

EXPRESION DE LAS PROTEINAS DE PARED CELULAR DE  
*Prosopis chilensis*  
EN RESPUESTA AL ESTRES PRODUCIDO POR HERIDAS.



MA6-B

R696 ex

c. 1

EXPRESION DE LAS PROTEINAS DE PARED CELULAR DE  
*Prosopis chilensis*  
EN RESPUESTA AL ESTRES PRODUCIDO POR HERIDAS.

Tesis presentada a la Universidad de Chile como  
requisito parcial para optar al grado de Magister en  
Ciencias Biológicas con mención en Botánica

Por

JOSE GREGORIO RODRIGUEZ PINTO

Director de Tesis : Dra. Liliana Cardemil Oliva

Santiago de Chile, Julio, 1992.

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Informe de aprobación  
Tesis de Magister**


Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato :

**JOSE GREGORIO RODRIGUEZ PINTO**

ha sido aprobada por la comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas, con mención en Botánica.

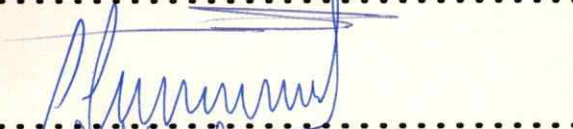
Directora de tesis:

Dra. Liliana Cardemil

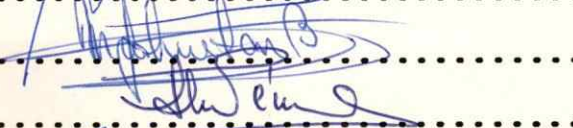
  
.....

Comisión informante de tesis:

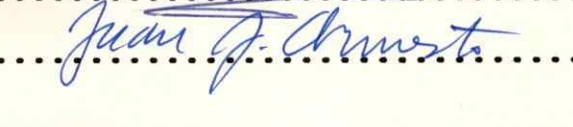
Dr. Luis Corcuera (Presidente)

  
.....

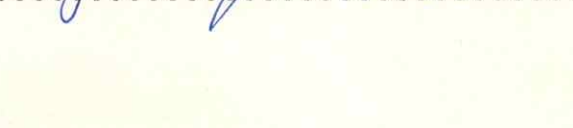
Dra. Myrna Johnston

  
.....

Dra. Luz María Pérez

  
.....

Dr. Juan Armesto

  
.....

SANTIAGO, 4 de enero de 1993

DEDICATORIA

A Dios, por hacerme feliz entre los árboles ...

A mi familia, por llevarme al bosque,  
cuidar mis sueños, dejarme volar y  
amar...

A la Condesa de las flores, por ser agua ...  
por ser fuego ...

AGRADECIMIENTOS :

- Le doy gracias a Dios por darme una familia que me ama y a quien amo.

- Agradezco a todos quienes con paciencia y desprendimiento me ayudaron. A ellos no necesito escribirles a un lugar lejano para que sepan que estoy agradecido, pues mientras estuve con todos y cada uno, sembramos una semilla y germinó... y ahora sólo crece, en silencio...

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Fisiología Genética Vegetal del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. Liliana Cardemil O. y fue financiada por la Red Latinoamericana de Botánica (Beca de magister y financiamiento parcial de la tesis), Proyecto FONDECYT 0160/88 por un Grant AID (DPE-5542-G-SS-8073-00), y el Departamento de Post-grado y Post-título de la Universidad de Chile.

## INDICE DE MATERIAS

INDICE .....	vi
LISTA DE TABLAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
ABREVIATURAS .....	xvi
RESUMEN .....	xviii
ABSTRACT .....	xxii
1.- INTRODUCCION .....	1
2.- MATERIALES Y METODOS. ....	14
2.1.- Material vegetal. ....	14
2.2.- Daño de las plántulas. ....	14
2.3.- Extracción de proteínas de pared celular de <u>Prosopis chilensis</u> y estimación de la concen tración de proteínas.....	19
2.4.- Análisis electroforético. ....	22
2.4.1.- Electroforesis desnaturante aniónica SDS-PAGE y determinación de masas moleculares. ....	22
2.4.2.- Electroforesis nativa catiónica.....	24
2.5.- Estimación de la actividad peroxidasa.....	25
2.6.- Test de glicosilación. ....	25
2.7.- Análisis Western. ....	26
2.8. Dot blot, inmunodetección western y análisis densitométrico. ....	30

2.9 .-Determinación de la composición de aminoácidos. ....	31
2.10.-Determinación de la secuencia amino-terminal	33
2.11. Análisis computacional comparativo de las composiciones y secuencias aminoacídicas.....	34
2.12. Inmunoimpresiones de tejidos sobre membranas	34
2.13.-Microscopía e inmunocitoquímica .....	35
3.- RESULTADOS. ....	39
3.1. Reconocimiento inmunológico de las proteínas de pared celular de <i>Prosopis chilensis</i> .....	39
3.1.1.- Inmunodetección y especificidad del anticuerpo antiextensina de testa de poroto de soya. ....	39
3.1.2.- Determinación de masas moleculares.....	42
3.1.3.- Expresión (acumulación) de proteínas en el desarrollo. ....	45
3.1.4.- Expresión de proteínas de pared en respuesta a las heridas.....	48
3.2.- Expresión tejido específica de las proteínas de pared por medio de inmunoimpresiones. ....	50
3.2.1.- Verificación de la especificidad del anticuerpo. ....	50
3.2.2.- Expresión durante el desarrollo.....	50
3.2.3.- Expresión en respuesta a las heridas....	56



3.3. Expresión tejido específica de las proteínas de pared vista por inmunocitoquímica	60
3.3.1.- Expresión durante el desarrollo.....	60
3.3.2.- Expresión en respuesta a las heridas....	60
3.4. Caracterización de las proteínas de pared celular .....	68
3.4.1.- Estimación de la actividad peroxidasa...	68
3.4.2.- Determinación de la glicosilación.....	74
3.4.3.- Composición de aminoácidos.....	74
3.4.4.- Secuencia amino-terminal.....	75
4.- DISCUSION .....	81
5.- CONCLUSIONES .....	102
6.- BIBLIOGRAFIA. ....	104

LISTA DE TABLAS

TABLA I	Composición de aminoácidos de proteínas de pared celular de cotiledones de plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> .....	76
TABLA II	Comparación de la proporción de aminoácidos de proteínas de pared celular de cotiledones de <u>Prosopis chilensis</u> . .....	77
TABLA III	Secuencias amino terminales de proteínas de pared celular de cotiledones de plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> .....	78
TABLA IV	Comparación de la secuencia amino terminal de una proteína de pared celular de cotiledones de <u>Prosopis chilensis</u> (63 KD), con secuencias amino terminales de proteínas ricas en prolina de otras dicotiledóneas .....	79

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Panorámica general de una de las áreas del norte de Chile ( IV Región) donde se desarrolla <u>Prosopis chilensis</u> en condiciones naturales.....	15
FIGURA 2	<u>Prosopis chilensis</u> , el algarrobo chileno. ....	16
FIGURA 3	Pastoreo en zonas áridas.....	17
FIGURA 4	Plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> de 1 mes de edad, cultivadas en el laboratorio....	18
FIGURA 5	Estadios de desarrollo estudiados en <u>Prosopis chilensis</u> . ....	20
FIGURA 6	Esquema de obtención de las proteínas de pared celular de <u>Prosopis chilensis</u> .....	21
FIGURA 7	Análisis Western de extractos de proteínas de pared de cotiledón dañado y no dañado de plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> . ....	40
FIGURA 8	Análisis Western de extractos de proteínas de pared de cotiledón dañado y no dañado de plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> . ....	41

FIGURA 9	Electroforesis en geles de poliacrilamida- SDS de proteínas de pared celular extraídas con CaCl <sub>2</sub> de cotiledones de plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> .	43
FIGURA 10	Electroforesis en geles catiónicos de proteínas de pared celular, extraídas con CaCl <sub>2</sub> , de cotiledones de plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> .	44
FIGURA 11	Análisis Western de la cinética de expresión de proteínas de pared celular de <u>Prosopis chilensis</u> .	46
FIGURA 12	Cinética de expresión de proteínas de pared celular de <u>Prosopis chilensis</u> en el desarrollo.	47
FIGURA 13	Cinética de expresión de proteínas de pared celular de <u>Prosopis chilensis</u> en respuesta a las heridas.	49
FIGURA 14	Impresiones de tejidos de <u>Prosopis chilensis</u> sobre membranas de PVDF.....	51
FIGURA 15	Impresiones de tejidos de <u>Prosopis chilensis</u> y maiz sobre membranas de PVDF.	52

FIGURA 16	Expresión de proteínas de pared celular durante el desarrollo temprano de plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> , analizada por inmunopresiones.....	53
FIGURA 17	Expresión de proteínas de pared celular durante el desarrollo temprano de plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> , analizada por inmunopresiones.....	54
FIGURA 18	Expresión de proteínas de pared celular en zonas dañadas de cotiledones de plántulas de 48 horas de edad de <u>Prosopis chilensis</u> , 48 horas post-daño, observados en inmuno-impresiones.....	55
FIGURA 19a	Expresión de proteínas de pared celular en cortes longitudinales, de semillas de 3 horas de edad (post-embebición) y cotiledones de 37 horas de edad, impresos sobre membrana PVDF y observados con lupa estereoscópica.....	57
FIGURA 19b	Expresión de proteínas de pared celular en cortes longitudinales, de semillas de 3 horas de edad (post-embebición) y cotiledones de 37 horas de edad, impresos sobre membrana PVDF y observados con lupa estereoscópica.....	58

FIGURA 19c	Expresión de proteínas de pared celular en corte longitudinal de radícula y corte transversal de hipocótilo de plántulas de 37 horas de edad, impresos sobre membranas PVDF.....	59
FIGURA 20	Inmunocitoquímica de la expresión de proteínas de pared celular de plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> de 96 horas de edad reveladas con anticuerpo antiextensina y observadas al microscopio óptico. ....	61
FIGURA 21a	Inmunocitoquímica de la expresión de proteínas de pared celular en cortes longitudinales de radícula en plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> de 96 horas de edad. ....	63
FIGURA 21b	Inmunocitoquímica de la expresión de proteínas de pared celular en cortes transversales de cotiledón de plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> de 96 horas de edad. ....	64
FIGURA 22a	Inmunocitoquímica de la expresión de proteínas de pared celular en cortes transversales de hipocótilo de plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> de 48 horas de	

edad, en respuesta al estrés producido por heridas. ....	65
FIGURA 22b Inmunocitoquímica de la expresión de proteínas de pared celular en cortes transversales de cotiledones de plántulas de <u>Prosopis chilensis</u> de 48 horas de edad, en respuesta al estrés producido por heridas. ....	66
FIGURA 23 Inmunocitoquímica detallada de una zona de expresión de proteínas de pared celular de <u>Prosopis chilensis</u> en respuesta a las heridas .....	67
FIGURA 24a Diferenciación de raíces secundarias de plántulas de 24 horas de edad, 60 horas post-daño. ....	69
FIGURA 24b Diferenciación de raíces secundarias observadas en cortes longitudinales de radículas dañadas de 84 horas de edad, incluidas en parafina, teñidas con safranina- fast green y observadas al microscopio óptico. ....	70
FIGURA 25 Inmunocitoquímica de la expresión de proteínas de pared celular en la zona de emisión de raíces secundarias inducidas por heridas. ....	71

Figura 26 Esquema de una cinética de aparición de  
raíces secundarias en plántulas dañadas  
y no dañadas de Prosopis chilensis..... 72



## ABREVIATURAS

Ala	: Alanina
$\beta$ - Gal	: $\beta$ - Galactosidasa
BSA	: Bovino suero albúmina
CaCl <sub>2</sub>	: Cloruro de calcio
Fasa	: Fumarasa
FAA	: Formalina alcohol acetona
F6PK	: Fructosa- 6 - fosfato quinasa
GRPs	: Proteínas ricas en glicina
Gly - X	: Glicina-otro aminoacido
h	: Horas
HCl	: Acido clorhídrico
HRGPs	: Proteínas ricas en hidroxiprolina
Hyp	: Hidroxiprolina
KD	: Kilodalton
Lys	: Lisina
min	: Minutos
mm	: Milímetros
M	: Molar
mM	: Milimolar
MOPS	: Acido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
m	: Metros
NaCl	: Cloruro de sodio

NP- 40 : Nonidet P40  
PK : Piruvato quinasa  
PAL : Fenilalanina amonio liasa  
Pro : Prolina  
PVP : Polivinilpirrolidona  
p/v : Peso/volumen  
RNA : Acido ribonucleico  
RPRPs : Proteínas repetitivas ricas en prolina  
SDS : Dodecilsulfato de sodio  
SDS - PAGE :Electroforesis en geles de poliacrilamida en  
presencia de SDS.  
Ser - (Hyp): Serina-Hidroxiprolina  
Thr : Treonina  
Tris : Tris (hidroximetil) amino metano  
v/v : Volumen/ volumen  
 $\alpha 2$  Mgl :  $\alpha 2$ - Macroglobulina

## RESUMEN

Uno de los aspectos a considerar en la adaptación fisiológica del algarrobo (Prosopis chilensis), son los mecanismos de resistencia al estrés producido por patógenos y heridas en el campo, sobre todo en las primeras etapas del desarrollo, cuando la planta es más sensible al estrés ambiental.

En el presente trabajo se ha estudiado la expresión (acumulación) de proteínas de pared celular en respuesta al estrés producido por heridas en tejidos de plántulas de Prosopis chilensis.

Se sometieron a prueba dos hipótesis alternativas :

HIPOTESIS 1 : La expresión de proteínas en respuesta a las heridas es específica, sólo inducible por heridas.

HIPOTESIS 2 : La expresión de proteínas en respuesta a las heridas no es específica. El daño gatilla una expresión de proteínas de pared característica, observada durante el desarrollo normal.

Estas hipótesis se evaluaron por medio del análisis electroforético (geles aniónicos y catiónicos), análisis Western, análisis por dot blot y densitometría de las proteínas de pared celular, que se expresan durante el desarrollo y en respuesta a las heridas. Las proteínas de pared celular de Prosopis chilensis fueron reconocidas empleando un anticuerpo

policlonal antiextensina de testa de poroto de soya. Asimismo, se estudió la expresión de proteínas de pared por medio de inmunoimpresiones y de una inmunocitoquímica fina. De estos análisis se puede afirmar que :

A) Al menos 4 proteínas de pared celular son reconocidas específicamente por el anticuerpo policlonal antiextensina de testa de poroto de soya, en Prosopis chilensis. Estas proteínas poseen masas moleculares de 180 KD, 126 KD, 107 KD y 63 KD.

B) Las proteínas de pared celular de cotiledones de plántulas de Prosopis chilensis se expresan ( acumulan ) durante el desarrollo de una manera tejido-dependiente, y en respuesta al daño mecánico, con un máximo de expresión (acumulación) a las 12 horas post-heridas.

Estas proteínas de pared parecen ser glicosiladas lo que ha sido revelado por su reacción positiva con dansilhidrazina. Por otro lado, empleando un test de peroxidasas se verificó que no son peroxidasas de pared celular. Sin embargo, la desaparición de la proteína extraíble a las 24 horas después del daño, podría estar correlacionada con la actividad peroxidasa del extracto total a esa edad, cuantificada por análisis dot blot y densitometría. La insolubilización de la proteína soluble en estas condiciones es discutida.

La proteínas de pared estudiadas fueron también caracterizadas por su composición de aminoácidos y secuencia

amino terminal. Del análisis computacional y estadístico realizado se desprende que existen dos grupos de proteínas de pared celular en Prosopis chilensis :

- Un primer grupo de proteínas de 180 KD, 126 KD y 107 KD :  
ricas en ácido glutámico/glutamina, ácido aspártico/asparagina y en menor proporción por arginina, leucina, prolina y glicina.

- Un segundo grupo representado por la proteína de 63 KD :  
rica en glutámico/glutamina, prolina, lisina, valina, ácido aspártico/asparagina, y tirosina. Las otras proteínas son especialmente ricas en ácido glutámico/glutamina.

El análisis de las secuencias amino-terminales por alineamiento (FASTA) con todo el banco de secuencias del EMBL, ha revelado que la proteína de 63 KD es muy parecida al extremo amino-terminal de una proteína rica en prolina de soya. Las otras secuencias no presentan similitudes con proteínas de pared descritas.

Finalmente, debe resaltarse, que las heridas producen la diferenciación de raíces secundarias, y que esta diferenciación implica una mayor expresión de proteínas de pared celular. Con esta evidencia y las presentadas se puede afirmar que la respuesta al estrés de heridas está relacionada al desarrollo.

## ABSTRACT

Among the physiological adaptations that are important to study in Prosopis chilensis are the resistant mechanisms to the stress caused by pathogens and wounding produced under natural conditions. Such mechanisms are responsible of the plant survival during the first developmental stages when the plant is more sensible to the environmental stress.

In the present work, the expression of cell wall proteins has been studied as a response to the stress caused by wounding in seedling tissues of Prosopis chilensis.

Two alternative hypothesis have been proposed:

HYPOTHESIS 1: The expression of cell wall proteins is specific, only induced by wounding.

HYPOTHESIS 2: The expression of cell wall proteins is not specific to wound stress. The injury triggers expression of cell wall proteins which are also induced during development.

These hypothesis were tested by electrophoretic analyses (anionic and cationic gel electrophoresis) followed by Western blot, dot blots and densitometric determinations of the proteins extracted with  $\text{CaCl}_2$  from the cell walls. The analyses were performed during development of the seedling and under wounding conditions.

The cell wall proteins of Prosopis chilensis were identified by immunological assays, using a polyclonal antibody raised against soybean seed coat extensin. The tissue-specific

expression of cell wall proteins was studied by tissue-immuno prints and by immuno-cytochemical analyses.

From these analyses it is possible to conclude that:

a) Four cell wall proteins are identified by the polyclonal antibody used ( anti- soybean seed coat extensin ), in Prosopis chilensis cotyledons . These proteins have molecular masses of : 180 KDa, 126 KDa, 107 KDa y 63 KDa.

b) These cell wall proteins are expressed ( accumulated ) during normal development in a tissue specific manner, and under wounding with a maximum of expression 12 hours after wounding.

These proteins exhibit a fluorescent positive reaction with dansylhydrazine and therefore, are glycoproteins.

The proteins do not show peroxidase activity. However, the disappearance of the extractable protein fraction , 24 hours after wounding is correlated with total cell wall extractable peroxidase activity. The peroxidase activity was estimated by dot blot followed of densitometric analysis. The insolubilization of the soluble cell wall proteins at this time of development is discussed.

The cell wall proteins of Prosopis chilensis were also characterized by their amino acid composition and by their amino terminal sequence. A computerized statistical analysis shows that there exist two groups of cell wall proteins in Prosopis chilensis :

- The first protein group comprises the proteins 180 KDa, 126 KDa, and 107 KDa which are rich in glutamic acid/glutamine and

aspartic acid/asparagine. Arginine, leucine, proline and glycine are less abundant amino acids.

- The second group comprises the protein of 63 KDa which is rich in glutamic acid/glutamine, proline, glycine, valine, aspartic acid/asparagine and tyrosine.

The analysis of the amino-terminal sequences demonstrated also that the three proteins of the first group have almost identical sequences. The 63 KDa protein has a completely different sequence. Using a FASTA alignment against all protein sequences of the EMBL bank, it was possible to find that the protein of 63 kD is very similar to soybean proline-rich proteins. However, the sequences of the proteins of the first group were not similar to any other cell wall protein described so far.

Finally, it is important to point out, that wounding induces secondary roots differentiation in seedlings of Prosopis chilensis, and this is correlated with an increase in the expression of the root cell wall proteins.

The results of the physiological and molecular analyses give enough evidences that the wounding responses are related to the development process in Prosopis chilensis.



## INTRODUCCION

Lejos de ser cubiertas simples, inertes y estáticas, las paredes son estructuras complejas y dinámicas (Darvill y col., 1980) que juegan roles fundamentales en el crecimiento y en el desarrollo, en la comunicación e intercambio intercelular y en la percepción de las señales del medio ambiente. Están constituidas por una red de carbohidratos, proteínas, lignina, agua y sustancias incrustantes como cutina, suberina, y algunos compuestos inorgánicos que varían de acuerdo a la especie, la edad, los tipos celulares, la interacción con otras células vecinas y en respuesta a diversos tipos de estímulos ambientales (Showalter, 1992).

### Las proteínas de pared celular.

La estructura y la regulación metabólica de las proteínas de pared celular ha sido objeto de estudio durante varias décadas. Tupper-Carey & Prestly (1924 en Cassab y Varner, 1988) fueron aparentemente los primeros en demostrar la presencia de proteínas en la pared celular. Sin embargo, no fue hasta la década de los 60, cuando Lamport descubrió que la hidroxiprolina era el constituyente aminoacídico principal de los hidrolizados de pared celular de tejidos cultivados in vitro (Lamport y Northcote, 1960; Dougall & Shimbayashi, 1960). Posteriormente Lamport (1969), obtuvo evidencias de que estos aminoácidos eran constituyentes de las proteínas de pared.

Desde que Lamport (1974) aisló y secuenció los primeros péptidos de pared, hasta la fecha, se ha acumulado una valiosa información. Cinco clases de proteínas de pared son las más abundantes y las mejor caracterizadas: Las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) o extensinas (Tierney y Varner, 1987), las proteínas ricas en glicina (GRPs, Varner y Cassab, 1986; Condit y Meagher, 1986), las proteínas repetitivas ricas en prolina (RPRPs, Chen y Varner, 1985a), las lectinas de solanáceas (Allen y Neuberger, 1973) y las proteínas de arabinogalactanos (Fincher y col., 1983).

Las extensinas son una familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina que se expresan constitutivamente en plantas superiores. La primera purificación reportada de una extensina fue realizada por Stuart y Varner (1980) en la raíz de zanahoria. Desde entonces, varios laboratorios han purificado extensinas de diferentes plantas y tejidos, tales como el tubérculo de papa (Leach y col., 1982), callos de tabaco (Mellon y Helgeson, 1982), suspensiones celulares de tomate (Smith y col., 1984) y testas de semillas de soya (Cassab y col. 1985). Estas proteínas son especialmente abundantes en dicotiledóneas, y han sido caracterizadas empleando dos enfoques:

- 1) Bioquímico : Por aislamiento, purificación y caracterización bioquímica de la proteína extraíble.
- 2) Molecular : Por aislamiento y caracterización de clones cDNA

y genómicos.

De estos estudios se desprenden las siguientes características fundamentales :

- 1) Son ricas en hidroxiprolina y serina, y en alguna combinación de los aminoácidos valina, tirosina, lisina e histidina (Lamport, 1969; Stuart y Varner, 1980).
- 2) Usualmente contienen en su secuencia pentapéptidos patrones repetitivos Ser-(Hyp), insertos en otras unidades repetitivas mayores (Smith y col., 1986).
- 3) La mayoría de los residuos de hidroxiprolina están glicosilados con uno y hasta cuatro residuos de arabinosa, mientras que los residuos de serina están glicosilados con galactosa (Lamport y col., 1973).
- 4) Poseen grandes modificaciones post-traduccionales : hidroxilación de los residuos de prolina (Stuart y Varner, 1980), glicosilación (Cassab et al., 1985; Leach y col., 1982; Melton y Helgeson, 1982), y formación de enlaces difeniléter entre los residuos de tirosina (Cooper y Varner, 1984). Son sintetizadas en el retículo endoplasmático, glicosiladas en el aparato de Golgi y secretadas hacia la pared celular (Chrispeels y Sadava, 1974) donde se incrementa su insolubilidad (Cooper y Varner, 1983; Smith y col., 1984) por la posible formación de enlaces covalentes isoditirosina (Fry, 1982) e interacción con otros polímeros de pared (P.e. pectina, Showalter, 1992).

- 5) Presentan masas moleculares que varían entre 86 y 120 KD (Showalter y Varner, 1989). Entre un 40-60 % de estos pesos está constituido por azúcares (Stuart y Varner, 1980).
- 6) Son proteínas básicas con puntos isoeléctricos de aproximadamente 10 debido a su alto contenido de lisina (Stuart y Varner, 1980).
- 7) Tienen generalmente una estructura helicoidal poliprolina II (Van Holst y Varner, 1984).
- 8) Se ven con apariencia de bastones al microscopio electrónico (Stafstrom y Staehlin, 1986 ; Heckman y col., 1988).

Las extensinas de monocotiledóneas como el maíz son diferentes a las extensinas presentes en dicotiledóneas. Estudios al nivel proteico (Kieliszewski y Lamport, 1987; Kieliszewski y Lamport, 1990 ; Hood y col., 1988) y molecular (Stiefel y col., 1988; Stiefel y col., 1990) señalan que una de las proteínas tipo extensina del maíz (THGRP), posee las siguientes características:

- 1) Es rica en treonina, y prolina, además de hidroxiprolina, lisina y serina.
- 2) Contiene dos patrones aminoacídicos repetitivos novedosos: Thr-Pro-Lys-Pro-Thr-Hyp-Hyp-Thr-Tyr-Thr-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Pro-Hyp y Ala-Thr/Ser-Lys-Pro-Pro, y solamente una Ser-Hyp<sub>4</sub>.
- 3) La mayoría de los residuos de hidroxiprolina no están glicosilado con arabinosa y los residuos de serina no están glicosilados.

4) No tienen una conformación de hélice poliprolina II.

Las proteínas ricas en glicina (GRPs) constituyen un nuevo grupo de proteínas de pared celular. El primer estudio realizado partió del aislamiento y la caracterización de un gen en petunia (Condit y Meagher, 1986). La proteína codificada por este gen contiene 67 % de glicina en unidades repetitivas Gly-X donde X es comúnmente Gly, pero también puede ser Ala o Ser. Otros genes que codifican para proteínas similares han sido aislados en poroto (Keller y col., 1988), tomate (Showalter y col., 1991), como también en Arabidopsis thaliana, tabaco, zanahoria y Chenopodium rubrum (Showalter, 1992). Todos estos clones presentan como característica común, un péptido señal en el extremo amino terminal de las proteínas codificadas, que presumiblemente es la señal que determina que estas proteínas se dirijan a la pared celular. Anticuerpos generados contra la proteína rica en glicina de petunia (Condit y col. 1990) y de poroto (Keller y col. 1988, 1989b), han permitido localizar estas proteínas en las paredes celulares de estas dicotiledóneas.

