controles con respecto a la fracción total, lo que sugiere que una mayor proporción de estas proteínas son moduladas por el desarrollo, y en condiciones de déficit hídrico, esta solubilidad se mantiene. Esto sugiere que dicho tratamiento restringe el aumento de solubilidad a pesar de que a los 22 días se tiene una total insolubilidad en ambas condiciones. En cuanto a la HRGP se observan cambios de solubilidad en la fracción total siendo notable el incremento entre los 15 y 22 días de los de déficit hídrico, mientras que la fracción de la pared indica un incremento similar al de la fracción total pero en menor proporción. Esto sugiere que el tratamiento prolongado del déficit hídrico modifica cuantitativa (cantidad) y cualitativamente (solubilidad) dicha proteína. Por otro lado, el desarrollo en la fracción total no muestra cambios en la solubilidad durante la cinética pero en la fracción de la pared se observa una disminución relativa en la solubilidad posiblemente debida al grado de diferenciación celular (en senescencia) pero aún así es interesante resaltar la alta solubilidad de esta proteína a tiempos largos.

ZONA DE LA RAÍZ SECUNDARIA (RS)

La fracción total de la PRP2 mostró un solo incremento de baja i.r.i. a los 8 días en condiciones control y nula i.r.i. a lo largo de toda la cinética para la condición de déficit hídrico. La fracción de la pared mostró durante todos los tiempos nula i.r.i. tanto para los controles como para el déficit hídrico. La fracción total de la HRGP control mostró un decremento transitorio de media-alta a baja-nula a alta i.r.i. durante la cinética. La fracción de la pared mostró un comportamiento similar al de la fracción total, siendo para los controles media-alta a nula a mediana i.r.i., y para las plantas con déficit hídrico de alta a nula a media-alta i.r.i.

Los datos en general, muestran que la PRP2 tiene baja solubilidad en ambas fracciones lo que sugiere que en su mayor proporción se encuentra entrecruzada con fuertes enlaces que en consecuencia hacen difícil su extracción. En cuanto a la HRGP se observa un comportamiento similar, tanto para la fracción de proteínas totales como para las de la pared celular en ambos,

controles y los de déficit hídrico; es decir, un decremento transitorio a los 15 días con un aumento igual o mayor al inicial en el caso de la fracción total pero menor para fracción de la pared. Esto sugiere una correlación entre los incrementos y decrementos de ambas fracciones pero además un comportamiento similar cuando son estimulados por el desarrollo o por condiciones hídricas desfavorables.

ZONA DE LA RAÍZ PRIMARIA (RP)

La fracción total de la PRP2 control mostró un solo incremento de nula-baja i.r.i. a los 15 días pero en condiciones de déficit hídrico se observó un incremento a baja i.r.i. a los 8 días de tratamiento. La fracción de la pared mostró para los controles el mismo incremento al mismo tiempo de tratamiento y para los de déficit hídrico se mantuvo durante toda la cinética con nula i.r.i. La fracción total de la HRGP control mostró un decremento transitorio similar al de RS: de mediana a baja-nula a alta i.r.i. durante la cinética y para los de déficit hídrico de baja a nula a alta i.r.i. La fracción de la pared también mostró este comportamiento: para los controles fue de mediana a nula a baja i.r.i. y para las plantas con déficit hídrico de alta a mediana i.r.i.

Los datos en general, muestran que la PRP2 se insolubiliza rápidamente (fracción de la pared celular) pero la fracción de proteínas totales indica que el déficit hídrico induce a que proteínas diferentes a las de la pared se encuentren en forma soluble a tiempos cortos, mientras que en condiciones control el desarrollo induce esta baja solubilidad solo después de 15 días de tratamiento. En cuanto a la HRGP se observa un comportamiento similar al observado tanto en la zona anatómica RS como en la fracción total, es decir, un decremento transitorio a los 15 días con un aumento menor al inicial, indicando una correlación entre los incrementos y decrementos de ambas fracciones y el tipo de tratamiento: desarrollo o déficit hídrico. Sin embargo la mayor solubilidad de la fracción total a los 22 días sugiere la presencia de proteínas diferentes a las de la pared que posiblemente son requeridas para el funcionamiento celular óptimo. En cuanto a las plantas de déficit hídrico, además de lo anterior los datos indican que una mayor proporción de estas proteínas totales forman parte de la fracción de la pared celular y que por las condiciones desfavorables hídricas se mantiene en forma altamente soluble posiblemente como una manera de contender con las nuevas condiciones.

ZONA DEL TALLO-RAÍZ (TR)

La fracción total de la PRP2 control mostró un solo incremento de nula a nula-baja i.r.i. a los 15 días. La fracción de la pared igualmente mostró el mismo incremento al mismo tiempo de tratamiento pero de mediana i.r.i. La fracción total de la HRGP control mostró un incremento de baja-nula a alta i.r.i. entre los 15 y 22 días de tratamiento y para los de déficit hídrico se observó una disminución transitoria de media a baja-nula a alta i.r.i. La fracción de la pared mostró para los controles una disminución de baja-mediana a nula i.r.i. y para las plantas con déficit hídrico de alta a nula i.r.i. entre los 8 y 15 días.

Los datos en general, muestran un incremento de la PRP2 a los 15 días de tratamiento, pero dicho incremento es debido solo al desarrollo ya que no hay diferencias con respecto al déficit hídrico; por otro lado, la baja solubilidad en la fracción total indica que una gran proporción de estas proteínas solubles forman parte de la fracción de la pared celular. En cuanto a la HRGP control se observa un incremento hacia alta solubilidad inducida por el mismo desarrollo en la fracción total, en condiciones de déficit hídrico se observa un comportamiento

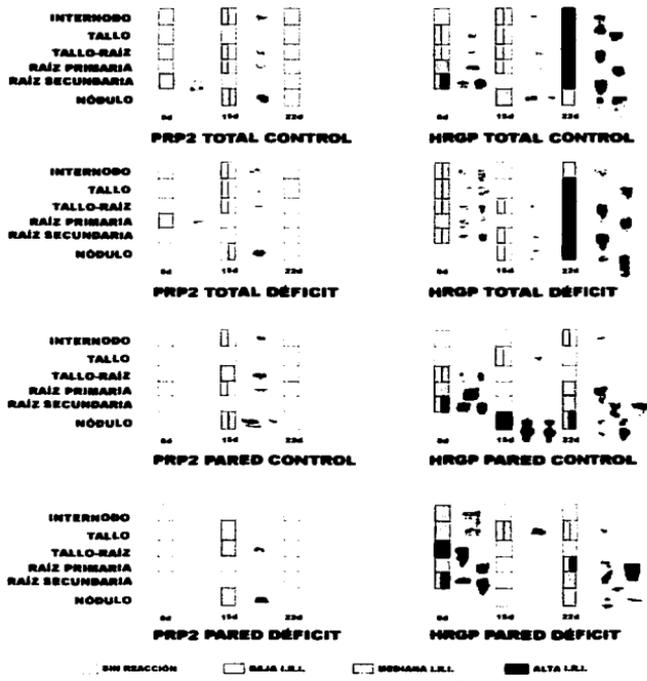


Fig. 10. Western blot de proteínas de la pared celular durante el desarrollo. Esquema en forma de rectángulo del tallo de la planta adulta con las seis regiones anatómicas disectadas que muestran la reacción inmune a los anticuerpos anti-SbPRP2 o anti-estereina de las fracciones de proteína total o proteína de la pared celular en condiciones control o de déficit hídrico a diferentes tiempos (8, 16 22 días). La intensidad a la reacción inmune (I.r.i.) se expresó en unidades arbitrarias. Recuadro sin color = sin reacción inmune, recuadro amarillo = baja I.r.i., recuadro azul = mediana I.r.i., recuadro rojo = alta I.r.i. Las líneas y/o manchas junto a cada recuadro corresponden con las bandas representativas obtenidas de los Western blot para cada región anatómica y tratamiento hídrico.

similar al de RS y RP; pero en la fracción de la pared celular el comportamiento es aparentemente inverso al de la fracción anterior, lo que indica que las proteínas solubles en la fracción total pueden ser de una naturaleza diferente a las de la pared celular.

ZONA DEL TALLO (T)

La fracción total de la PRP₂ mostró un solo incremento de a nula-baja i.r.i. a los 15 días en condiciones de déficit hídrico. La fracción de la pared igualmente mostró un incremento de baja i.r.i. al mismo tiempo de tratamiento. La fracción total de la HRGP mostró un comportamiento similar a la zona TR, para los controles y para los de déficit hídrico, para los primeros fué de baja-nula a alta i.r.i. entre los 15 y 22 días de tratamiento y para la segunda se observó una disminución transitoria de media a nula a alta i.r.i. La fracción de la pared mostró para los controles baja-mediana i.r.i. a los 15 días y para las plantas con déficit hídrico un decremento constante de media a baja-mediana a nula-baja i.r.i.

Los datos en general, muestran un incremento de la PRP₂ a los 15 días durante el desarrollo normal; además, la baja solubilidad en la fracción total indica que una gran proporción de estas proteínas solubles forman parte de la fracción de la pared celular. En cuanto a la HRGP control se observa un incremento hacia alta solubilidad inducida por el desarrollo en la fracción total; en condiciones de déficit hídrico se observa un comportamiento similar al de RS y RP (decremento transitorio en la solubilidad); pero en la fracción de la pared celular el comportamiento para los controles es con un solo incremento a los 15 días, lo que sugiere que las proteínas altamente solubles tienen un destino diferente al de formar parte de la pared celular. En cuanto a las plantas con déficit hídrico se observa un decremento constante en la solubilidad lo que sugiere, por un lado, que las proteínas solubles desde los 8 días son de origen exclusivo de la pared celular (se insolubilizan en función del tiempo), mientras que las proteínas de la fracción total tienen un comportamiento y posiblemente una función y destino diferente a las de la pared celular.

ZONA DEL INTERNODO (I)

La fracción total de la PRP₂ mostró un solo incremento de nula-baja i.r.i. a los 15 días en ambas condiciones. La fracción de la pared mostró un incremento al mismo tiempo de tratamiento de nula-baja i.r.i. solo para los controles. La fracción total de la HRGP control mostró un incremento constante de nula a baja-nula a alta i.r.i. y para los de déficit hídrico se observó una disminución transitoria (similar a las zonas anatómicas anteriores) de media a nula a media i.r.i. La fracción de la pared mostro para los controles nula-baja i.r.i. a los 22 días y para las plantas con déficit hídrico media i.r.i. a los 8 días.

Los datos en general, muestran una baja-nula solubilidad de la PRP₂ a los 15 días debido principalmente al desarrollo; también, la baja solubilidad en la fracción de la pared sigue indicando que la solubilidad es dirigida por el desarrollo. En cuanto a la HRGP control se observa un comportamiento similar al del tallo, con un incremento constante de la solubilidad inducida por el desarrollo en la fracción total; en condiciones de déficit hídrico también se observa un comportamiento similar al de RS, RP, TR y T (decremento transitorio en la solubilidad). Sin embargo, en la fracción de la pared celular el comportamiento para los controles es con un solo incremento de la solubilidad a los 22 días, lo que también sugiere que las proteínas altamente solubles tienen un destino diferente al de formar parte de la pared celular. En cuanto a las plantas con déficit hídrico se observa un aumento a mediana solubilidad a los 8 días, lo que sugiere que las proteínas solubles de la fracción total tienen un destino mayoritario en la pared celular para insolubilizarse con el tiempo pero las proteínas solubles que aparecen a los 22 días pueden tener una función y destino diferente a las de la pared celular.

Como resumen general de los Western blot, fué evidente la mayor solubilidad de la HRGP que de la PRP2 por efecto del déficit hídrico. La PRP2 se mantiene con baja-mediana solubilidad hasta los 15 días en la fracción total mientras que en la fracción de la pared sólo a los 15 días muestra algunas diferencias en la solubilidad de dicha proteína; así los resultados indican que aparentemente las diferencias en solubilidad sólo se deben al desarrollo más que al déficit hídrico. La HRGP de la fracción total muestra una solubilidad inicial mediana y después de una disminución hay otro incremento aún mayor a los 22 días con déficit hídrico; sin embargo, hay diferencias en la solubilidad: a los 8 días con déficit hídrico la solubilidad es mayor en la región aérea y menor en la radicular, a los 15 días hay mayor insolubilización en la mayoría de las zonas anatómicas, y a los 22 días hay un incremento importante de solubilidad en casi todas las zonas y ligeramente menor en I. Esto sugiere un patrón de solubilidad similar debido al desarrollo (comparando con los controles): regiones como las raíces en las que predomina la HRGP en forma soluble a los 8 d, o insoluble a los 15 días, pero el gran incremento en la solubilidad a los 22 días en la región aérea sugiere que es debido desarrollo normal más que a la condición hídrica, pero además podría indicar un momento importante de síntesis de nueva proteína durante el desarrollo (inicio en la formación de botones florales). La fracción de la pared celular muestra mayor solubilidad a los 8 días en la región radicular y aérea cuando la planta es sometida a déficit hídrico y en menor proporción en condiciones control, lo que coincide con los resultados de la fracción total indicando que una parte importante de la fracción total son proteínas de la pared; a los 15 días la mayor diferencia a es la insolubilización en nódulo con respecto al control, lo que también coincide con lo observado en la fracción total. Finalmente, a los 22 días la mayor solubilidad se vuelve a observar en la región radicular aunque disminuye la solubilidad en los nódulos y aumenta en la RP. Lo anterior sugiere que tanto el déficit hídrico como el desarrollo son moduladores de la solubilidad de la HRGP tanto en la fracción total como en la de la pared celular.

MÉTODO CUANTITATIVO

ANÁLISIS DE LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y DE HIDROXIPROLINA

El análisis de la determinación de proteínas totales y de la de hidroxiprolina con proteínas totales y de la pared celular (ambas en forma insoluble) durante el desarrollo de la planta del frijol bajo condiciones de déficit hídrico, fué realizado para conocer cuantitativamente, el destino de las proteínas ricas en hidroxiprolina (PRP₂ y HRGP) en estas condiciones. Este se realizó como se describió anteriormente (ver material y método). Los datos fueron nuevamente agrupados en cuatro rangos arbitrarios de solubilidad y tres tipos de resultados: 1) relación hidroxiprolina/proteína soluble total e hidroxiprolina/proteína soluble de la pared celular, 2) hidroxiprolina insoluble de la pared celular y 3) proteína soluble total y proteína soluble de la pared celular, cada uno para las condiciones control y de déficit hídrico. Los datos del tipo 3 indicaron la solubilidad y la localización subcelular: proteínas citoplásmicas (fracción total) y/o de la pared celular (fracción de la pared celular). Los datos del tipo 1 indicaron cuánta de la proteína total obtenida (datos de tipo 3) se encontró hidroxilada (PRP₂ y/o HRGP y/u otras) en cada una de las zonas anatómicas de la planta. Finalmente, los datos del tipo 2 nos indicaron cuánta proteína hidroxilada estaba insoluble en la pared y el posible tipo de enlaces que tiene, de tal modo que la alta solubilidad indicó enlaces fuertes pero hidrolizables mientras que la mediana solubilidad indicó enlaces más fuertes y menos hidrolizables o extraíbles. Los resultados en conjunto provenientes de la electroforesis se muestran en la figura 11.

ZONA DE NÓDULOS (N)

Las plantas control en la zona N mostraron para la relación de tipo 3 de la fracción total mediana solubilidad constante, similar a la fracción de la pared celular: baja solubilidad constante. En la relación tipo 1 de la fracción total se observó baja solubilidad constante mientras que para la fracción de la pared se observó insolubilidad constante. Para los datos de tipo 2 se observó una alta solubilidad constante.

Las plantas con déficit hídrico mostraron para la relación de tipo 3 de la fracción total un decremento de mediana a baja solubilidad y de la fracción de la pared celular se observó un incremento de nula a baja solubilidad. En la relación tipo 1 de la fracción total se observó insolubilidad a lo largo de la cinética y para la fracción de la pared celular se observó un incremento de nula a alta solubilidad. Para los datos de tipo 2 se observó un incremento de baja a mediana solubilidad.

Los datos en general, muestran que una proporción considerable de la prolina de las proteínas totales control (datos de tipo 3) se hidroxila (datos de tipo 1), pero no así las provenientes de plantas en condiciones de déficit hídrico, las cuales disminuyeron totalmente su solubilidad, lo que indica que el déficit hídrico modifica la naturaleza de las proteínas totales (citoplásmicas y de la pared celular). Las proteínas de la fracción de la pared celular control muestran que una cantidad importante de la fracción total son proteínas de la pared celular pero estas proteínas no se encuentran en la fracción de proteínas hidroxiladas solubles sino en las insolubilizadas; por otro lado las proteínas de las plantas con déficit hídrico muestran que a los 15 días todas las proteínas totales son de un tipo diferente a las de la pared celular y que las pocas que hay están insolubles en la pared pero con un tipo de enlaces hidrolizables. A los 92 días la mayor parte de proteínas totales son proteínas de la pared celular en forma altamente

soluble pues la fracción insoluble muestra enlaces débiles altamente hidrolizables. Esto indica que una condición hídrica desfavorable y sostenida incrementa la cantidad de proteínas solubles hidroxilables. A mayor tiempo, se incrementa la cantidad de proteínas insolubles fácilmente hidrolizables. Lo anterior sugiere que el déficit hídrico afecta la calidad en los enlaces de las proteínas hidroxiladas y entrecruzadas en la pared celular.

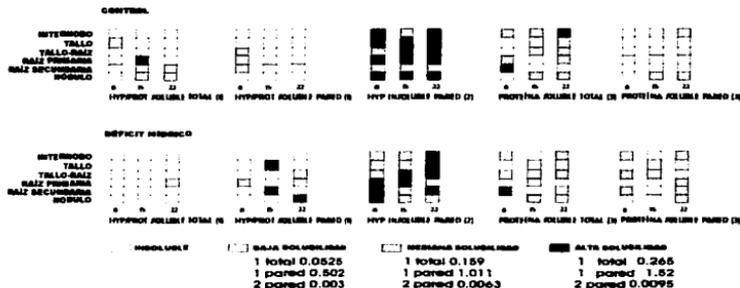


Fig. 11. Determinación de la relación hidroxiproteína/proteína durante el desarrollo. Esquema de las zonas anatómicas de la planta adulta en donde se muestra el nivel de entrecruzamiento (solubilidad) de la proteína total y de la pared celular tanto de la fracción soluble como de la insoluble cuando la planta es sometida a diferentes condiciones hídricas (control o de déficit hídrico) durante 8, 15 o 22 días. La solubilidad se expresó. La solubilidad se expresó en mg hyp/ml CaCl₂ para las relaciones hipprot soluble total de hipprot (1) y las fracciones de proteínas soluble (3) y en mg hyp/mg peso seco para las relaciones hipprot insolubles de la pared celular. La solubilidad se expresó en unidades arbitrarias. Recuadro sin color = insoluble, recuadro amarillo = baja solubilidad, recuadro azul = mediana solubilidad, recuadro rojo = alta solubilidad.

ZONA DE LA RAÍZ SECUNDARIA (RS)

Las plantas control en la zona RS mostraron para la relación de tipo 3 de la fracción total un decremento de alta a nula solubilidad entre los 8 y 15-22 días, mientras que la fracción de la pared celular se mostró insoluble en toda la cinética. En la relación tipo 1 de la fracción total se observó un incremento de baja a nula solubilidad constante mientras que la fracción de la pared mostró un decremento de baja a nula solubilidad entre los 8 y 15-22 días. Para los datos de tipo 2, los controles mostraron baja solubilidad toda la cinética.