Genes que codifican para proteínas ricas en glicina han sido también aislados de monocotiledóneas como el maíz (Gómez y col. 1988), el arroz (Mundy y Chua, 1988) el sorgo (Crétin y Puigdomènech, 1990 en Showalter, 1992) y la cebada (Rohde y col. 1990 en Showalter, 1992). En general, las proteínas de

monocotiledóneas son menos ricas en glicina, no poseen unidades repetitivas reconocibles, y en algunos casos están localizadas en el citoplasma y no en la pared.

**Las proteínas repetitivas ricas en prolina (RPRPs)** se caracterizan por la presencia de unidades repetitivas de dos residuos de prolina (Pro-Pro) dentro de una variedad de otras repeticiones de orden mayor. La caracterización de dos proteínas ricas en prolina de soya (Datta y col., 1989) ha revelado una baja glicosilación, e incluso la pérdida total de los azúcares. Se sabe también que estas proteínas contienen cantidades equimolares de prolina e hidroxiprolina (Kleis-San Francisco y Tierney, 1990).

**Las lectinas de solanáceas** son glicoproteínas restringidas a la familia de las solanáceas, y que se caracterizan por su capacidad específica de aglutinar oligómeros de N-acetilglucosamina, su localización predominantemente extracelular y su particular riqueza en hidroxiprolina y arabinosa (Showalter y Varner, 1989). La lectina del tubérculo de papa pertenece a este grupo. Posee un masa molecular de alrededor de 50 KD y está constituida por un 50 % de carbohidratos y un 50 % de proteína. De esta lectina destaca su riqueza en hidroxiprolina y serina, glicosiladas con arabinosa y galactosa, respectivamente, y también de glicina y cisteína. En este sentido poseen grandes similitudes con las extensinas (Showalter, 1992).

Finalmente, es importante definir otro importante grupo de glicoproteínas de pared celular : Las proteínas de arabinogalactanos (Fincher y col., 1983 ; Showalter y Varner, 1989 ; Showalter, 1992). Estas proteínas son altamente solubles y glicosiladas mayoritariamente con D-galactosa y L-arabinosa (90 % a un 98 % de todo su peso corresponde a azúcares) siendo especialmente ricas en hidroxiprolina, serina, alanina, treonina y glicina. Al parecer las repeticiones más frecuentes en las secuencias determinadas son del tipo Ala-Hyp (Gleeson y col., 1989). Además, poseen puntos isoeléctricos en el rango de pH. 2-5. Las proteínas de arabinogalactanos han sido localizadas en la pared celular (Clarke y col., 1979). Sin embargo, también se les ha encontrado asociadas a la membrana plasmática (Pennel y col., 1989; Norman y col., 1990).

#### Proteínas de pared y respuesta al estrés.

Existe una amplia documentación que señala que la expresión de estas proteínas de pared, además de ser constitutiva y dependiente del desarrollo, varía en respuesta a diversos tipos de estrés biótico y abiótico. El incremento del nivel normal de las extensinas de pared celular se ha encontrado asociado a las siguientes condiciones de estrés :

1) Infección fúngica y bacteriana : Hammerschmidt y col., (1984), han detectado acumulación de estas glicoproteínas y deposición de lignina como evento inicial en la resistencia

del pepino a infección por hongos. Esquerré-Tugayé y col., (1979) indican que estas proteínas presentan un incremento de 10 veces su nivel normal en respuesta a la infección, y que este incremento se correlaciona con un aumento en la resistencia de la planta al patógeno. También el tratamiento con fragmentos de pared celular, tanto del hongo como de la planta, estimulan la síntesis de estas glicoproteínas (Roby y col., 1985).

2) Daño mecánico : Chrispeels y col., (1974) han señalado que la síntesis y secreción de extensina en raíces de zanahoria es estimulada por corte y aireación del tejido. También, Stuart y Varner (1980) han detectado acumulación de extensina en discos de zanahoria, después del daño mecánico. Además, en discos de zanahoria dañados, se presenta una activación de la síntesis de RNA mensajeros de extensina (Chen y Varner 1985a, 1985b). Por otro lado, la expresión de los genes de extensina y de la fenil amonio liasa (PAL), es incrementada en respuesta al daño mecánico, y en condiciones aeróbicas, esta expresión confiere resistencia a la infección bacteriana en tubérculos de papa (Rumeau y col., 1990).

3) Aclimatación al frío : Russell y col., (1990), han señalado que la aclimatación al frío en guisante, está asociada a un incremento en la expresión de los RNA mensajeros de extensina.

También se ha señalado que las proteínas de pared celular están implicadas en el desarrollo. Al respecto se sabe que la



expresión de la extensina en testa de poroto de soya, es tejido específica y regulada durante el desarrollo (Cassab y col., 1985). Igualmente, ha sido detectado el incremento de extensina durante la senescencia (Chrispeels y col., 1974). Estudios recientes han demostrado una regulación tejido específica y durante el desarrollo de proteínas de pared celular ricas en prolina (Hong y col., 1989).

Considerando estos antecedentes, se ha sugerido que las extensinas y otras proteínas de pared podrían cumplir, además de roles estructurales, un papel en la respuesta al estrés ambiental, por lo que estarían implicadas en la resistencia de las plantas al estrés de heridas.

#### **Expresión de proteínas de pared en plantas de ambientes áridos y semiáridos : hipótesis y objetivos del estudio.**

Un interesante modelo natural para evaluar la posibilidad de que estas proteínas jueguen un rol en la resistencia al estrés producido por heridas, lo constituyen las plantas que viven en ambientes áridos y semiáridos. Sin embargo, no existen en la literatura estudios al respecto.

Prosopis chilensis, es un árbol nativo de las zonas áridas y semiáridas del centro y norte chico de Chile, que ha sido calificado como resistente al estrés térmico (Felker y col., 1982), hídrico, salino y el producido por patógenos y heridas en el campo (observaciones de campo). Dado que las

extensinas de pared celular y otras proteínas relacionadas se expresan constitutivamente durante el desarrollo y de una manera tejido-dependiente, es importante investigar la expresión de proteínas de pared en respuesta al estrés producido por heridas, y compararla con la expresión normal de estas proteínas en las primeras etapas del desarrollo en plantas como Prosopis chilensis, sometidas a diversas condiciones adversas o estresantes en sus ambientes nativos.

En relación a la expresión de proteínas de pared celular en respuesta al estrés producido por heridas, es posible proponer, al menos, dos hipótesis alternativas :

HIPOTESIS 1 : La respuesta a las heridas es específica, sólo inducible por heridas.

HIPOTESIS 2 : La respuesta a las heridas no es específica. El daño gatilla una expresión de proteínas de pared característica, observada durante el desarrollo normal.

Para evaluar estas hipótesis se han propuesto los siguientes objetivos :

(1) Reconocer y comparar, haciendo uso de anticuerpos policlonales anti-extensina, las proteínas de pared celular de Prosopis chilensis, en condiciones de estrés de heridas y durante las primeras etapas del desarrollo normal.

(2) Identificar, valiéndose del uso de anticuerpos, las diferencias tejido-específicas en la expresión de estas

proteínas en respuesta al estrés de heridas y durante las primeras etapas del desarrollo.

(3) Caracterizar y comparar estas proteínas de pared celular en cuanto a su grado de glicosilación, actividad peroxidasa, composición de aminoácidos y secuencia amino terminal.

El presente trabajo es uno de los pocos estudios realizados en relación a la expresión de proteínas de pared celular en respuesta al estrés de heridas y durante desarrollo, en plantas nativas. Un trabajo similar se ha llevado a cabo en una conífera nativa, Araucaria araucana (Cardemil y Riquelme, 1991). La posibilidad de una respuesta relacionada al desarrollo o bien inducida sólo por heridas, tiene profundas implicancias en el manejo genético de la expresión de estas proteínas con el objeto de mejorar la tolerancia de las plantas al estrés. Hacer una manipulación genética sin hacer este tipo de estudios, podría significar una alteración no deseada del programa ontogenético.

Este estudio reviste especial relevancia no sólo como aporte a la bioquímica y fisiología de las proteínas de pared, sino también considerando que el algarrobo es un árbol importante en el desarrollo económico de las zonas áridas. Por un lado, sus frutos representan una excelente fuente de proteínas para el ganado, aparte de brindar sombra en las labores de pastoreo, y madera de excelente calidad. Por otro lado, desde un punto de vista natural el árbol es el refugio de

una abundante microfauna, y es importante en la dieta de herbívoros nativos. Además es una planta que fija nitrógeno, representando así una fuente de enriquecimiento para los suelos.

Considerando estos aspectos y muy probablemente por impacto humano los bosques naturales de algarrobo se han reducido (Fuentes y col., 1989). Sin embargo, los efectos del estrés hídrico, y el producido por heridas de patógenos e insectos, podrían explicar parcialmente la poca regeneración natural observada en estos árboles, que es otro factor a considerar en la disminución de las poblaciones de algarrobo. Al respecto de las heridas producidas por insectos, es importante acotar que los frutos y las semillas de las especies de Prosopis, son comidos por insectos de los órdenes: Hemíptera, Lepidóptera y Coleóptera, a partir del momento en que los frutos comienzan a formarse, y hasta que llegan a su madurez. Los gorgojos de la familia Bruchidae (Coleóptera) son los que producen el mayor daño en las semillas de Prosopis. (Johnson, 1983). Otros herbívoros (guanacos, cabras, caballos, ganado vacuno y liebres) consumen los frutos del algarrobo, pero a su vez dispersan las semillas. En este sentido, considerando el daño potencial producido por insectos, las respuestas defensivas de las semillas antes y durante la germinación son fundamentales para la propagación de este árbol nativo. La expresión de proteínas de pared celular en estas

etapas podría ser un criterio importante de selección.

En el contexto experimental, las semillas de algarrobo pueden ser obtenidas y almacenadas en grandes cantidades siendo fácilmente cultivables en el laboratorio. Todas estas razones hacen que el algarrobo sea un árbol modelo, que debe ser considerado en diversos estudios bioquímicos, ecofisiológicos, sociobiológicos, forestales y de mejoramiento genético de plantas cultivadas.

## MATERIALES Y METODOS.

### 2.1.- Material vegetal.

Prosopis chilensis es un árbol nativo (Figs. 1, 2 y 3) que se encuentra en la región semi árida de Chile central y Norte Chico, desde Santiago a Copiapó (de sur a norte) y desde el Valle Central a 2400 mts de altura en los andes chilenos (de oeste a este).

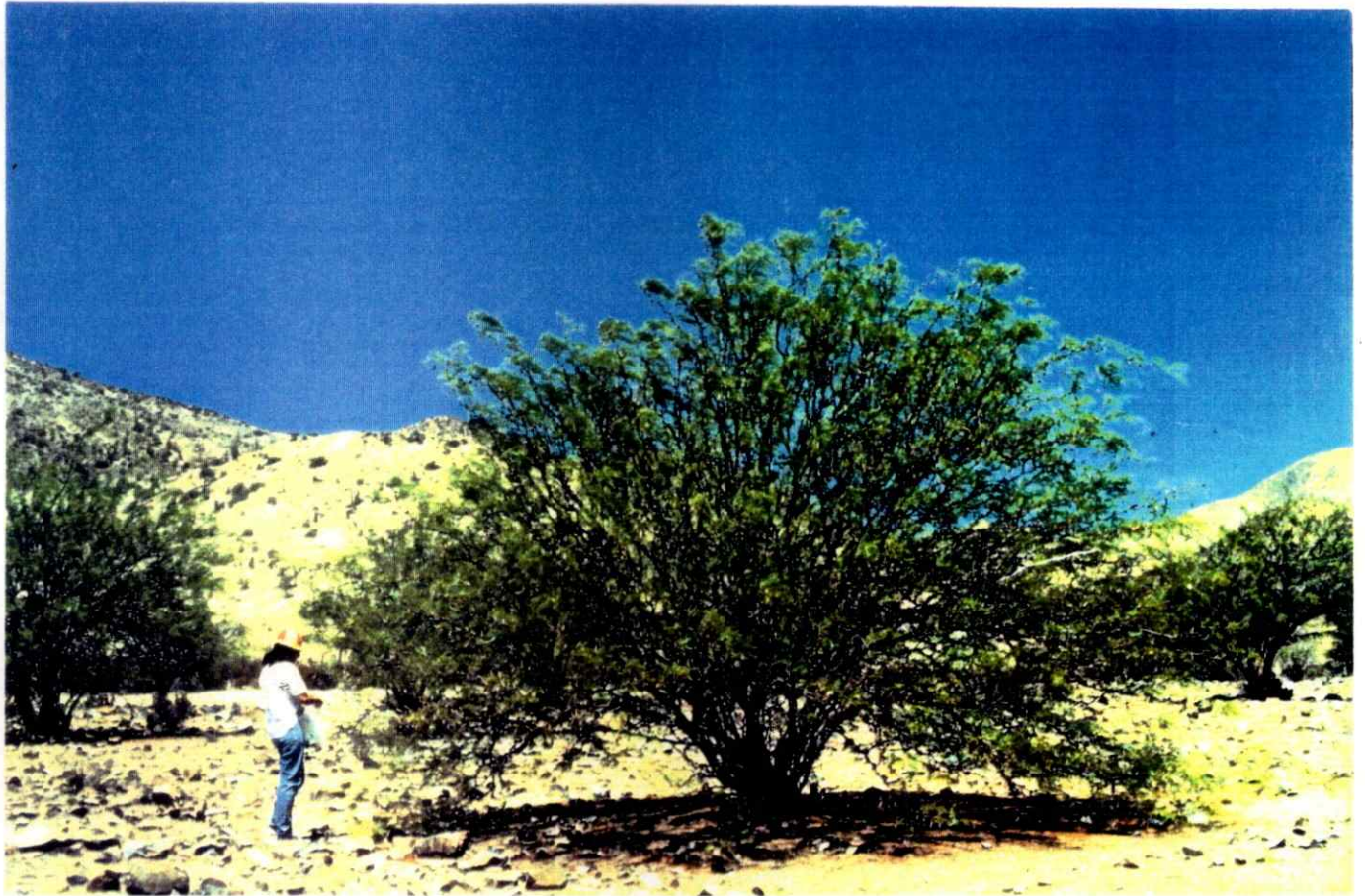
En esta investigación se emplearon las semillas de un banco de Prosopis chilensis mantenido en el laboratorio (Fig. 4), y renovado anualmente con la recolección de nuevos frutos, provenientes de una zona adyacente a la ciudad de Santiago (Colina, Peldehue), donde los algarrobos prosperan naturalmente. Las semillas separadas de los frutos fueron escarificadas con ácido sulfúrico durante 10 minutos (Comunicación personal Consuelo Medina) con la finalidad de romper la latencia. Seguidamente, después de varios lavados en agua, las semillas fueron colocadas sobre papel absorbente humedecido, en una bandeja de germinación, e introducidas en una cámara de crecimiento estabilizada a 25° C, con un fotoperíodo de 12 h luz, 12 horas oscuridad.

### 2.2. - Daño de las plántulas.

Las heridas fueron producidas manualmente haciendo cortes con hojilla de afeitar, en cotiledones, hipocótilos y radículas de plántulas de 48 h de edad. Para tratar de efectuar heridas



**FIGURA 1 : Panorámica general de una de las áreas del norte de Chile ( IV Región) donde se desarrolla *Prosopis chilensis* en condiciones naturales.**



**Figura 2: *Prosopis chilensis*, el algarrobo chileno.**





**Figura 3 : Pastoreo en zonas áridas. El algarrobo ofrece una alternativa para el pastoreo en zonas áridas. Sus frutos tienen un alto contenido de proteínas y su sombra cobija al ganado en períodos muy calurosos. El árbol fija nitrógeno, por lo que es una fuente de nitrógeno para el suelo.**



**Figura 4: Plántulas de *P.chilensis* de 1 mes de edad cultivadas en el laboratorio.**

parejas y reproducibles, en los hipocótilos y radículas, que tienen una forma alargada y cilíndrica, se realizaron cortes transversales profundos cada 2 mm. En los cotiledones, que son ovalados, los cortes fueron longitudinales e igualmente separados unos 2 mm.

### **2.3.- Extracción de proteínas de pared celular y estimación de la concentración de proteínas.**

Se realizaron extracciones de proteínas de pared celular de cotiledones de plántulas no dañadas de 48, 60 y 72 horas de edad, y de plántulas dañadas de 48 horas de edad, 30 min, 3 horas, 12 y 24 horas después del daño (Fig. 5). Los cotiledones fueron utilizados por presentar en estudios previos el mayor rendimiento proteico, en relación a los otros tejidos mencionados. Las extracciones de proteínas de pared celular se llevaron a cabo según el método descrito por Stuart y Varner (1980) y Cassab y col.(1985), considerando 3 réplicas para cada una de las edades analizadas. El procedimiento de extracción (Figura 6) implicó la molienda de cada tejido en hielo seco y su homogeneización en una solución de acetato de potasio 0,1 % (p/v) y PVP 1 % (p/v) en bisulfito de sodio 4 mM. Con la finalidad de descartar las proteínas ajenas a la pared celular, las extracciones se hicieron en un set de lavados y centrifugaciones (800 g en períodos de 10 min, en una centrífuga Sorvall RC- 5B, con un rotor SS-34), usando detergente NP-40 y bisulfito de sodio. Del pellet así obtenido,

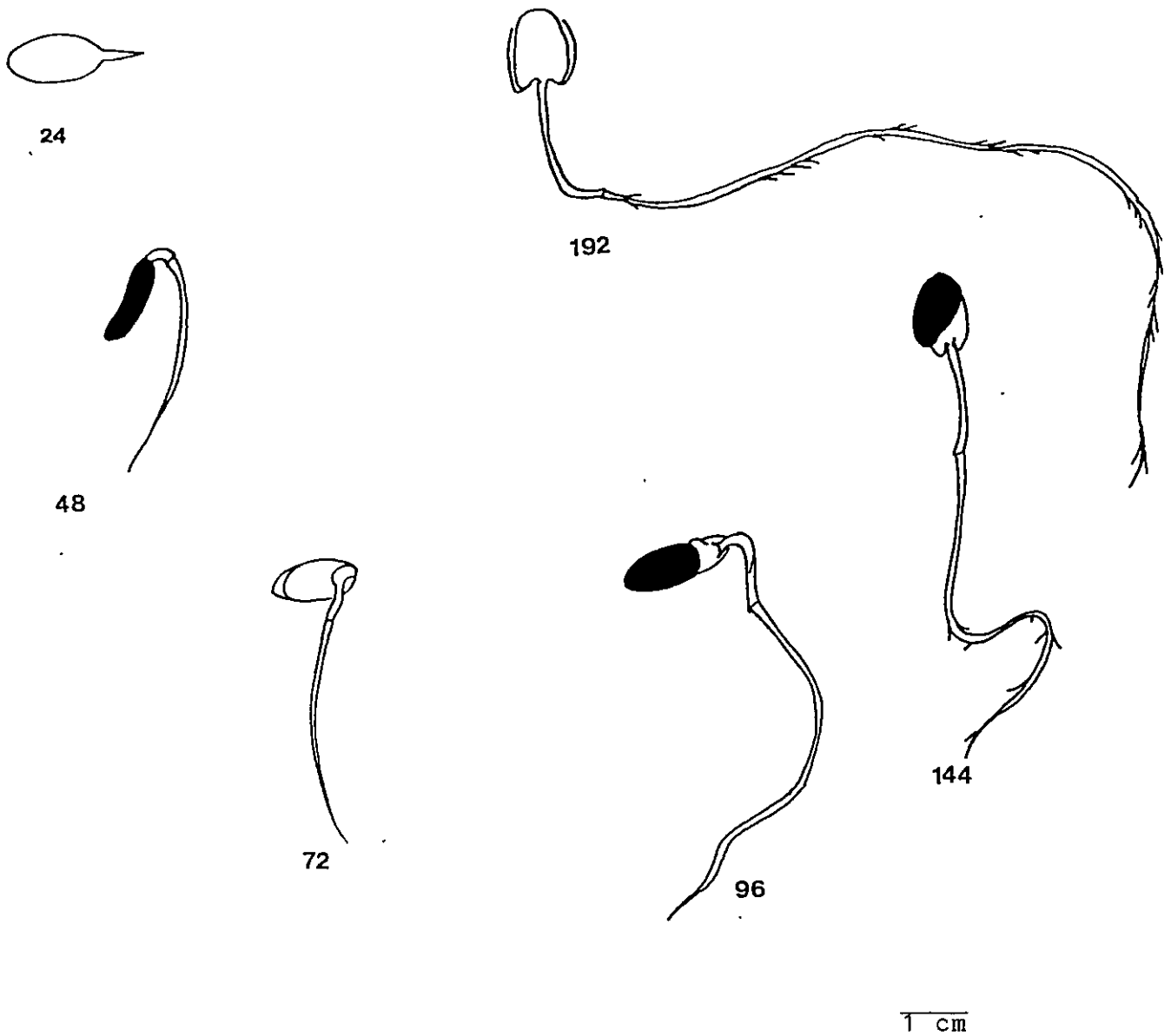
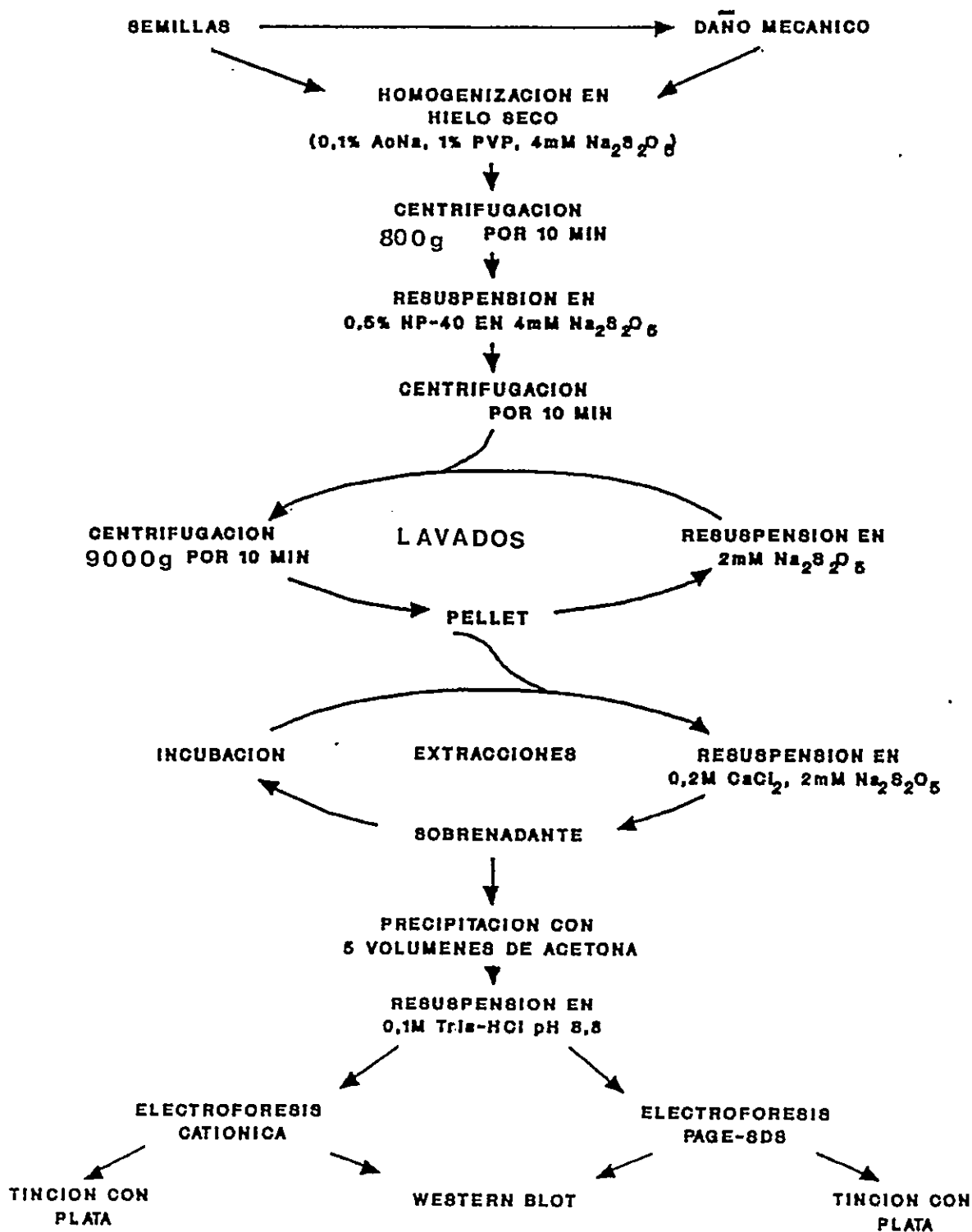


Figura 5: Estadios de desarrollo estudiados en *Prosopis chilensis*. Se representan plántulas de 24, 48, 72, 96, 144 y 192 horas (T = testa, C = cotiledón, H = hipocótilo, R = radícula). Los dibujos fueron realizados a una escala natural.

FIGURA 6:

ESQUEMA DE OBTENCION DE LAS PROTEINAS DE PARED CELULAR DE *Prosopis chilensis*.



constituido principalmente por paredes celulares, se hizo una extracción con tres lavados sucesivos de  $\text{CaCl}_2$ . Los extractos fueron separados de las paredes por centrifugación a 9000 g. Los sobrenadantes de cada centrifugación fueron analizados por el método de Bradford (1976) para la determinación de proteínas totales.

Las fracciones extraídas usando  $\text{CaCl}_2$ , fueron precipitadas en acetona, secadas y resuspendidas en buffer Tris HCl pH.8,8; para su posterior análisis electroforético.

#### **2.4.- Análisis electroforético.**

##### **2.4.1.- Electroforesis desnaturante aniónica SDS PAGE y determinación de masas moleculares.**

Las proteínas de pared celular se analizaron según el método de electroforesis en poliacrilamida con SDS descrito por Laemli (1970). El gel separador (pH 8,8) contenía 10 % de poliacrilamida y 0,1 % de SDS y el gel concentrador (pH 6,8) contenía 3,5 % de poliacrilamida, y fueron preparados a partir de una solución de acrilamida : bis-acrilamida 30 : 0,8. Cada pocillo del gel fue cargado con 15 o 30 ug de proteína según el caso. El buffer de carga (1X) tenía la siguiente composición: Tris HCl 0,0625 M, pH 6,8 ; SDS al 2%; glicerol al 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol al 0,001%. Para mantener estas concentraciones se agrego por cada volumen de muestra 1 volumen del buffer de carga 2X. Todas las muestras fueron hervidas a baño María por unos 3 min

antes de ser cargadas con la finalidad de completar la desnaturalización de las proteínas.

Las proteínas estándares de masa molecular conocida fueron preparadas y preteñidas por una compañía comercial (Sigma Co.). Los marcadores preteñidos fueron los siguientes:

$\alpha_2$ -macroglobulina ( $\alpha_2$  Mgl), 180 KD;  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ Gal), 116 KD; fructosa- 6- fosfato quinasa (F6PK), 84 KD; piruvato quinasa (PK), 58 KD; fumarasa (Fasa), 48,5 KD. Las masas moleculares de las proteínas de las muestras fueron determinadas por interpolación de la curva de movilidad relativa (migración relativa de las proteínas en geles desnaturalantes) en función del logaritmo de las masas moleculares estándares.

Las bandas de proteínas fueron visualizadas con la tinción de plata utilizando el método de Nielsen & Brown (1984). Este método consiste en fijar el gel por 30 minutos en una solución de metanol al 40 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v), seguida de tres lavados (10 min. c/u) con una solución de etanol 10 % (v/v) y ácido acético 5 % (v/v). A continuación el gel es oxidado por 5 minutos con dicromato de potasio 3,4 mM conteniendo ácido nítrico 3,2 mM y después, lavado dos veces con agua desionizada. Se añade entonces la solución de nitrato de plata 12 mM por 30 minutos, para geles de 1 mm de grosor. Luego se lava 1 minuto con agua desionizada y se adiciona la solución reductora (carbonato de sodio 0,28 M y formaldehído

0,0185 % (v/v)) renovándola cada 5 minutos aproximadamente, hasta que se revelen claramente las bandas de proteínas. La reacción es detenida con ácido acético 5 % (v/v). Los geles mantenidos en esta solución fueron fotografiados y posteriormente secados entre papeles de celofán, en un secador de geles (Drygel jr. modelo SE 540, Hoefer Scientific Instrument).

Los geles (180 X 130 X 1 mm) fueron sometidos a una intensidad de corriente constante de 22 mA durante un período de 5 a 7 horas, usando como buffer el TRIS-HCl 0,25 M y glicina 0,192 M pH 8,8, conteniendo SDS 0,1 %.

#### 2.4.2.- Electroforesis nativa catiónica.

Para analizar las proteínas en su conformación nativa, se realizaron electroforesis en geles catiónicos, según lo descrito por Thomas y Hodes (1981). En estas electroforesis las proteínas se desplazan en relación a su carga y a su masa, del polo positivo (ánodo) al negativo (cátodo). Para tal fin se empleó una solución de acrilamida:bis-acrilamida (40% : 2%), resultando una concentración de acrilamida del 9,7% en el gel separador. Se cargaron 30  $\mu$ g de proteínas en cada pocillo. Por cada volumen de muestra se agregó un volumen de buffer de carga catiónico constituido por : 20%  $\beta$ -mercaptoetanol, 40 % glicerol ; 0,030 % rojo de pironina, en buffer KOH 0,2 M y MOPS 0,24 M, pH. 8,0. La electroforesis se llevó a cabo a una intensidad de corriente de 7 mA por 36 horas aproximadamente,



empleando un buffer MOPS 0,02 M, histidina 0,1 M; que se lleva a pH 6,8 titulando con histidina.

#### **2.5.- Estimación de la actividad peroxidasa.**

La actividad peroxidasa fue estudiada en los geles catiónicos descritos, empleando una solución de 0-fenilendiamina 0,1% (p/v) y peróxido de hidrógeno 0,012 % (v/v) como sustrato en buffer citrato de sodio 0,1 M a pH 4,5 (Cassab y col., 1988). Una reacción de color amarillo-anaranjado, desarrollada pocos minutos después de añadir el reactivo, fue la evidencia de la actividad peroxidasa. La reacción fue detenida agregando agua desionizada en lavados sucesivos. Los geles fueron fotografiados inmediatamente debido a la poca estabilidad del color.

Para cuantificar la actividad peroxidasa de extractos totales y la del estándar de peroxidasa de rabanillo ("Horse radish") se realizó un análisis por dot blot de las muestras, empleando el mismo test de actividad descrito, y evaluando densitométricamente las diferencias. Detalles sobre el dot blot y la densitometría se explican en la sección 2.8.

#### **2.6.- Test de glicosilación.**

La detección de glicoproteínas se realizó directamente en los geles catiónicos descritos empleando el método de fluorescencia descrito por Eckhardt y col., (1976). En este procedimiento los geles fueron fijados durante toda la noche en una solución de metanol al 40 % (v/v) y ácido acético 5 %.

Posteriormente, se oxidaron con ácido peryódico al 0,5 % (p/v) en ácido acético 5 %, a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, con la finalidad de eliminar el exceso de ácido peryódico, se lavaron con bisulfito de sodio 0,5 % en ácido acético 5 % (v/v), en tres lavados sucesivos de 10 minutos cada uno. Una vez concluida esta etapa, los geles se sumergieron durante 2 horas en una solución que contiene dansilhidrazina al 0,09 % en acetato de sodio 0,09 M, pH 5,6. La dansilhidrazina fue preparada al 1% en etanol y entonces mezclada con el buffer de acetato de sodio. Una vez concluida la tinción, los geles fueron desteñidos con el buffer acetato de sodio 0,09 M, pH 5,6 durante unas 3 a 4 horas en lavados sucesivos, hasta que el fondo ("background") dado por la tinción desapareció. Las bandas con glicosilación fueron observadas empleando un transiluminador de luz ultravioleta (Chromato-VUE Transilluminator Model. TS-36).

#### 2.7.- Análisis Western.

Después de realizadas las electroforesis desnaturantes SDS-PAGE y las catiónicas nativas, se hicieron electrotransferencias de las proteínas de los dos tipos de geles, a papel de nitrocelulosa, de acuerdo al método de Towbin y col., (1979). Para tal fin se cortaron dos hojas de papel de filtro Whatmann y una hoja de nitrocelulosa de acuerdo al tamaño del gel. El papel de nitrocelulosa fue humedecido en agua desionizada y colocado sobre el gel. A su vez los papeles

de filtro fueron embebidos en el buffer de transferencia de acuerdo al tipo de electroforesis realizada. En el caso de los geles corridos por SDS-PAGE se empleó la solución : Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 % a pH 8,3 y para geles catiónicos se empleó : 0,022 M MOPS, 0,1 M histidina, pH 6,8. Para cada caso, los papeles humedecidos fueron utilizados para cubrir, como en un "sandwich", el gel y la nitrocelulosa. Este sistema fue compactado en una grilla plástica con la ayuda de láminas esponjosas inertes y porosas, y finalmente colocado en una cámara de electrotransferencia con el buffer señalado de acuerdo al tipo de electroforesis. Cuando se electrotransfirieron geles SDS-PAGE, la hoja de nitrocelulosa se ubicó hacia el ánodo (+) de la cámara y la electrotransferencia se realizó a 180 mA durante toda la noche a 10 °C. En el caso de los geles catiónicos, la hoja de nitrocelulosa se ubicó hacia el cátodo (-) de la cámara y la electrotransferencia se realizó a la intensidad y temperatura descritas.

Después de las electrotransferencias, las proteínas fueron evaluadas en cuanto a su respuesta inmune, utilizando un primer anticuerpo policlonal antiextensina de testa de poroto de soya obtenido en conejo (Cassab y col., 1985), y un segundo anticuerpo producido en cabra contra las inmunoglobulinas de conejo, conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma, Co). El primer anticuerpo fue gentilmente cedido por el Dr. Joseph Varner de

la Universidad de Washington, St. Louis, Missouri, U.S.A., como parte de un proyecto compartido con ese laboratorio.

El análisis Western de detección inmunológica se realizó a temperatura ambiente e implicó los siguientes procedimientos:

a) Se lavó el papel de nitrocelulosa por 10 min en buffer de lavado (Tris 0,1 M ; azida de sodio 0,05 % (p/v), Tween-20 0,04 % (v/v), pH 8,0).

b) Se sumergió durante 3 horas en buffer de bloqueo (Tris 0,1 M ; azida de sodio 0,05 % (p/v), Tween-20 0,04 % (v/v), albúmina de suero bovino 0,25 % (p/v), gelatina 0,25 % (p/v) a pH 8,0).

c) Se incubó con el anticuerpo policlonal antiextensina de testa de poroto de soya durante toda la noche. La dilución empleada fue 1 : 10.000 en buffer de bloqueo.

d) Se lavó el filtro de nitrocelulosa 3 veces en períodos de 15 minutos cada uno, con buffer de lavado.

e) Se incubó durante toda la noche, con el segundo anticuerpo de cabra producido contra inmunoglobulinas de conejo y conjugado con fosfatasa alcalina. La dilución empleada fue de 1 : 20.000 en buffer de bloqueo.

f) Se lavó el filtro 1 vez con buffer de lavado por 10 minutos, luego dos veces en períodos de 15 minutos con un buffer de lavado que contenía SDS 0,05 % y finalmente con el buffer de lavado sin SDS, como al principio, por 10 minutos.

g) Se sumergió en buffer Tris HCl 0,1 M ; NaCl 0,1 M ; pH 9,55

por 15 minutos.

h) Se realizó el revelado de la reacción inmunológica por medio de una detección colorimétrica de la actividad fosfatasa alcalina. La reacción de color se realizó sumergiendo el filtro en una solución que contiene  $MgCl_2$  4mM, azul de nitrotetrazolio 0,1 mg/ml y 5-bromo-4-cloro-indolil-fosfato 0,5 mg/ml en el buffer Tris HCl 0,1 M; NaCl 0,1M; pH 9,55.

i) La reacción fue detenida con agua desionizada cuando el color apareció (entre 5 y 15 minutos).

Paralelamente se consideraron los siguientes controles de especificidad del anticuerpo antiextensina:

- Análisis Western con el suero de un conejo no inmunizado (Suero preinmune) y el segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina.
- Análisis Western sin el primer anticuerpo, con el segundo anticuerpo.
- Análisis Western con el primer anticuerpo, sin el segundo anticuerpo.
- Análisis Western sin el primer anticuerpo, sin el segundo anticuerpo.

#### 2.8.- Dot blot, inmunodetección western y análisis densitométrico.

Para evaluar cuantitativamente la inducción de proteínas se realizó un análisis por dot blot con un equipo Bio-dot de la firma comercial BioRad. El equipo está constituido por una

placa superior de 96 agujeros huecos que se sujeta por 4 tornillos a una placa inferior, desde la que puede conectarse una bomba de vacío. Entre las dos placas se encuentra una lámina de goma flexible también agujereada y que sirve de soporte para el papel de nitrocelulosa. El sistema es armado con la lámina de nitrocelulosa humedecida en el buffer Tris HCl 0,1 M, pH 8,8. Las muestras de las edades y condiciones especificadas anteriormente, y los estándares (extensina de zanahoria) fueron distribuidas y colocadas en los agujeros en alicuotas de 200  $\mu$ L, en cuatro diluciones seriadas de 2,5  $\mu$ g; 1,25  $\mu$ g; 0,625  $\mu$ g; 0,313  $\mu$ g; para todas los casos. Una vez colocadas las muestras se aplicó un vacío leve que permitió depositar las proteínas lentamente sobre el filtro de nitrocelulosa. Cuando los pocillos se secaron, se agregaron 200  $\mu$ l del buffer Tris HCl 0,1 M, pH 8,8 para lavarlos, y una vez que este volumen pasó a través del filtro, se retiró el vacío. Los filtros así tratados (" dot blot ") fueron evaluados por el análisis western previamente descrito.

La cuantificación de la reacción colorimétrica se llevó a cabo por digitalización de imágenes y densitometría computarizada de los filtros de nitrocelulosa. Para tal fin se empleó un programa de computación, el Gel perfect 5.2, diseñado por el Dr. Salvador Bozzo, del Dpto. de Medicina Experimental, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Tal como lo describe el manual del usuario, el sistema Gel perfect está

basado en tres programas que efectúan las labores básicas para hacer un análisis densitográfico de geles, de fotografías u otro tipo de imágenes :

- a) Captación de la imagen mediante un Scanner (digitalizador de imágenes). Se producen archivos de tipo TIFF.
- b) Mediciones densitométricas usando Gel Perfect 5.2. Se producen archivos OUT GEL.PS. La cuantificación implica el cálculo de las integrales de curvas Gaussianas cuyas áreas representan la intensidad relativa de la respuesta medida.
- c) Impresión de gráficos usando lenguaje Postscript. Se producen salidas gráficas en impresoras laser o de agujas.

Los tres programas se instalan y usan en un computador AT286 o en uno mejor. Cada uno de los programas del sistema es independiente, es decir, se puede digitalizar en un sistema, transportar el archivo TIFF generado a otro sistema para su medición, y luego el archivo OUT.GEL.PS a otro sistema para la impresión de los informes.

## 2.9.- Determinación de la composición de aminoacídica.

Antes de determinar la composición de aminoácidos, fue necesario realizar una electroforesis catiónica de las proteínas de pared celular reconocidas previamente por análisis western. Para ello se cargaron 100 ug de proteínas de pared en cada pocillo del gel, con su respectivo buffer de carga. Estas proteínas, identificadas por sus movilidades relativas en

geles SDS-PAGE, como de 180 KD, 126 KD, 107 KD y 63 KD, fueron electrotransferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) usando un buffer de transferencia catiónica que no contiene histidina (MOPS, 0,022 M en Tris 8,3 mM, pH 6,8).

Después de la electrotransferencia, y con el objeto de visualizar las bandas de proteínas, la membrana PVDF fue teñida con azul de Coomasie R-250 al 0.25 % (p/v) en una solución de metanol al 50 % y ácido acético glacial al 10 %, por unas 12 horas, para luego ser desteñida por otras 12 horas con dos soluciones de desteñido : La primera conteniendo ácido acético glacial al 10 % y metanol al 50 %, la segunda con ácido acético glacial al 10 % y metanol al 10%.

Las bandas identificadas fueron cortadas de las membranas en tiras de 5 X 10 mm y enviadas a la Monsanto Corporate Research, Chesterfield, MO, USA, para su respectivo análisis. Durante el análisis cada tira se sometió a una hidrólisis ácida con vapores de HCl 6 N en tubos sellados al vacío y por 24 horas a 115 ° C. Los aminoácidos liberados fueron extraídos con dos lavados de 200 ul de una solución de metanol al 30% (v/v) conteniendo HCl 0,1 N y entonces, llevados a sequedad.

Las muestras desecadas fueron resuspendidas en 90 µl de citrato de sodio 0.2 M, pH 5.4, e inyectadas (50 µl), en un analizador de aminoácidos Beckman 6300. El analizador separa los aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico en una



columna de poliestireno sulfonado. Los aminoácidos son cuantificados mediante determinación colorimétrica empleando la ninhidrina. La lectura de la absorbancia a 540 y 440 nm permitió cuantificar los alfa-aminoácidos y la prolina, respectivamente.

#### **2.10.-Determinación de la secuencia amino-terminal.**

La secuencia amino-terminal fue determinada en las bandas identificadas y cortadas de membranas PVDF teñidas con azul de coomassie. Los análisis se realizaron en la Monsanto Corporate Research, MO., por el método de degradación de Edman, usando un secuenciador automático equipado con un analizador de derivados feniltiohidantoíneos y valiéndose del programa 03RPTH. Los aminoácidos liberados, como derivados feniltiohidantoíneos, fueron identificados por análisis en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase inversa sobre una columna C-18 Brownlee (150 X 3.9 mm). La absorción de los derivados feniltiohidantoíneos fue evaluada a 254 nm.

#### **2.11.- Análisis computacional comparativo de las composiciones y secuencias aminoacídicas.**

Las proporciones de aminoácidos obtenidas de las proteínas de pared estudiadas, así como las secuencias amino-terminales fueron comparadas contra todas las proteínas cuyas proporciones de aminoácidos y secuencias existían en el banco de secuencias del European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Se realizó también un análisis parcial de similitud

de estas proteínas empleando el método de Cornish Bowden (1983). Las secuencias amino-terminales fueron comparadas utilizando el análisis de alineamiento FASTA (Pearson y Lipman, 1988).

#### 2.12.-Inmunoimpresiones de tejidos sobre membranas. -

Las impresiones fueron realizadas considerando el método descrito por Cassab y Varner (1987). Sin embargo, se realizaron varias modificaciones importantes:

- A) Las impresiones se realizaron sobre la cara lisa de membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF).
- B) Las membranas fueron secadas a 80 °C por unas 10 horas.

En todos los casos, tejidos de plántulas de 3, 26, 37, 48, 72, y 96 horas de edad fueron cortados, transversal y longitudinalmente, imprimiéndolos unas 6 veces en cada caso sobre las membranas, por unos 30 seg. Una experiencia idéntica se realizó con tejidos de plántulas dañadas de 48 horas de edad, 48 horas después del daño. En todos los casos se consideraron 3 réplicas, es decir, tres membranas donde se hacían las impresiones de tejido descritas.

Las membranas así impresas fueron incubadas con el primer anticuerpo antiextensina y reveladas con un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina.

### 2.13.-Microscopía e inmunocitoquímica.

Las muestras utilizadas fueron fijadas con FAA (Formalina 2% -ácido acético 5% -alcohol etílico 45%) deshidratadas e incluidas en parafina, para luego ser cortadas con un micrótopo automático y teñidas con safranina fast-green según el método propuesto por Jensen (1962), que ha sido estandarizado y modificado en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Católica de Chile, por la Dra. Gloria Montenegro. Se emplearon cotiledones, hipocótilos y radículas de plántulas dañadas de 48 horas de edad, 48 horas después del daño y de los respectivos controles de plántulas no dañadas de 96 horas de edad. En todos los casos se consideraron por lo menos 3 réplicas. El procedimiento seguido puede resumirse en los siguientes pasos:

- 1) Se realizó la fijación en FAA por 12 horas.
- 2) A continuación se hizo una deshidratación alcohólica secuencial sumergiendo las muestras en la siguiente serie alcohólica:
  - Etanol 50%, 20 minutos a temperatura ambiente y 10 min. a 58 °C.
  - Etanol 70% (20 min. Temp.Amb., 10 min. a 58 °C)
  - Etanol 95 % (30 min a Temp.Amb.).
  - Etanol 100 % (30 min. a Temp.Amb.).
  - Solución de Tert-butanol 50 % y etanol absoluto 50

% (15 min. a Temp. Amb.).

- Tert-butanol 100 % (25 °C toda la noche).

3) Se incluyeron en parafina los tejidos. Para ello se colocaron las muestras en una mezcla de 1:1 tert-butanol: paraplast (parafina para análisis). Luego se incrementó la concentración de parafina durante 3 horas, hasta dejar las muestras definitivamente en pequeños bloques que contienen parafina sola. La penetración de la parafina se demoró por lo menos unas 6 horas. Posteriormente el bloque se solidificó, quedando listo para ser orientado y cortado en el micrótopo.

4) Se hicieron cortes de aproximadamente 10- 20 micrones.

5) Los cortes seriados fueron colocados sobre portaobjetos previamente bañados con una lámina delgada y uniforme de una mezcla (1:1) de albúmina de huevo (filtrado de una clara de huevo) y glicerina, que se dejó secar a 40 °C unos 30 minutos sobre los portaobjetos. La cinta de cortes seriados que sale del micrótopo en los distintos casos, fue estirada en una cubeta de agua a 40 °C por unos 3 a 4 minutos, y luego montada en los portaobjetos tratados. Seguidamente, los portaobjetos con sus muestras fueron colocados sobre una plancha de calentamiento a 40 °C.

6) Hidratación y tinción:

En esta etapa dos grupos de muestras idénticas (réplicas) fueron teñidas. Uno de los grupos fue teñido con Safranina-fast green de la siguiente manera:

- Se Sumergieron durante 10 minutos en una solución que contiene: 0,5 grs de safranina, 50 ml de etanol al 95% y 50 ml de agua destilada.

- Se Enjuagaron con agua destilada 2 veces en periodos de 2 minutos.

- Se hidrataron las muestras en la siguiente serie: etanol 100 %, 95%, 70% y 50% (5 minutos en cada solución).

- Las muestras se sumergieron durante 7 minutos en una solución que contiene: 0,1 grs de Fast-green, 10 ml de etanol, y 10 ml de eugenol.

- Se destiñeron por 5 min con una solución de eugenol que contiene: 50 ml de eugenol comercial, 25 ml de etanol, 25 ml de xilol.

- La destinción continuó con otro lavado de la solución de eugenol por 10 min.

- Finalmente, los portaobjetos fueron bañados dos veces en periodos de 10 minutos, con xilol puro, antes de hacer el montaje con balsamo del Canadá y colocar el respectivo cubreobjeto.

Después de unas 3 horas el bálsamo se había endurecido y las muestras fueron observadas en un fotomicroscopio Nikon Optiphot para tomar las fotografías (ASA 100, KODAK GOLD) y hacer los estudios respectivos.

El otro grupo de réplicas montadas en parafina fue

utilizada para la inmunocitoquímica. Para ello los portaobjetos fueron desparafinizados sumergiéndolos sucesivamente en la siguiente serie:

- Xilol puro dos veces en períodos de 10 minutos.
- Etanol (2 veces por 5 minutos cada una).
- Una solución que contiene: 45 ml de metanol más 5 ml de peróxido de hidrógeno al 3 % (20 minutos).
- Etanol 95 %, 75 %, 50 % (5 minutos cada solución).
- Lavado en agua desionizada por 5 minutos.

Después de la desparafinación, las muestras fueron incubadas con el 1<sup>er</sup>. y 2<sup>do</sup> anticuerpos, como fue especificado en el análisis Western descrito en la sección 2.7. Para ello las muestras fueron : lavadas con buffer de lavado, bloqueadas con albúmina de suero bovino y gelatina, incubadas con el 1er anticuerpo antiextensina de testa de poroto de soya (dilución 1: 10.000), lavadas de nuevo, e incubadas con el segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1:20.000), para ser reveladas colorimétricamente por la reacción enzimática. La especificidad del anticuerpo fue chequeada paralelamente en cortes idénticos, en una serie de tratamientos controles, ya especificados en la sección 2.7.

## RESULTADOS

### 3.1.-Reconocimiento inmunológico de las proteínas de pared celular de *Prosopis chilensis*.

#### 3.1.1.- Inmunodetección y especificidad del anticuerpo antiextensina de testa de poroto de soya.

El anticuerpo policlonal antiextensina de testa de poroto de soya reacciona en forma cruzada con al menos 4 proteínas de pared celular de cotiledones dañados de Prosopis chilensis (carril 2, Fig. 7A). El reconocimiento que hace este anticuerpo es específico, puesto que el control B (preinmune) y el control C (sin 1er, con 2do. Anticuerpo) no presentan reactividad (Carril 2, Fig. 7B y 7C).

Para verificar si el anticuerpo policlonal antiextensina de testa de poroto de soya era capaz de reaccionar con una extensina purificada (control positivo), se empleó en el análisis Western la extensina de zanahoria enviada gentilmente por la Dra. Marcia Kielisyenshi, de la Universidad de Georgia, USA. El anticuerpo antiextensina reconoció una banda cuya movilidad relativa es diferente a las reconocidas en tejidos dañados (Carril 3 Fig. 7A). Este reconocimiento es específico puesto que los controles no presentan reactividad (Carril 3, Fig. 7B y 7C). Una mejor



**Figura 7 : Analisis western de extractos de proteínas de pared de cotiledón dañado y no dañado de plántulas de *Prosopis chilensis*, revelado con anticuerpo anti- extensina de testa de poroto de Soya ( dilución 1 : 10.000) y un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina ( dilución 1: 20.000). A) Suero preinmune antiextensina, B) Suero preinmune, C) Control sin primer y con segundo anticuerpo. Carril 1 : 20 ugrs de proteínas del extracto de tejido no dañado. Carril 2 : 20 ugrs de proteínas del extracto de tejido dañado. Carril 3 : 10 ugrs del estándar de extensina de zanahoria.**





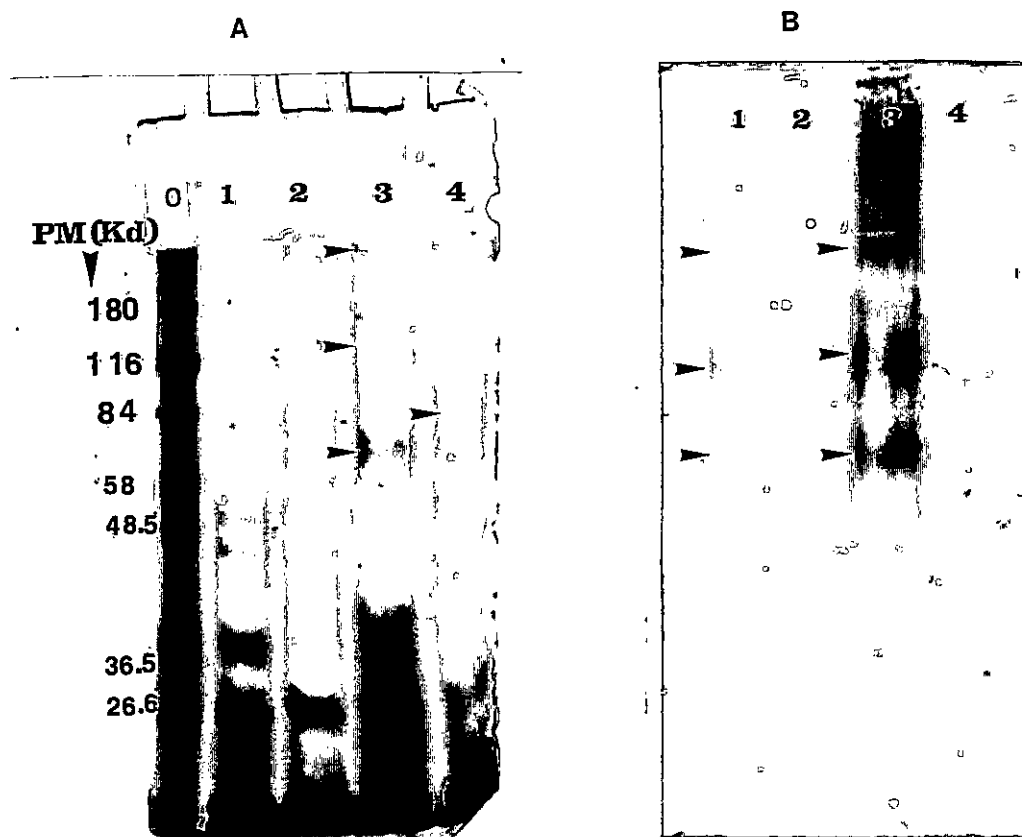
**Figura 8 : Analisis western de extractos de proteínas de pared de cotiledón dañado y no dañado de plántulas de *Prosopis chilensis*, revelado con anticuerpo anti- extensina de testa de poroto de Soya ( dilución 1 : 10.000) y un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina ( dilución 1: 20.000). Carril 2 : 20 ugrs de proteínas del extracto de tejido no dañado. Carril 1 : 20 ugrs de proteínas del extracto de tejido dañado. Carril 3 : 10 ugrs del estándar de extensina de zanahoria.**

detección de la extensina de zanahoria puede observarse en la figura 8 (carril 3). Nótese que esta extensina migra como una banda gruesa (patrón de glicoproteína), en la parte superior del gel.