Las plantas con déficit hídrico mostraron para la relación de tipo 3 de la fracción total un decremento de alta a nula solubilidad y un incremento a baja solubilidad a los 22 días. Para la fracción de la pared celular se observó un comportamiento muy similar: disminución de mediana a nula solubilidad y un incremento a baja solubilidad. En la relación tipo 1 de la fracción total se observó insolubilidad a lo largo de la cinética y para la fracción de la pared celular se

observó un incremento transitorio de nula a alta solubilidad entre los 8 y 15 días. Para los datos de tipo 2 también se observó un incremento transitorio de nula a baja solubilidad.

Los datos en general, muestran que al comparar las proteínas totales control (datos de tipo 3) con las que se hidroxilan las prolinas (datos de tipo 1) hay una gran cantidad de prolinas en proteínas totales solubles a tiempos cortos que aparentemente no se hidroxilan pero un pequeña proporción de estas proteínas son de la pared celular. Por otro lado a tiempos más largos se observa baja hidroxilación de proteínas totales. Las proteínas de la pared celular muestran un tipo de enlace hidrolizable (mediana insolubilidad); todo lo anterior sugiere que a tiempos cortos hay una mayor cantidad de proteínas solubles con un destino diferente al de la pared celular (transporte) y solo una pequeña proporción de prolinas se hidroxila a tiempos más largos como parte del proceso de desarrollo de esta zona anatómica. En el caso de las proteínas totales bajo condiciones de déficit hídrico se observa la misma tendencia que los controles pero con un incremento de solubilidad a los 22 días, de manera similar las proteínas de la pared celular pero en menor proporción a tiempos cortos. Lo anterior indica que todas estas proteínas tienen un destino mayoritario para la pared celular a los 8 y 22 días ya que la proporción hidroxilada de la pared a los 15 días parece provenir de las proteínas insolubilizadas con enlaces hidrolizables. Es posible que el déficit hídrico modifique la naturaleza de los enlaces (soluble-insoluble), su posible destino y el tiempo de acción de las proteínas. Finalmente, al comparar los resultados de hidroxiprolina insoluble control (datos de tipo 2), con las proteínas hidroxiladas de la pared (datos de tipo 1), se observó baja solubilidad a tiempos cortos en proteínas hidroxiladas pero mediana insolubilidad durante toda la cinética en proteínas insolubles, lo que además sugiere que por ser una zona de crecimiento constante, requiere un tipo de enlaces fuertes pero hidrolizables. Sin embargo, en condiciones de déficit hídrico se observó una modificación en la insolubilidad con respecto a los controles, mostrando enlaces fuertes e insolubles a los 8 y 22 días y sólo a los 15 días se observó una mediana insolubilidad. Lo anterior podría indicar que el déficit hídrico modifica el tipo de enlaces para cambiar la estructura radical (raíces más fibrosas) en búsqueda de fuentes de agua (raíces más largas) (Tomos and Pritchard, 1994).

ZONA DE LA RAÍZ PRIMARIA (RP)

Las plantas control en la zona RP mostraron para la relación de tipo 3 de la fracción total un decremento transitorio de mediana a nula solubilidad entre los 8 y 15 días, mientras que la fracción de la pared celular se mostró insoluble durante toda la cinética. En la relación tipo 1 de la fracción total se observó un incremento transitorio de nula a alta solubilidad entre los 8 y 15 días mientras que la fracción de la pared mostró un decremento de baja a nula solubilidad entre los 8 y 15-22 días. Para los datos de tipo 2, los controles mostraron nula solubilidad durante toda la cinética.

Las plantas con déficit hídrico mostraron para la relación de tipo 3 de la fracción total un incremento transitorio de nula a baja solubilidad entre los 8 y 15 días y para la fracción de la pared celular se observó un incremento de baja solubilidad a los 22 días. En la relación tipo 1 de la fracción total se observó baja solubilidad a los 22 días y para la fracción de la pared celular se observó un decremento-incremento de mediana a nula a baja solubilidad. Para los datos de tipo 2 se observó un incremento de baja solubilidad a los 22 días.

Los datos en general, muestran que al comparar las proteínas totales control (datos de tipo 3) con las que se hidroxilan (datos de tipo 1) hay una mediana cantidad de prolinas en proteínas totales solubles a los 8 y 22 días que aparentemente no se hidroxilan ni están en la fracción de la pared celular, pero a los 15 días se observa una alta solubilidad de proteínas hidroxiladas que aparentemente no tienen su origen en esta zona anatómica (posiblemente transportadas). En cuanto a las proteínas hidroxiladas de la pared celular solo muestran baja

solubilidad a los 8 días (datos de tipo 1); lo anterior sugiere que a tiempos cortos hay una acumulación de proteínas totales solubles con un destino mayoritario diferente al de la pared celular (solo una pequeña proporción de proteínas de la pared celular se hidroxila). A los 15 días se observa una alta acumulación de proteínas hidroxiladas solubles que aparentemente no tienen un origen en esta zona anatómica lo que posiblemente indica que provienen de la zona RS que había mostrado enlaces hidrolizables de las proteínas insolubles en la pared celular. En el caso de las proteínas totales bajo condiciones de déficit hídrico se observa baja solubilidad a los 15 días pero con hidroxilación de prolina en proteínas solubles a los 22 días, lo que sugiere que a los 15 días estas proteínas son utilizadas en procesos diferentes a los estructurales pero no así a los 22 días, donde una pequeña cantidad de estas prolinas en proteínas solubles se hidroxila y otra proveniente de la hidroxilación de la pared celular podría tener un papel estructural y posiblemente de otro tipo (mensajero). Esto sugiere que el déficit hídrico modifica la naturaleza de los enlaces a estos tiempos largos en la RP y su posible destino-función de estas proteínas. Finalmente, al comparar los resultados de hidroxiprolina insoluble control (datos de tipo 2), con las proteínas hidroxiladas de la pared (datos de tipo 1) se observó baja solubilidad a tiempos cortos en proteínas hidroxiladas pero alta insolubilidad toda la cinética en las proteínas insolubles. Esto indica que las proteínas hidroxiladas provienen de la fracción total, pero anterior a los 8 días las proteínas de la pared ya estaban insolubilizadas. Sin embargo, en condiciones de déficit hídrico se observó la misma solubilidad a los 8 días que los controles lo que sugiere que estas proteínas provienen de otra zona anatómica cercana, posiblemente RS. La baja solubilidad a los 22 días es de origen de las proteínas insolubilizadas en la pared celular ya que observamos enlaces fuertes hidrolizables, lo que sugiere que el déficit hídrico incrementa el transporte proteico de proteínas insolubilizadas en la pared celular a otras zonas anatómicas a las que se les modificó el tipo de enlaces cuyo probable propósito sea el de servir como señal inducida por las condiciones hídricas desfavorables.

ZONA DEL TALLO-RAÍZ (TR)

Las plantas control en la zona TR mostraron para la relación de tipo 3 de la fracción total un incremento constante de nula a baja y a media solubilidad mientras que la fracción de la pared celular se mostró insoluble durante toda la cinética. En la relación tipo 1 de la fracción total también se observó insolubilidad constante mientras que la fracción de la pared mostró un decremento de mediana a nula solubilidad entre los 8 y 15-22 días. Para los datos de tipo 2, los controles mostraron un decremento de baja a nula solubilidad entre los 8 y 15-22 días.

Las plantas con déficit hídrico mostraron para los datos de tipo 3 de la fracción total un incremento de baja a mediana solubilidad entre los 8-15 y 22 días. En la fracción de la pared celular se observó una disminución constante de mediana a baja a nula solubilidad. En la relación tipo 1 de la fracción total se observó insolubilidad a lo largo de la cinética y para la fracción de la pared celular se observó un incremento de baja solubilidad a los 22 días. Para los datos de tipo 2 se observó un decremento de baja a nula solubilidad entre los 8 y 15-22 días.

Los datos en general, muestran que las proteínas totales control (datos de tipo 3) se incrementan de forma constante pero al compararlos con las que se hidroxilan (datos de tipo 1), observamos que no hay proteínas y que las pocas existentes son proteínas hidroxiladas solubles de la pared celular (8 días) pero al parecer tienen su origen en la fracción insoluble, pues muestra una mediana insolubilidad (enlaces fuertes hidrolizables). Lo anterior sugiere que a tiempos cortos hay una tendencia a hidrolizar proteínas insolubilizadas en la pared celular como parte del proceso de crecimiento y desarrollo y por otra parte, el incremento constante de las proteínas totales solubles (diferentes a las de la pared) indica que a mayor tiempo hay un mayor requerimiento de este tipo de proteínas para los procesos normales del desarrollo en esta zona anatómica. En el caso de las proteínas totales bajo condiciones de déficit hídrico se

observa una tendencia similar a la de los controles pero con un incremento de solubilidad a los 8 días (de nula a baja solubilidad), de igual forma las proteínas hidroxiladas totales se mantienen casi insolubles; las proteínas de la pared celular muestran que una gran proporción de proteínas totales a tiempos cortos son proteínas de la pared celular pero que con el tiempo tienden a la insolubilización e incluso mantienen un tipo de enlace similar al de los controles como el observado en la fracción insoluble a los 8 días de tratamiento (poco hidrolizable). En cuanto a las proteínas hidroxiladas de la pared celular a los 22 días, los datos sugieren que su posible origen es a partir de las proteínas totales que van en aumento, lo anterior indica que a tiempos cortos los enlaces se hidrolizan (proceso de desarrollo) mientras que las proteínas de la pared celular (no hidroxiladas) se incrementan debido al efecto que produce el déficit hídrico desde tiempos tempranos.

ZONA DEL TALLO (T)

Las plantas control en la zona T mostraron para los datos de tipo 3 de la fracción total un incremento constante de nula a baja a mediana solubilidad, mientras que la fracción de la pared celular se mostró insoluble toda la cinética. En la relación tipo 1 de la fracción total se observó un decremento de baja a nula solubilidad entre los 8 y 15-22 días, mientras que la fracción de la pared se mostró insoluble. Para los datos de tipo 2, esta también se mostró insoluble.

Las plantas con déficit hídrico mostraron para los datos de tipo 3 de la fracción total un incremento de nula a baja solubilidad entre los 8 y 15-22 días; para la fracción de la pared celular se observó un incremento transitorio de nula a baja solubilidad. En la relación tipo 1 de la fracción total se observó insolubilidad a lo largo de la cinética y para la fracción de la pared celular se observó un incremento de alta solubilidad a los 15 días. Para los datos de tipo 2 se observó un incremento transitorio de nula a baja a nula solubilidad.

Los datos en general, muestran que al comparar las proteínas totales control (datos de tipo 3) con las que se hidroxilan (datos de tipo 1), las primeras muestran un incremento proteico en función del tiempo, mientras que las segundas sólo muestran pocas proteínas hidroxiladas las cuales tienen un destino diferente al de la pared celular que se muestra en su fracción en forma insoluble. Esto correlaciona con la cantidad de proteínas insolubles (datos de tipo 2). Lo anterior sugiere que a mayor tiempo hay una mayor cantidad de proteínas totales solubles con un destino mayoritario diferente al de la pared celular y solo una proporción mínima se hidroxila a tiempos cortos y forma parte de la fracción de la pared celular soluble (HRGP y PRP9) como parte del proceso de desarrollo de esta zona anatómica. En el caso de las proteínas totales bajo condiciones de déficit hídrico (datos de tipo 3), se observa una tendencia a incrementar las proteínas totales solubles pero sin llegar a las cantidades finales de los controles. Comparando las proteínas hidroxiladas (datos de tipo 1) con las proteínas de la pared celular (datos del tipo 3), observamos un incremento de las proteínas de la fracción soluble a los 15 días que correlaciona con el incremento de las proteínas hidroxiladas, lo que implica que una gran proporción de las primeras se hidroxilan pero también otra proporción proviene de la disminución en la insolubilidad de las proteínas entrecruzadas en la pared celular (datos de tipo 2). Lo anterior sugiere que el déficit hídrico modifica, en esta zona anatómica, los enlaces proteicos a tiempos cortos dando lugar a un incremento de la fracción hidroxilada y altera la acumulación de proteínas totales solubles a tiempos largos.

ZONA DEL INTERNODO (I)

Las plantas control en la zona I mostraron para los datos de tipo 3 de la fracción total un decremento de alta a mediana a alta solubilidad mientras que la fracción de la pared celular mostró un incremento de nula a baja solubilidad entre los 8-15 y 22 días. En la relación tipo 1

de la fracción total y de la pared se mostraron insolubles. Para los datos de tipo 2, se mostró un incremento transitorio de nula a baja a nula solubilidad.

Las plantas con déficit hídrico mostraron para la relación de tipo 3 de la fracción total, un decremento-incremento de baja a nula a mediana solubilidad. Para la fracción de la pared celular se observó también un decremento-incremento de baja a nula a baja solubilidad. En la relación tipo 1 de la fracción total y de la fracción de la pared, las proteínas se mostraron insolubles. Para los datos de tipo 2 se observó un decremento constante de mediana a baja y a nula solubilidad.

Los datos en general, muestran que al comparar las proteínas totales control (datos de tipo 3) con las que se hidroxilan (datos de tipo 1), que las primeras disminuyen, y aumentan la cantidad de proteínas que aparentemente no se hidroxilan, mientras que las proteínas de la fracción de la pared celular solo incrementan a los 92 días, lo que sugiere que una pequeña proporción de proteínas totales son proteínas de la pared celular pero diferentes a las hidroxiladas (posiblemente del tipo de las AGP u otras). Al comparar los resultados de hidroxiprolina insoluble control (datos de tipo 2), con las proteínas hidroxiladas de la pared (datos de tipo 1) se observa una disminución en la insolubilidad a los 15 días pero aparentemente estas proteínas hidrolizadas no pasan fácilmente a la fracción soluble como en el caso de otras zonas anatómicas, lo que sugiere que estas proteínas son susceptibles de ser hidrolizadas pero se mantienen en la pared celular. En el caso de las proteínas totales bajo condiciones de déficit hídrico se observa una tendencia similar a la de los controles, pero con una solubilidad menor que igualmente no se hidroxilan (insolubles); y de manera similar a esta fracción, las proteínas de la fracción de la pared celular disminuyen e incrementan, lo que indica que la mayoría de estas proteínas tendrán un destino en la pared celular pero de naturaleza diferente a la proteínas hidroxiladas. En cuanto a las proteínas insolubles (datos de tipo 2) se observa un incremento en la insolubilidad en función del tiempo, lo que sugiere que, al igual que en T, las proteínas hidrolizadas se mantienen en la pared celular (no pasan a la fracción soluble hidroxilada, datos de tipo 1) como una alternativa para el desarrollo en condiciones adversas hídricas de esta zona anatómica.

ANÁLISIS COMPUTACIONAL

COMPARACIÓN DEL PERFIL HIDROPÁTICO DE LA PRP2 CON OTRAS PROTEÍNAS.

Para iniciar esta sección, debe aclararse que los datos presentados y el análisis que se desprendió de los mismos son altamente especulativos. Sin embargo, muchos de los resultados obtenidos en las dos secciones anteriores arrojaron información sugerente de una función adicional a la estructural de las PRP por lo que se realizó un análisis computacional.

Para obtener información que apoyara la función propuesta para la PRP2 de proteína señal (capaz de moverse), se realizó una búsqueda y comparación de la secuencia de aminoácidos con otras secuencias de proteínas conocidas que pudieran tener esta función usando el programa computacional GCG (GETSEQ y BESTFIT). Las proteínas buscadas y comparadas fueron: la proteína del movimiento del virus del mosaico de la coliflor (Thomas and Maule, 1995; Waigmann et al., 1994), la proteína del movimiento del virus del mosaico de la coliflor cepa cm-1841, la proteína del movimiento del virus del clavel, la proteína del movimiento del virus de la higuera, proteína hipotética del gene 2 del virus del pez gato, cadena alfa del fibrinógeno de lamprea (Wang et al., 1989), proteína LENOD2 de la lupina (Szczyglowski and Legocki, 1990), cortactina de gallo (Wu et al., 1991), el precursor de la glicoproteína 1 de la superficie celular (proteína B de la capa externa) (proteína 1 de la capa S) de *Clostridium* (Fujino, et al., 1993), el precursor de la proteína del antígeno S de *Plasmodium falciparum* (Bickle and Coppel, 1992), el precursor de la proteína defectiva del corion-1 FC106 de *Drosophila* (Warning, et al., 1990), la involucrina (Eckert and Green, 1986), el gene *USO1* relacionado con el citoesqueleto (Nakajima et al., 1991) y las gluteninas (Anderson et al., 1989).

Adicionalmente, se realizó el análisis de estos polipéptidos por perfil hidropático y comparándolos con el de la PRP2 utilizando el programa computacional SEQWEB PACAGE. Los resultados anteriores nos proporcionaron una idea aproximada sobre sus posibles estructuras y funciones.

El resumen de los resultados obtenidos con las 14 proteínas se muestra en la tabla 5. Según las características proteicas, se dividieron en 7: presencia o ausencia de movimiento, capacidad de

adhesión, polimorfismo molecular, peso molecular, localización intra ó extracelular, capacidad de insolubilización y estabilidad de la molécula a altas temperaturas o condiciones desnaturalizantes.

Proteína relacionada por similitud e identidad con PRP	Mov	Adhesión	Polimorfismo	No. residuos aa	Loc. extracel	Sol. & insol.	Estable	Referencia bibliográfica
Prot. B cepa ext. en <i>Clostridium</i>	-	+	-	1664	+	insol	+	Fujino et al. 1993.
Precursor de la prot. Defectuosa del conón en <i>Drosophila</i>	-	-	+(splicing)	940	+	insol	+	Warning et al. 1990.
Involucrina	-	+	+	585 (humana) 560 (chimpancé) 835 (orangután)	-	insol	+	Eckert and Green. 1980.
Glutena	-	+(prop. viscoelást.)	+	848, 838, 660, 648	-	insol	+	Anderson et al. 1989.
Precursor de la cadena alfa del fibrinogeno en <i>Petromizon</i>	-	-	-	961	-	insol	+	Wang et al. 1989.
LENOD2	-	-	+(fam. gérica)	434	+	insol	+	Szczygiowski and Legocki. 1990.
Prec. prot. antígeno 5 en <i>Plasmodium</i>	-	-	+	593	-	sol	+	Bickle and Coppel. 1992.
Prot. hipotética del gene 2 en <i>Ictatuna</i>	-	-	-	961	-	sol	-	
Cortactina	-	+(asocia a membr. o RE)	+(prod. alternativos)	563	-	sol	-	Wu et al. 1991.
Prot. mov. virus de la coliflor	+	+	-	320	- (citopl)	sol	-	Thomas and Maule. 1995.
Prot. mov. virus del mosaico de la coliflor cepa cm-1841	+	+	-	327	- (citopl)	sol	-	
Prot. mov. virus cleveland	+	+	-	319	- (citopl)	sol	-	
Prot. mov. virus del mosaico de la higuera	+	+	-	323	- (citopl)	sol	-	
Gene <i>USO1</i> en <i>Saccharomyces</i>	+	-	-	1790	- (citopl)	sol	+	Nakajima et al. 1991.

Tabla 5. Análisis comparativo de diversas proteínas con la PRP2. Siete características de los 14 péptidos usados en la comparación con la PRP2.

En la tabla 6, se muestran seis características proteicas: capacidad de entrecruzamiento, existencia de dominios repetidos ricos en aminoácidos como prolina o hidroxiprolina, con capacidad de unión a alguna estructura celular implicada en su función o en su regulación, porcentaje de similitud, porcentaje de identidad y resumen de funciones más importantes.

El agrupamiento de los polipéptidos se realizó en base a tres criterios. Los del grupo 1 poseen características comunes con la PRP2, como son el entrecruzamiento, la insolubilización, poseen dominios repetidos que pueden formar α -hélices, estabilidad de la molécula en condiciones desnaturalizantes y localización principalmente extracelular. Los polipéptidos del grupo 2 poseen la característica de asociarse con componentes del citoesqueleto o de la membrana para su función, posiblemente como proteínas señal.

Finalmente, los polipéptidos del grupo 3, que son proteínas del movimiento, proteínas que pueden moverse a través de plasmodesmos, usando componentes membranosos (retículo endoplásmico y membrana plasmática).

Dentro de los polipéptidos del grupo 1 están la proteína B de la capa externa de *Clostridium*, el precursor de la proteína defectuosa del conon de *Drosophila*, la involucrina, la glutenina, el precursor de la cadena α del fibrinógeno de *Petromizon*, la nodulina LENOD2, el precursor de la proteína del antígeno S *Plasmodium*, la proteína hipotética del gene 2 *Ictalura* y la cortactina.

En el grupo 2 está la cortactina y la proteína del gene *USO1* de *Saccharomyces*.

El grupo 3 está formado por la proteína del movimiento del virus del mosaico de la coliflor, la proteína del movimiento del virus del mosaico de la coliflor cepa cm-1841, la proteína del movimiento del virus del clavel, la proteína del movimiento del virus del mosaico de la higuera y el gene *USO1* de *Saccharomyces*.

Es interesante observar que la cortactina y el gene *USO1* de *Saccharomyces* comparten características de dos grupos, 1 y 2, para la primera proteína; y, 2 y 3 para la última. Lo anterior sugiere que las PRP2 podrían tener funciones adicionales a las que posee.

Podemos observar que el entrecruzamiento es una característica que comparte el grupo 1 con la PRP2, excepto la proteína hipotética del gene 2 de *Ictalura*. Ninguna proteína de los otros grupos tiene esta característica.

Muy cercana a la característica anterior son la insolubilidad y la estabilidad. Las proteínas insolubles son las proteínas del grupo 1, excepto la proteína hipotética del gene 2 de *Ictalura*. En cuanto a las que tienen una mayor estabilidad son todas las proteínas del grupo 1 y el gene *USO1* de *Saccharomyces* del grupo 2-3.

En cuanto a los dominios repetidos, todos los polipéptidos tienen regiones ricas en aminoácidos cargados positivamente. De estos, los que poseen en su secuencia principalmente prolina son la proteína B de la capa externa de *Clostridium*, el precursor de la proteína defectuosa del conon de *Drosophila*, la glutenina, la nodulina LENOD2 y la cortactina, todos pertenecientes al grupo 1.

La parte del polimorfismo fué un parámetro que se tomó en consideración porque las PRP, así como las HRGP, son proteínas de familias multigénicas y en consecuencia polimórficas. Así, proteínas polimórficas son el precursor de la proteína defectuosa del conon de *Drosophila*, la glutenina, la involucrina, la nodulina LENOD2, el precursor de la proteína del antígeno S de *Plasmodium* y la cortactina, que también son del grupo 1.

El número de residuos de aa que se consideró para hacer comparaciones con el de la PRP2 (aproximadamente, 570 residuos), fué menor de 1000 residuos para la involucrina, la glutenina,

precursor de la cadena α del fibrinógeno de *Petromizon*, la nodulina LENOD2, la proteína hipotética del gene 2 de *Ictanulid*, la cortactina y las proteínas del movimiento de los virus.

Las proteínas con localización extracelular son la proteína B de la capa externa de *Clostridium*, el precursor de la proteína defectuosa del corion de *Drosophila*, la glutenina y la nodulina LENOD2, clasificadas en el grupo 1.

Prot. relacionada por similitud e identidad con PRP2	Entrecruzamiento	Dominio repetido	Se une o regula	Similitud (%)	Identidad (%)	Función	Gpo
Prot. B capa ext. en <i>Clostridium</i>	+	+ (ricos en pro)	+ (une a ferrina)	25.6	25.6	Factor de anclaje a un segmento duplicado	1
Precursor de la prot. defect. corion en <i>Drosophila</i>	+	+ (ricos en pro)	+ (tejido específica y splicing)	41.2	42.1	Estabiliza estructura, entrecruza prot. corion cascaron	1
Involucrina	+	+ (ricos en glu y ac glu)	+ (prot memb)	30	30	Entrecruza proteínas membrana.	1
Glutenina	+	+ (ricos en pro)	+ (puentes disulfuro)	25.2 33.3	25.2 33.3	Propiedad viscoelástica, "chicos"	1
Precursor de la cadena alfa del fibrinógeno en <i>Aetromizon</i>	+	+ (rico en ser, glu, try)	+ (puentes intra-e inter-moleculares)	42.9	28.0	Cubierta de los entrocitos (conversion del fibrinógeno a fibrina) catalizada por trombina (entrecruzamiento de cadenas)	1
LENOD2	+	+ (rico en pro, 40%)	+ (compuestos excretados)	36.7	34.1	Estados tempranos del desarrollo del nódulo. Prot. nódulo específica de la pared	1
Prec. prot. antigeno 5 en <i>Plasmodium</i>	+	+ (ricos en arg y lys)		54.5	45.45		1
Prot. hipotética del gene 2 en <i>Ictanulid</i>	-			33.3	33.3		1
Cortactina	-	+ (rico en pro, ser, treo)	+ (fosforilada)	58.3	58.3	Asociación con F-actina (?). Organización de la estructura celular, diferenciación, ciclo celular, crecimiento, transformación	1,2
Prot. mov. virus coliflor	-		+ (membrana y RE)	50.0	42.0	Transporte del virus. Modifica tamaño de plasmodesmos	3
Prot. mov. virus mosaico coliflor cepa cm-1841	-		+ (membrana y RE)	50.0	42.0	Transporte del virus. Modifica tamaño de plasmodesmos	3
Prot. mov. virus clavel	-		+ (membrana y RE)	57.2	49.7	Transporte del virus. Modifica tamaño de plasmodesmos	3
Prot. mov. virus mosaico higuera	-		+ (membrana y RE)	64.4	59.7	Transporte del virus. Modifica tamaño de plasmodesmos	3
Gene USOP7 en <i>Saccharomyces</i>	-	+ (ricos en asp y glu)	+ (calcio)	42.1	26.3	Similar a proteínas del citoesqueleto. Gene esencial. Proteína motora.	2,3

Tabla 6. Análisis comparativo de diversas proteínas con la PRP2. Seis características de los catorce péptidos usados en la comparación con la PRP2. La última columna indica el grupo al que pertenecen estos péptidos, según sus características generales.

Para la característica de adhesión, solo tres proteínas del grupo 1 la poseían (la proteína B de la capa externa de *Clostridium*, involucrina y glutenina), mientras que todas las de los grupos 2 y 3 la presentaron, excepto la proteína del gene *USO1* de *Saccharomyces*.

El movimiento se evaluó por la función hipotética sugerida para la PRP2, y las proteínas que lo mostraron son todas las del grupo 3. Es importante notar que la proteína del gene *USO1* de *Saccharomyces*, es diferente de las proteínas del movimiento pero con características moleculares similares y que comparten con la PRP2.

Los perfiles hidropáticos de las proteínas se muestran en el apéndice C.

Las gráficas de los perfiles hidropáticos se compararon con un paquete computacional suizo, en base a las regiones de mayor solapamiento permitiendo pequeños espaciamentos a lo largo de las secuencias.

La proteína B de la capa externa de *Clostridium*, se traslapó casi totalmente con el C-terminal de la PRP2. El C-terminal es una región que codifica para una proteína del gene llamado CipA, la cual es componente del celulosoma. Fijino et al. (1993), indicaron que las regiones repetidas ricas en prolina, posiblemente estaban implicadas en el anclaje del celulosoma a la superficie celular. Tiene una localización extracelular al igual que la PRP2.

El precursor de la proteína defectuosa del corion de *Drosophila*, mostró en la comparación con la PRP2 un traslape con su región C-terminal. Lo anterior, se correlaciona con la similitud e identidad que fueron de 42.1%, en ambas. El C-terminal de este precursor proteico sufre modificaciones postraduccionales (splicing alternativo) que hacen que esta sea la región menos conservada, dando lugar a tres productos génicos de diferente tamaño y posiblemente con diferente función. Sin embargo, la secuencia con la que se comparó corresponde al producto génico mayoritario. La función que se le ha atribuido es la formar entrecruzamientos intermoleculares alineando las proteínas para formar la envoltura del queratinocito, usando para ello a una transglutaminasa (Waring et al., 1990).

La involucrina humana es una proteína con una secuencia de amino ácidos muy similar a la de la PRP2. Muestra un mayor traslape en la zona del C-terminal. Al igual que las PRP's, las involucrinas animales son capaces de entrecruzar con otras proteínas de la membrana plasmática usando para ello una transglutaminasa, que análogamente para el caso de las PRP o HRGP es una peroxidasa (Eckert and Green, 1986).

Las gluteninas del trigo poseen una propiedad viscoelástica que les da una consistencia "chiclosa" característica. Son proteínas de reserva y, al igual que las PRP, se insolubilizan por el entrecruzamiento de la proteína a través de puentes disulfuro entre residuos de cisteína. El traslape de esta proteína con la PRP2 fue en una pequeña zona del N-terminal y en todo el C-terminal. Lo anterior pudo ser por los dominios repetidos ricos en prolina que estas proteínas poseen (Anderson et al., 1989).

El precursor de la cadena alfa del fibrinógeno de *Petromizon*, muestra un traslape con la PRP2, principalmente, en el C-terminal. Wang et al. (1989), infirieron que esta región era la que llevaba a cabo el entrecruzamiento de las cadenas del fibrinógeno que por conversión catalizada por una trombina, daban lugar al fibrinógeno. Este entrecruzamiento crea una cubierta, inicialmente suave y, posteriormente dura en los eritrocitos. Sin embargo, es una proteína no-glicosilada.

La nodulina LENOD2 mostró un traslape total con la secuencia de aminoácidos de la PRP2. Lo anterior es sorprendente, dado que son proteínas que tienen funciones diferentes, pero por los antecedentes que muestran motivos repetidos comunes, era un resultado esperado. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el porcentaje de similitud e identidad fue 36.7% y 34.1%,

respectivamente. Además, es una proteína núcleo específica que posee casi el mismo número de residuos de aminoácidos que la PRP2.

El precursor de la proteína del antígeno S de *Plasmodium*, es una proteína estable en condiciones desnaturalizantes que muestra un gran polimorfismo, aunque tiene una localización vacuolar. Cuando se le compara con la PRP2, se observa un traslape casi total en el N-terminal y completo en el C-terminal (Bickle and Coppel, 1992).

La proteína hipotética del gene 2 *Ictalund* se traslapó con 80 aa del C-terminal de la PRP2. Es importante notar que esta proteína forma parte del canal viral del pez gato y cuya similitud e identidad fué del 33.3%. Esta proteína es soluble, lo que correlaciona con la obtención de una fracción soluble de PRP2 localizada en el citoplasma celular.

La cortactina traslapó casi en su totalidad con la PRP2. Un sobrelapamiento importante al inicio de N-terminal, pero sobre todo en el C-terminal. Es una proteína que se asocia con componentes de la membrana plasmática de las células animales. Se ha sugerido que puede funcionar como un regulador dentro del ciclo celular y los procesos de diferenciación y crecimiento. También se ha sugerido que puede actuar en la organización de la estructura celular ya que puede tener interacciones proteína (membranal)-proteína (citoesqueleto). La similitud e identidad fueron del 58.3%, lo que apoya en gran medida las características comunes con la PRP2.

La proteína del movimiento del virus del mosaico de la coliflor es una secuencia de 325 aminoácidos. Tiene varias regiones y dominios: un dominio de unión al RNA, una región espaciadora altamente conservada, una caja G, una caja D (posiblemente regulada por fosforilación), un motivo LPL, dos regiones esenciales para que tenga efecto la actividad biológica (una en el N-terminal y otra en el C-terminal), una alfa hélice (implicada en el esparcimiento de la infección) y un dominio E de 80 aa que incrementa el tamaño límite de exclusión de los plasmodesmos.

Al comparar dicha secuencia con la de la PRP2 se observó que sobrelapa en varias regiones. En el centro, las regiones que sobrelapan son el dominio de unión a RNA y en varios puntos del dominio funcional E. Al realizar el alineamiento de aminoácidos del dominio funcional, se obtuvo una similitud del 46% y una identidad del 23%. Al realizar el análisis conjunto con el perfil hidropático se observó que en el C-terminal hay un traslape con la región espaciadora y con una región esencial para la función biológica. También se observó un sobrelape en región N-terminal, con una región hidrofílica y con la segunda región esencial para que se lleve a cabo la actividad biológica. Comparten también la alfa hélice, que en la proteína viral funciona en el esparcimiento de la infección.

Dado que se desconocía si las similitudes e identidades de la proteína anterior con la PRP2 eran aleatorias, se hicieron comparaciones con tres diferentes proteínas del movimiento de virus vegetales. La proteína del movimiento del virus del mosaico de la coliflor cepa cm-1841, la proteína del movimiento del virus del clavel y la proteína del movimiento del virus del mosaico de la higuera. En general, estas tres proteínas también traslapan con las mismas regiones y dominios funcionales. Lo anterior sugiere otra posible función análoga de la PRP2 con la de las proteínas del movimiento virales.

La proteína codificada por el gene *USO1* de *Saccharomyces*, tiene un sobrelape con la PRP2 en la región del C-terminal. La secuencia repetida de esta región, sugiere que es una α -hélice, homóloga con la de proteínas del citoesqueleto. Algunos dominios repetidos posiblemente sirvan como unión a vesículas, por lo que su posible función motora sea en el transporte de vesículas por unión a microtúbulos. Es una proteína que se ha sugerido está involucrada en la vía de secreción de proteínas desde el RE y AG, hasta su destino final. Es una proteína que se asocia a membranas y/o a componentes del citoesqueleto. Nakajima et al. (1991), seleccionaron levaduras mutantes en este

gene que impedían la segregación sexual. Además, las mutantes mostraban modificaciones morfológicas en el grosor de la envoltura nuclear, RE y múltiples vacuolas.

FUNCIÓN ALTERNA: EXPORTACIÓN DE LA PRP2.

A manera de discusión, podemos decir que las plantas durante su desarrollo llevan a cabo numerosos eventos de señalización intracelular: incremento o disminución de la concentración de hormonas, modificación de la concentración de metabolitos, fosforilación o defosforilación de proteínas, inducción o inhibición en la expresión génica, etc. Pero también, estas señales pueden modificarse cuando la planta es sometida a algún tipo de estrés, por ejemplo, déficit hídrico.

Las plantas elaboran un gran número de respuestas de defensa cuando son expuestas a estreses bióticos o abióticos. Entre ellas la activación transcripcional de los correspondientes genes de defensa (Cramer et al., 1985). Se ha señalado la producción de señales difusibles en el sitio de reconocimiento molecular que pueden inducir la transcripción de genes de defensa en los tejidos vecinos. Aunque la naturaleza de estas moléculas señal es desconocida. Se sabe que tanto productos de rompimiento fúngicos o de la pared celular actúan como potentes elicitores en respuestas de defensa (Davill and Albersheim, 1984).

La inducción preferencial de miembros individuales de la familia génica de las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina en interacciones compatibles *versus* incompatibles, sugiere que estos son regulados por mecanismos de señalización diferentes o que un mecanismo de señalización común es modulado por otros factores específicos para cada tipo de interacción. Esta respuesta puede reflejar diferencias en la habilidad de tejidos individuales para producir y responder a una señal común. La activación selectiva de rutas de señalización por estrés con diferentes características funcionales pueden ser importantes en el despliegue de la defensa de las plantas en diversas situaciones biológicas (Templeton et al., 1990). Durante la infección causada por hongos y elicitores, la epidermis aparentemente libera una señal difusible, ya que se acumulan glicoproteínas ricas en hidroxiprolina en el parénquima perivasculoso. Además, Corbin et al. (1987) indican que un número de distintas señales endógenas por estrés (interacciones compatibles *versus* incompatibles, así como en tejidos heridos) están involucradas en la inducción de transcritos de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina.

Evidencia proporcionada sobre estos eventos de señalización sugieren la acumulación de azúcares como la trehalosa (Fañás-Rodríguez et al., 1998) y la inducción en la expresión de ciertos genes como en el caso de proteínas LEA, proteínas de choque calórico, proteínas que transfieren lípidos o las PRP. Colmenero-Flores et al. (1997), sugieren la existencia de una interrelación en la expresión de estos genes para la sobrevivencia de las plantas. Pero, aunado con el conocimiento de las funciones de algunas proteínas y la gran homología con las PRP2, se pueden sugerir modelos de acción en los que no sólo estén implicadas las interacciones proteína-proteína que se dan por reconocimiento de dominios repetidos dando lugar al entrecruzamiento proteico, sino que a través de este mecanismo de reconocimiento de secuencias o motivos se produzcan interacciones con otros componentes celulares que sirvan de señal como respuesta al déficit

hídrico o como en el caso de los plasmodesmos, donde cambios en su arquitectura (Itaya et al., 1998) y conformación básica (Baluska et al. 2001) principalmente durante el desarrollo, permitiendo cruzar proteínas de poco más de 50 KDa (Pickard and Beachy, 1999).

Mucha de la evidencia mostrada en la alineación de secuencia de aminoácidos y perfiles hidropáticos, apoyan la función de las PRP-HRGP en la formación de una barrera contra los patógenos o de protección a heridas o estreses abióticos a través de entrecruzamientos covalentes. También se ha sugerido que las regiones ricas en prolina tienen interacciones proteína-proteína, como mostró el análisis de características de todos los péptidos del grupo 1 (ver tablas 5 y 6). Por otro lado, al comparar la secuencia de la proteína del movimiento del virus del mosaico de la coliflor y las regiones y dominios que posee (Thomas and Maule, 1995; Waigmann, 1994), con las regiones de mayor similitud e identidad de las HRGP y PRP, se observó que compartían el dominio de unión con el RNA (ver apéndice C). Además, en la comparación de los perfiles hidropáticos se observó un solapamiento con la región hidrofóbica que es esencial para la actividad biológica de esta proteína, compartiendo el dominio de unión con el RNA y la región del carboxilo terminal que es una región altamente conservada y que también tiene que ver con su función biológica (ver apéndice C). Con estos datos, se apoya indirectamente la posible función alterna y análoga de la PRP.

Nuestros resultados apoyan evidencias de asociación de las PRP con componentes de la matriz extracelular o del citoesqueleto, como en la implicación de la PRP3 y PRP4 de *Arabidopsis* en la determinación de la estructura de la pared celular durante el desarrollo y el modelaje de la matriz extracelular (Tierney and Bernhardt, 1998). Funcionalmente, podrían tener papeles similares a otros complejos de proteínas como: a) la profilina, donde la proteína une monómeros de actina, poli-L-prolina y lípidos de polifosfoinositol, la cual está implicada en la morfogénesis y regulación de la formación de estructuras de F-actina del citoesqueleto localizada en regiones celulares específicas a través de la interacción con secuencias ricas en prolina (Mahoney et al., 1997); b) las isoformas de polen capaces de romper la citoarquitectura por asociación con poli-L-prolina y actina (Gibbon et al., 1998); c) la unión de las fibrillas de *Porphyromonas gingivalis* a PRP, PRG (glicoproteínas ricas en prolina) y esterinas, que funcionan como receptores y se ha sugerido que la aparición de sitios de unión se debe a cambios conformacionales y específicamente en regiones de péptidos comunes (Amano et al., 1998); d) observamos que todos los casos anteriores son muy similares al comparar con la cortactina y la proteína codificada por el gen *USO1* de *Saccharomyces*, el cual está relacionado con el citoesqueleto y aparentemente es requerido para el transporte intracelular de proteínas y se regula con calcio (Nakajima et al., 1991); finalmente, e) la relación de los virus y proteínas del movimiento, así como la arquitectura y función de los plasmodesmos que no solo son canales citoplásmicos, sino que permiten la descarga de macromoléculas al floema como un sistema de transferencia a larga distancia regulado por calcio (Baluska et al., 2001), de forma selectiva usando chaperonas plasmodesmales y proteínas de anclaje (Lucas, 1999) o importe no-selectivo de moléculas de hasta 50 KDa (Ruiz-Medrano et al., 2001; Imlau et al., 1999).