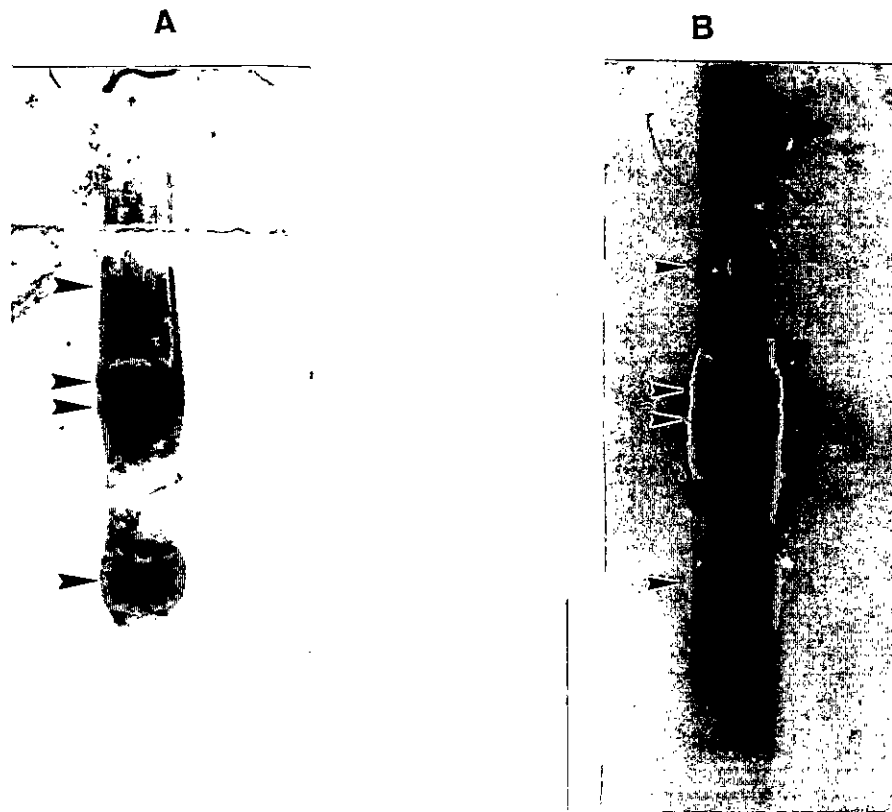
En los extractos de proteínas de pared de tejidos no dañados, una banda distinta es detectada por el anticuerpo antiextensina (carril 1, Fig. 7A). Sin embargo, esta banda es detectada también cuando se incuba con el suero preinmune (control A, Fig. 7B, carril 1) o bien sólo con el 2do. Anticuerpo (control b, Fig. 7C, carril 1), lo que permite establecer que se trata de un reconocimiento inespecífico.

### 3.1.2.- Determinación de masas moleculares.

Los resultados de la interpolación de la curva de movilidad relativa (migración relativa de las proteínas en geles desnaturalantes (Fig. 9A) en función del logaritmo de las masas moleculares estándares), revelaron, que las proteínas de pared celular estudiadas en extractos de pared de cotiledones dañados, presentan masas moleculares aproximadas de : 180 KD, 126 KD, 107 KD y 63 KD. Estas proteínas poseen reactividad cruzada con el anticuerpo antiextensina de testa de poroto de soya (Fig. 9B). Un patrón de proteínas similar puede observarse en los geles catiónicos (Fig. 10A) y en su respectivo análisis Western (Fig. 10B).



**Figura 9 : Electroforesis en geles de poliacrilamida - SDS de proteínas de pared celular extraídas con  $\text{CaCl}_2$  de cotiledones de plántulas *Prosopis chilensis*. A) Gel teñido con plata. B) Análisis Western ( Western blot ) revelado con anticuerpo anti- extensina de testa de poroto de Soya ( dilución 1 : 10.000) y un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina ( dilución 1 : 20.000). Carril 0) Estándares de masa molecular. Carriles 1) y 3) 15 microgramos de extractos de proteínas de pared de cotiledones obtenidas 24 horas post- daño de plántulas de 24 y 36 horas de edad. Carriles 2) y 4) 15 microgramos controles no dañados de las muestras de plántulas de 24 y 36 horas de edad.**

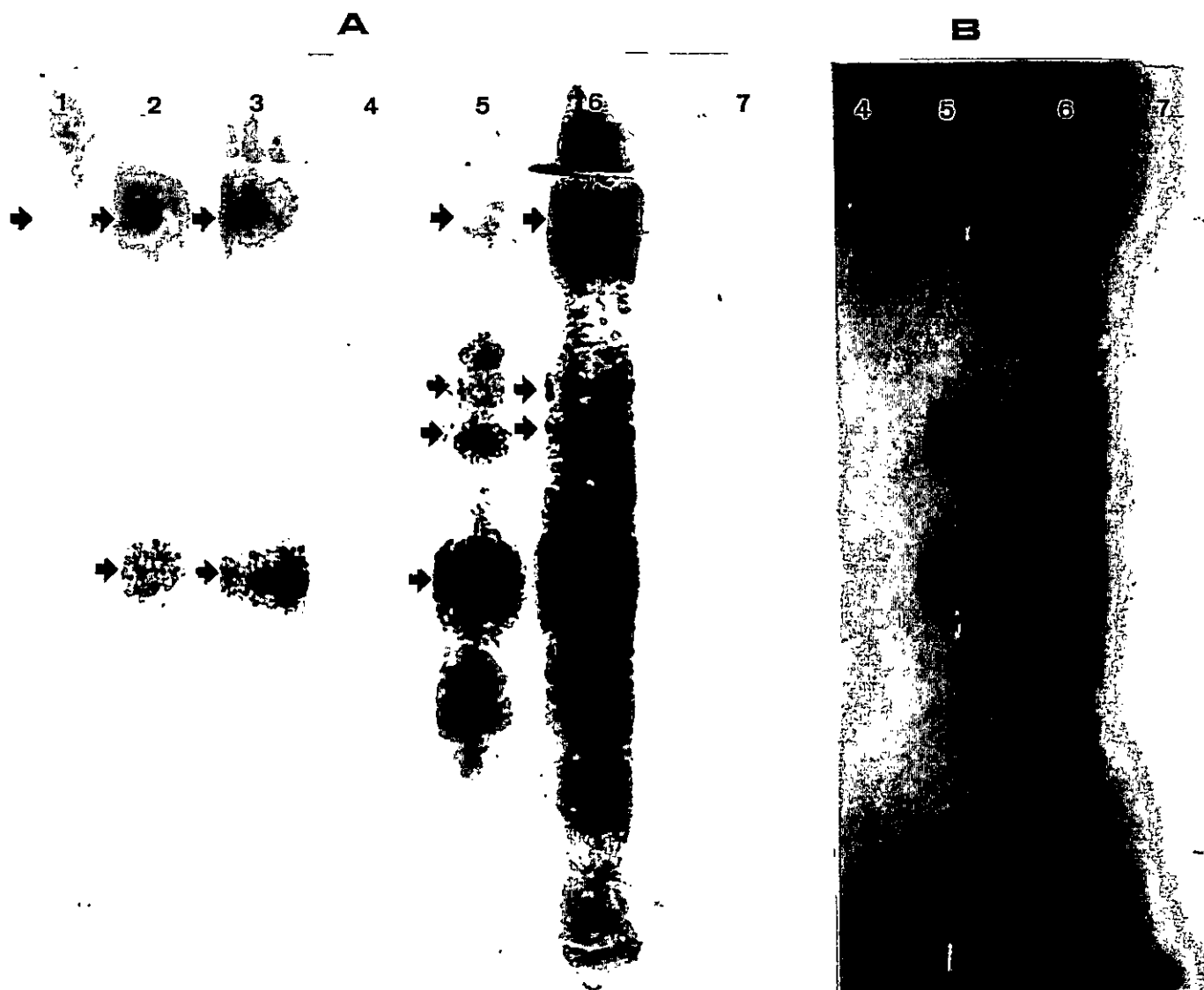


**Figura 10 : Electroforesis en geles catiónicos de proteínas de pared celular extraídas con  $\text{CaCl}_2$  de cotiledones de plántulas de *Prosopis chilensis* de 38 horas de edad, obtenido 24 horas post- daño. A) Gel teñido con plata. B) Análisis Western ( Western blot ) revelado con anticuerpo anti- extensina de testa de poroto de Soya ( dilución 1 : 10.000) y un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina ( dilución 1 : 20.000).**

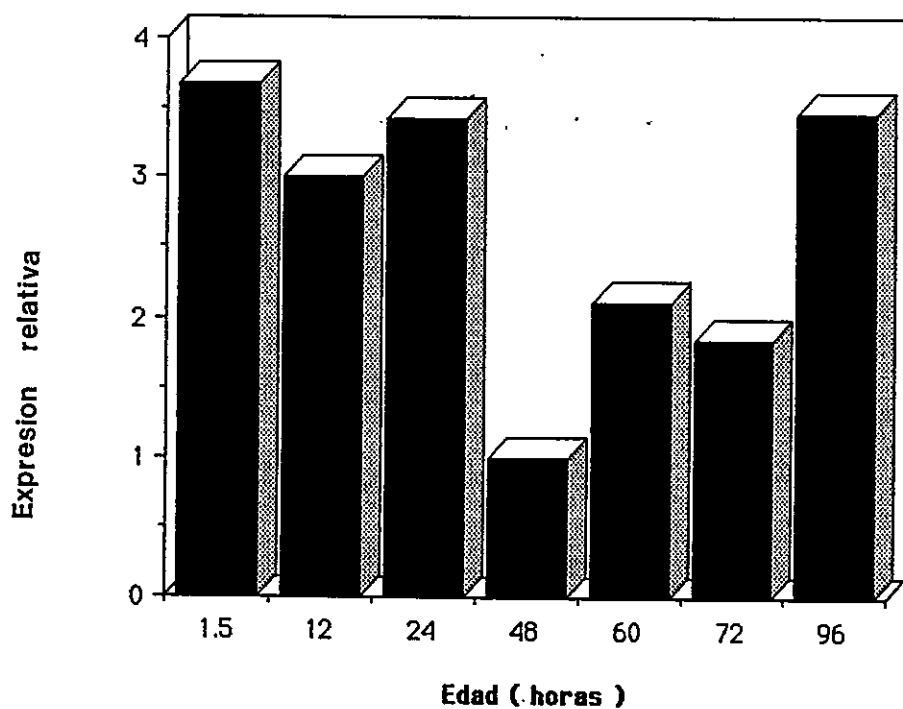
### 3.1.3.- Expresión (acumulación) de proteínas durante el desarrollo normal.

Las proteínas de pared celular estudiadas de cotiledones dañados de Prosopis chilensis, se expresan también durante el desarrollo normal en plántulas no dañadas (Fig. 11, carriles 1, 2 y 3). Las bandas correspondientes a proteínas de 180 KD y 63 KD, son especialmente reconocidas por el anticuerpo antiextensina en extractos de proteínas de 48, 60 y 72 horas de edad. De la intensificación progresiva de las bandas en la medida en que se incrementa la edad, se deduce que estas proteínas son expresadas durante el desarrollo.

La cuantificación de esta expresión por análisis dot blot y la densitometría, expresada como número de veces de expresión con respecto a un control de 48 horas, indica que la mayor expresión de proteínas de pared (Aprox. 3,7 veces) durante el desarrollo normal ( sin daño ) se da a las 1.5 horas de edad (Figura 12), es decir en semillas en las que aún no ha brotado la radícula, 1.5 horas post-imbibición. El nivel de expresión experimenta una ligera disminución a las 12 y 24 horas de edad, y una gran caída a las 48 horas. Posteriormente, a las 60 y 72 horas comienza a presentarse una nueva expresión (Aprox. 2 veces) que termina con una recuperación de los niveles iniciales a las 96 horas de edad.



**Figura 11 : Análisis Western ( Western blot) de la cinética de expresión de proteínas de pared celular de *Prosopis chilensis*. revelado con anticuerpo anti- extensina de testa de poroto de Soya ( dilución 1 : 10.000) y un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina ( dilución 1: 20.000).A) Suero inmune antiextensina, B) Suero preinmune. Carriles 1 , 2 y 3) Extractos de proteínas de pared de cotiledones de plántulas no dañadas de 48, 60 y 72 horas de edad, respectivamente. Carriles 4 , 5 , 6 y 7) Extractos de proteínas de pared celular de cotiledones de plántulas de 48 horas de edad a las 0.5 ; 3 ; 12 y 24 horas después de producir el daño mecánico.**



**Figura 12 : Cinética de expresión (acumulación) de proteínas de pared celular de *Prosopis chilensis* en el desarrollo. Los resultados fueron obtenidos por análisis dot- blot y densitometría e indican el número de veces que se expresan las proteínas de pared celular, en relación al control no dañado de 48 horas. (Expresión relativa).**

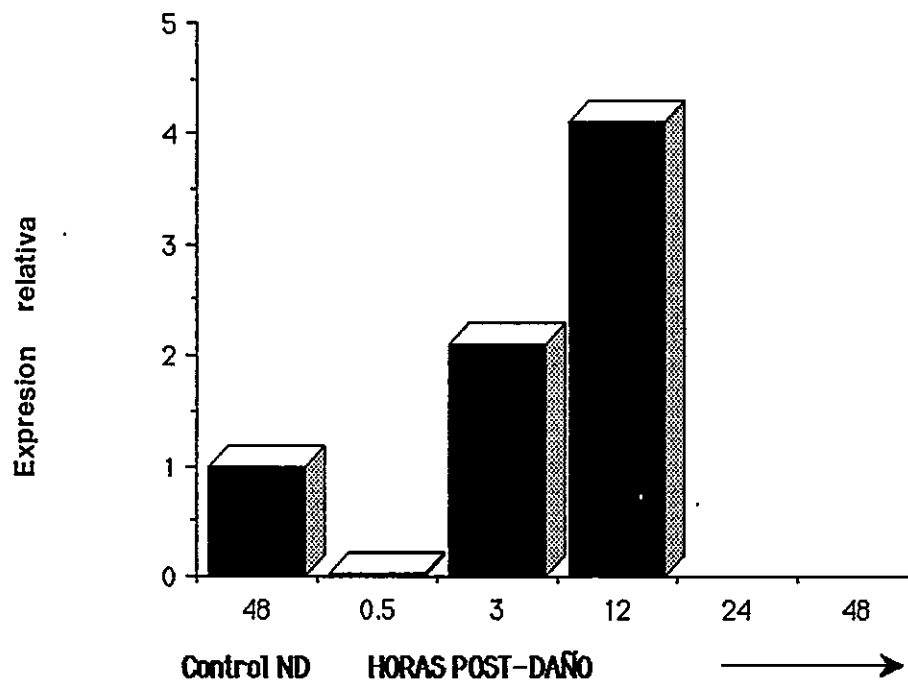
Igualmente, el análisis dot blot y la densitometría permitieron relativizar los datos obtenidos en Prosopis chilensis con respecto a un estándar de extensina de zanahoria. De la comparación se desprende que las proteínas de pared celular de P.chilensis ( e.g. la extensina y otras) presentan una inmunoreacción con el anticuerpo antiextensina que es aproximadamente el doble que la que presenta una muestra equivalente de extensina de zanahoria.

#### 3.1.4.- Expresión de proteínas en respuesta a las heridas.

Las proteínas de pared celular de Prosopis chilensis estudiadas (180 KD, 126 KD, 107 KD y 63 KD) son expresadas por heridas. Los resultados de la cinética de aparición de las proteínas evaluados por análisis Western (Fig. 11), indican que las proteínas se presentan en plántulas de 48 horas de edad, 3 h después del daño (carril 5, Fig.11), y se intensifica, alcanzando un máximo a las 12 horas post-daño (carril 6, Fig.11). La proteína con una expresión más evidente es la de 63 KD, que corresponde a la banda más gruesa (carriles 5 y 6, Fig. 5 y 6) En dos tiempos posteriores al daño no se observa reacción inmune (carriles 4 y 7, Fig. 11).

El análisis por dot blot, y la respectiva densitometría, expresada como expresión relativa con respecto al control no dañado de 48 horas, corroboran la tendencia que se ha





**Figura 13 : Cinética de expresión (acumulación) de proteínas de pared celular de *Prosopis chilensis* en respuesta a las heridas. Los resultados fueron obtenidos por análisis dot- blot y densitometría e indican el número de veces que se expresan las proteínas de pared celular, en respuesta a las heridas con respecto al control no dañado de 48 horas. (Expresión relativa ).**

descrito en el párrafo anterior. La expresión máxima, en respuesta al estrés producido por heridas (12 horas post-daño) es de aproximadamente 4 veces, con respecto al control de 48 horas de edad.

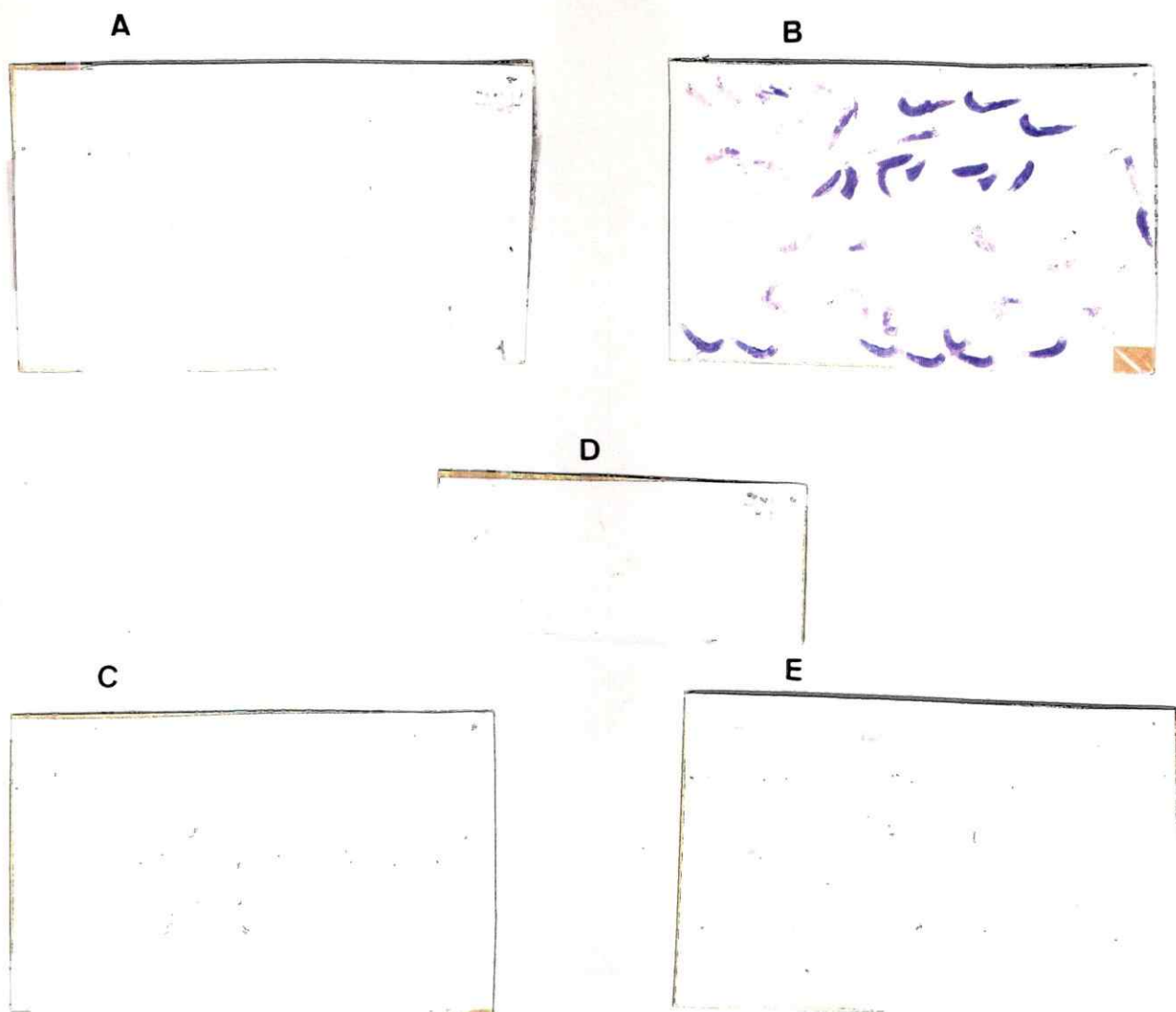
### 3.2.- Expresión tejido específica de proteínas de pared por medio de inmunoimpresiones.

#### 3.2.1.- Verificación de la especificidad del anticuerpo.

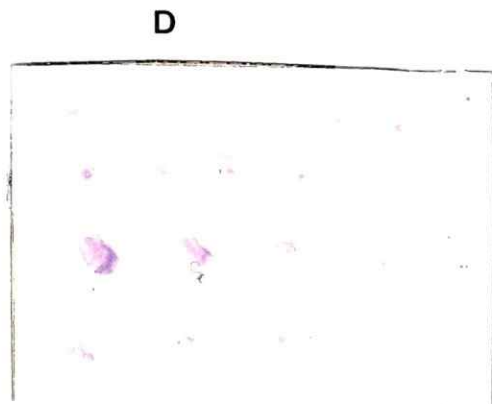
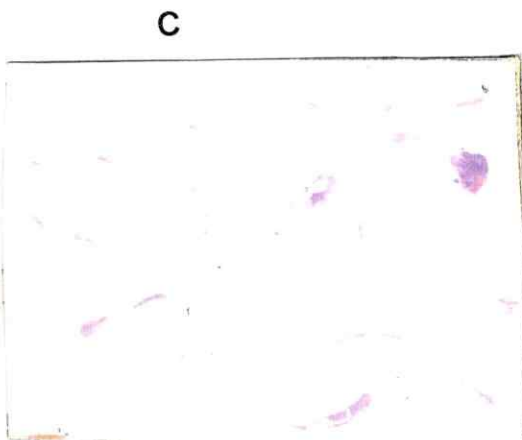
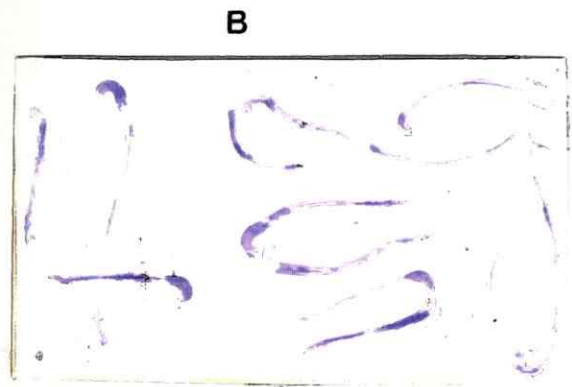
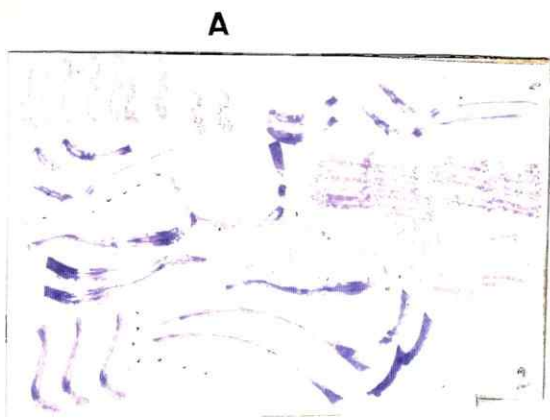
La identificación inmunológica de proteínas de pared celular en impresiones de tejidos sobre membranas requirió un chequeo de la especificidad del anticuerpo antiextensina de testa de poroto de soya (Figuras 14 y 15). Ninguno de los controles señalados presentó reactividad con el anticuerpo antiextensina (Membranas A,C,D y E, Fig. 14 ; membranas C y D en la Fig.15). El suero inmune, en cambio hace un reconocimiento específico, evidente en las inmunoimpresiones (membrana B, Fig.14 ; membranas A y B, Fig. 15).

#### 3.2.2.- Expresión durante el desarrollo.

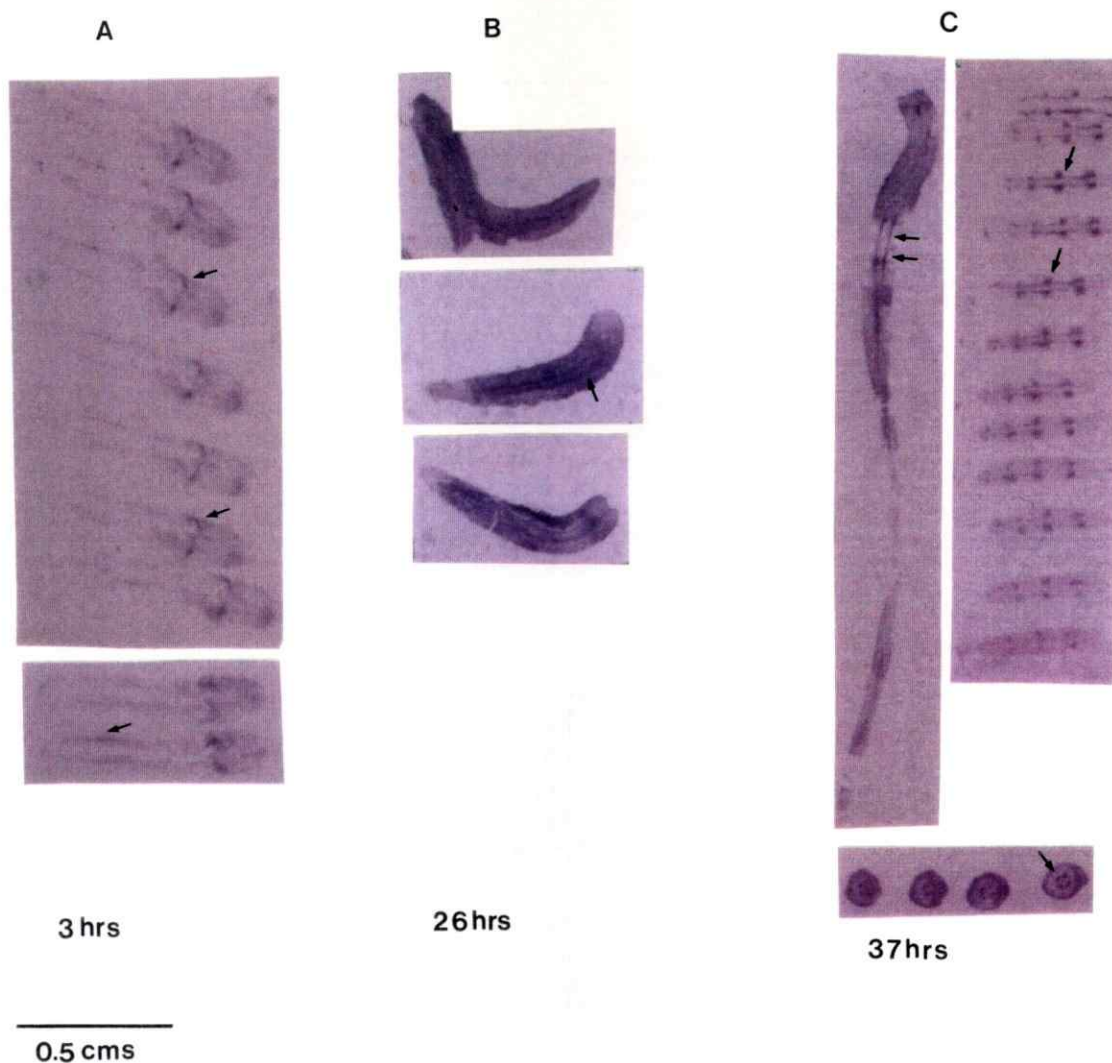
Las impresiones han confirmado que existe una expresión de proteínas de pared durante el desarrollo (Figuras 16,17 y 18). A las 3 horas de edad (Fig. 16A), cuando aun no ha brotado la radícula de la plántula, ya se encuentran expresadas las proteínas, muy especialmente localizadas en la zona meristemática del embrión y en los



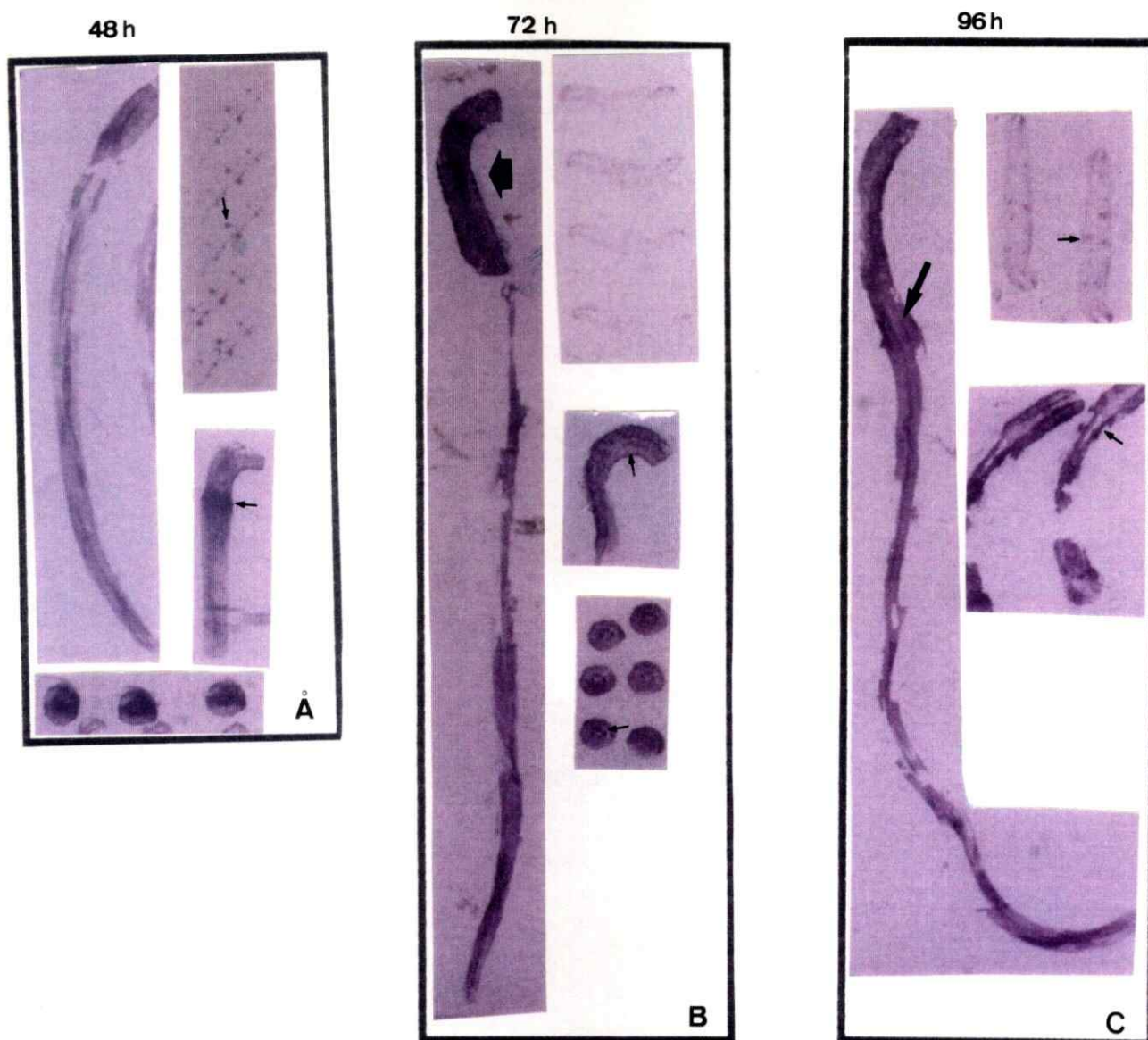
**Figura 14: Impresión de tejidos de *Prosopis chilensis* sobre membranas de PVDF, con A) Suero preinmune, B) Suero Inmune antiextensina, C) Control sin primer y con segundo anticuerpo, D) Control con primer y sin segundo anticuerpo, y E) Control sin primer y sin segundo anticuerpo. El Western blot fue revelado con anticuerpo anti- extensina de testa de poroto de Soya ( dilución 1 : 10.000) y un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina ( dilución 1: 20.000).**



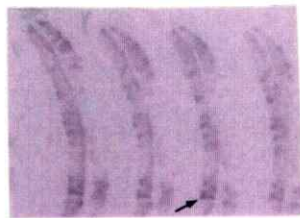
**Figura 15 : Impresión de tejidos de *Prosopis chilensis* y maiz sobre membranas de nylon, reveladas con suero inmune anti- extensina de testa de poroto de soya A y B) *Prosopis chilensis*. C y D) Maíz.**



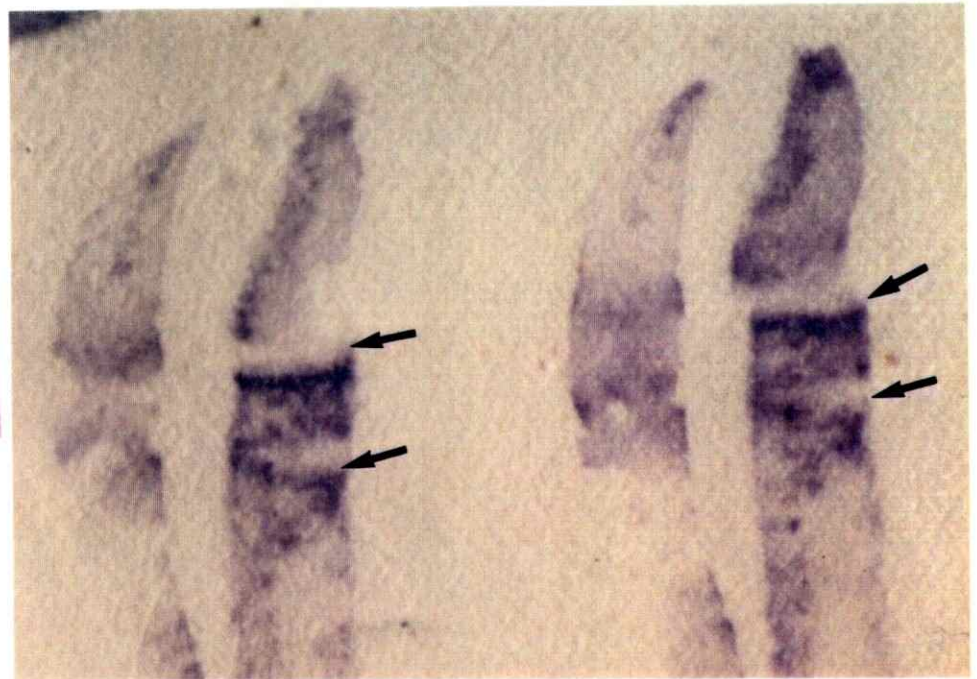
**Figura 16 : Expresión de las proteínas de parad celular durante el desarrollo temprano de plántulas de *Prosopis chilensis*, analizada por inmunopresiones ( escala señalada). A) 3 horas de edad. B) 26 horas de edad. C) 37 horas de edad. Se indican con flechas: a las 3 horas, zona meristemática y haces vasculares de los cotiledones en cortes longitudinales, de semillas de 3 horas de edad (post embebición); a las 26 horas, haces vasculares de cortes longitudinales de radícula ; a las 37 horas, haces vasculares en corte longitudinal de radícula ( izquierda ) y transversal de cotiledones ( derecha ) e hipocótilo ( abajo). Los cortes fueron impresos sobre membrana PVDF y la inmunolocalización fue realizada empleando como primer anticuerpo, el policlonal antiextensina de testa de poroto de soya (dilución 1:10.000) y un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1: 20.000).**



**Figura 17 : Expresión de las proteínas de pared celular durante el desarrollo temprano de plántulas de *Prosopis chilensis* en impresiones sobre membranas PUDF (escala señalada). A) 48 horas de edad. B) 72 horas de edad. C) 96 horas de edad. Se indican con flechas : a las 48 horas, haces vasculares en cortes transversales de cotiledones ( superior a la derecha ) y , Zona de conexión hipocótilo- radícula en corte longitudinal ( inferior derecha ). A las 72 horas, hipocótilo en corte longitudinal ( superior izquierda ) y haces vasculares en : corte longitudinal y transversal de hipocótilo ( medio e inferior derecho respectivamente ). A las 96 horas haces vasculares en : corte longitudinal de radícula ( superior izquierda); corte transversal de cotiledón ( superior derecha ) y corte longitudinal de hipocótilo ( inferior derecha ) .**



0.5cms



20 X

**Figura 18 : Inducción de la expresión de proteínas de pared celular en zonas dañadas de cotiledones de plántulas de 48 horas de edad de *Prosopis chilensis* , 48 horas post- daño, observados en inmunopresiones (izquierda ) y con lupa estereoscópica (derecha). Nótese la inducción en respuesta a las heridas ( flechas ). Los cortes fueron impresos sobre membrana PVDF. La inmunolocalización fue realizada empleando como primer anticuerpo, el policlonal antiextensina de testa de poroto de soya (dilución 1:10.000) y un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1: 20.000).**

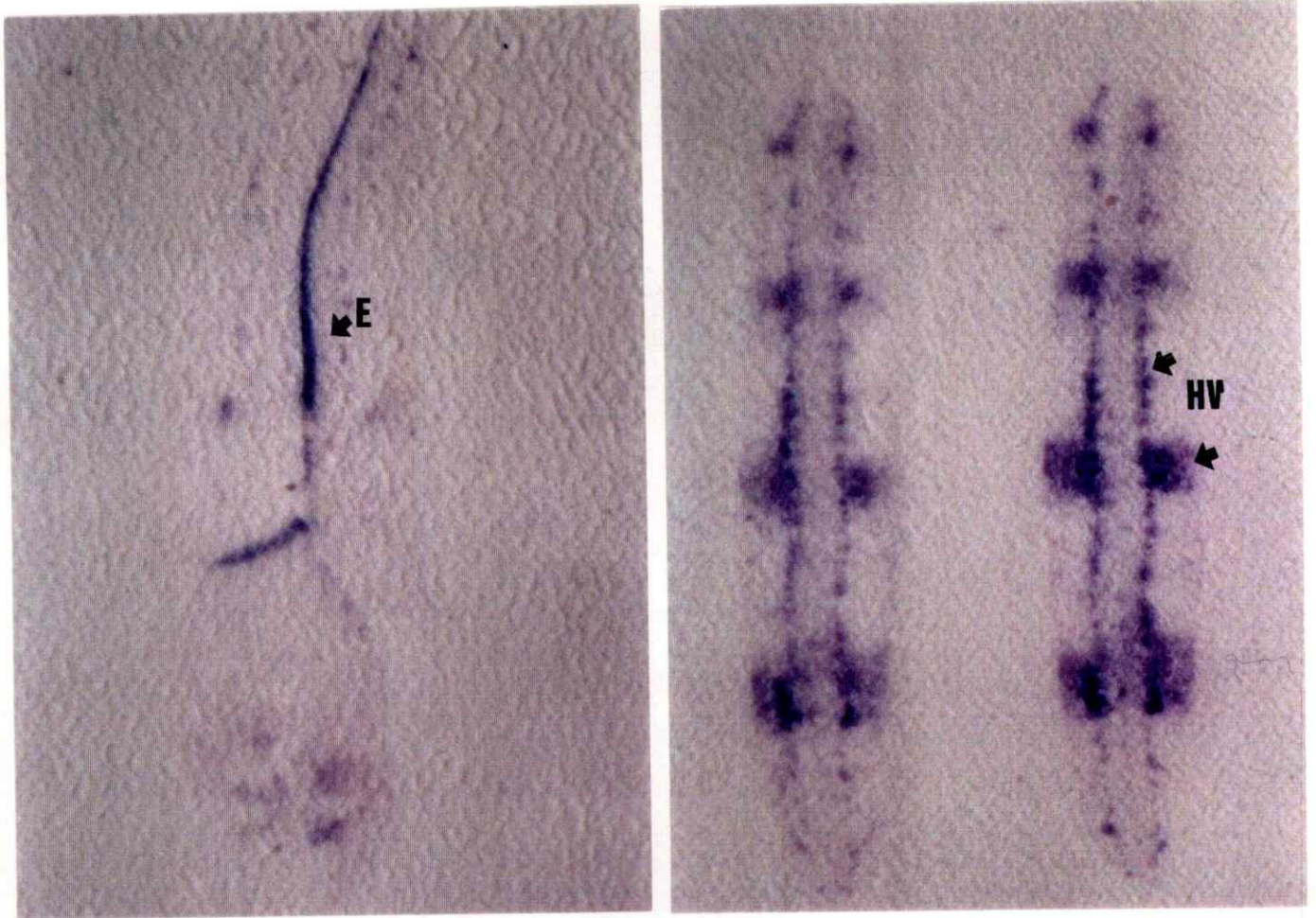
haces vasculares de los cotiledones. A las 26 horas, la reacción se hace más intensa y localizada en toda la radícula, aunque se destacan los haces vasculares (Fig.16B). A las 37 horas, aunque la reacción es menos intensa que a las 26 horas, la inmunolocalización es muy precisa e indica que las proteínas de pared están asociadas a los haces vasculares (Fig. 16C). Vale destacar que entre las 24 y 37 horas de edad se presenta un crecimiento sustancial de las plántulas en sus radículas e hipocótilos. La situación no cambia demasiado a las 48 horas aunque a esta edad destaca la inmunoreacción de la zona que conecta al hipocótilo con la raíz (Fig. 17A). A las 72 horas se incrementa la reacción del hipocótilo, disminuyendo a las 96 horas (Figs. 17B y 17C). En los tres casos (48,72 y 96 horas), la radícula y el hipocótilo no sólo han crecido en longitud sino en grosor.

Las diferencias en la expresión tejido específica de estas proteínas, así como entre dos estadios importantes del desarrollo (3h vs 37 h, semilla vs. plántula), quedan bien establecidas en las observaciones de las impresiones a la lupa (Fig. 19a, 19b, 19c). Nótese que ya a las 3 horas se presenta una expresión de estas proteínas localizada en la zona meristemática, y epidermis y haces vasculares de los cotiledones. Sin embargo, la intensidad de esta respuesta es relativamente menor si se le compara con la reacción a las 37 horas de edad.



3 h

37 h

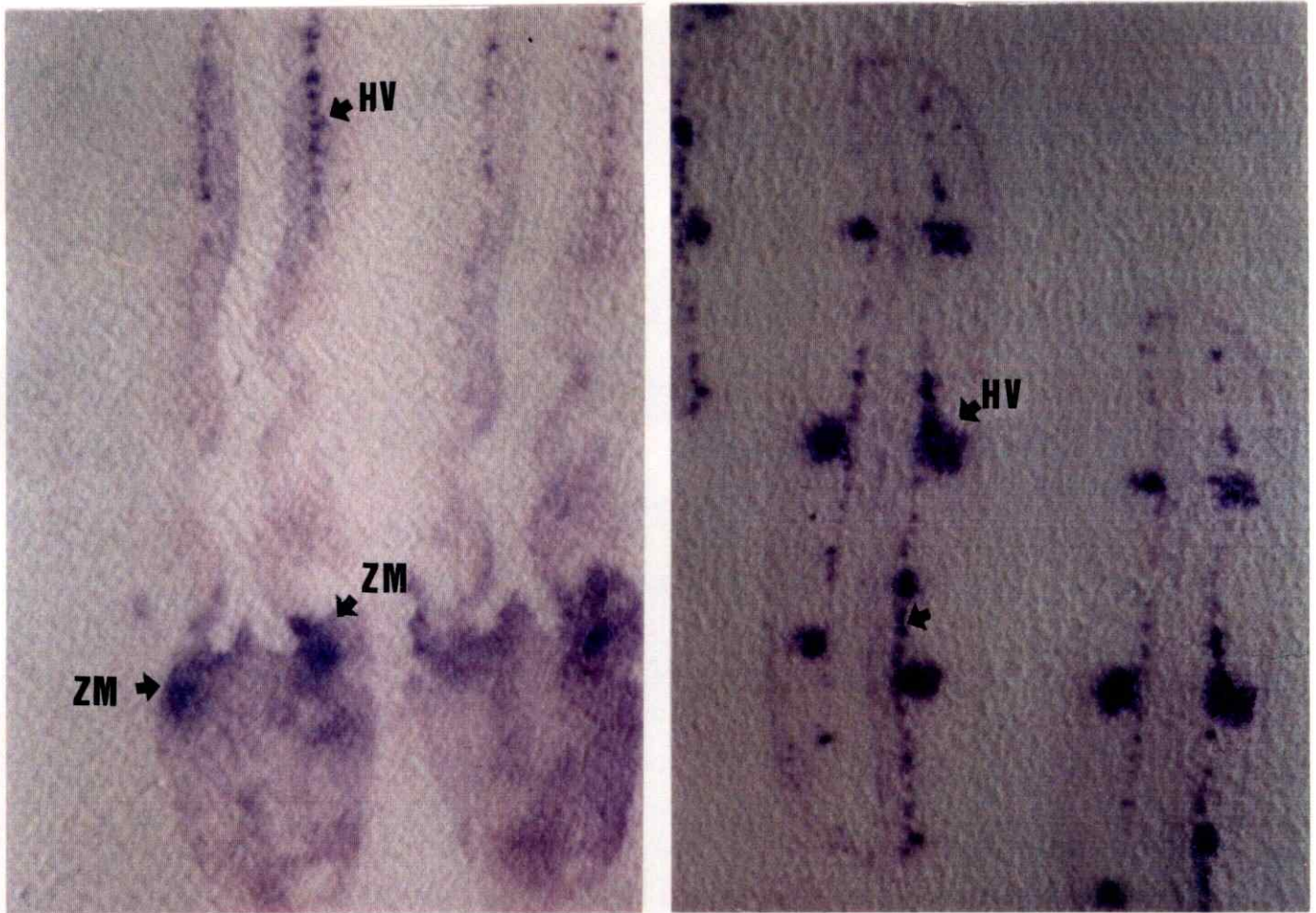


20X

**Figura 19 a : Expresión de proteínas de pared celular en cortes longitudinales, de semillas de 3 horas de edad (post embección) y cotiledones de 37 horas de edad impresos sobre membrana PVDF y observados con lupa estereoscópica. La inmunolocalización fue realizada empleando como primer anticuerpo, el policlonal antiextensina de testa de poroto de soya (dilución 1:10.000) y un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1: 20.000). Las zonas marcadas corresponden a : E= Epidermis de cotiledones, HV= Haces Vasculares de cotiledones.**

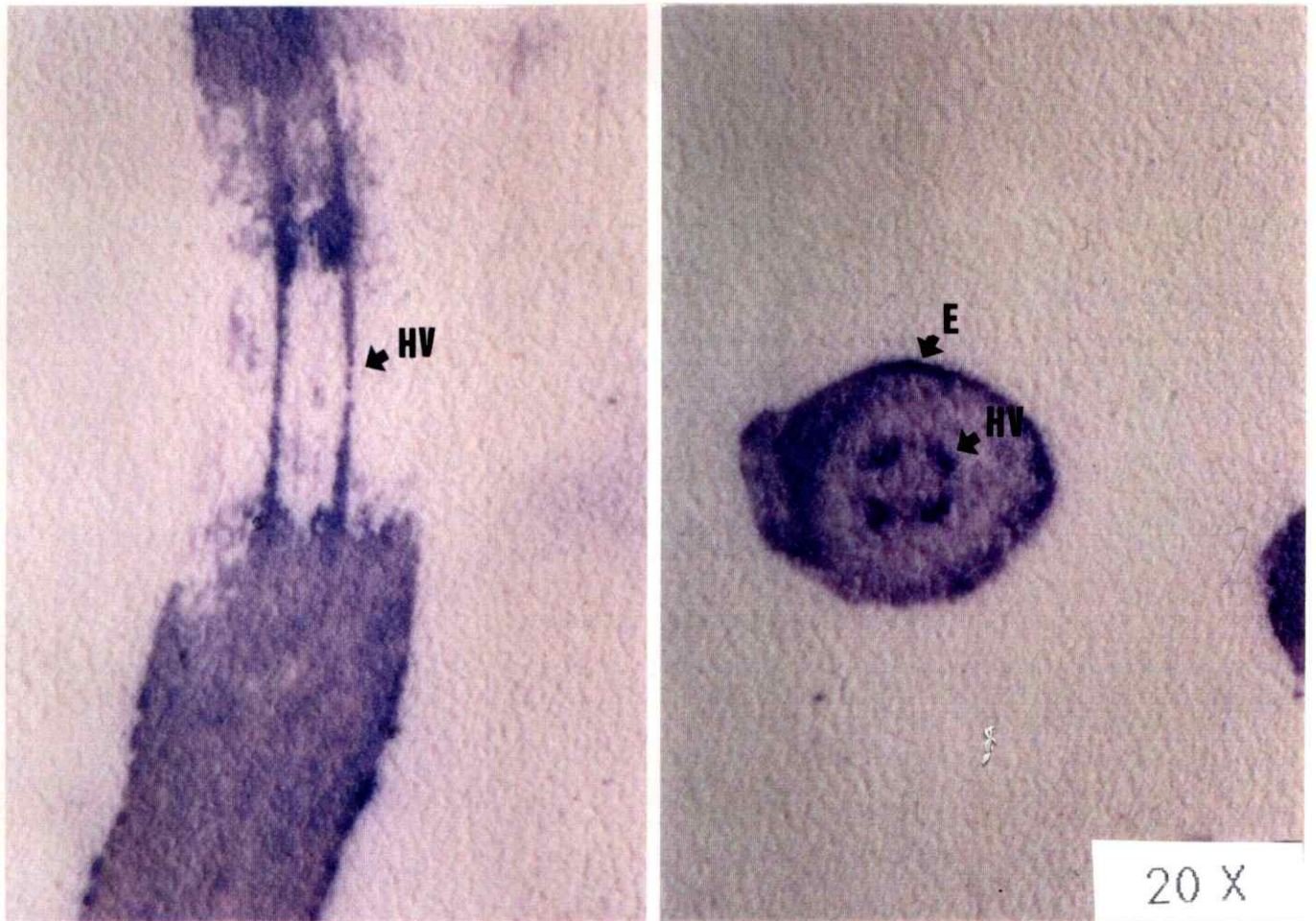
3 h

37 h



20X

**Figura 19 b : Expresión de proteínas de pared celular en cortes longitudinales, de semillas de 3 horas de edad (post embección) y cotiledones de 37 horas de edad impresos sobre membrana PVDF. La inmunolocalización fue realizada empleando como primer anticuerpo, el policlonal antiextensina de testa de poroto de soya (dilución 1:10.000) y un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1: 20.000). Las zonas marcadas corresponden a : HV= Haces Vasculares de cotiledones, ZM= Zona meristemática.**



**Figura 19 c : Expresión de proteínas de pared celular en cortes longitudinales y transversales de radículas de 37 horas de edad impresos sobre membrana PVDF. La inmunolocalización fue realizada empleando como primer anticuerpo, el policlonal antiextensina de testa de poroto de soya (dilución 1:10.000) y un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1: 20.000). Las zonas marcadas corresponden a : E= Epidermis de cotiledones, HV= Haces Vasculares de cotiledones.**

### **3.2.3.- Expresión en respuesta a las heridas.**

Las heridas inducen la expresión de proteínas en la zona de daño (Fig. 18). La respuesta está caracterizada por una intensificación de la reacción inmune en la zona del corte. Zonas no dañadas vecinas no presentan expresión.