Los datos específicos que apoyan la posible existencia de la función hipotética del movimiento de las PRP, fueron los polipéptidos del grupo 3, ya que las diferentes proteínas del movimiento de virus vegetales tienen un porcentaje de similitud promedio del 55.25% para regiones compartidas importantes en la función biológica. Por otro lado, el descubrimiento del transporte de material viral infeccioso usando los plasmodesmos, guió al descubrimiento de proteínas vegetales, incluyendo factores de transcripción, capaces de usar esta vía de tránsito por

medio de componentes celulares involucrados en la mediación y regulación de su transporte así como de factores fisiológicos y del desarrollo (Lucas, 1995; Lucas, 1999).

Mencionaremos tres posibles hipótesis usando como modelos: a) la carga de moléculas en tejidos fotosintéticos (source); carbono fijado y nitrógeno) y descarga a tejidos fotosintéticamente inactivos (sink; tejidos apicales aéreos y radicales, cambium vascular, órganos en desarrollo, raíces, órganos de almacén, tumores inducidos por A. tumefaciens, etc.) (Oparka and Santa Cruz, 2000); b) la función de las proteínas virales del movimiento; y c) Modelo de tráfico macromolecular a través de los plasmodesmos por medio de chaperonas (Lucas, 1999).

Recordemos brevemente las características de los plasmodesmos (figura 11), el modo de acción de las proteínas del movimiento de virus vegetales (figura 14) y el movimiento de macromoléculas a través de los plasmodesmos (figura 13).

LOS PLASMODESMOS

Los plasmodesmos tienen una función importante en el establecimiento de la continuidad citoplásmica entre las células vecinas dentro de órganos y tejidos. Son canales recubiertos por membrana plasmática que establecen rutas intercelulares responsables del tráfico célula-célula de moléculas y macromoléculas (metabolitos, iones, agua, proteínas y ácidos nucleicos). Entre las células adyacentes queda un anulus citoplásmico formado de membrana citoplásmica y RE apesado en el centro llamado desmotúbulo.



Fig. 12. Modelo esquemático de un plasmodesmo (adaptado de Overall and Blackman, 1996). Muestra el RE modificado, en forma de desmotúbulo (cilindro café), el cual atraviesa la pared celular (verde plateado), se asocia con F-actina (perlas verdes), y está interconectado con la membrana plasmática (línea de azul oscuro) via miosina VIII y centrina (elipses rojas, flecha). Miosina VIII y centrina pueden anclar elementos corticales del RE (verde claro), asociados con F-actina (perlas verdes) en la membrana plasmática fuera del plasmodesmo (elipses rojas, cabeza de flecha). Al centro, la vista hipotética de la miosina VIII basada en uniones entre la membrana plasmática y la actina asociada al RE del desmotúbulo. Note que la miosina VIII forma dímeros via dominios coiled-coil. Del lado derecho, una estructura similar (no necesariamente funcional) de la miosina I (borde de cepillo), monómero que forma peldaños interconectados al centro por heces de F-actina (perlas verdes) con la membrana plasmática en una microvellosidad. Mecánicamente estabiliza las microvellosidades de las células del epitelio intestinal, importante para la motilidad citoplásmica (miosina I) más que para la generación de tensión en la membrana plasmática (miosina VIII).

Elementos tardíos estabilizan la estructura interna limitando el lumen y la porosidad (Baluska et al., 2001) definiendo el tamaño del poro del plasmodesmo. La membrana plasmática y el desmotúbulo están densamente cubiertos con proteínas globulares integrales de membrana (citoplásmica y del RE) y proteínas especiales de unión (Oparka et al., 1999; Ding et al., 1992), interconectadas con elementos "spoke-like" (Lucas, 1999). La conductividad plasmodesmal originalmente reportada fue de 800-1000 Da, lo que sugería que el diámetro de los microcanales formados en el *annulus* citoplásmico era de 3 nm, estableciendo un primer nivel de control sobre lo que se puede mover a través de esta ruta "simplesómica": iones y pequeños metabolitos (azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, hormonas), que pasan por difusión. Esta vía es importante durante condiciones de estrés, pues funciona con un control metabólico y fisiológico, ya que el límite en tamaño de exclusión (SEL) es regulado por gradientes transcelulares inducidos por presión del turgor (Oparka and Prior, 1992), ATP (Cleland et al., 1994), calcio (Baluska et al., 2001), luz (Epel and Erlanger, 1991) y otras señales ambientales. Los cambios del turgor o inducidos por heridas aumentan el establecimiento de dominios especiales aislados simplásmicamente.

Estudios de transfección no invasiva usando la proteína verde fluorescente han mostrado que los plasmodesmos existen en tres configuraciones básicas: cerrado, dilatado y abierto (Crawford and Zambryski, 2000). Todo sugiere fuertemente que los plasmodesmos son "organelos" contráctiles que fluctúan en estas tres configuraciones y que la actomiosina y centrina son las fuerzas que participan formando una entrada sensible al calcio (Baluska et al., 2001).

Se ha mostrado que el SEL no es universalmente válido y muchos plasmodesmos existen naturalmente en forma dilatada permitiendo el paso de moléculas más grandes. Algunos datos revelan que los plasmodesmos en regiones sink están dilatados lo que está directamente relacionado con la fuerza sink (habilidad competitiva de los organismos heterótrofos para importar, procesar y guardar fotoasimilados). Así, en la región sink de las hojas, la proteína verde fluorescente (27 kDa) con proteínas fusionadas de diferentes pesos moleculares (hasta poco más de 50 kDa) podían moverse libremente en *Arabidopsis* (Imlau et al., 1999), tabaco (Oparka et al., 1999) y otras plantas y órganos (Itaya et al., 2000). Incluso, alteraciones más dramáticas fueron reportadas en células corticales de raíces de trébol y tomate parasitadas con nemátodos. Aquí, los microcanales se alargaban y el desmotúbulo central desaparecía (Hussey et al., 1992), mostrando una estructura similar a los poros de los elementos de la criba (Baluska et al., 2001).

Análisis de translocación han revelado la presencia de más de 150 proteínas, cuyo rango en peso molecular va desde 10 hasta 100 kDa, las cuales están en un constante intercambio (Nakamura et al., 1993; Fisher et al., 1992; Sakuth et al., 1993). Aparentemente, estas proteínas tienen la capacidad de incrementar el SEL potenciando su propio transporte, además de la identificación de homólogos de chaperonas en el la vía de translocación del floema de *Ricinus communis* sugiere el desdoblamiento y redoblamiento como un paso importante en el proceso de tráfico por medio de los plasmodesmos (Schobert et al., 1995). Utilizando técnicas de inmunofluorescencia se han podido identificar algunas proteínas presentes de forma enriquecida, como actina, miosina VIII, calreticulina localizada en RE, centrina y proteína cinasa dependiente de calcio (White et al., 1994; Yahalom et al., 1998; Baluska et al., 1999, 2000, 2001; Blackman et al., 1999; Reichelt et al., 1999; Overall et al., 2000).

La miosina VIII es exclusiva de plantas (Hodge and Cope, 2000) y la calreticulina es una proteína conservada del RE que secuestra calcio. Estas dos proteínas y la actina están especialmente enriquecidas en la porción externa del plasmodesmo, agrupadas en campos puntuales donde sus cuellos funcionan como un "esfínter" (Radford et al., 1998) y asociados con

elementos corticales del RE. La participación de acciones coordinadas entre actina y miosina en plasmodesmos abiertos/dilatados/cerrados, tiene soporte por hallazgos de depolimerización de F-actina en plasmodesmos dilatados (Ding et al., 1996). Por otro lado, la inhibición de ATPasas de miosina constriñen los cuellos de los plasmodesmos (Radford and White, 1998) y dilata los elementos del RE cercanos al plasmodesmo (Samaj et al., 2000); por lo que la constricción y el mantenimiento de la constricción debe ser un proceso dependiente de ATP (depleción de ATP abre los plasmodesmos).

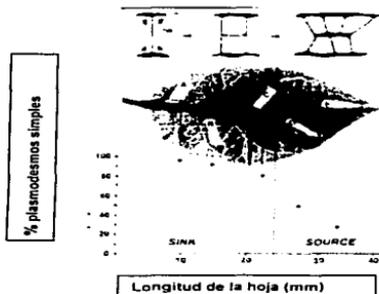


Fig. 13. La transición sink-source es acompañada por un cambio estructural de las formas simple a ramificada de los plasmodesmos. La gráfica muestra el porcentaje de plasmodesmos simples encontrados en diferentes sectores de la hoja. La transición sink-source está señalada en la región sombreada. C-cavidad central; CW-pared celular; D-desmotúbulo; ER-retículo endoplásmico; WC-collar de pared.

Los plasmodesmos pueden ser simples, en forma de H o ramificados (Oparka et al., 1999). Al dividirse la célula, se forman plasmodesmos simples cuando las paredes celulares nuevas son depositadas entre las células hijas, o en paredes celulares pareadas ya establecidas. Tienen una sola membrana plasmática alineada con el canal que contiene el RE axial para formar el desmotúbulo.

Durante la elongación celular, los plasmodesmos simples pueden tener diferentes grados de alteración estructural. Una forma común de estas modificaciones involucra la ramificación inicial en forma de H, hasta producir los ramificados que tienen una cavidad central conspicua en tejidos maduros (Itaya et al., 1998; Oparka et al., 1999). Lo anterior sugiere que la forma y función se regulan por el desarrollo. Así, los primeros, generalmente se localizan en tejidos jóvenes o sink, los de forma H en la zona transición sink-source y los plasmodesmos ramificados en los tejidos maduros o source (Oparka et al., 1999) (fig. 13).

El sistema vascular vegetal comprende los elementos conductores xilema y floema. Están involucrados en el intercambio de nutrientes entre órganos de localización distante. El flujo en el xilema es hacia arriba por medio de filas de células muertas (traqueas y elementos del vaso) cuyo flujo es dirigido por el potencial hídrico (gradiente tensional). Del otro lado, el floema se compone de células vivas que forman el sistema de tubos de la criba. Las hojas maduras funcionan como sitios en los cuales los "fotosintatos" son cargados hacia el sistema de tubos del floema en las venas menores actuando como una fuente de carbón fijado. Los materiales cargados dentro de esta red

venas entran a los componentes de la vía a larga distancia del floema a un flujo dirigido por presión que logra la translocación (figura 14).

APOPLASMA	SIMPLASMA
Paredes celulares y espacios intercelulares que forman un continuum (no-viva) .	Componentes citoplásmicos de las células vivas.
Solutos y solventes que se mueven vía simple difusión y difusión relacionada con gradientes.	Componentes citoplásmicos unidos por el plasmalema, el cual delimita los componentes citoplásmicos de los no-citoplásmicos en la planta.
Constituye el ESPACIO LIBRE .	Movimiento regulado por FUERZA OSMOTICA . La acumulación requiere energía.
Baja capacidad acarreadora	Movimiento y comunicación intercelular es facilitado por PLASMODESMOS .

Tabla 7. Diferencias entre apoplasma y simplasma.

Siguiendo la evolución de los plasmodesmos, el cuerpo de la planta está compuesto en esencia de dos grandes compartimentos, el simplasma y el apoplasma. El apoplasma es la parte no-viva o pared celular, mientras que el simplasma es la parte viva o citoplasma. El apoplasma tiene una baja capacidad acarreadora. Las conexiones plasmodesmales permiten tanto la difusión como el flujo de masa en direcciones especificadas por gradientes de concentración o por fuerzas osmóticas o hidrostáticas generadas dentro del simplasma.

Los tejidos sink reciben nutrientes por liberación simplásmica vía plasmodesmos o a través del apoplasma vía sistema de transportadores de azúcares localizados en la membrana plasmática del complejo elementos de la criba-células acompañantes (CA-EC) y células meristemáticas circundantes o receptoras (Ruiz-Medrano et al., 2001).

TIPOS	ABUNDANCIA PLASMODESMAL	MODO DE DESCARGA
1	Muchos plasmodesmos en todas las interfases celulares entre el mesófilo y el complejo CA-EC.	Simplásmico
2*	Pocos plasmodesmos	Apoplásmico
2b	CA-EC están aislados, en apariencia, apoplásmicamente	Apoplásmico
2c	Alta frecuencia de plasmodesmos en haces vasculares, pocos internos y CA-EC pueden estar aislados	Apoplásmico

Tabla 8. Tipos de carga del floema.

Hay algunos detalles concernientes al concepto y término "descarga del floema" que es necesario tomar en cuenta (tabla 7, figura 14, extremo superior derecho). La frecuencia plasmodesmal es un indicador del potencial de descarga y se define como el número de plasmodesmos a lo largo o asociados con una pared celular en particular o interfase y se expresa en número de plasmodesmos por μm de pared celular (área de contacto con pared). Retomando la frecuencia plasmodesmal y suponiendo que la presencia de un alto número de plasmodesmos en una interfase, entonces habrá una mayor posibilidad de que el transporte siga una ruta simplásmica.

Mientras que con una frecuencia plasmodesmal baja hay una gran probabilidad de descarga apoplásmica en el floema, van Bel y Gamalet (1992) reconocen cuatro subgrupos derivados de los antes mencionados, basados en el origen de las plantas con flores, que sugiere que el primer ancestro tenía carga simplásmica (incluye muchas especies tropicales) y uno más avanzado de origen reciente para los de carga apoplásmica (dominante en herbáceas) (tabla B).

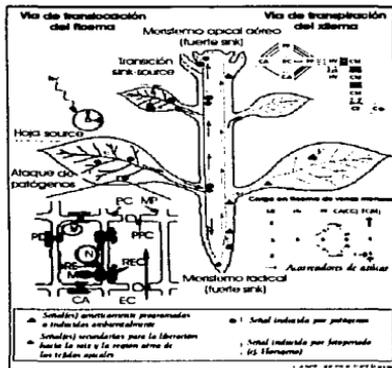


Fig. 14. Ilustración esquemática del sistema vascular vegetal que funciona como un sistema de comunicación inter-órgano. Una señal producida en la raíz (ej. ABA) en respuesta a un estrés ambiental (ej. sequía) se mueve dentro de la vía de transpiración del xilema hacia tejidos vegetativos, donde existe un control celular. Esta molécula señal puede inducir la liberación, hacia la vía de translocación del floema, de una señal secundaria para liberar hacia raíz y tejidos apicales aéreos. Esta señal puede modular el índice de crecimiento de raíces y regiones aéreas por medio del control en el ciclo celular dentro de sus ápices, por mediación de un cambio en el radio raíz-región aérea. La ilustración inferior izquierda muestra que el ataque de patógenos o estresores ambientales pueden inducir la síntesis de moléculas señal que son translocadas vía floema, hacia tejidos sistémicos donde tienen un efecto específico (ej. establecimiento de resistencia sistémica adquirida o inducción floral). Cada complejo CA-EC parece funcionar como un componente integral de un sistema de procesamiento de información. La ilustración inferior derecha muestra las funciones del continuum simplásmico plasmodesmal CA-EC para el intercambio de nutrientes y macromoléculas de información. La sacarosa se mueve simplásmicamente desde ME hacia PF, donde un paso apoplásmico está a veces involucrado en la carga de sacarosa hacia CA-EC. Note que los plasmodesmos en los límites PF-CA debe existir alguna forma de regulación para evitar el regreso por difusión de la sacarosa (plasmodesmo estrecho). La ilustración superior derecha esquematiza el modo de descarga en función de la frecuencia plasmodesmal. CA, células acompañantes; EC, elementos de la cribra; RE, retículo endoplásmico; M, mitocondria; N, núcleo; PD, plasmodesmo; MP, membrana plasmática; REC, retículo de los elementos de la cribra; PC, plato de la cribra; POC, poro del plato de la cribra; V, vacuola; S, sacarosa; BE, mesófito; PF, células del parénquima del floema; CM, células del mesófito; CE, células de la epidermis; CG, células guarda; HV, heces vasculares. Las flechas indican la dirección del flujo.

MODO DE ACCIÓN DE LA PROTEÍNA DEL MOVIMIENTO DE VIRUS VEGETALES.

Estudios celulares y moleculares han proporcionado el soporte experimental de que los plasmodesmos tienen la capacidad de permitir el paso de proteínas y ácidos nucleicos con pesos moleculares mayores a 1 kDa: a) por inducción del incremento del SEL (mayor de 20 y menor a 60 kDa); b) facilitando el movimiento hacia las células vecinas; y c) mediando el transporte célula a célula de transcritos infecciosos. Aunque algunos virus parecen requerir de proteínas adicionales para una infección efectiva. Como en el caso del virus del mosaico del trébol que requiere de cuatro proteínas esenciales para el tráfico del RNA viral (Lough et al, 1998).

Los virus vegetales poseen una proteína del movimiento (PMV), generalmente de bajo peso molecular (30 kDa, para la del virus del mosaico de la coliflor), las cuales se han localizado en la región cercana a los plasmodesmos. La PMV interacciona con complejos proteicos específicos de la membrana plasmática (Mezitt and Lucas, 1996), con elementos corticales de la cara citoplásmica del RE (Helein et al., 1998) y con el citoesqueleto (McLean and Zambryski, 2000) incrementando el SEL. Es así como puede llevar a cabo su transporte como complejo PMV-vRNA (DNA) (Mezitt and Lucas, 1996) (figura 15).

Boyco et al. (2000) han sugerido la PMV confiere una estabilidad congelada en los microtúbulos, posiblemente vía contactos laterales con protofilamentos de microtúbulos e interacciones con sitios de nucleación de microtúbulos. Lo que hace que estas propiedades sean cruciales para la efectividad del transporte de las partículas virales a través de los plasmodesmos, donde la interacción con RE y actina del citoesqueleto pudieran estar implicadas en el incremento del SEL. También se sabe que las paredes celulares poseen microdominios alrededor de los plasmodesmos caracterizados por una composición única de pectina (Orfila and Knox, 2000). La enzima pectin metiltransferasa, es responsable de la desterificación de pectinas secretadas y localizadas en los plasmodesmos (Morvan et al., 1998). Doroknov et al. (1999) y Chen et al. (2000) reportaron que la PMV del virus del mosaico del tabaco interactúa directamente con esta enzima y que esta interacción es esencial para la dilatación de los plasmodesmos. La pectin metiltransferasa puede cambiar rápidamente la estructura de las pectinas de la pared celular especialmente las de la interfase pared celular-membrana plasmática, que afectan directamente la estructura del plasmodesmo.