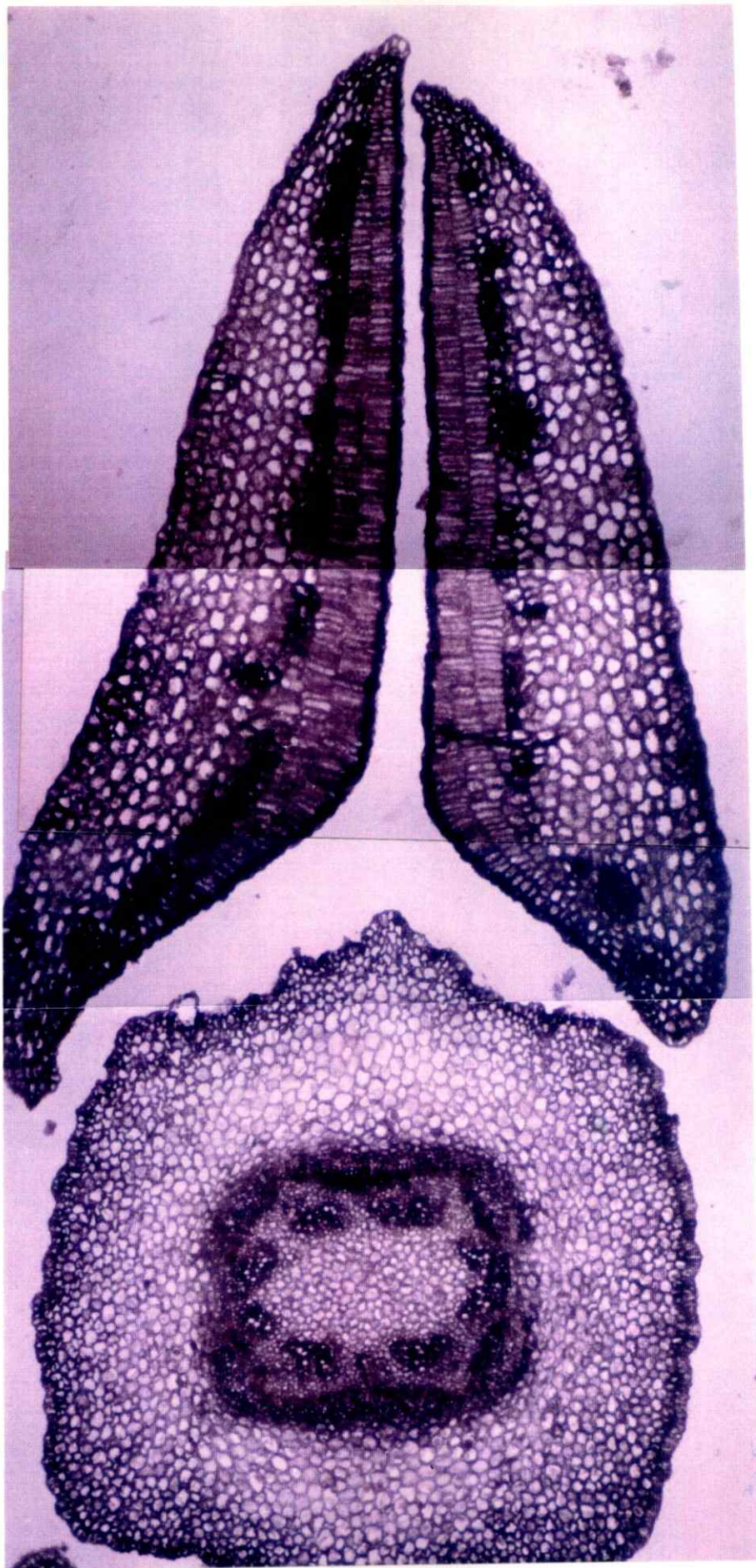
### **3.3.- Expresión tejido específica de las proteínas de pared vista por inmunocitoquímica.**

#### **3.3.1.- Expresión durante el desarrollo.**

De la Inmunocitoquímica (Fig. 20) se desprenden evidencias que corroboran el patrón de expresión tejido-específico sugerido por las inmunopresiones : Los haces vasculares (xilema, floema y cambium vascular) y epidermis, son las zonas más inmunoreactivas (Fig. 21a y 21b). Los cortes observados al microscopio, muestran que la expresión de estas proteínas es constitutiva y que están localizadas mayoritariamente en las paredes celulares.

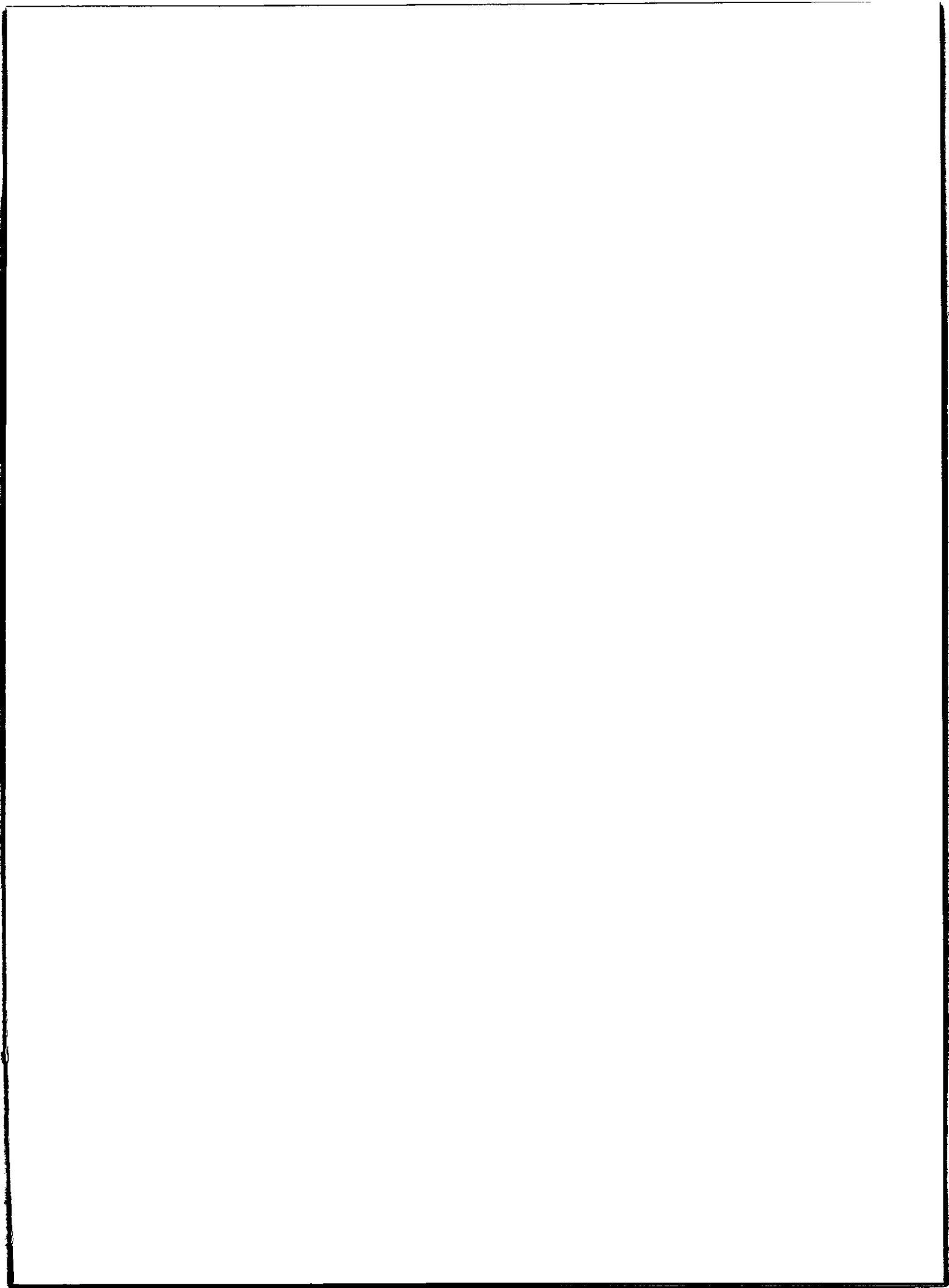
#### **3.3.2.- Expresión en respuesta a las heridas.**

De las observaciones de tejidos heridos (Fig. 22a y 22b) se deduce que existe una inducción de proteínas de pared en respuesta al daño. Esta puede describirse como un "halo de inducción" en paredes y citoplasmas de células vivas que rodean a un grupo de células muertas (Fig. 22b, y Fig. 23). Es importante destacar que la inducción de proteínas de pared en respuesta a las heridas, es menor o igual que la que se presenta en haces vasculares durante el desarrollo normal.

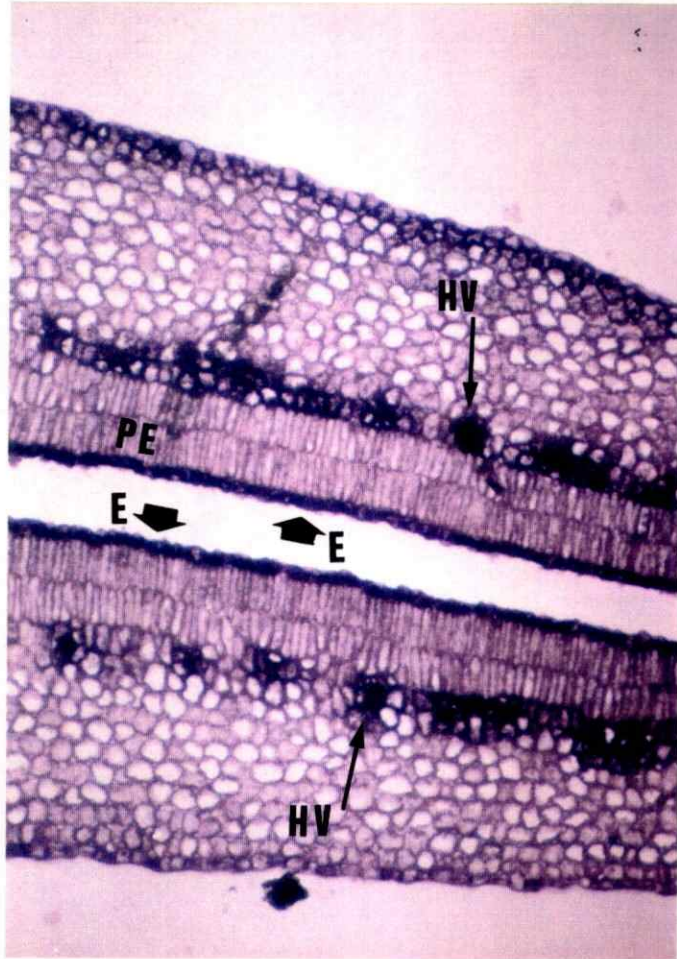


**Figura 20 : Ver leyenda en hoja siguiente.**

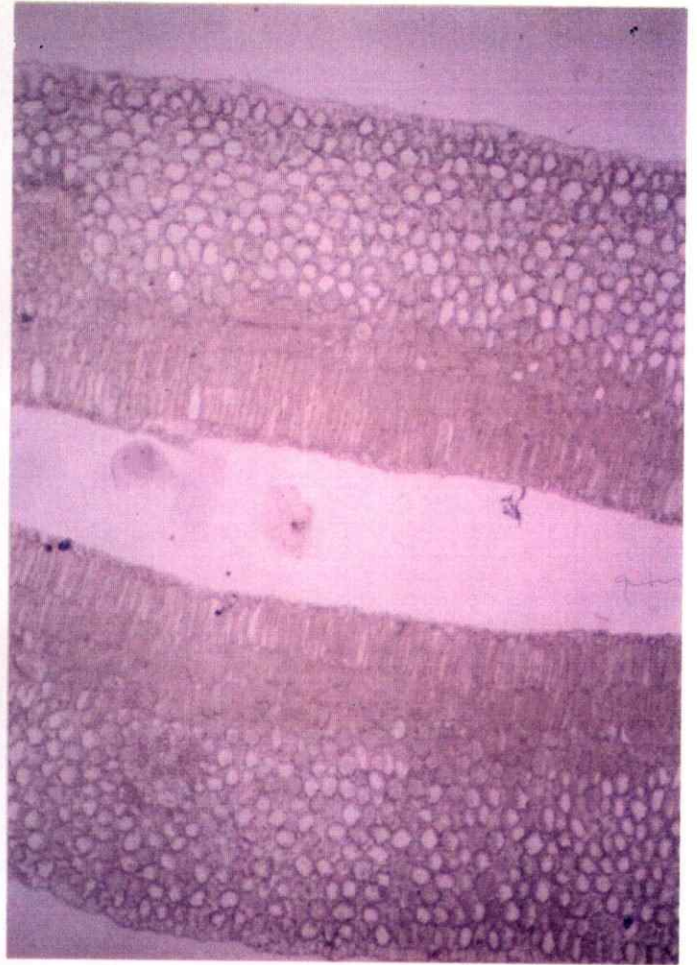
**Figura 20 : Inmunocitoquímica de la expresión de proteínas de pared celular de plántulas de *Prosopis chilensis* de 96 horas de edad reveladas con anticuerpo antiextensina y observadas al microscopio óptico. Se presenta una panorámica general de un corte transversal de cotiledón e hipocótilo. Las zonas más teñidas corresponden a los haces vasculares y epidermis. La inmunolocalización fue realizada empleando como primer anticuerpo, el policlonal antiextensina de testa de poroto de soya ( dilución 1:10.000) y un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1: 20.000).**



A



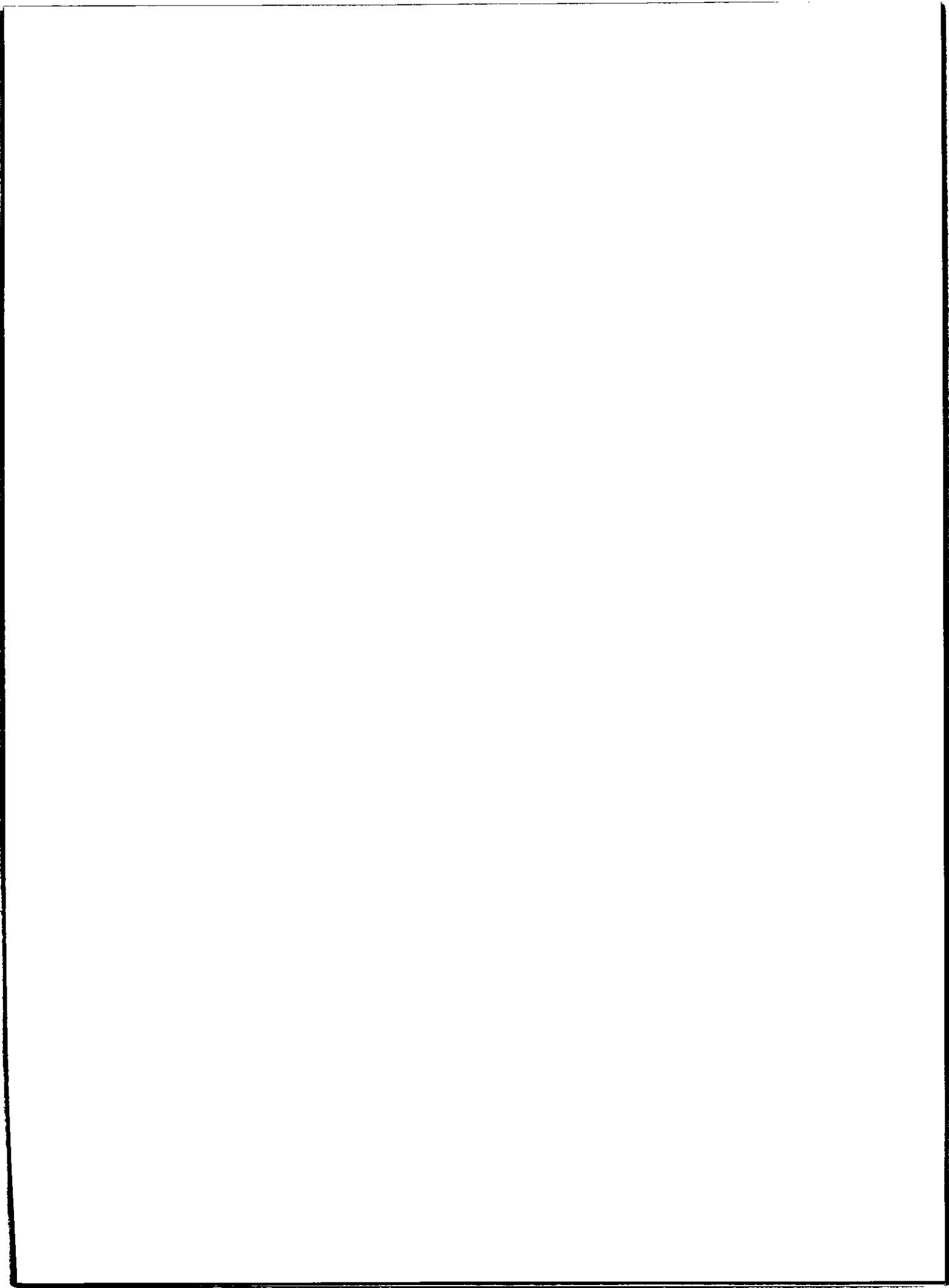
B

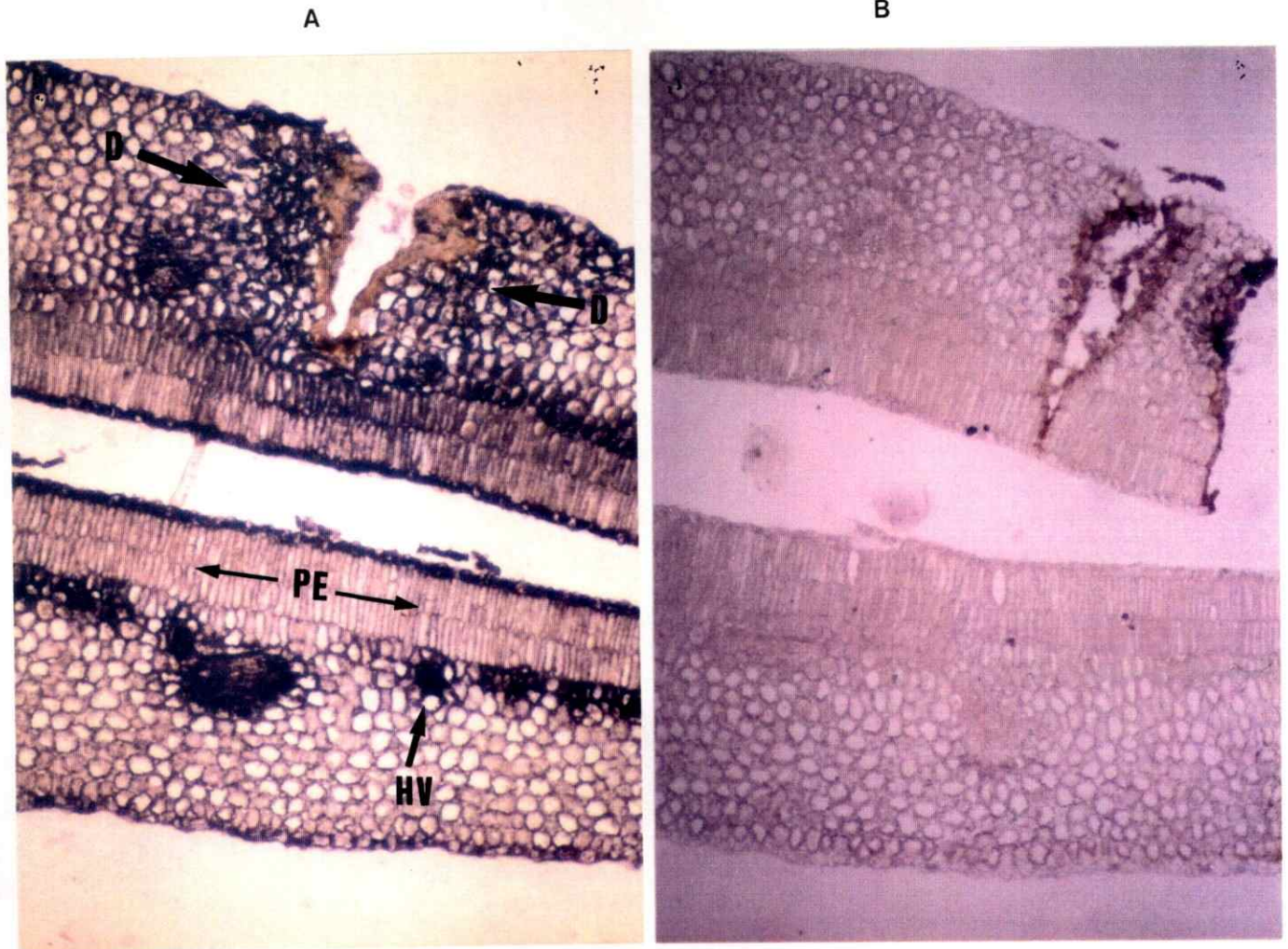


82X

**Figura 21 b : Inmunocitoquímica de la expresión de proteínas de pared celular en cortes transversales de cotiledón de plántulas de *Prosopis chilensis* de 96 horas de edad, reveladas con anticuerpo antiextensina, y observadas al microscopio óptico. A) Suero inmune, B) Suero preinmune. Las flechas señalan las siguientes zonas: E= Epidermis; HV= Haz vascular ; PE= Parénquima en empalizada.**







82X

**Figura 22 b : Inmunocitoquímica de la expresión de proteínas de pared celular en corte transversal de cotiledones de plántulas de *Prosopis chilensis* de 48 horas de edad, en respuesta al estrés producido por heridas, revelados con : A) Suero inmune, B) Suero preinmune. Las flechas indican las siguientes zonas: D= daño; E= Epidermis; HV= Haz vascular; PE= Parénquima en empalizada.**



206X

**Figura 23 : Inmunocitoquímica detallada de una zona de inducción de proteínas de pared celular de *Prosopis chilensis* en respuesta a las heridas ( D= Inducción ).**

Por otro lado, las radículas de plantas dañadas de 24 horas de edad, 60 horas post-daño, producen raíces secundarias (Figs. 24a y 24b) en las zonas adyacentes a las heridas. En las zonas de diferenciación de raíces secundarias, existe inmunoreacción positiva con el anticuerpo policlonal antiextensina de testa de poroto de soya (Fig. 25). Se presenta una intensa expresión en la zona que presiona la nueva raíz en su salida hacia el exterior (Fig. 25-1). La raíz secundaria diferenciada inmunoreacciona preferencialmente en su base (Fig. 25-3).

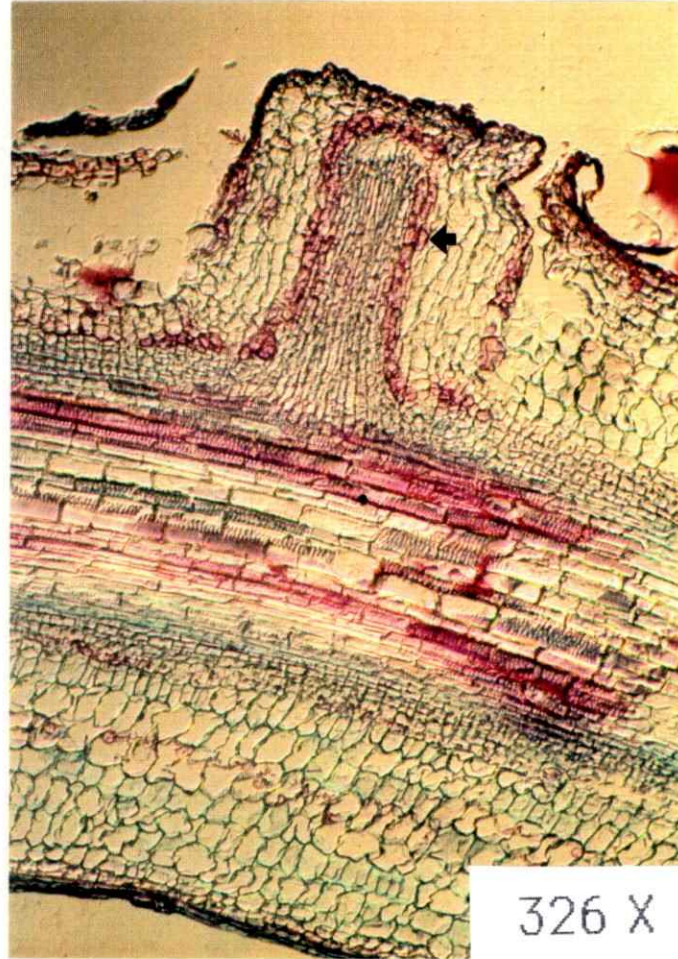
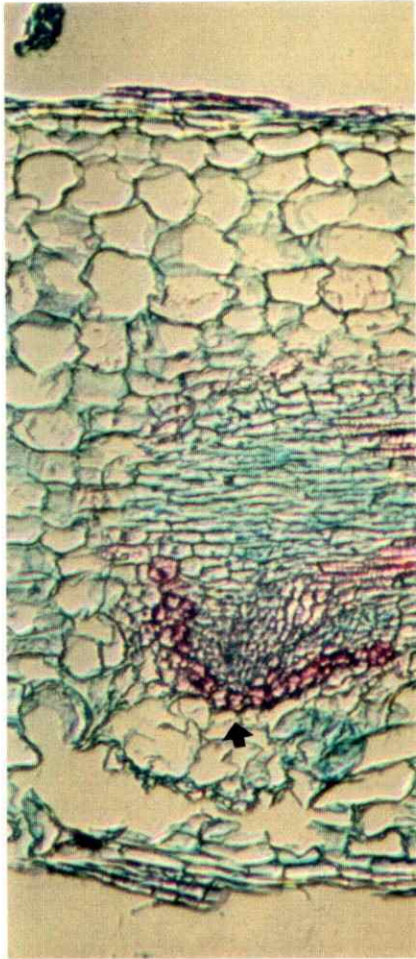
### 3.4.- Caracterización de las proteínas de pared celular.