La respuesta de las plantas al ataque de patógenos ha mostrado una cantidad de respuestas de defensa sistémica. En esta situación, las señales móviles en el floema parecen funcionar activando genes de defensa en tejidos no infectados (figura 14, inferior izquierda). Por ejemplo, en solanáceas, el daño por mordisqueo de insectos da lugar a la inducción sistémica de inhibidores de proteínas. En este caso, la señal móvil es un 18-mero, la sistemina, producida por las células acompañantes (Jacinto et al., 1997). El receptor asociado a membrana y su activación causa la sobre-regulación de una proteína cinasa activada por mitógenos (MAP) y la vía de señalización del jasmonato (Ryan, 2000). La activación de estas señales en cascada se transmiten a los tejidos circundantes donde los genes de defensa se encienden.

MOVIMIENTO DE MACROMOLÉCULAS A TRAVÉS DE PLASMODESMOS

El concepto simplásmico, está basado en bases anatómicas del plasmodesmo. El anulus citoplásmico, formado entre la membrana y localizado centralmente con el retículo endoplásmico apesado, establece la vía simplásmica para la difusión de metabolitos, iones y posiblemente pequeñas hormonas. Lo anterior está de acuerdo con los detalles ultraestructurales del anulus y del tamaño límite de las moléculas que pueden pasar de una célula a otra (moléculas mayores a 1 kDa

son incapaces de pasar por los microcanales) (Lucas, 1998). Varios estudios han demostrado que los plasmodesmos, además de permitir el intercambio de pequeños metabolitos tienen la capacidad de mediar el transporte célula a célula de proteínas y ácidos nucleicos (carga apoplásmica) (Lucas, 1999).

Utilizando coinfección de PMV marcada fluorescentemente y el RNA marcado covalentemente resulta en un tráfico instantáneo tanto de la proteína como del RNA. Lo anterior establece que la capacidad de los plasmodesmos para mediar el transporte célula a célula de macromoléculas existe como una forma de facilitar el tráfico de complejos macromoleculares endógenos (Lucas and Wolf, 1993).

Hay un fuerte soporte a la hipótesis de que el floema tiene la capacidad de translocar señales con secuencias específicas. Experimentos con plantas transgénicas que expresaban GFP (proteína verde fluorescente) o la infiltración en hojas source con GFP insertada en el T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* dá lugar a la pérdida progresiva de GFP-mRNA y GFP asociada con fluorescencia en tejidos sistémicos. Lo que es consistente con la producción, en células del mesófilo, de moléculas con secuencias específicas que pueden moverse vía plasmodesmos hacia el tejido vascular, donde entran en la vía de translocación del floema. Algunos candidatos son fragmentos de RNA de doble cadena (dsRNA), los dsRNA y los cRNA. Usando diferentes técnicas, se observó que los plasmodesmos de los tejidos sink sirven como una vía dinámica para el tráfico de proteínas y complejos RNA-proteína (figura 14, inferior derecha) (Oparka et al., 1999). Lo anterior, refleja la participación de grupos específicos de moléculas producidas por la activación de programas discretos del desarrollo.

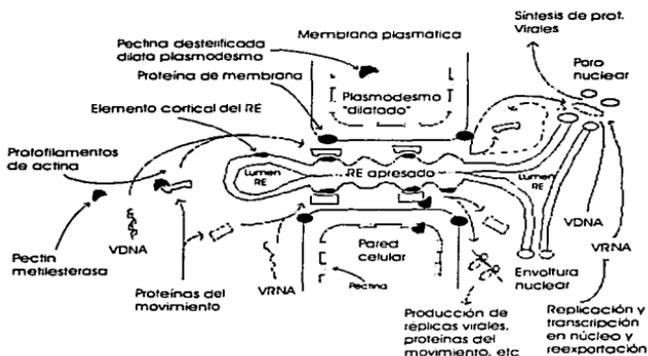


Fig. 15. Esquema general de exportación de la proteína del movimiento de virus vegetales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cientos de proteínas han sido detectadas en la vía de translocación del floema, pero muy pocas han sido caracterizadas a nivel molecular (Ruiz-Medrano et al., 2000).

Existe evidencia directa de que proteínas endógenas, sintetizadas en una célula en particular, son subsecuentemente transportadas hacia las células vecinas (o más distantes). Estos descubrimientos establecen un nuevo paradigma para entender la manera que las plantas superiores controlan ciertos procesos durante su crecimiento y/o desarrollo. Mezitt y Lucas (1996), han discutido sobre el concepto de programación del desarrollo, que involucra control supracelular regulado por el tráfico plasmodesmal de moléculas informacionales (proteínas de control supracelular, SCP) y sus presuntos cofactores en la interacción con proteínas plasmodesmales para potenciar el control temporal y espacial. Además, la circulación a larga distancia de las SCP dentro del floema proporciona un mecanismo por el cual las señales localizadas en los meristemas apicales de la parte aérea pueden viajar para encender otras fases dentro del desarrollo de la planta.

Kreuger y van Holst (1996) sugirieron un posible mecanismo de acción de las AGP, dado que poseen una vida media muy corta (10 -15 min). Esto podría implicar un sistema activo y susceptible a cambios ambientales de degradación y reciclamiento tanto de las AGP, como de las proteínas con las que interacciona. Tomando en cuenta que el epitope es esencial para la actividad, puede ser un vehículo para enviar mensajes, modificando de esta manera el control de la posición celular por alteración en la interacción con las células vecinas, y en consecuencia, de su desarrollo. Alternativamente podría cambiar moléculas diferentes que contengan epitopes que puedan ser modulados de forma similar como una herramienta para modificar la pared celular.

Woehlecke et al. (1998), encontraron que el tamaño de los poros de las células del parénquima en los internodos de *Phragmites australis* (CAV) trin. ex Steudel, eran más grandes en las regiones en crecimiento de las paredes primarias (en elongación), que en las regiones que ya no crecían y estaban endurecidas (células de las regiones intermedia y madura). Dicha regulación parece estar asociada con la presencia de ácido indolacético (aminoácidos), y por otro lado, parece incrementar el tamaño del poro en ausencia de azúcares consumibles. Con lo anterior, puede inducirse un efecto en la elongación celular ("teoría ácida") y por otro la regulación del SEL en base al nivel citosólico de ATP (Cleland et al., 1994). Así, el tamaño del poro controla programas que determinan la expansión de la pared celular durante el crecimiento y la resistencia de estas en las células restantes.

Existe una atractiva posibilidad con respecto a la miosina VIII, que por analogía con la miosina I (estabiliza las microvellosidades del epitelio intestinal), regula la arquitectura del plasmodesmo vía formación de cadena radial de unión entre el desmotúbulo y la membrana plasmática. Lo anterior daría lugar al esquema de que miosinas no convencionales son más importantes para la generación de tensión en la membrana plasmática que para la generación de motilidad citoplásmica (miosina I). Una característica importante en la secuencia de la miosina VIII es su C terminal único, que tiene varios sitios de fosforilación para las proteínas cinasas A y C. También, la presencia de cuatro motivos IQ de unión a calmodulina, que implica la regulación con calmodulina y calcio (Reichelt and Kendrick-Jones, 2000), sugiere que la calreticulina localizada en RE puede regular la arquitectura del plasmodesmo por su capacidad buffer para el calcio (Baluska et al, 1999). El calcio intracelular regula la permeabilidad plasmodesmal a los pocos segundos; cuando se eleva el calcio citoplásmico causa el cierre inmediato de los plasmodesmos, implicando respuestas ambientales, como la luz (Epel and Erlanger, 1991). Junto con el calcio, los fosfoinositoles (IP₂ e IP₃) inhibieron el transporte célula-célula y el IP₃ pudo transportarse rápidamente por los plasmodesmos. Así, las vías de señalización dependientes de calcio pueden ser

controladas por IP_3 (Franklin-Tong et al., 1996). La hipótesis predice que plasmodesmos sink se mantienen activamente en una configuración abierta por una regulación local mediada con calreticulina de los niveles citoplásmicos de calcio que sensiblemente modulan la contractibilidad producida por actomiosina y centrina; por lo que la miosina VIII, centrina y calreticulina serían los principales candidatos en la modulación de la fuerza sink vía apertura de plasmodesmos sink (Baluska et al., 2001).

Las plantas se adaptan a estímulos ambientales y ataque (luz, patógenos, sequía o déficit de nutrientes) a nivel celular, de tejidos o de todo el organismo. La función del sistema de comunicación inter-órgano fue identificada por estudios de inducción floral. El sistema de comunicación es una combinación de programas genéticos en los meristemos apicales aéreos y señales ambientalmente activadas. Es muy compleja la forma en que las plantas responden a un estímulo determinado para dar lugar a una relocalización de recursos y ser almacenados como una fuente limitada de recursos. Un ejemplo bien conocido es la liberación de ABA en el xilema bajo condiciones de sequía (Jackson, 1997) dando lugar a respuestas diferenciales en tejidos distantes. El mecanismo por el cual ABA induce la translocación de recursos se ha obtenido por la caracterización de ICK1 (inhibidor de una proteína cinasa dependiente de ciclina inducida por ABA), que directa o indirectamente, tiene un control diferencial en el ciclo celular así como el índice de crecimiento de tejidos radicales y aéreos (Wang et al., 1998) (figura 14).

Cambiando un poco de tema y en relación con ciertos componentes celulares, podemos mencionar a la trehalosa. La trehalosa (α -D-glucopiranosil-[1-1]- α -D-glucopiranosido), es un disacárido poco común en el reino vegetal. Evidencias indican que es el componente principal de órganos simbióticos, donde aparentemente es sintetizado por el simbionte bacterial (Müller et al., 1994; Schubert et al., 1992). Especialmente en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, la trehalosa se acumula en los nódulos en desarrollo (Streeter, 1985), además de que muestra un alto grado de estimulación en respuesta a estrés por sequía exhibiendo un contenido relativamente alto de agua, lo que pudiera proporcionar a la planta una mayor resistencia a la sequía (Fariás-Rodríguez, et al., 1998).

Lo anterior sugiere que las plantas noduladas tienen una ventaja selectiva ante la sequía. Por otra parte, aunque la trehalosa se encuentra claramente compartamentalizada en el citoplasma del huésped, también se encontró en órganos aéreos del hospedero a concentraciones muy bajas. La alta concentración de trehalosa en el nódulo hace considerar que tras alcanzar ciertos niveles, es como puede entrar al xilema y viajar a órganos aéreos, lo que pudiera estar sucediendo con la PRP2.

La ventaja selectiva que significa la resistencia a la sequía por medio de altas concentraciones de trehalosa como mecanismo osmorregulador, provoca una necesidad, por parte de la planta hacia el osmoprotector producido por los bacterioides en el nódulo. Es decir, bajo condiciones normales en el régimen de agua, el citoplasma de las células infectadas en los nódulos contiene altas concentraciones de solutos, iones y proteínas, pero cuando está involucrado el déficit hídrico, una bacteria que sintetiza un compuesto osmoprotector como respuesta a esta situación le permite a la planta una gran ventaja adaptativa ante condiciones climáticas adversas. Así, la disminución del potencial hídrico causado por la sequía, incrementa la síntesis de trehalosa mientras que el bajo índice de hidrólisis permite el "escape" del nódulo, para actuar como osmoprotector en otras partes de la planta (Fariás-Rodríguez et al., 1998).

Los datos mencionados sobre la trehalosa (Fariás-Rodríguez, 1998), los de la AGP (Kreuger y van Holst, 1996) y los de las proteínas del movimiento de algunos virus de plantas (Mezitt and Lucas, 1996), pueden correlacionarse con los resultados obtenidos aquí, específicamente cuando

la proporción de proteínas totales en plantas adultas en condiciones de déficit hídrico se modifica (fig. 10). Los resultados indican la presencia de proteínas diferentes a las HRGP o PRP, las cuales incrementaban su concentración para luego disminuir dramáticamente. Posiblemente, lo que estamos observando es un conjunto de mecanismos que usa la planta cuando es sometida a déficit hídrico. Por un lado, podría existir un mecanismo acoplado con la interacción a plasmodesmos, como en el caso de proteínas del movimiento de virus vegetales; por otro lado, podría haber un mecanismo, aparentemente guiado por la disminución en el potencial hídrico, que indujera el aumento en las concentraciones proteicas y de otros componentes celulares (iones y azúcares), como el mostrado con la trehalosa (Farias-Rodríguez et al., 1998) y que correlaciona con la alta acumulación de ENOD2 y de PRP2, en los nódulos de frijol. Alternativamente, podría darse una modificación de la posición celular por alteración en la interacción con las células vecinas y en consecuencia de su desarrollo por la disolución de la interacción proteína-proteína, como en el caso de las AGP (Kreuger y van Holst, 1996).

MODELOS

Con todo lo anterior, y nuestros resultados, pudimos inferir que las PRP2 no solo funcionan como proteínas estructurales de la pared celular sino que podía tener otra importante función fisiológica como proteína señal durante condiciones de déficit hídrico. En algunos experimentos realizados con plántulas de frijol simulando sequía usando diferentes concentraciones de ABA, con inmunolocalización se observó la presencia incrementada de PRP en células acompañantes (comunicación personal, Colmenero y Covarubias), lo que sugiere fuertemente una posible translocación desde el complejo células acompañantes-elementos de la criba (CA-EC) para pasar a la vía de translocación del floema. El modelo por el cual la PRP2 es capaz de viajar usando la vía cide transporte a larga distancia se discute a continuación.

Como se mencionó al inicio de esta sección, y habiendo recordado las características de los plasmodesmos (figura 12), el modo de acción de las proteínas del movimiento de virus vegetales (figura 15) y el movimiento de macromoléculas a través de los plasmodesmos, se sugieren tres posibles modelos que pudieran estar funcionando para el transporte de la PRP2:

- a) Modelo de propagación de infección viral por medio de proteínas virales del movimiento (PMV) (Mezitt and Lucas, 1996).
- b) Modelo de tráfico macromolecular a través de los plasmodesmos por medio de chaperonas (Lucas, 1999).
- c) Modelo de tráfico inespecífico de macromoléculas (Oparka et al., 1999).

Con respecto al primer modelo, mencionaremos los resultados obtenidos por Lucas and Wolf (1993), quienes utilizando confección de PMV marcada fluorescentemente y el RNA marcado covalentemente, observaron un tráfico instantáneo tanto de la proteína como del RNA. Lo anterior estableció que la capacidad de los plasmodesmos para mediar el transporte célula a célula de macromoléculas existía como una forma de facilitar el tráfico de complejos macromoleculares endógenos. Existe evidencia que apoya que los plasmodesmos de plantas superiores tienen tráfico selectivo (Lucas et al., 1993; Perbal et al., 1996). Un ejemplo es la proteína RPP13-1 de 13 KDa, que codifica para un miembro de la familia génica de la tio-redoxina, cuya expresión está confinada a las células acompañantes en hojas y tallos del arroz (Ishwatari et al. 1998). Cuando la RPP13-1 marcada con fluorescencia era microinyectada a las células del mesófilo, se movía de una célula a otra por medio de los plasmodesmos que facilitaban su transporte. Por otro lado, RPP13-1 además de inducir

el incremento del SEL se estableció la importancia de cinco amino ácidos en el N-terminal y los residuos del 101-108 para una interacción efectiva con los plasmodesmos. Lo anterior proporcionó datos valiosos con respecto a motivos esenciales de interacción con plasmodesmos para el transporte de célula a célula (Lucas, 1999).

Es posible sugerir que las PRP2 posean motivos esenciales reconocidos por alguna proteína-cofactor (complejo PRP2-proteína o cofactor de unión al citoesqueleto) e interactuar con algún componente del citoesqueleto, moviéndose de esta manera en el citoplasma (posiblemente miosina VIII) (Fig. 16), como pudo inferirse de los resultados obtenidos en la determinación de proteínas totales, donde se observó un incremento de proteínas de naturaleza diferente a las de la pared celular. Posterior a su "llegada", se lleva a cabo una interacción con proteínas plasmodesmales tanto de la membrana plasmática como del RE con un posiblemente anclaje a través del reconocimiento de dominios o secuencias específicas. El direccionamiento proteico se identifica y regula por medio de dominios, para llegar al sitio blanco: los plasmodesmos. Finalmente, con el reconocimiento-unión temporal a proteínas globulares específicas localizadas en RE apesado y membrana plasmática, que es lo que determina y regula el tipo de moléculas que se moverán hacia las células vecinas para llegar a la vía de flujo de larga distancia del floema, de forma similar a como lo hacen los virus (figuras 15 y 16).

Lucas (1999) propuso un modelo basado en una de las primeras evidencias de proteínas endógenas que traficaban en el floema, la proteína KNOTTED1 (KN1) que controla el destino final de los meristemas vegetativos y florales. Se demostró la planta tenía factores de transcripción con propiedades funcionales casi idénticas a las de la PMV: incrementaba el SEL hasta 40 KDa y se propagaba rápidamente (Lucas et al, 1995). Experimentos realizados con proteínas del floema de la calabaza, mostraron translocación acompañada de incremento del SEL, cuyo tamaño iba de 9-200 KDa, sugiriendo fuertemente que esta proteína se desdobla para ser transportada a través de los microcanales plasmodesmales.

Experimentales usando KN1 y modificando su tamaño por unión covalentemente a partículas de oro de diferentes tamaños (1.4, 6 y 15 nm), se observó que no cancelaba la capacidad de interactuar con los plasmodesmos ni de translocarse, pero el movimiento era reducido, lo que sugería que complejos de este tamaño llegan a límites físicos para los microcanales produciendo un entorpecimiento estérico durante el proceso de translocación. Lo anterior dió evidencia directa de que una combinación de proteínas desdobladas y el incremento físico en el diámetro de los microcanales plasmodesmales están involucrados en la translocación de proteínas (Lucas, 1999).

Con estas bases experimentales, propuso un modelo que muestra la posible forma de tráfico macromolecular a través de los plasmodesmos en tres pasos: 1) interacción con chaperonas para unirse posteriormente a receptores plasmodesmales; 2) producción de un cambio conformacional y transferencia al sitio de unión para aumentar el SEL; y 3) translocación de la proteína desdoblada a través del microcanal plasmodesmal dilatado para, finalmente, liberar las macromoléculas a la célula adyacente (figura 17).

Retomando lo anterior, la PRP2 pudiera ser translocada por su interacción con chaperonas y posterior reconocimiento de secuencias específicas por receptores plasmodesmales; dicha interacción induce la translocación y finalmente el redoblamiento y liberación de la proteína de una célula a otra hasta llegar a la vía de flujo a larga distancia del floema.

El último modelo, se basa en los tres tipos y las tres conformaciones de los plasmodesmos. Los plasmodesmos se encuentran en tres tipos: simples, en forma de H o ramificados, y están localizados en diferentes órganos y tejidos según su capacidad fotosintética: nula o sink, alta o source y moderada o sink-source). Dicha capacidad es regulada principalmente por el desarrollo;

es decir, hay plasmodesmos simples en tejidos sink, plasmodesmos ramificados en órganos source y plasmodesmos en forma de H en tejidos que se encuentran en la región de transición sink-source. En el caso de las tres conformaciones: abierta, dilatada o cerrada tienen lugar por la participación de acciones coordinadas entre actina y miosina VIII en los plasmodesmos. Hay que señalar que la frecuencia plasmodesmal como indicador del potencial de descarga es un parámetro que debe tomarse en cuenta, dependiendo del tipo celular en un tejido en particular.