#### 3.4.1.- Estimación de la actividad peroxidasa.

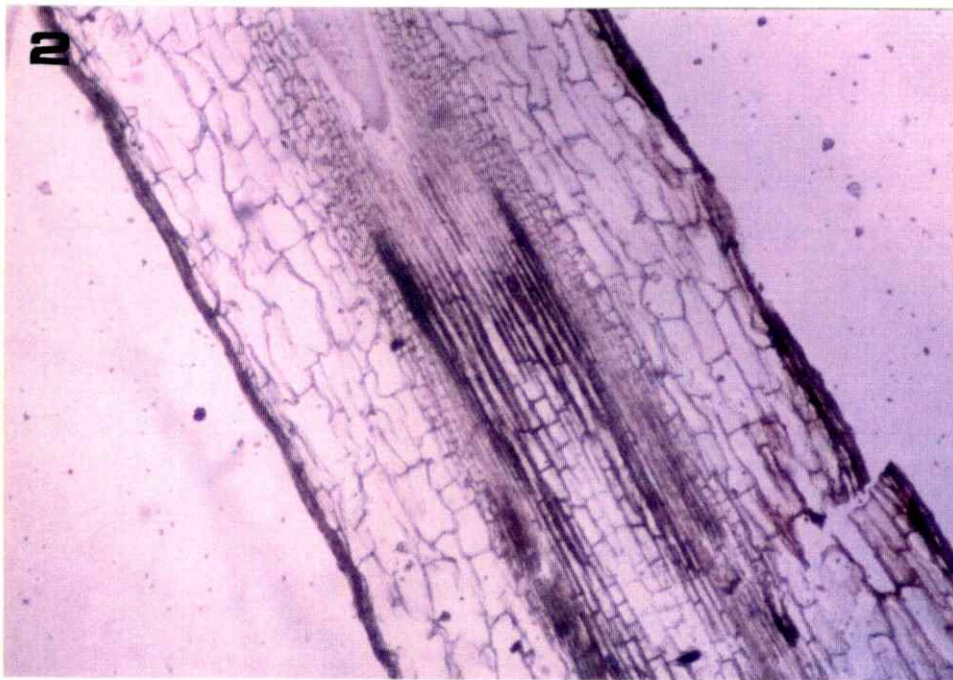
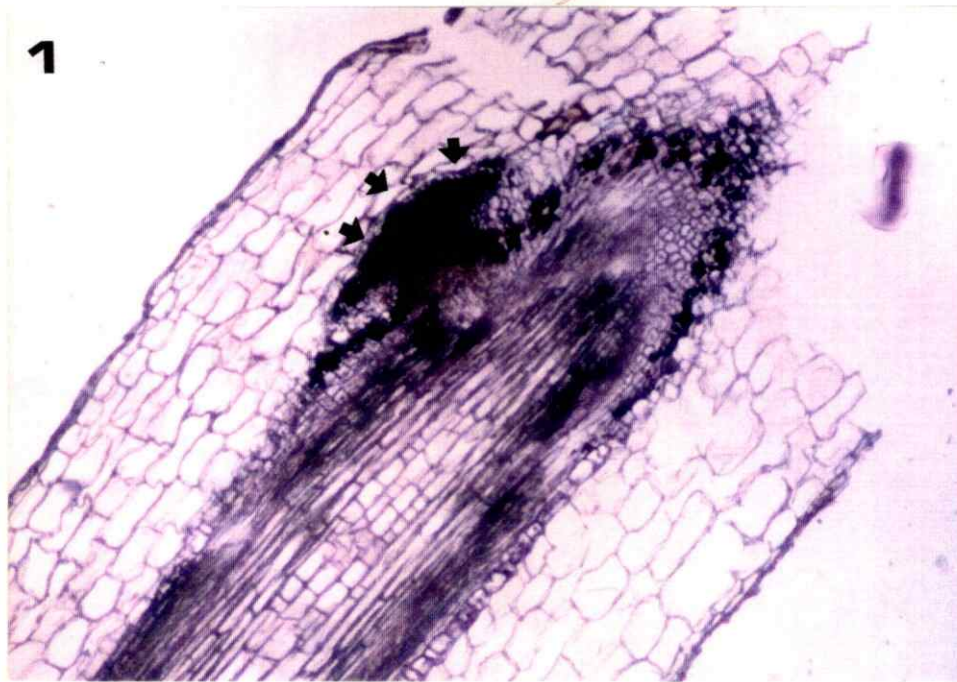
Las proteínas de pared celular de cotiledones de Prosopis chilensis (masas moleculares : 180 KD, 126 KD, 107 KD y 63 KD) no presentan actividad peroxidasa, lo que fue determinado directamente por tinción de actividad en geles catiónicos en presencia de peróxido de hidrógeno y orto-fenilendiamina. Sin embargo, existen otras proteínas de baja masa molecular presentes en los geles, que poseen actividad peroxidasa. Esta actividad, medida como actividad total, fue cuantificada por análisis dot blot y densitometría. Los resultados muestran una alta actividad peroxidasa en cotiledones de 48 horas de edad, 24 horas después del daño. Esto coincide con la desaparición de las proteínas tipo extensina extraíble, a esa edad, como se observa en el carril



**Figura 24 a : Diferenciación de raíces secundarias en plántulas de 24 horas de edad, 60 horas post-daño.**

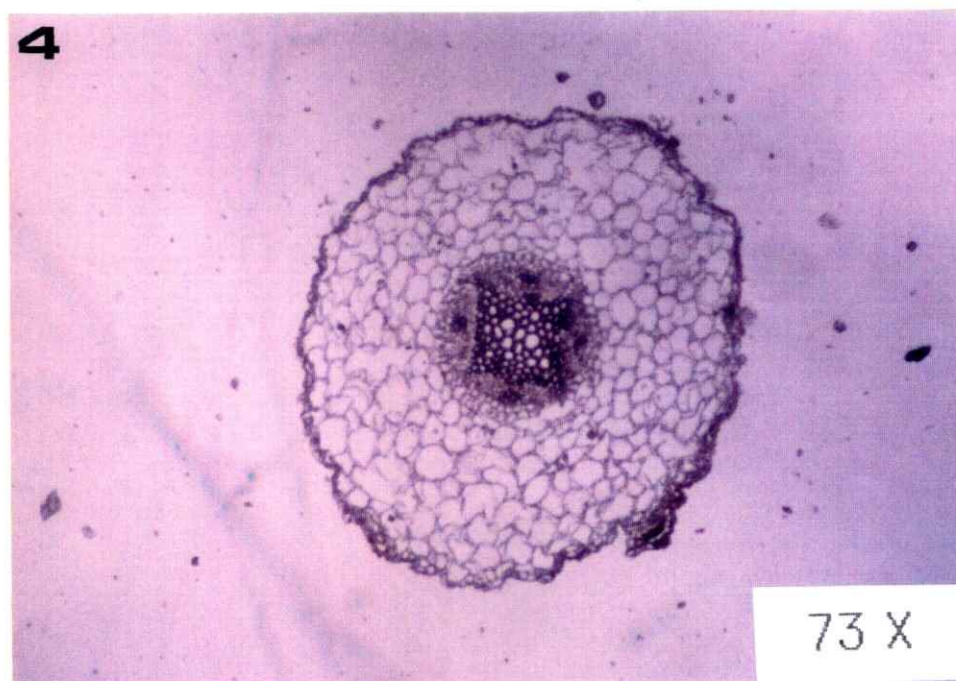
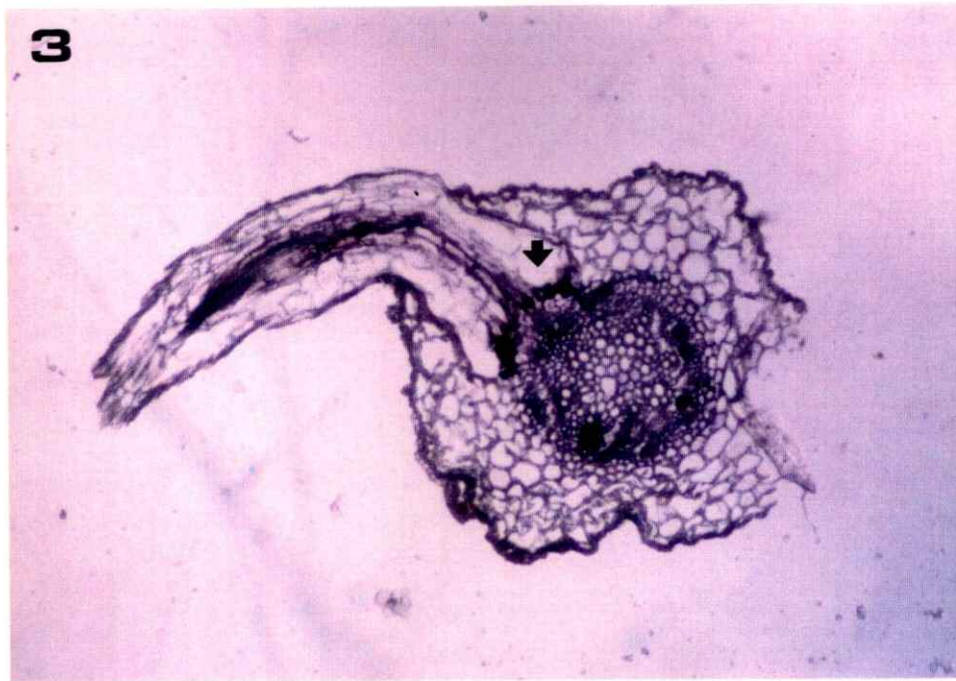


**Figura 24 b : Diferenciación de raíces secundarias observadas en cortes longitudinales de radículas dañadas de 84 horas de edad incluidas en parafina , teñidas con Safranina Fast- green y observadas al microscopio óptico.**



73X

**Figura 25 : Inmunocitoquímica de la expresión de proteínas de pared celular en la zona de emisión de raíces secundarias inducidas por heridas. 1) Revelado con anticuerpo antiextensina. 2) Suero preinmune. Las flechas señalan en (1) la inducción de proteínas de pared en respuesta a la diferenciación de la raíz secundaria.**



**Figura 25 : Inmunocitoquímica de la expresión de proteínas de pared celular en la zona de emisión de raíces secundarias inducidas por heridas. 3) Revelado con anticuerpo antiextensina.4) Suero preimmune. La flecha en (3) indica zona basal de tinción preferencial.**



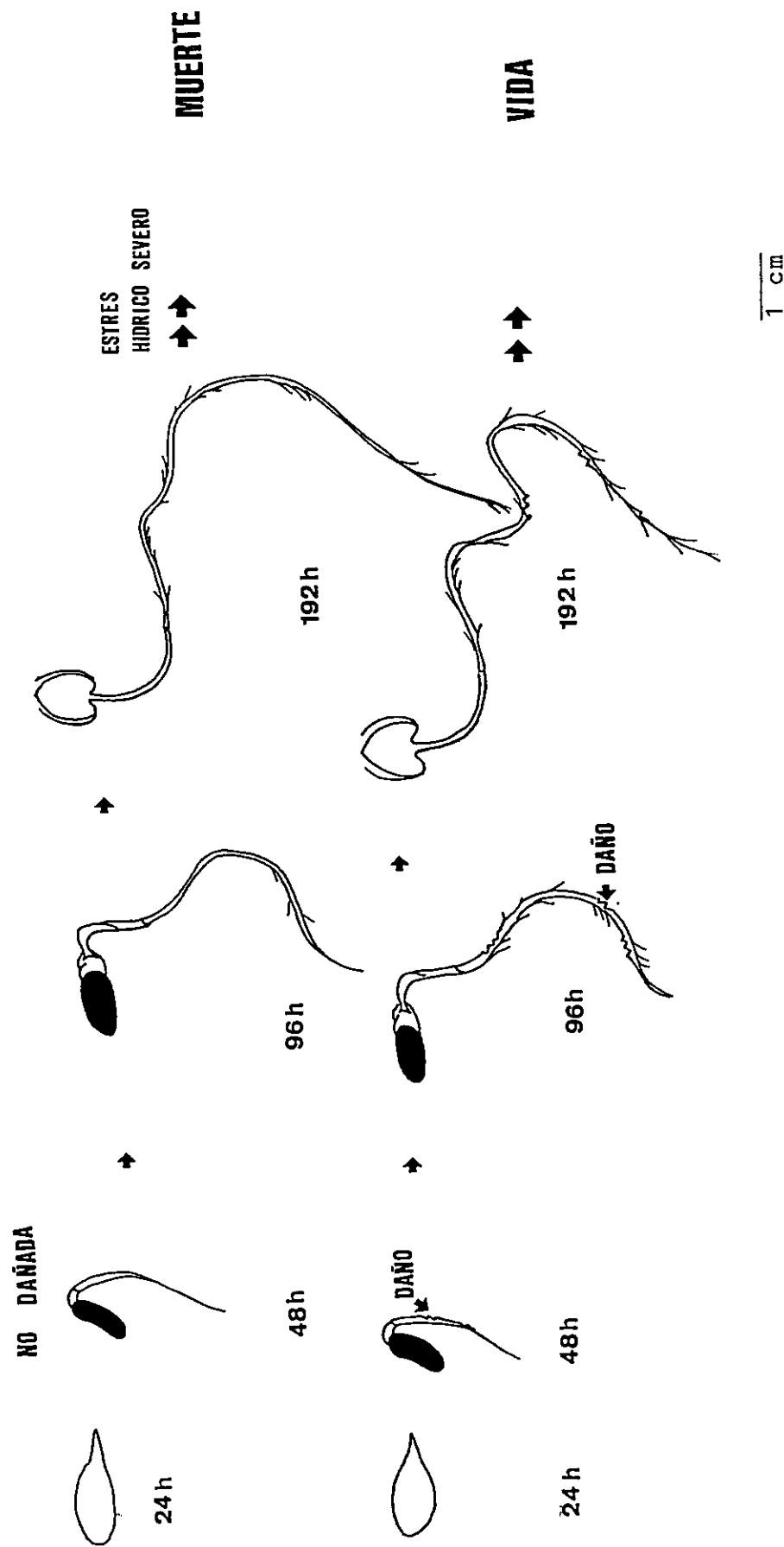


Figura 26 : Esquema de una cinética de aparición de raíces secundarias en plántulas dañadas y no dañadas ( Escala natural). De izquierda a derecha se señalan las edades y fenotipos. El daño fue producido en plántulas de 48 horas de edad. Se señalan las zonas de daño y la aparición de raíces secundarias en el sentido opuesto a la herida y el efecto de un estrés hídrico severo en los dos grupos de plántulas .

7, Fig.11. Comparada con una cantidad equivalente del estándar de peroxidasa de rabanillo la actividad peroxidasa detectada es unas 10 veces menor.

#### 3.4.2.- Determinación de la glicosilación.

Las proteínas de pared celular estudiadas en P.chilensis, son teñidas positivamente con dansilhidrazina, lo que sugiere que están glicosiladas.

#### 3.4.3.- Composición de aminoácidos.

La determinación de la composición de aminoácidos de las proteínas de pared celular estudiadas, revela que al parecer existen dos grupos de proteínas en los extractos de pared de cotiledones de P. chilensis (Tabla I):

- A) Un primer grupo de proteínas de 180 KD, 126 KD y 107 KD, ricas en ácido glutámico/glutamina, ácido aspártico/asparagina y en menor proporción por arginina, leucina, prolina y glicina.
- B) Un segundo grupo representado por la proteína de 63 KD, rica en glutámico/glutamina, prolina, lisina, valina, ácido aspártico/ asparagina, y tirosina.

La estimación del número de residuos aminoacídicos por molécula, revela las mismas tendencias que el análisis porcentual (Tabla I).

Las proporciones de aminoácidos analizadas por la relación de Cornish Bowden (1983), no fueron válidas puesto que las proteínas comparadas poseen distinta masa molecular.

En estas condiciones no es posible hacer una evaluación estadística confiable de las diferencias entre las proteínas. Sin embargo, se estimaron índices que pueden indicar tendencias generales en las similitudes de estas proteínas. Para ello se empleó la siguiente fórmula, de la cual derivan los datos de la tabla II:

$S Q = 10^4 * \sum (n_{iA}/N_A - n_{iB}/N_B)^2$ , donde:

S Q = sumatoria de las diferencias porcentuales del i-ésimo aminoácido en la proteína A y la B.

$N_A$  = Porcentaje total de aminoácidos en A (100 %)

$N_B$  = Porcentaje total de aminoácidos en B (100%)

$n_{iA}$  = Porcentaje del i-ésimo aminoácido en la proteína A.

$n_{iB}$  = Porcentaje del i-ésimo aminoácido en la proteína B.

En la tabla II se muestra que la proteína de 63 KD es la que presenta mayores S Q, cuando se le compara con la de 180 KD, 126 KD y 107 KD. En las otras comparaciones los valores de S Q son relativamente menores.

#### 3.4.4.- Secuencia amino-terminal.

Las secuencias amino-terminales determinadas (Tabla III), señalan igual que el análisis de aminoácidos, dos grupos de proteínas. El primer grupo está formado por la proteína de 180 KD, la de 126 KD y la de 107 KD. Debido a la igualdad en los residuos de aminoácidos de las secuencias, la proteína de 107 KD parece ser la misma que la de 126 KD.

Tabla I: Composición de aminoácidos de proteínas de pared celular de cotiledones de plántulas de Prosopis chilensis.

AMINOACIDO	PROTEINAS			
	180 kD	126 kD	107 kD	63 kD
Hyp	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pro	6.7 (104.7)	7.8 (85.5)	8.2 (75.5)	14.7 (80.1)
Asx	11.5 (179.7)	11.7 (129.4)	10.5 (97.2)	8.9 (46.8)
Thr	2.3 (35.5)	2.9 (31.6)	2.9 (26.3)	3.1 (17.0)
Ser	6.8 (107.1)	7.1 (78.5)	6.9 (63.2)	3.5 (18.9)
Glx	23.8 (376.6)	21.3 (235.4)	18.6 (171.4)	18.7 (101.9)
Gly	6.2 (97.6)	5.7 (62.6)	4.8 (44.3)	3.3 (18.1)
Ala	5.0 (78.9)	5.4 (59.6)	4.6 (42.7)	3.8 (20.4)
Val	4.7 (73.6)	5.5 (60.9)	6.4 (58.9)	12.3 (67.0)
Cys	0.8 (12.8)	0.7 (8.1)	0.1 (1.2)	0.2 (1.3)
Met	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	2.0 (18.5)	0.0 (0.0)
Ile	4.4 (78.2)	3.5 (38.4)	3.0 (27.3)	1.8 (9.7)
Leu	7.4 (116.1)	6.4 (70.4)	5.1 (46.6)	2.5 (13.8)
Tyr	2.6 (40.6)	3.4 (38.0)	5.7 (52.3)	8.5 (46.2)
Phe	2.8 (44.5)	2.6 (28.3)	2.0 (18.4)	1.3 (7.3)
His	0.9 (14.2)	2.4 (26.8)	4.6 (42.1)	2.1 (11.2)
Lys	4.8 (75.6)	6.2 (68.03)	8.5 (78.5)	13.5 (73.6)
Arg	9.3 (146.1)	7.4 (81.9)	6.2 (57.2)	2.2 (12.1)
Trp	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Nota Datos expresados en mol % y Nro. de residuos experimentales por mol ( Paréntesis ). Los residuos mayoritarios están subrayados. Algunos no pudieron ser estimados (n.d.).

Tabla II. Comparación de la proporción de aminoácidos de las proteínas de pared celular de cotiledones de *Prosopis chilensis* (180 KD, 126 KD, 107 KD, 63 KD). Los valores corresponden a los SΔQ estimados por el método de Cornish Bowden, 1983.

Proteínas según masas moleculares (KD)				
	180	126	107	63
180 KD	0			
126 KD	9.3	0		
107 KD	94.7	34.7	0	
63 KD	371.6	256.2	161.9	0

Nota: La diferencia mínima es 126 KD vs 180 KD, la diferencia máxima es 63 KD vs 180 KD.

**Tabla III: Secuencias amino terminales de proteínas de pared celular de cotiledones de plántulas de *Prosopis chilensis*. Las bandas estudiadas ( 1,2,3 y 4) se muestran en un gel catiónico ( derecha ).**

BANDA 1 180 KD -- X X G N E A L Q E I M X Q I G

BANDA 2 126 KD -- X X Q X Q A L K X I M X X E G G S L (L) X

BANDA 3 107 KD-- X X Q I Q A L K X I M R R X G

BANDA 4 63 KD-- N Y Y Q P ( HYPRO ) T Y K P P E K P X

Nota : E= Acido glutámico, H= Histidina, I = Isoleucina, K = Lisina, P= Prolina, Q= Glutamina , S= Serina , T= Treonina V= Valina, Y = Tirosina .

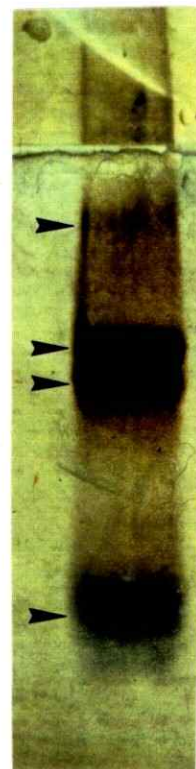


Tabla IV : a) Alineamiento de la secuencia amino terminal de una proteína de pared celular de cotiledones de *Prosopis chilensis* (63 KD), con secuencias amino terminales de proteínas ricas en prolina de otras dicotiledoneas. Los recuadros indican los aminoácidos compartidos por las secuencias. El inicio de la transcripción en la proteína madura se indica con números (margen izquierdo).

1	NYYQPPTYKPP-EKP	63Kd <i>Prosopis chilensis</i>
1	NYENPPVYKPPTTEKP	PRP2 <i>Glycine max</i>
1	DYEKPP IYKPPVYTP	PRP1 <i>Glycine max</i>
-1	TYYK-P I K K P P V Y K P	PRP3 <i>Glycine max</i>
7	FYEPPP I E K P P T Y E P	NO75 <i>Glycine max</i>
	F H S H P P I H K P P V Y T P	PR33 <i>Daucus carota</i>
1	QYHLNPVYEPPVNGP	NO12 <i>Pisum sativum</i>

b) Matriz de distancia para las secuencias alineadas. La tabla indica en cada comparación el número de aminoácidos no compartidos.

	63kD	PRP2	PRP1	PRP3	NO75	PR33	NO12
63kD	0						
PRP2	4	0					
PRP1	7	6	0				
PRP3	7	8	5	0			
NO75	8	6	5	7	0		
PR33	9	9	5	7	6	0	
NO12	9	8	8	9	10	10	0

Ninguna de estas proteínas tiene homología con las proteínas vegetales, cuyas secuencias están almacenadas en el banco de EMBL.

Por otro lado está la proteína de 63 KD. La secuencia amino-terminal de esta proteína es claramente distinta, y posee prolina e hidroxiprolina. Una comparación de esta secuencia (Tabla IV), empleando un análisis de alineamiento FASTA, con todo el banco de secuencias del EMBL, reveló que esta proteína posee una alta homología en su extremo amino-terminal con las respectivas secuencias amino-terminales de proteínas de pared celular ricas en prolina de otras dicotiledóneas. Los extremos amino-terminales de las proteínas ricas en prolina de soya (Glycine max) resultan los más homólogos y conservados, siendo menos conservados en Daucus carota y Pisum sativum. Una matriz de distancias revela que el extremo amino-terminal más semejante, basándose en el número de aminoácidos compartidos, es el de una proteína rica en prolina de soya codificada por un clon genómico (PRP 1).



## DISCUSION

### Reconocimiento inmunológico de las proteínas de pared celular de Prosopis chilensis.

En el presente trabajo se ha estudiado la expresión (acumulación) de proteínas de pared celular en respuesta al estrés producido por heridas en tejidos de plántulas de Prosopis chilensis. Para tal fin, se empleó un anticuerpo policlonal antiextensina de testa de poroto de soya (Cassab y Varner, 1987). Se ha demostrado que este anticuerpo reacciona en forma cruzada con las proteínas de pared celular de P.chilensis. Inicialmente sólo fueron reconocidas proteínas de cotiledones dañados, mientras que los extractos de proteínas de tejidos no dañados presentaban una sola proteína muy antigénica y por lo tanto de inmunoreactividad totalmente inespecífica. Esta proteína de inmunoreactividad inespecífica no volvió a aparecer en posteriores análisis. Por otro lado, la reacción detectada podría no ser antigénica y deberse a una actividad fosfatasa presente en la proteína misma. En estudios posteriores, se ha visto que algunos extractos de proteínas de P. chilensis poseen una aparente inmunoreactividad basal que debió restársele al tratamiento inmune cuando se quiso cuantificar la expresión por análisis dot blot.