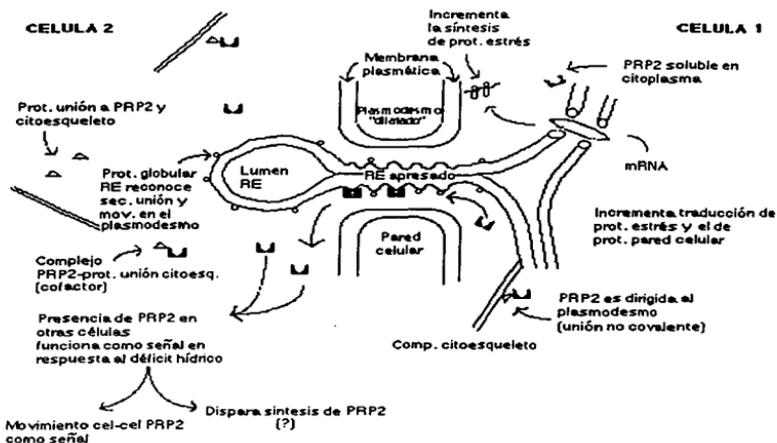


Fig. 16. Modelo sugerido de exportación de la proteína rica en prolina (PRP2) de la pared celular del frijol.

En los modelos anteriores, se postula un transporte altamente selectivo y/o dependiente de proteínas endógenas para el transporte de macromoléculas a través de los plasmodesmos. Oparka et al. (1999), demostraron que proteínas como la esporamina (20kDa) y patatina deletada (47 kDa-56 aa) fusionadas con GFP (27 kDa) y GFP sola, eran capaces de pasar a través de plasmodesmos localizados en regiones sink con un movimiento inmediato hacia las células adyacentes, siendo esto parte de la evidencia que indicaba la división funcional entre los tres tipos de plasmodesmos.

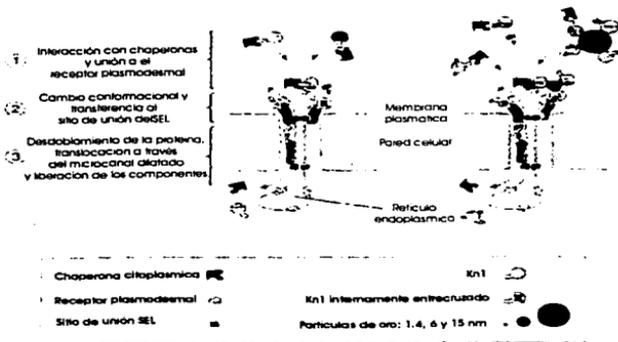


Fig. 17. Modelo de tráfico de macromoléculas a través de plasmodesmos por medio de chaperonas. Tres pasos están involucrados en la translocación célula a célula de proteínas a través de plasmodesmos. El diagrama de la izquierda representa el movimiento célula a célula de KN1 y el comportamiento de KN1 entrecruzado. El diagrama de la derecha se enfoca en la translocación impuesta por la introducción de KN1 conjugado con oro. Note que este modelo no intenta dar la localización exacta de los componentes mostrados para la maquinaria de translocación plasmodesmal en un compartimiento celular específico. En el primer paso (1), una chaperona citoplasmática se une a KN1 y el complejo chaperona-KN1 interactúa con un receptor plasmodesmal. El complejo chaperona-KN1 es liberado al orificio del microcanal plasmodesmal y se une al sitio de dilatación SEL (2). En esta segunda fase, un cambio conformacional apropiado, el complejo se une al sitio de unión SEL, permitiendo el acceso a través del microcanal. En el tercer paso (3) el complejo chaperona KN1 ya desdoblado es translocado a través del microcanal y es liberado en el citoplasma de la célula vecina. Este proceso involucra un conjunto único de proteínas localizadas dentro del microcanal plasmodesmal. Internamente KN1 entrecruzado es capaz de unirse a la chaperona e interactuar con el receptor plasmodesmal. Sin embargo como KN1 entrecruzado no puede tener el cambio conformacional apropiado, el complejo se une al sitio de unión SEL, siendo incapaz de activar el mecanismo de dilatación y el proceso se bloquea en el paso 2. Los conjugados de oro 1.4 nm-KN1 se unen a la chaperona y reconocen exitosamente a los componentes plasmodesmales de cada paso durante la translocación. Los complejos de oro 6 y 15 nm-KN1 también se unen a la chaperona e interactúan con el receptor. Como el tamaño físico excede el espacio disponible para entrar y unirse al sitio de unión SEL, la translocación se detiene entre el paso 1 y el paso 2. Cuando KN1 entrecruzado o el complejo de oro de 6 y 16 nm-KN1 se unen al receptor plasmodesmal o al sitio de unión SEL, bloquean el acceso a estos sitios para otras proteínas capaces de traficar (Kragler et al., 1998).

Sugerían que si en hojas sink los plasmodesmos permitían el movimiento sin restricción de la GFP descargada en el floema, entonces otros tipos de solutos y macromoléculas (como la PRP2) también se descargarían al floema usando la misma vía, tomando en cuenta que el tamaño de las macromoléculas para traficar libremente tiene un rango de 50-60 Kda, por lo que parece

innecesario el reconocimiento, interacción específica con proteínas o transportadores plasmodesmales.

Sin embargo, en regiones source, el movimiento de la GFP se mostró restringido, y solo se observó tráfico extensivo cuando existía la presencia de la PMV, la cual modifica el SEL plasmodesmal, aunque no queda descartada la actividad de algún otro factor endógeno del movimiento (Mezzit and Lucas, 1996), chaperonas, etc. Concluyeron que la permeabilidad de los plasmodesmos dependía del tipo de tejido examinado: sink o source. Por otro lado, dicha permeabilidad también puede incrementarse por traumas fisiológicos como la respuesta a inhibidores metabólicos, estrés anaeróbico, inhibidores de la polimeración de actina o estrés osmótico. La explicación es que dichos traumas modifican la estructura de los plasmodesmos ramificados hasta tener una permeabilidad similar a la de los plasmodesmos simples, como un mecanismo que facilite la rápida entrada de macromoléculas en las células de los diferentes tejidos dañados.

De esta forma, la PRP α podría moverse desde las células de las raíces (tejidos sink) y ser translocados por medio de plasmodesmos simples hasta llegar a la vía de flujo del floema, viajando sin ninguna restricción y con un movimiento inmediato como molécula señal hasta aquellos tejidos más sensibles, como son los meristemos apicales.

CONCLUSIONES

- 1 El efecto que el déficit hídrico produce durante el crecimiento y desarrollo del frijol es una compleja regulación temporal y espacial en la insolubilización o entrecruzamiento de las glicoproteínas en la pared celular, por lo que la hipótesis nula que refiere que el déficit hídrico no produce ningún efecto durante el crecimiento y desarrollo del frijol queda rechazada.
- 2 Dentro de los métodos cualitativos, el efecto del déficit hídrico observado usando impresión de tejidos durante el crecimiento de las plántulas se halló mayor frecuencia e incremento en la intensidad de la reacción inmune de la HRGP en forma soluble (20:14), mientras que la PRP2 con baja frecuencia e intensidad de la reacción inmune disminuida (1:1). Lo anterior muestra que el déficit hídrico induce la mayor participación de la HRGP soluble (intensidad de la reacción inmune incrementada).
- 3 El efecto del déficit hídrico usando el análisis por inmunolocalización fue una mayor frecuencia e incremento en la intensidad de la reacción inmune de la HRGP (19:16) en forma soluble e insoluble, mientras que la PRP2 presenta una menor frecuencia e intensidad de la reacción inmune incrementada (18:10). Lo anterior muestra que el déficit hídrico induce el incremento de la intensidad de la reacción inmune de la HRGP y el decremento de la PRP2.
- 4 El efecto del déficit hídrico observado en los Western blots se halló un incremento en la frecuencia y la solubilidad de la HRGP (8:6), siendo la fracción total la de mayor frecuencia con respecto a la fracción de la pared celular (4:2). La PRP2 muestra una menor frecuencia con alta solubilidad (6:5), siendo la fracción total la de mayor frecuencia (3:2), la fracción de la pared celular para ambas proteínas es la que tiende a insolubilizarse (2:1). En las regiones E1, I y M de la fracción de la pared celular hay proteínas de bajo peso molecular (PM). Lo anterior mostró que el déficit hídrico a) incrementa la solubilidad de la HRGP y la PRP2, b) HRGP tiene una mayor participación que la PRP2, c) el tiempo de inducción con déficit hídrico es 1 h, dando como efecto el incremento o disminución en la solubilidad y/o frecuencia para ambas proteínas, d) las regiones E2, I y M son las que presentan mayor frecuencia con alta solubilidad; e) las regiones E1, I y M son las que presentan mayor frecuencia con baja solubilidad y proteínas de bajo PM.
- 5 Dentro de los métodos cuantitativos, el efecto del déficit hídrico observado usando la determinación de proteínas totales y de hidroxiprolina durante el crecimiento de las plántulas se encontró una mayor frecuencia de modificaciones en proteínas hidroxiladas solubles e insolubles en E1 con respecto al resto de las regiones anatómicas (9.3:2:1).
- 6 Dentro de los métodos cualitativos, el efecto del déficit hídrico observado usando la impresión de tejidos durante el desarrollo de las plantas hubo una mayor frecuencia con intensidad de la reacción inmune disminuida en HRGP (32:19) con un máximo a los 15 d (7:8:4) y la intensidad de la reacción inmune incrementada tuvo un máximo a los 8 d (6:3:4). La AGP disminuyó en un 50% la frecuencia con intensidad de la reacción inmune disminuida (16:10) alcanzando el máximo a los 22 d (3:3:4). Lo anterior sugiere que el déficit hídrico induce una mayor participación de la HRGP con baja intensidad de la reacción inmune hasta los 15 d y una casi nula participación de la AGP en estas condiciones hídricas.
- 7 El efecto del déficit hídrico observado en los análisis por inmunolocalización sugiere que un mismo tratamiento produce efectos de alta solubilidad y/o insolubilidad temporal y espacial diferentes para cada una de las proteínas

estudiadas. Así, el déficit hídrico es un factor que determina una mayor participación a tiempos medios (HRGP) y tardíos (PRP2) mientras que el proceso del desarrollo la determina tempranamente.

8 El efecto del déficit hídrico observado en los Western blot sugiere que el déficit hídrico: a) induce la mayor participación de la HRGP soluble que de la PRP2 soluble, b) induce un incremento en la solubilidad de la HRGP; c) el tiempo de inducción en el incremento de solubilidad de la HRGP es a los 8 d mientras que para la PRP2 es a los 15 d; d) el tiempo de inducción para la insolubilización de ambas proteínas es a los 15 d; e) la HRGP tiene una mayor participación en nódulos, tallo e internodo (4.5.5); f) la PRP2 muestra mayor participación en nódulos, raíz primaria, raíz secundaria y tallo (2.3.2.2); g) tanto el déficit hídrico como el desarrollo son moduladores de la solubilidad de la HRGP tanto en la fracción total como en la de la pared celular.

9 Dentro de los métodos cuantitativos, el efecto del déficit hídrico observado usando la determinación de proteínas totales y de hidroxiprolina durante el desarrollo fue que el déficit hídrico induce un incremento de la solubilidad de las proteínas con prolinas hidroxiladas y de la fracción total (1.3.10), siendo la zona R1 la de mayor frecuencia de incremento en la solubilidad de las proteínas con prolinas hidroxiladas (4.2).

10 La herida da lugar a que las proteínas de la pared celular se entrecrucen rápida y mayoritariamente en todos las regiones de la plántula

11 Se identificaron dos polipéptidos con el anticuerpo policlonal anti-PRP2. Los pesos moleculares aproximados fueron 33 y 36 Kda; estos pueden ser diferentes proteínas pero con características similares o una degradación o modificación postraduccional del mismo polipéptido. Se observó una regulación diferencial durante el crecimiento, durante el desarrollo y durante el déficit hídrico.

12 La presencia de señal citoplásmica en las inmunolocalizaciones sugiere que las proteínas de la pared celular pueden estar unidas o en componentes u organelos celulares (membranosos o del citoesqueleto).

13 La co-extracción de las PRP2 con proteínas totales junto con una reacción negativa de unión del anticuerpo sugiere una posible asociación (específica) no observada con las HRGP.

14 Se proponen las siguientes funciones. a) HRGP es una proteína estructural, el entrecruzamiento se manifiesta preferentemente durante el desarrollo y con déficit hídrico, y b) PRP2 es una proteína estructural, el entrecruzamiento se manifiesta preferentemente durante el crecimiento (tamaño) así como con déficit hídrico. El posible movimiento de la proteína(s) de un tejido a otro sugiere una función de proteína señal.

15 De los datos obtenidos se propone el siguiente significado biológico como sigue.

- Fase rápida
Intracelular. Protección "transitoria"; modificaciones muy pequeñas de la presión del turgor, entrecruzamiento de proteínas de la pared celular, proteínas entrecruzadas no-covalentemente se liberan, síntesis de proteínas (cofactores).
- Fase lenta
Extracelular, interruptor que "encienda o apague" mecanismos de alarma por medio del tráfico de moléculas mensajeras para proteger (crecimiento) y contener (desarrollo) con ambientes hostiles (déficit hídrico) modificación del SEL, disminución de ATP, disminución de la presión del turgor, translocación, tráfico a larga distancia.

PERSPECTIVAS

1.- Confirmar la hipótesis del movimiento de la PRP2.

a) Analizar la expresión del mRNA de PRP2 mediante hibridaciones *in situ* y compararla con el patrón de localización de la proteína del movimiento

b) Realizar un vector de PRP + PVF (proteína verde fluorescente) e inyectar en células para verificar movilización.

2.- Determinar que tipo de material proteico se une a las PRP2 usando una doble señal con anticuerpos para PRP2 y para componentes del citoesqueleto (profilina, actina, etc.)

3.- Investigar que otros factores bióticos o abióticos producen la misma respuesta obtenida a tiempos cortos (ni herida ni déficit hídrico ni crecimiento).

a) Determinar variaciones en el potencial eléctrico a tiempos cortos.

b) Determinar variaciones de diferentes hormonas a tiempos cortos.

c) Investigar efecto de exceso o falta de iones y/o nutrientes.

4.- Experimentar con variedades resistentes o susceptibles a sequía.

5.- Experimentar con mutantes parciales en pared celular celular.

6.- Experimentar con varios medios estresantes que provoquen una respuesta de déficit hídrico usando cultivo de tejidos.

7.- Experimentar con diferentes fracciones de agua para producir déficit hídrico así como déficit por falta de riego.

8.- Determinación de di-isoditrosina bajo las diferentes condiciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acevedo E., T. C. Hsiao, D. W. Henderson. 1971. Immediate and subsequent growth responses of rice leaves to change in water status. *Plant Physiol.* 48:631-636.
2. Armano A., S. Shizukuishi, H. Horie, S. Kimura, I. Morisaki, S. Hamada. 1998. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to proline-rich glycoproteins in parotid saliva via a domain shared by major salivary components. *Infect. Immun.* 66:2072-2077.
3. Anderson O. D., F. C. Greene, R. E. Yep, N. G. Halford, P. R. Shewry, J. M. Malpic-Romero. 1989. Nucleotide sequences of the two high-molecular-weight glutenin genes from the D-genome of a hexaploid bread wheat, *Triticum aestivum* L. cv. Cheyenne. *Nucleic Acids Res.* 17:461-462.
4. Averyhart-Fullard V., K. Datta, A. Marcus. 1988. A Hydroxyproline rich-protein in the soybean cell wall. *Proc. Natl. Assoc. Sci. USA.* 85:1082-1085.
5. Baluska F., J. Smajr, R. Napier., D. Volkmann. 1999. Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex. *Plant J.* 19:481-488. In Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Volkmann. 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
6. Baluska F., D. Volkmann, P. W. Brown. 2000. Actin-based domains of the "cell periphery complex" and their associations with polarized "cell bodies" in higher plants. *Plant Biol.* 2:253-267. In Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Volkmann. 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
7. Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Volkmann. 2001. Sink plasmodesmata as gateways for phloem unloading. Myosin VIII and calreticulin as molecular determinants of sink strength? *Plant Physiol.* 126:39-46.
8. Bickie O. D., R. Coppel. 1992. S-antigen protein precursor of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56:141-150.
9. Blackman L. M., J. D. I. Harper, R. L. Overall. 1999. Localization of a centrin-like protein to higher plant plasmodesmata. *Eur. J. Cell Biol.* 78:297-304. In Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Volkmann. 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
10. Bozarth, C. S., J. E. Mullet, J. Boyer. 1987. Cell wall proteins at low water potentials. *Plant Physiol.* 85:261-267.
11. Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
12. Bradley D. J., P. Kjelbom, C. J. Lamb. 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70:21-30.
13. Brady J. D., I. H. Sadler, S. C. Fry. 1996. Di-isodityrosine, a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross-link. *Biochem. J.* 315:323-327.
14. Brisson L., R. Tonhaken, C. Lamb. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6:1703-1712.
15. Brown A. D. 1990. *Microbial water stress physiology*. John Wiley & Sons, Ltd. England. 156 pp.
16. Carpita N. C. 1986. Incorporation of proline and aromatic amino acids into cell walls of maize coleoptiles. *Plant Physiol.* 80:650-665.
17. Cassab G. I., J. E. Varner. 1987. Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining an by tissue printing on nitrocellulose paper. *J. Cell Biol.* 105:2581-2588.
18. Cassab G. I., J. E. Varner. 1988. Cell wall proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:321-353.
19. Cassab G. I., J. Nieto-Sotelo, J. B. Cooper, G. J. Van Holst, J. E. Varner. 1985. A developmentally regulated hydroxyproline-rich glycoprotein from the cell walls of soybean seed coats. *Plant Physiol.* 77:532-535.