El uso de anticuerpos policlonales en contra de fracciones de pared celular de plantas superiores (Huber y Nevins, 1981) y el de un péptido sintético relacionado a extensina (Smith, 1981), así como el uso de anticuerpos monoclonales en contra de la glicoproteína rica en hidroxiprolina de pared celular de Chlamydomonas (Smith y col., 1984), han demostrado la importancia del enfoque inmunológico para estudiar la estructura de las paredes celulares. Kieliszewski y Lampert (1986) estudiaron las propiedades y reactividades cruzadas de anticuerpos policlonales obtenidos en conejo contra dos precursores muy glicosilados de extensina de tomate (P1 y P2) y sus respectivos polipéptidos desglicosilados con ácido fluorhídrico (dP1 y dP2), señalando que existen tres tipos de determinantes antigénicos o epítopes en estas glicoproteínas: 1) El epítope glicosilado; 2) El epítope no glicosilado de la proteína intacta y 3) Los epítopes expuestos solamente después de la desglicosilación. Por otro lado, anticuerpos policlonales en contra de la extensina-1 glicosilada de zanahoria fueron capaces de reconocer de manera específica a este antígeno, siendo minoritaria la reacción cruzada con una segunda extensina presente en zanahoria (extensina-2). Los mismos anticuerpos policlonales reconocieron levemente a proteínas de arabinogalactanos y a la lectina de papa. En consistencia con estas evidencias, es esperable que existan

epítopes comunes entre las proteínas de pared celular de Prosopis chilensis y la extensina de testa de poroto de soya, contra la cual fue derivado el anticuerpo policlonal empleado en el presente trabajo de investigación. Es muy probable que los epítopes glicosilados sean importantes en el reconocimiento realizado con anticuerpos policlonales antiextensina (Stafstrom y Staehelin, 1988), y esto pueda explicar que el anticuerpo antiextensina de testa de poroto de soya sea capaz de reconocer más de una glicoproteína de pared en Prosopis chilensis y, también, peroxidasas de pared celular que están glicosiladas, como las de Araucaria araucana, una conífera nativa de Chile (Alejandro Riquelme, comunicación personal).

En el caso de la extensina de tomate, al parecer los azúcares por si mismos no explican la antigenicidad, ya que se trata más bien de una interacción entre azúcares y aminoácidos (arabino-oligosacáridos de hidroxiprolina) que son reconocidos en una determinada conformación, no sólo en la extensina, sino en otras glicoproteínas con epítopes glicosilados comunes (Proteínas de arabinogalactanos y lectina de papa). (Kieliszewski y Lamport, 1986). Probablemente, el anticuerpo policlonal antiextensina de testa de poroto de soya reconoce más de un epítope azúcar-aminoácido en las proteínas de pared de P. chilensis. Esto ha sido revelado por análisis dot blot y densitometría de los

extractos de pared celular de P. chilensis, comparados con cantidades equivalentes de proteína de una extensina estándar de zanahoria. Estos análisis muestran que la reacción inmune de los extractos utilizados es aproximadamente el doble que la presentada por la extensina purificada de zanahoria, lo que podría estar indicando la presencia de más epítopes reconocidos por el anticuerpo en proteínas de pared de P. chilensis. Esto es consistente con la mayor cercanía filogenética que existe entre soya y algarrobo. De cualquier modo la reactividad cruzada requiere una mayor atención en futuros estudios. Una posibilidad es purificar los anticuerpos que se tienen, empleando una cromatografía de inmunoafinidad en una columna donde se encuentre el antígeno. La otra es producir anticuerpos contra las proteínas de pared de Prosopis chilensis estudiadas en este trabajo.

**Expresión de proteínas de pared durante el desarrollo normal.**

Los análisis electroforéticos (SDS-PAGE y catiónicos) y de Western blot representados en las figuras 9 y 10, han demostrado que existen al menos 4 proteínas de pared celular en cotiledones de Prosopis chilensis cuya expresión (acumulación) está regulada por el desarrollo de las plántulas. Estas proteínas poseen masas moleculares aproximadas de 180 KD, 126 KD, 107 KD y 63 KD, que están en el rango de las masas reportadas para glicoproteínas ricas en

hidroxiprolina (Seegers y LaRue, 1985).

La expresión de proteínas de pared cambia durante el desarrollo. Tales variaciones en la cinética de expresión (acumulación) sugieren un balance entre procesos de síntesis y degradación que estaría regulado de acuerdo a las demandas metabólicas en cada etapa del desarrollo. La expresión temprana de proteínas de pared a las 1,5 horas podría ser el resultado de una acumulación de proteína soluble, producida por una síntesis activa, inmediatamente después que el metabolismo es reactivado en la semilla, durante la germinación. La disminución observada a las 48 horas puede interpretarse como el resultado de una incorporación rápida de la proteína soluble a la fracción insoluble de la pared celular en un período comprendido entre las 24 y 48 horas, cuando se produce una elongación sustancial de la radícula y del hipocótilo de plántulas de Prosopis chilensis. Después de las 48 horas, la proteína soluble estaría sintetizándose y acumulándose nuevamente, presumiblemente por una disminución de la tasa de elongación. Podría esperarse que esto constituya una compleja cinética de pulsos que se mantenga oscilando durante toda la vida de la planta.

Las evidencias presentadas coinciden parcialmente con lo señalado por Sadava y col., (1973) y Klis (1976) en epicótilos de Pisum sativum cultivados en oscuridad, al referirse a una acumulación de las glicoproteínas ricas en

hidroxiprolina durante y un corto tiempo después de la elongación. Van Holst y col.,(1980), han reportado para hipocótilos de Phaseolus vulgaris, que las proteínas totales de pared disminuyen durante la elongación, en más de un 50 %, pero que específicamente las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina se acumulan, lo que coincide con un incremento en el grado de arabinosilación de la hidroxiprolina. Los mismos autores señalan que la proporción de todos los aminoácidos que componen las proteínas de pared celular cambia durante el desarrollo; incrementándose particularmente, la hidroxiprolina, la serina, la lisina y la histidina.

Otros estudios, donde se contempla la relación entre desarrollo y expresión de proteínas de pared, han sido realizados utilizando el enfoque de la biología molecular. Hong y Key (1987), han estudiado un clon cDNA, el pTU04, que es diferencialmente expresado durante el crecimiento del hipocótilo de soya. Ellos separaron el hipocótilo de soya en tres zonas representativas de los diferentes estados de desarrollo celular: la zona apical, la de elongación y la madura, e hicieron un análisis Northern con los RNA poli (A) de cada tejido, empleando como sonda el clon cDNA. De esta manera se demostró que el patrón de expresión estaba constituido por dos mensajeros homólogos a la sonda, y que estos mensajeros sufrían cambios dramáticos en sus tamaños en

respuesta al desarrollo evaluado desde regiones de crecimiento activo, donde se presenta un mensajero de baja masa, hasta regiones relativamente quiescentes o maduras, donde se presentan varios mensajeros de alta masa. Las secuencias nucleotídicas del cDNA y del gen correspondiente SbPRP1, predicen una proteína rica en prolina. La expresión de este gen es sensible a la auxina, o a los cambios en el crecimiento inducidos por auxina, y esto ha sido claramente demostrado en un experimento donde se trató a la zona madura quiescente con auxina, restaurando la división celular, y produciéndose una activación de los mensajeros de baja masa, característicos de zonas en división.

Los resultados obtenidos por medio de inmunopresiones, indican que las proteínas de pared celular de Prosopis chilensis se expresan constitutivamente y de una manera tejido específica especialmente en epidermis y haces vasculares de cotiledones, hipocótilos y radículas de plántulas cuyas edades oscilan entre 24 y 96 horas. La expresión también depende del estado de desarrollo, lo que resulta muy evidente en las variaciones de intensidad de la respuesta inmune en las distintas edades consideradas en las impresiones. Destaca la inmunoreacción temprana de los haces vasculares y epidermis de cotiledones de semillas, y muy especialmente, la reactividad de los primordios foliares y meristemas de embriones de estas semillas (3 horas post-

imbibición), comparada con tejidos de plántulas de 37 horas de edad.

Estos resultados confirman la amplia documentación que existe en la literatura. Cassab y Varner (1987), han demostrado que la extensina en semillas de soya, está fundamentalmente localizada en la testa, y esto coincide con una gran abundancia de haces vasculares. Los haces vasculares poseen células xilemáticas con paredes gruesas donde presumiblemente se acumularía la extensina. Varner y Ye (1991), han señalado, valiéndose de impresiones de tejido sobre membranas, que las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, son abundantemente expresadas en las células del cambium de tallos de soya y también, en las células del parénquima que rodean al xilema primario y en unas pocas capas de células corticales adyacentes al floema primario. Por otro lado, las proteínas ricas en glicina de pared celular están presentes en las células lignificadas: xilema primario, xilema secundario y floema primario. Al parecer son las células maduras las que poseen mayor grado de expresión de estas proteínas. Sin embargo, utilizando el anticuerpo antiextensina de testa de poroto de soya se pudo detectar en Prosopis chilensis inmunoreactividad en los primordios y meristema del embrión, en semillas de 3h post imbibición, lo que nuevamente estaría indicando la presencia de epítopes compartidos entre las proteínas de pared asociadas a haces



vasculares y epidermis, y las asociadas a zonas en división.

La inmunocitoquímica realizada en tejidos de P. chilensis, ha permitido confirmar la asociación de extensina o proteínas tipo extensina a los haces vasculares y la epidermis de cotiledones, hipocótilos y radículas.

**Expresión de proteínas de pared en respuesta al estrés producido por heridas.**

El estudio de la expresión (acumulación) de proteínas de pared celular de Prosopis chilensis en respuesta al estrés producido por heridas es un objetivo fundamental de esta tesis. En la figura 11 A se observa una acumulación de las proteínas estudiadas en respuesta a las heridas. Como puede observarse, todo el patrón de proteínas descrito en la figura 10 se intensifica con respecto a los controles no dañados, alcanzando un máximo a las 12 horas post-daño. Un análisis densitométrico por banda que compara la expresión a las 12 horas post-heridas con el control no dañado de 60 horas, indica que las proteínas de 107 y 126 KD aumentan unas 10 veces en respuesta a las heridas, mientras que la de 180 KD y la de 63 KD, unas 3,7 y 2,5 veces respectivamente. Debe destacarse también en la figura 10 la desaparición de la proteína extraíble a los 30 minutos y 24 horas post-daño. Esto podría asociarse a una insolubilización de la proteína extraíble en la matriz de la pared celular en respuesta a las

heridas. Cambios en la solubilidad de una extensina extraíble de zanahoria han sido estudiados por experimentos de pulso y caza por Cooper y Varner (1983). En estos experimentos discos estériles de zanahoria fueron aireados a 25 °C, por al menos 30 horas, con la finalidad de inducir, por efecto del daño, esta glicoproteína rica en hidroxiprolina de pared celular (Chrispeels y col., 1974). Una vez dado el pulso de prolina marcada, y medida la proteína soluble marcada, se evidenció que lentamente esta proteína se hacía no extraíble en un período de 24 horas. Un derivado de la tirosina, la isoditirosina, se forma en la pared celular durante esta insolubilización y podría servir como un enlace proteína-proteína (Cooper y Varner, 1983; Fry, 1982), aunque esto no ha sido comprobado aún (Showalter y Varner, 1989). Sin embargo existen proteínas de pared celular que no contienen tirosina (Condit y col., 1990) y en las que se cree la insolubilización ocurre via una O-glicosilación de los residuos de serina, o simplemente siendo físicamente atrapada por la matriz de la pared celular.

En el caso de las glicoproteínas tipo extensina es importante destacar que la insolubilización es inhibida por inhibidores de peroxidasas. (Cooper y Varner, 1983).

Como las peroxidasas pueden jugar un papel importante en la insolubilización de las proteínas de pared celular, se pensó que un incremento en la actividad de estas enzimas, podría

explicar la desaparición de las proteínas de pared celular 30 min y 24 horas post-daño, en plántulas de Prosopis chilensis. Esta posibilidad fue evaluada realizando una prueba de peroxidasas en presencia de peróxido de hidrógeno y orto-fenilendiamina, en geles, y en membranas impresas por dot blot. El análisis densitométrico comparado con un estándar de peroxidasa de rabanillo, detectó actividad sólo a las 24 horas post-daño. Esta actividad es unas 10 veces menor que el control de peroxidasa de rábano, y corresponde a un grupo de proteínas que migra muy cerca del frente de migración en la parte inferior del gel. La aparición de la actividad peroxidasa coincidente con la desaparición de la proteína extraíble 24 horas post-daño, podría explicar una insolubilización de las proteínas tipo extensina en la pared. A los 30 minutos post-heridas, otro tipo de insolubilización podría ocurrir, mediada por los mismos fragmentos de pared celular producidos por el corte (Cooper y Varner, 1984) o bien, por metabolitos asociados al daño que aparecen sólo en los primeros minutos después de las heridas (e.g. Sustancias fenólicas; L.M. Pérez, comunicación personal).

Estudios al nivel de la transcripción y traducción de las proteínas de pared de P. chilensis, serían necesarios para establecer si la desaparición de la fracción soluble, en respuesta a las heridas, es debida a una regulación al nivel transcripcional y/o traduccional. La cinética de expresión

detectada por Showalter y col., (1985) para RNA mensajeros de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP), indica que los mRNA de una HRGP de Phaseolus vulgaris, se expresan 3 horas después de las heridas, o bien del tratamiento con inductores, respectivamente. No obstante, la respuesta de los mRNA de la HRGP de poroto a los inductores, es temporal, mientras que la acumulación de mensajeros de pared en respuesta al estrés producido por heridas es más permanente en el tiempo.

Los resultados de las impresiones sobre membranas de tejidos dañados de Prosopis chilensis indican que existe una expresión de proteínas en la zona herida. La inmunocitoquímica de tejidos dañados presenta más detalladamente esta respuesta caracterizada por una expresión de proteínas en las células vivas que rodean la herida. Esto ha sido también reportado por Cardemil y Riquelme (1991), para una conífera nativa de Chile: Araucaria araucana.

Una abundante literatura señala que el daño mecánico altera dramáticamente la expresión génica. La respuesta a las heridas implica la acumulación de hidroxiprolina unida a pared, después del corte, en discos de zanahoria (Sadava y Chrispeels, 1974) y en secciones de hipocótilo de poroto incubadas aeróbicamente (Klis y col., 1983). La formación de fitoalexinas acompaña a la acumulación de hidroxiprolina de pared celular en respuesta a lesiones inducidas

artificialmente en hipocótilos de poroto, indicando que estos dos fenómenos son parte de una respuesta general a las heridas.

Desde el punto de vista molecular, la expresión de proteínas de pared celular es una respuesta que varía de acuerdo a varios tipos de señales. Esta respuesta ha sido bien caracterizada sobre todo en las extensinas. En las raíces de zanahoria dos transcriptos (1,5 y 1,8 Kb) que codifican para el mismo gen, pero con diferentes sitios de comienzo 5', se acumulan en respuesta a las heridas (Chen y Varner, 1985 b). Por otro lado, el etileno, induce la aparición de mensajeros de extensina de 1,8 y 4,0 Kb en las raíces de zanahoria (Ecker y Davis, 1987). Los mRNA que codifican para dos enzimas del metabolismo fenilpropanoide: La L-fenil amonio liasa y la 4-coumarato-coenzima A ligasa, requeridas para la síntesis de lignina, se acumulan marcadamente en respuesta al etileno. La acumulación de diversos transcriptos de extensina, en respuesta a la infección bacteriana y etileno (Memelink y col., 1987) en tabaco, al igual que en respuesta a daño, infección e inductores fúngicos en poroto (Corbin y col, 1987) y en respuesta al daño en tallos de tomate (Showalter y Varner, 1987), son otras evidencias que respaldan la tesis de que existe, una expresión transcripcional de proteínas de pared celular en respuesta al estrés en plantas.

## Caracterización de las proteínas de pared de Prosopis chilensis.

Se han caracterizado cuatro proteínas de pared celular de Prosopis chilensis en cuanto a su glicosilación, actividad peroxidasa, composición de aminoácidos y secuencia aminoterminal.

Hasta ahora se sabe que estas proteínas se tiñen con dansilhidrazina, lo que sugiere que están glicosiladas. Por otro lado no poseen actividad peroxidasa.

En cuanto a la composición de aminoácidos (Tabla I), puede decirse que existen dos grupos de proteínas:

A) Un primer grupo de proteínas de 180 KD, 126 KD y 107 KD: ricas en ácido glutámico/glutamina, ácido aspártico/asparagina y en menor proporción por arginina, leucina, prolina y glicina.

B) Un segundo grupo representado por la proteína de 63 KD : rica en glutámico/glutamina, prolina, lisina, valina, ácido aspártico/asparagina, y tirosina.

Las comparaciones posibles de las proporciones aminoacídicas han sido limitadas por los siguientes factores:

- Los análisis de aminoácidos realizados por la Monsanto Co. no estiman el contenido de hidroxiprolina, porque esta co-eluye con el ácido aspártico.
- Durante la hidrólisis el triptófano es completamente destruido, y la asparagina y glutamina son desaminadas a ácido

aspártico.

Estos factores han hecho difícil, estimar un valor confiable de prolina/hidroxiprolina, que resulta importante, en las comparaciones con otras proteínas de pared ricas en hidroxiprolina o en prolina. Sin embargo, resulta evidente que la proteína de 63 KD posee una mayor cantidad de prolina con respecto a la de 180 KD, 126 KD y 107 KD.

Por otro lado, se intentó comparar las proporciones de aminoácidos de estas proteínas entre sí por el método de Cornish Bowden (1983). El análisis no es adecuado para comparar proteínas de distinto tamaño. Sin embargo, podría suponerse que todas las proteínas comparadas tienen el tamaño de la proteína de mayor masa molecular (180 KD). En estas condiciones, haciendo uso de una tabla estadística, todas las proteínas resultan ser distintas, porque la zona de rechazo es muy pequeña, debido a que la supuesta proteína comparada tiene 180 KD. Este, no obstante, es un artefacto, puesto que el test está siendo forzado. Sin embargo, sin emplear un criterio estadístico, sino más bien las diferencias dadas por el método de los mínimos cuadrados, se cumple que la proteína menos semejante a las demás es la de 63 KD. Valiéndose de estas apreciaciones, es bastante probable que existan dos grupos de proteínas de pared que se expresan en respuesta al estrés de heridas en P. chilensis.

El análisis de las secuencias amino-terminales, a pesar de los cortos fragmentos secuenciados, ha sido fundamental por dos razones:

- Las secuencias aminoterminales, muy probablemente revelan las características de toda la proteína estudiada, porque normalmente las proteínas de pared son de carácter repetitivo.
- Las secuencias aminoterminales pueden ser alineadas y comparadas con otras secuencias amino-terminales.
- Las secuencias pueden ser comparadas contra todo un banco de secuencias, por alineamiento FASTA.

De estos resultados queda claro que la proteína de 63 KD es probablemente una proteína rica en prolina, que tiene una gran homología con la proteína de soya 1 (PRP1). Las otras proteínas de 180 KD, 126 KD y 107 KD no tienen homólogos en el banco de datos. La síntesis de un anticuerpo fabricado en contra de un péptido sintético, derivado de la secuencia amino terminal de la proteína de 63 KD, permitiría verificar si la expresión de esta proteína de P. chilensis, es equivalente a la de la PRP1 de soya en el desarrollo (Hong y col., 1989). De hecho, los transcriptos del gen SbPRP1 se expresan en el hipocótilo maduro, la raíz y la testa inmadura de la semilla, y esto coincide parcialmente con la inmunolocalización de las proteínas de pared de Prosopis chilensis en zonas maduras representadas en los haces vasculares.



## Consideraciones sobre las hipótesis del trabajo.

Es conveniente considerar de nuevo las dos hipótesis que fundamentan esta investigación, en relación a la expresión de proteínas de pared celular en respuesta al estrés producido por heridas:

HIPOTESIS 1: La respuesta a las heridas es específica, sólo inducible por heridas.

HIPOTESIS 2: La respuesta a las heridas no es específica. El daño gatilla una expresión de proteínas de pared característica, observada también durante el desarrollo normal.

Las evidencias presentadas en este trabajo señalan que la respuesta producida por las heridas no es específica (Hipótesis 2), puesto que existe una expresión constitutiva de las mismas proteínas de pared asociada al desarrollo normal. El efecto del daño sobre la expresión de proteínas de pared, debe considerarse cuantitativo, es decir, las heridas incrementan la intensidad de una respuesta normal. No obstante, los niveles de expresión alcanzados en respuesta al estrés de heridas son comparables con los máximos alcanzados en algunas etapas del desarrollo normal. Por ejemplo, los niveles de expresión alcanzados en respuesta al estrés de heridas 12 horas post-daño son aproximadamente equivalentes a los alcanzados en etapas tempranas del desarrollo normal (1,5 horas de edad). En este sentido, puede definirse la

respuesta al daño como equivalente a la registrada en algunas etapas del desarrollo normal. Por otro lado, la inmunocitoquímica muestra que los haces vasculares y la epidermis, presentan una mayor expresión constitutiva de proteínas de pared en comparación con la detectada en la zona de las heridas. Aunque esta evidencia es aparentemente contradictoria con lo referido para el análisis electroforético, se puede explicar considerando que la alta expresión de proteínas está relacionada a la acumulación normal durante el crecimiento y la diferenciación del tejido vascular y epidérmico. Sin embargo, gran parte de estas proteínas deben estar insolubilizadas y no ser extraíbles. Por otro lado, en el caso de los extractos totales de cotiledones dañados, que fueron empleados para las electroforesis, se supone las heridas activan la síntesis de novo de proteínas de pared, lo que explicaría el incremento de las mismas en la fracción extraíble con  $\text{CaCl}_2$ .

Existen otras evidencias en la literatura que al parecer respaldan la hipótesis 1 de este trabajo de investigación, es decir la especificidad de la respuesta al daño. Corbin y col., (1987), proponen que existen un número de genes de defensa que estarían organizados en pequeñas familias multigénicas, y que operarían con distintos sistemas de transducción de las señales del medio ambiente, lo que se reflejaría en una activación génica precisa en diferentes

condiciones de estrés. Los mismos autores han probado empleando diferentes sondas que los transcriptos de HRGP inducidos por estrés son codificados por genes distintos en poroto. Estos genes de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina son diferencialmente regulados, tanto en la cinética de acumulación como en el patrón total de activación, en hipocótilos dañados y en hipocótilos infectados con una raza compatible o incompatible del hongo C. lindemuthianum. Sin embargo, sin restar el inmenso valor de estos hechos, es bien cierto que las mismas se basan en estudios realizados en un sólo órgano y un sólo estado de desarrollo, por lo que la especificidad propuesta podría estar restringida, y no mantenerse al estudiar otras etapas del desarrollo.

Ludevid y col., (1990), han estudiado la expresión de proteínas de pared celular en maíz, y han encontrado, empleando una sonda cDNA, que la máxima acumulación de m-RNA es encontrada en la zona en división de la punta de la raíz de plántulas jóvenes y en callos embriogénicos y meristemáticos. La inducción de los mismos genes se produce por daño mecánico, y no, durante la elongación celular o la diferenciación. Esta evidencia abre la posibilidad de que exista una respuesta a las heridas que es equivalente a la de tejidos que se encuentran en división, lo que no sería extraño en la zona herida donde se inicia un proceso de cicatrización que involucra división celular. La respuesta

a las heridas no sólo implica una cicatrización en plántulas de P.chilensis, sino además una regeneración y diferenciación de raíces secundarias, y esta es quizás uno de los hallazgos más importantes de la presente investigación, puesto que ha orientado significativamente las hipótesis del trabajo. La observación de que las radículas de plántulas de P.chilensis, diferencian raíces secundarias visibles, unas 60 horas después de las heridas, es una evidencia de que el desarrollo está directamente implicado en la respuesta al estrés de heridas y por lo tanto en la sobrevivencia de las plántulas. El anticuerpo policlonal antiextensina de testa de poroto de soya, inmunoreacciona con estas raíces secundarias, y muestra una intensa respuesta inmune en la zona cortical que presiona la nueva raíz en su salida hacia el exterior. Nuevamente, esta evidencia refuta la hipótesis 1 y respalda a la hipótesis 2, señalando que la respuesta a las heridas tiene equivalentes en el desarrollo normal. Al respecto se sabe que una extensina específica se expresa en la iniciación de raíces laterales (Keller y Lamb, 1989).

Finalmente, es conveniente resaltar algunos aspectos de este trabajo y de otros que contribuyen a entender las funciones de las proteínas de pared celular. Las evidencias presentadas en este trabajo y en gran parte de la literatura revisada, están de acuerdo en que la expresión de proteínas de pared está asociada a procesos de estrés en plantas y

también al desarrollo. Sin embargo, no en todos los estudios realizados las equivalencias entre respuestas dependientes del desarrollo y respuestas al estrés, resultan obvias. El papel estructural de estas proteínas en la pared celular es de importancia fundamental para entender la vinculación posible entre desarrollo y respuesta al estrés de heridas: en ambos procesos la pared debe modificarse continuamente. La respuesta defensiva puede ser en si misma una respuesta del desarrollo, con la que una planta determinada podría escapar del estrés y sobrevivir (Fig. 26).

## CONCLUSIONES

- A) Al menos 4 proteínas de pared celular son reconocidas específicamente por el anticuerpo policlonal antiextensina de testa de poroto de soya, en Prosopis chilensis.
- B) Las proteínas descritas poseen masas moleculares de 180 KD, 126 KD, 107 KD y 63 KD.
- C) Las proteínas de pared celular de cotiledones de plántulas de Prosopis chilensis se expresan (acumulan) durante el desarrollo de una manera tejido-dependiente, y en respuesta al daño mecánico, con un máximo de expresión (acumulación) a las 12 horas post-heridas.
- D) Variaciones en la actividad peroxidasa podrían explicar cambios en la cantidad de proteína extraíble, debido a su insolubilización en la pared celular.
- E) La caracterización parcial de estas proteínas revela que son glicoproteínas y no presentan actividad peroxidasa.
- F) La composición de aminoácidos de las proteínas estudiadas, señala que la proteína con mayor cantidad de prolina es la de 63 KD. Las otras proteínas son especialmente ricas en ácido glutámico/glutamina.
- G) El análisis de las secuencias amino-terminales por alineamiento (FASTA) con todo el banco de secuencias del EMBL, ha revelado que la proteína de 63 KD es muy

parecida al extremo amino-terminal de una proteína de soya rica en prolina. Las otras secuencias no presentan similitudes con proteínas de pared descritas.

- H) La expresión de proteínas de pared que acompaña a la diferenciación de raíces secundarias es otra evidencia de que la respuesta al estrés de heridas está relacionada al desarrollo.

## BIBLIOGRAFIA

Allen, A.K., and Neuberger, A. (1973). The purification and properties of the