20. Cavalleri A. J., J. S. Boyer. 1982. Water potentials induced by growth in soybean hypocotyls. *Plant Physiol.* 69:492-496.
21. Cleland R. E., T. Fujiwara, W. J. Lucas. 1994. Plasmodesmal-mediated cell-to-cell transport in wheat roots is modulated by anaerobic stress. *Protoplasma* 178:81-85.
22. Colmenero-Flores J. M. 1997. Caracterización de genes que responden a déficit hídrico en *Phaseolus vulgaris* L. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México, 215 pp.
23. Colmenero-Flores J. M., F. Campos, A. Garcíarrubio, A. A. Covarrubias. 1997. Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol. Biol.* 35:393-405.
24. Cooper J. B., J. E. Varner. 1983. Insolubilization of hydroxyproline-rich cell wall glycoprotein in aerated carrot root slices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112:161-167.
25. Corbin D. R., N. Sauer, C. J. Lamb. 1987. Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Mol. Cell. Biol.* 7:4337-4345.
26. Cramer C. L., T. B. Ryder, J. N. Bell, C. J. Lamb. 1985. Rapid switching of plant gene expression by fungal elicitors. *Science* 227:1240-1243.
27. Crawford K. M., P. C. Zambrsky. 2000. Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmal transport. *Curr. Biol.* 10:1032-1040. *In* Baluska F., F. Cyrcokova, J. Kendrick-Jones, D. Voikmann. 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
28. Christopels M. J. 1970. Synthesis and secretion of hydroxyproline containing macromolecules in carrot. *Plant Physiol.* 45:223-227. *In* Cassab G. I., J. E. Varner. 1987. *J. Cell Biol.* 105:2581-2588.
29. Darvill A. G., P. Albersheim. 1984. Phytoalexins and their elicitors: a defense against microbial infection of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:245-275. *In* Templeton M. D., R. A. Dixon, C. J. Lamb, M. A. Lawton. *Plant Physiol.* 94:1265-1269.
30. Deetz D. A., H. G. Jung, D. R. Buxton. 1996. Water-deficit effects on cell-wall composition and *in vitro* degradability of structural polysaccharides from alfalfa stems. *Crop. Sci.* 36:386-388.
31. Ding B., J. S. Haudenshield, R. J. Hull, S. Wolf, R.N. Beachy, W. J. Lucas. 1992. Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell.* 4:915-928.
32. Ding B., M.O. Kwong, L. Warnberg. 1996. Evidence that actin filaments are involved in controlling the permeability of plasmodesmata in tobacco mesophyll. *Plant J.* 10:157-164. *In* Baluska F., F. Cyrcokova, J. Kendrick-Jones, D. Voikmann. 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
33. Doerner P. J. E. Joergensen, R. You, J. Steppuhn, C. Lamb. 1996. Cyclin expression limits root growth and development. *Nature.* 380:520-523.
34. Doonan J. J. 1996. Plant growth: root in the cell cycle. *Curr. Biol.* 6(7):788-789.
35. Dougalit D. K., K. Shimbayashi. 1990. Factors affecting growth of tobacco callus tissue and its incorporation of tyrosine. *Plant Physiol.* 35:394-404.
36. Drozd M., E. Kucharaz, J. Szyja. 1976. A calorimetric micro-method for determination of hydroxyproline in blood serum. *Z. Med. Laborchnik* 17:163-171.
37. Eckert R. L., H. Green. 1986. Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell* 46:583-589.
38. Epel B. L., M. A. Erlanger. 1991. Light regulates symplastic communication in etiolated corn seedlings. *Physiol. Plant.* 83:149-153.
39. Feriás-Rodríguez R., B. Arias, J. J. Peña-Cabriles. 1998. The accumulation of trehalose in nodules of several cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its correlation with resistance to drought stress. *Physiol. Plantarum* 102:353-359.
40. Fisher D. B., Y. Wu, M. s. b. Ku. 1992. Turnover of solute proteins in the sieve tube. *Plant Physiol.* 100:1433-1441. *In* Lucas W. J. 1995. *Curr. Op. Cell Biol.* 7:673-680.
41. Franklin-Tong V. E., B. K. Drovak, A. C. Allan, P. A. C. Watkins, A. J. Trewavas. 1996. Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by a slow-moving calcium wave propagated by inositol 1, 3, 5-triphosphate. *Plant Cell.* 8:1305-1321. *In* Baluska F., F. Cyrcokova, J. Kendrick-Jones, D. Voikmann. 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
42. Friensen H. J., J. P. Napp, T. Gledemans, W. Siekema, H. Van Dam, F. Govers, J. Lounseer, A. Van Kammen, T. Bisseling. 1987. Characterization of nodulin 75 of soybean: a gene product involved in early stages of root nodule development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4495-4499. *In* Wilson R. C., F. Long, E. M. Maruoka, J. B. Cooper. 1994. *Plant Cell* 6:1265-1275.
43. Fry S. R. 1983. Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell wall glycoprotein. *Biochem. J.* 204:449-455. *In* Carpita, N. C. *Plant Physiol.* 80:660-666.

44. Fry S. C. 1983. Feruloylated pectins from the primary cell wall; their structure and possible functions. *Planta* 157:111-123.
45. Fry S. C. 1988. The growing plant cell: chemical and metabolic analysis. Longman, Harlow.
46. Fry S. C. 1994. Chemical analysis of components of the primary cell wall. *In Plant cell biology: a practical approach*. Ed. by N. Harris & K. J. Oparka. IRL Press at Oxford University, New York. pp.199-220.
47. Fujino T., P. Béguin, J. P. Aubert. 1993. Organization of a *Clostridium thermocellum* gene cluster encoding the cellulosomal scaffolding protein C1pA and a protein possibly involved in attachment of cellulosome to the cell surface. *J. Bact.* 175(7):1991-1999.
48. Gibbon B. C., L. E. Zonia, D. R. Kovar, P. J. Hussey, J. C. Staiger. 1998. Pollen protein function depends on interaction with proline-rich motifs. *Plant Cell* 10:981-993.
49. Goodenough U. V., B. Gebhart, R. P. Mecham, J. E. Heuser. 1986. Crystals of the *Clamydomonas reinhardtii* cell wall polymerization, depolymerization, and purification of glycoprotein monomers. *J. Cell Biol.* 103:405-417.
50. Green P. B., R. O. Erickson, J. Bunny. 1971. Metabolic and physical control of cell elongation rate. *Plant Physiol.* 47:423-430. *In* Schultz H. R., M. A. Matthews. 1993. *Crop Sci.* 33:287-294.
51. Harris S. 1981. *In* Brown A. D. 1990. Microbial water stress physiology. John Wiley & Sons, Ltd. England. 156 pp.
52. Hellein M., H. S. Padgett, J. S. Gens, B. G. Pickard, S. J. Casper, B. L. Epeil, R. N. Beachy. 1998. Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell.* 10:1107-1120. *In* Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Volkmann. 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
53. Hernández M. E. 1996. Sin modeloje para pronosticar sequías, lo que cabe es administrar la poca agua del país. *In* López S. 1996. Gaceta UNAM. 23 de septiembre, 10-13 pp.
54. Hiroshi N., J. S. Boyer. 1990. Wall extensibility and cell hydraulic conductivity decrease in enlarging stem tissue at low water potentials. *Plant Physiol.* 93:1610-1619.
55. Hodge T. M., J. T. V. Cope. 2000. A myosin family tree. *J. Cell Sci.* 113:3353-3354. *In* Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Volkmann. 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
56. Hsiao T. C. 1973. Plant responses to water stress. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24:519-570. *In* Schultz H. R., M. A. Matthews. 1993. *Crop Sci.* 33:287-294.
57. Hsiao T. C., E. Acevedo, E. Ferreres, D. W. Henderson. 1976. Stress metabolism: water stress, growth and osmotic adjustment. *Philos. Trans. R. Soc. London B.* 273:479-500. *In* Schultz H. R., M. A. Matthews. 1993. *Crop Sci.* 33:287-294.
58. Hussey R. S., C. W. Mims, S. W. Westcott III. 1992. Ultrastructure of root cortical cell parasitized by the ring nematode *Criconemella xenoplax*. *Protoplasma.* 167:55-65.
59. Iraki N. M., R. A. Bressan, P. M. Hasegawa, N. C. Carpita. 1989. Alteration of a physical and chemical structure of the primary cell wall of growth-limited plant cell adapted to osmotic stress. *Plant Physiol.* 91:39-47.
60. Ishiwatari Y., C. Honda, I. Kawashima, S. Nakamura, H. Hirano, S. Mori, T. Fujiwara, H. Hayashi, M. Chino. 1995. Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta.* 195:458-463. *In* Lucas W. J. 1999. *J. Exp. Bot.* 50:979-987.
61. Itaya A., Y. T. A. Derek, Y. Bao, R. S. Nelson, B. Dmg. 1998. *Plant Physiol.* 118:373-385. *In* Pickard B. G., N. Beachy. 1999. *Cell.* 98:5-8.
62. Jacinto T., B. McGill, V. Franceschi, J. DelanoFreire, C. A. Ryan. 1997. Tomato polyostromin promoter confers wound-inducible, vascular bundle-specific expression of the beta-glucuronidase gene in transgenic tomato plants. *Planta.* 203:406-412. *In* Ruiz-Medrano R., B. Xococonite-Cázares, W. J. Lucas. 2001. *Curr. Op. Plant Biol.* 4:202-209.
63. Jackson M. 1997. Hormones from roots as signals for the shoot of stressed plants. *Trends Plant Sci.* 2:22-28. *In* Ruiz-Medrano R., B. Xococonite-Cázares, W. J. Lucas. 2001. *Curr. Op. Plant Biol.* 4:202-209.
64. Kleczkowski M. J., T. A. Derek, D. T. A. Lamport. 1994. Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-traditional codes, and phylogeny. *Plant J.* 5:157-172.
65. Kjellbom P. L. Snogerup, C. Stöhr, C. Reuzeau, P. F. McCabe, R. I. Pennell. 1997. Oxidative cross-linking of plasma membrane arabinogalactan proteins. *Plant J.* 12(5): 1189-1196.
66. Kleis-Ser Francisco S. M., M. L. Terney. 1990. Isolation and characterization of a proline-rich cell wall protein from soybean seedlings. *Plant Physiol.* 94:1897-1902. *In* Wilson R. C., F. Long, E. M. Maruoka, J. B. Cooper. 1994. *Plant Cell* 6:1265-1275.
67. Krueger M., G. J. van Holst. 1996. Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Mol. Biol.* 30:1077-1086.

68. Lamport D. T. A. 1965. The protein component of primary cell walls. *Adv. Bot. Res.* 2:151-218.
69. Lamport D. T. A. 1969. The isolation and partial characterization of hydroxyproline-rich glycopeptides obtained by enzymatic degradation of primary cell walls. *Biochemistry* 8:1155-1163.
70. Lamport D. T. A. 1974. The role of hydroxyproline-rich proteins in the extracellular matrix of plants. 30th Symposium Soc. Dev. Biol. 113-130. New York Academic.
71. Lamport D. T. A. 1980. Structure and function of plant glycoproteins. *In The Biochemistry of Plants*, ed. P. K. Stumpf, E.E. Conn, New York. Academic. 639 pp.
72. Lamport D. T. A., D. H. Northcote. 1960. Hydroxyproline in primary cell walls of higher plants. *Nature* 118:655-656.
73. Lamport D. T. A., L. Epstein. 1983. A new model for the primary cell wall: a concatenated extensin-cellulose network. *In: Carpinia N. C. Plant Physiol.* 80:660-666.
74. Lara M., H. Pons, J. Padilla, J. Folch, F. Sánchez. 1984. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 78:1019-1023.
75. Lichtenthaler H. K. 1996. Estrés en la vegetación: introducción al concepto de estrés en plantas. *J. Plant Physiol.* 148:4-14
76. Lindstrom J. T., L. O. Vodkin. 1991. A soybean cell wall protein is affected by seed color genotype. *Plant Cell* 3:561-571.
77. Lockhart J. A. 1965. An analysis of irreversible plant cell elongation. *J. Theor. Biol.* 8:246-275. *In* Schultz H. R., M. A. Matthews. 1993. *Crop Sci.* 33:287-294.
78. Lucas W. J., B. Ding, C. van der Schoot. 1993. Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol.* 125:435-476. *In* Lucas W. J. 1999. *J. Exp. Bot.* 50:979-987.
79. Lucas W. J. 1995. Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. *Curr. Op. Cell Biol.* 7:673-680.
80. Lucas W. J., S. Bouché-Pillon, D. P. Jackson, L. Nguyen, L. Baker B. Ding, S. Hake. 1995. Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science*, 270:1980-1983. *In* Lucas W. J. 1999. *J. Exp. Bot.* 50:979-987.
81. Lucas W. J. 1999. Plasmodesmata and the cell-to-cell transport of proteins and nucleoprotein complexes. *J. Exp. Bot.* 50:979-987.
82. Lucas W. J., S. Wolf. 1993. Plasmodesmata: the intercellular organelles of green plants. *Trends Cell Biol.* 3:308-315. *In* Lucas W. J. 1999. *J. Exp. Bot.* 50:979-987.
83. Lucas W. J., S. Wolf. 1999. Connections between virus movement, macromolecular signaling and assimilate allocation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:192-197. *In* Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Volkmann. 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
84. Mahoney N. M., P. A. Janmey, S. C. Almo. 1997. Structure of profilin-poli-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. *Nature Struct. Biol.* 4:953-960.
85. Markwalker H. U., H. Noukom. 1976. Diferulic acid as a possible cross-linking in hemicelluloses from wheat germ. *Phytochem* 15:836-837. *In* Carpinia, N. C. *Plant Physiol.* 80:660-666.
86. Matsuda K., A. Riaz. 1981. Stress-induced osmotic adjustment in growing regions of barley leaves. *Plant Physiol.* 68:571-576. *In* Schultz H. R., M. A. Matthews. 1993. *Crop Sci.* 33:287-294.
87. Matthews M. A., E. van Volkenburgh, J. S. Boyer. 1984. Acclimation of leaves growth to low water in sunflower. *Plant Cell Env.* 8:199-206. *In* Schultz H.R., M.A. Matthews. 1993. *Crop Sci.* 33:287-294.
88. McLean B. G., P. C. Zambryski. 2000. Interactions between viral movement proteins and the cytoskeleton. *In* Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Volkmann. 2001. *Plant Physiol.* 128:39-46.
89. Meyer R. F., J. S. Boyer. 1972. Sensitivity of cell elongation to low water potential in soybean hypocotyls. *Planta* 108:77-87. *In* Schultz H. R., M. A. Matthews. 1993. *Crop Sci.* 33:287-294.
90. Mezitt L. A., W. J. Lucas. 1996. Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids. *In* Mol. Biol. 32:251-273.
91. Michellina V. A., J. S. Boyer. 1982. Complete turgor maintenance at low water potential in the elongating region of maize leaves. *Plant Physiol.* 69:1145-1149. *In* Schultz H. R., M. A. Matthews. 1993. *Crop Sci.* 33:287-294.
92. Miller D. J., A. R. Stabas, C. Sidebottom, G. C. Smith, A. K. Allen, G. P. Bolwell. 1992. A major stress-inducible Mr=42000 wall glycoprotein of french bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta* 187:176-184.
93. Morvan O. M. Quentin, A. Jauneau, A. Mareck, C. Morvan. 1998. Immunogold localization of pectin methylesterases in the cortical tissues of flax hypocotyl. *Protoplasma.* 202:175-184.

- In* Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Voikmann, 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
94. Müller J., Z-P Xie, C. Staeheling, R. B. Mellor, T. Boyer, A. Wiemken, 1994. Trehalose and trehalase in root nodules from various legumes. *Physiol Plant.* 90:86-92. *In* Farias-Rodríguez R., R. B. Mellor, C. Arias, J. J. Peña-Cabrales, 1998. *Physiol. Plantarum* 102:353-359.
95. Nakaïjima H., A. Hirata, Y. Ogawa, T. Yonehara, K. Yoda, M. Yamasaki, 1991. A cytoskeleton-related gene, *USO1*, is required for intracellular protein transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 113(2):245-260.
96. Nakamura S., H. Hayashi, S. Mori, M. Chino, 1993. Protein phosphorylation in the sieve tubes of rice plants. *Plant Cell Physiol.* 34:927-933. *In* Lucas W. J. 1995. *Curr. Op. Cell Biol.* 7:673-680.
97. Niebel A., J. de Almeida Engler, C. Tiré, G. Engler, M. Montagu, G. Gheysen, 1993. Induction patterns of an extensin gene in tobacco upon nematode infection. *Plant Cell* 5:1597-1710.
98. Oparka K. J., D. A. M. Prior, 1992. Direct evidence for pressure generated closure of plasmodesmata. *Plant J.* 2:741-750. *In* Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Voikmann, 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
99. Oparka K. J., A. G. Roberts, P. Bosvink, S. Santa Cruz, I. Roberts, K. S. Pradel, A. Imlau, G. Kottitzky, N. Sauer, B. Eppl, 1999. Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell.* 97:743-754.
100. Oparka K. J., S. Santa Cruz, 2000. The great scape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:323-347. *In* Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Voikmann, 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
101. Orlic C., J. P. Knox, 2000. Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation of pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. *Plant Physiol.* 122:775-781. *In* Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Voikmann, 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
102. Overall R. L., R. G. White, L. M. Blackman, J. E. Radford, 2000. Actin and myosin in plasmodesmata. *In* Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Voikmann, 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
103. Perbal M. C., G. Haughn, H. Saedler, Z. Schwarz-Sommer, 1996. Non-cell autonomous function of the *Arabidopsis* floral homeotic proteins DEFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development.* 122:3433-3441. *In* Lucas W. J. 1999. *J. Exp. Bot.* 50:979-987.
104. Pickard B. G., N. Beachy, 1999. Intercellular connections are developmentally controlled to help move molecules through the plant. *Cell.* 98:5-8.
105. Pitman W. D., E. Moore, 1985. Monosaccharides in detergent residues of tropical forage plants. *Crop. Sci.* 25:790-792. *In* Deetz D. A., H. G. Jung, D. R. Buxton, 1996. *Cop. Sci.* 36:386-388.
106. Preston R. D. 1974. **The physical biology of plant cell walls.** London. Chapman & Hall. 491 pp.
107. Radford J. E., M. Vest, R. L. Overall, 1998. Callose deposition at plasmodesmata. *Protoplasma.* 201:30-37. *In* Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Voikmann, 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
108. Radford J. E., R. G. White, 1998. Localization of a myosin-like protein to plasmodesmata. *Plant J.* 1:74-750. *In* Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Voikmann, 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
109. Reichelt, S., A. E. Knight, T. P. Hodge, F. Baluska, J. Samaj, D. Voikmann, J. Kendrick-Jones, 1999. Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *Plant J.* 19:555-569. *In* Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Voikmann, 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
110. Reichelt, S., J. Kendrick-Jones, 2000. Myosins. *In* Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Voikmann, 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
111. Reid P. D., R. F. Pont-Lezica, 1992. **Tissue Printing. Tools for the study of anatomy, histochemistry and gene expression.** U. S. A. Academic Press, Inc. 188 pp.
112. Ruiz-Medrano R., B. Xocoostie-Cázares, W. J. Lucas, 2001. The floem as a conduit for inter-organ communication. *Curr. Op. Plant Biol.* 4:202-209.
113. Ryan C. A. 2000. The systemic signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1477:112-121. *In* Ruiz-Medrano R., B. Xocoostie-Cázares, W. J. Lucas, 2001. *Curr. Op. Plant Biol.* 4:202-209.
114. Saechu T., C. Schoberl, A. Pecsvaradi, A. Eichholz, E. Komor, G. Orlicch, 1993. Specific proteins in the sieve tube exudates of *Ricinus communis* L. seedlings: separation, characterization and in vivo labelling. *Planta.* 191:207-213. *In* Lucas W. J. 1995. *Curr. Op. Cell Biol.* 7:673-680.

115. Samař J., M. Peters, D. Volkmann, F. Baluska. 2000. Effects of myosin ATPase inhibitor 2,3-butanedione 2-monoxime on distribution of myosin, F-actin, microtubules, and cortical endoplasmic reticulum in maize root epices. *Plant Cell Physiol.* 41:571-582. In Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Volkmann, 2001. *Plant Physiol.* 126:39-46.
116. Sauer N., D. R. Corbin, B. Keller, C. J. Lamb. 1990. Cloning an characterization of a wound-specific hydroxyproline-rich glycoprotein in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Environ.* 13:257-266.
117. Scalbert A., B. Monties, J-Y Lallemand, E. Guittet, C. Rolando. 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochem.* 24:1359-1362.
118. Scheres B., C. van de Weil, A. Zalenski, B. Horbath, H. Spaink, H. van Eck, F. Zwartkruis, A. M. Wolters, T. Gloudemans, A. Van Kammen, T. Bisseling. 1992. The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell* 60:281-294.
119. Schlipfenbacher R., S. Wenzl, F. Lottspeich, M. Sumper. 1986. An extremely hydroxyproline-rich glycoprotein is oxidized in inverting *Vicia*. *FEBS Lett.* 209:57-62.
120. Schober C., P. Grossmann, M. Gottschalk, E. Komor, A. Pecsvaradi, U. Zur Nieden. Sieve-tube exudates from *Ricinus communis* L. seedlings contains ubiquitin and chaperones. *Planta*, 196:205-210. In Lucas W. J. 1995. *Curr. Op. Cell Biol.* 7:673-680.
121. Schubert A., P. Wyss, A. Wiemken, 1992. Occurrence of trehalose in vesicular-ubuscular mycorrhizal fungi and in mycorrhizal fungi. *J. Plant Physiol.* 140:41-45.
122. Schultz H. R., M. A. Matthews. 1993. Growth, osmotic adjustment and cell-wall mechanics of expanding grape leaves during water deficit. *Crop Sci.* 33:287-294.
123. Shackel K. A., M. A. Matthews, J. C. Morrison. 1987. Dynamic relation between expansion and cellular turgor in growing grape leaves. *Plant Physiol.* 84:1156-1171.
124. Shirasat A. H., N. Wilford, I. M. Evans, L. N. Gatehouse, R. R. D. Croy. 1991. Expression of a *Brassica napus* extensin gene in the vascular system of transgenic tobacco and rape plants. *Plant Mol. Biol.* 17:701-709.
125. Showalter A. M. 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5:9-23.
126. Showalter A. M., J. Zhou, D. Rumeau, S. G. Worst, J. E. Varner. 1991. Tomato extensin and extensin-like cDNAs: Structure and expression in response to wounding. *Plant Mol. Biol.* 16:547-565. In Brady J. D., I. H. Sadler, S. C. Fry. *Biochem. J.* 315:323-327.
127. Steeves T. A., I. M. Sussex. 1989. *Patterns in plant development*. 2nd edition. Cambridge University Press, USA, pp. 1-4.
128. Streeter J. G. 1985. Accumulation of a trehalose by *Rhizobium* bacteria and bacteroids. *J. Bacteriol.* 164:78-84.
129. Stuart D. A., J. E. Varner. 1980. Purification and characterization of salt-extractable hydroxyproline-rich glycoprotein from aerated carrot discs. *Plant Physiol.* 66:787-792.
130. Szczygłowski K., A. B. Legocki. 1990. Isolation and nucleotide sequence of cDNA clone encoding nodule-specific (hydroxy)proline-rich protein LENOD2 from yellow lupin. *Plant Mol. Biol.* 15:361-363.
131. Talz L., Z. Zilber. 1991. *Plant Physiology. In The Benjamin/Cummings series in the life sciences*, Editor, Eds. The Benjamin/Cummings Company, Inc. Cap. 14.
132. Templeton M. D., R. A. Dixon, C. J. Lamb, M. A. Lawton. 1990. Hydroxyproline-rich glycoprotein transcripts exhibit different spatial patterns of accumulation in compatible and incompatible interactions between *Phaseolus vulgaris* and *Colletotrichum lindomethianum*. *Plant Physiol.* 94:1265-1269.
133. Thomas C. L., A. J. Maule. 1995. Identification of structural domains within the cauliflower mosaic virus movement protein by scanning deletion mutagenesis and epitope tagging. *Plant Cell* 7:561-572.
134. Tierney M. L., C. Bernhardt. 1998. Members of PRP gene family in *Arabidopsis* are important for both root hair development and the early stages of lateral root development. *Abstract of 8th International cell walls meeting*. John Innes Centre. Norwich, U.K. 8.08 pp.
135. Tiré C., R. De Rycke, M. de Loose, D. Inzé, M. Van Montagu, G. Engler. 1994. Extensin gene expression in induced by mechanical stimuli leading to local cell wall strengthening in *Nicotiana glauca*. *Planta* 195:175-181.
136. Tomos D., and J. Pritchard. 1994. Biophysical and biochemical control of cell expansion in root and leaves. *J. Exp. Bot.* 45:1721-1731.
137. Townin H. T., T. Staehelin, J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.
138. Tupper-Carey Presly. 1924. In Preston R. D. 1974. London. Chapman & Hall. 491 pp.
139. Van Bel A. E. Y., G. Galardi. (1992) Ecophysiology of phloem loading in source leaves. *Plant Cell and Environ.* P. 15-265

140. Van Heltz G. J. 1981. Cell walls and arabinogalactan-protein of *Phaseolus vulgaris* L. Thesis Doctoral, Universidad de Amsterdam, 48 pp.
141. Van Heltz G. J., F. M. Kils, F. Bouman, D. Stegwee. 1980. Changing cell-wall composition in hypocotyls of dark-grown bean seedling (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta* 149:209-212.
142. Van Heltz G. J., J. E. Varner. 1984. Reinforced polyproline II conformation in a hydroxyproline-rich cell wall glycoprotein from carrot root. *Plant Physiol.* 74:247-251.
143. Varner J. E., L-S Lin. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell* 56:231-239.
144. Waffenschmidt S. J., F. Woessner, K. Beer, U. W. Goodenough. 1993. Isodityrosine cross-linking mediates insolubilization of cell walls in *Clamydomonas*. *Plant Cell.* 5:809-820.
145. Weigmann E., W. J. Lucas, V. Citovsky, P. Zambryski. 1994. Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:1433-1437.
146. Weibot V. 1985. On the life strategies of plants and animals. *Trends Genet.* 1:165-169.
147. Wang Y. Z., J. Patterson, J. E. Gray, C. Yu, B. A. Cottrell, A. Shimizu, D. Graham, M. Riley, R. F. Doolittle. 1989. Complete sequence of the lamprey fibrinogen a chain. *Biochem.* 28:9801-9806.
148. Wang H., Q. Qi, P. Schorr, A. J. Cutler, W. L. Crosby, L.C. Fowke. 1998. ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and Cdc2D3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.* 15:501-510. *In Ruiz-Medrano R., B. Xoconostle-Cázares, W. J. Lucas. 2001. Curr. Op. Plant Biol.* 4:202-209.
149. Warning G. L., R. J. Hawley, T. Schoenfeld. 1990. Multiple proteins are produced from *dec-1* egg shell gene in *Drosophila* by alternative RNA splicing and proteolytic cleavage events. *Develop. Biol.* 142:1-12.
150. White R. G., K. Badelt, R. L. Overall, M. Vesik. 1994. Actin associated with plasmodesmata. *Protoplasma.* 160:169-184. *In Baluska F., F. Cyrckova, J. Kendrick-Jones, D. Volkmann. 2001. Plant Physiol.* 126:39-48.
151. Wilkie K. B. C. 1979. Hemicelluloses in grasses and cereals. *In Carpatha N. C. Plant Physiol.* 80:660-666
152. Wilson R. C., F. Long, E. M. Marucka, J. B. Cooper. 1994. A new hydroxyprolin-rich early nodulin from *Medicago truncatula* is highly expressed in nodule meristematic cells. *Plant Cell* 6:1265-1275.
153. Williamson M. P. 1996. Di-isodityrosine a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential crosslink. *Biochem. J.* 297:249-260. *In Brady J. D., I. H. Sadler, S. C. Fry. Biochem. J.* 315:323-327.
154. Woehecke H., C. Titel, U. Melzer, R. Ehwald. 1998. Cell wall pore size and cell wall expansion in suspension cultures and growing plant organs. Abstract of 8th International cell walls meeting. John Innes Centre, Norwich, U.K. 7.47 pp.
155. Wu H., A. B. Reynolds, S. B. Kanner, R. R. Vines, J. T. Parson. 1991. Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60^{src} substrate. *Mol. Cell Biol.* 11:5112-5124.
156. Yahalom A., R. Lando, A. Katz, B. L. Epel. 1998. A calcium-dependent protein kinase is associated with maize mesocotyl plasmodesmata. *J. Plant Physiol.* 153:354-362.
157. Ye Z. H., J. E. Varner. 1991. Tissue-specific expression of cell wall proteins in developing soybean tissues. *Plant Cell.* 3:23-37. *In Brady J. D., I. H. Sadler, S. C. Fry. Biochem. J.* 315:323-327.

TRIS CON
FALLA DE ORIGEN

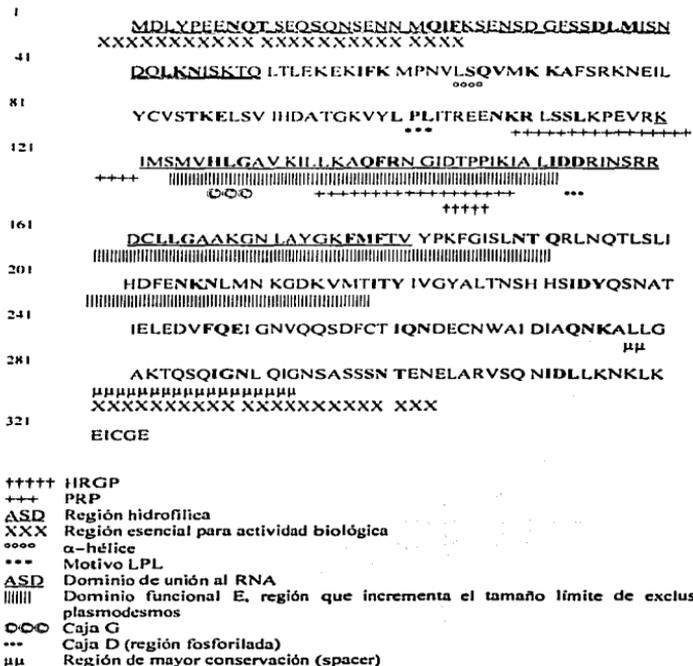
APÉNDICE A

Bonilla I., C. Mergold-Villaseñor, M. E. Campos, N. Sánchez, H. Pérez, L. López, L. Castrejón, F. Sánchez y G. I. Cassab. 1997.

Las paredes celulares aberrantes de los nódulos de la raíz de frijoles deficientes de boro no tienen proteínas ricas en hidroxiprolina/proteínas ricas en prolina unidas covalentemente.

Plant Physiol. 115:1329-1340.

APÉNDICE B



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig. 1b. Secuencia de la proteína del movimiento de la coliflor. En ella se señalan los dominios y regiones esenciales para su función.

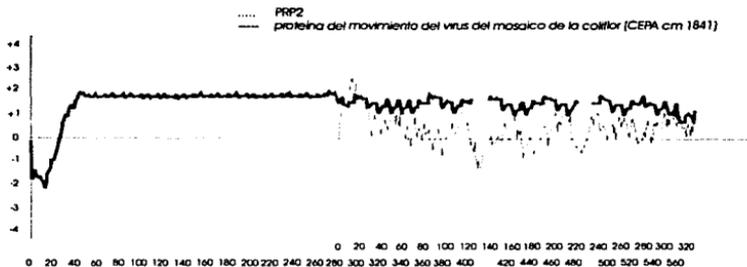


Fig. 2b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con la proteína del movimiento del virus del mosaico de la coliflor (cepa CM 1841).

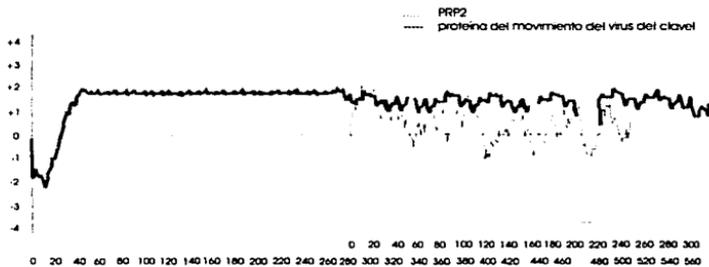
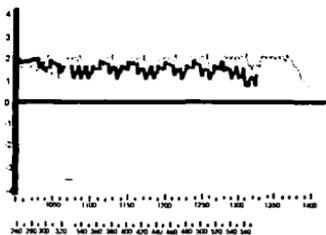
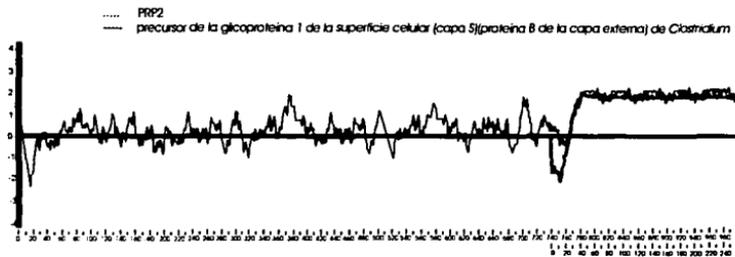


Fig. 3b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con la proteína del movimiento del virus del clavel.

TÍPICIS CON
 FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig. 4b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con el precursor de la glicoproteína 1 de la superficie celular (capa 5) (proteína 8 de la capa externa) de Clostridium.

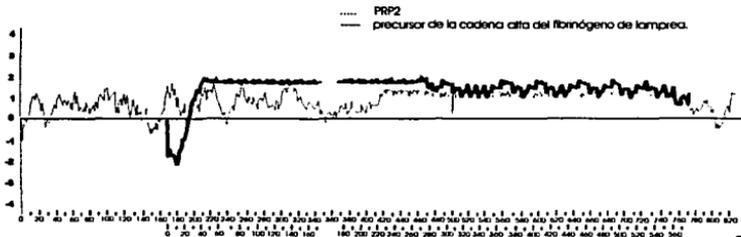


Fig. 5b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con el precursor de la cadena alfa de fibrinógeno de lamprea.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

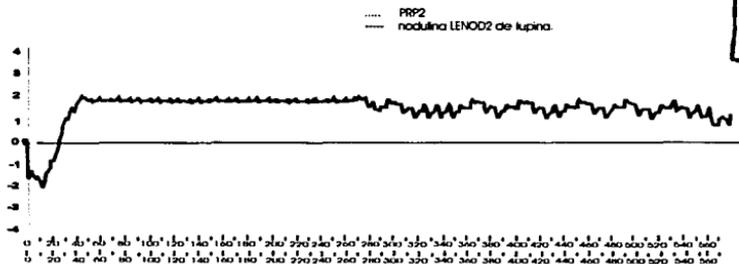


Fig. 6b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con la nodulina LENOD2 de lupino.

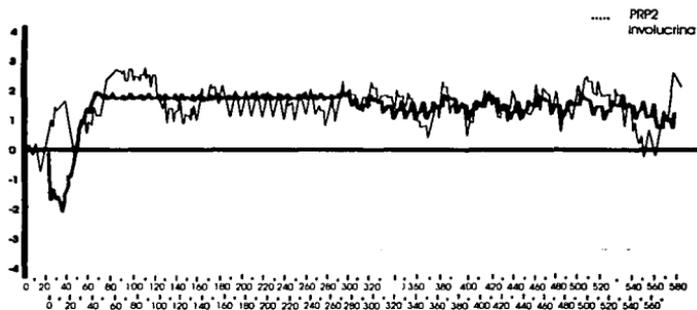


Fig. 7b. Resultados de la comparación del perfil hidrofóbico de la PRP2 con la involucrina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 8b. Resultados de la comparación del perfil hidrofóbico de la PRP2 con la gliadina del trigo.

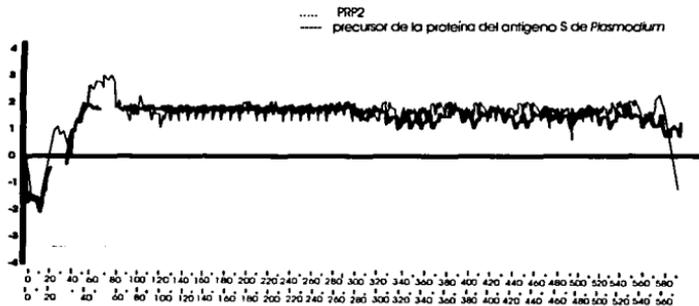


Fig. 9b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con proteína del antígeno S de *Plasmodium*.

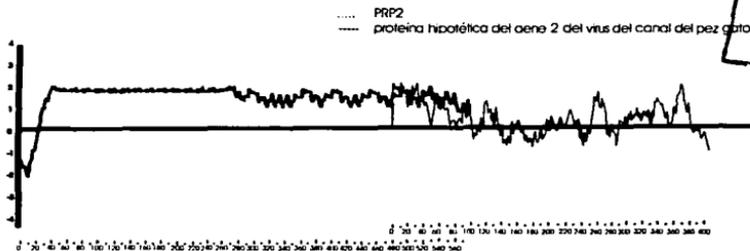


Fig. 10b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con proteína hipotética del gene 2 del virus del canal del pez gato.

PREVIS CON
 A DE ORIGEN

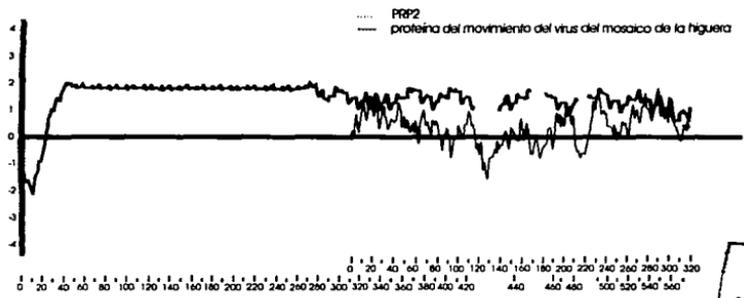


Fig. 11b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con la proteína del movimiento del virus del mosaico de la higuera.

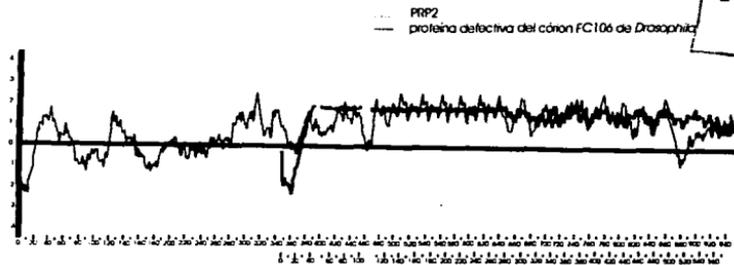


Fig. 12b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con la proteína defectiva del corión FC106 de *Drosophila*.

TESIS CON
 RALLA DE ORIGEN

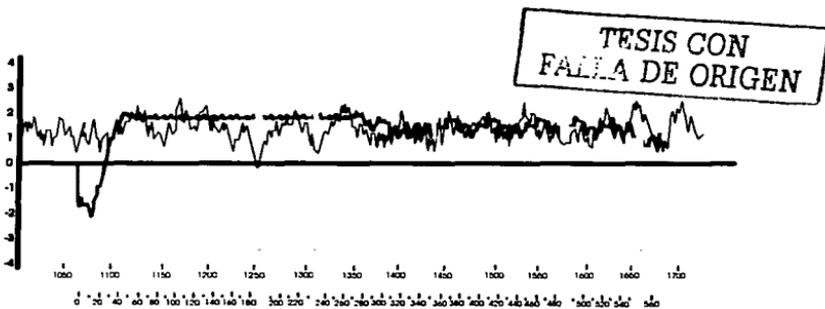
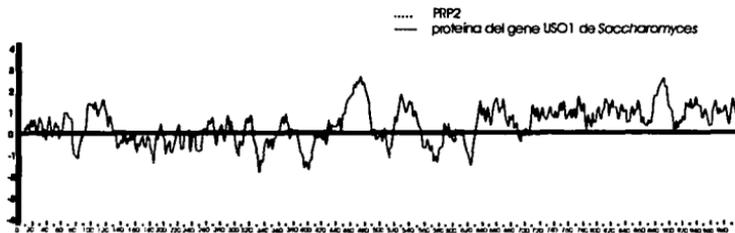


Fig. 13b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con la proteína del gene USO1 de *Saccharomyces*.

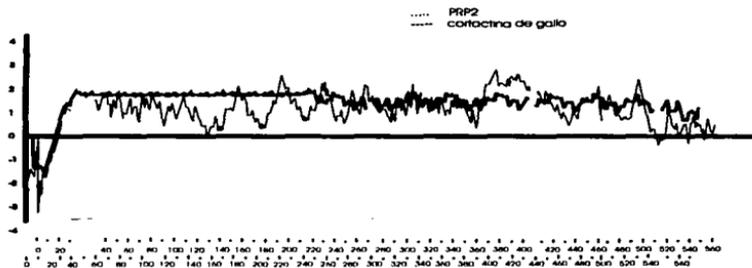


Fig. 14b. Resultados de la comparación del perfil hidropático de la PRP2 con la cortactina de gallo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN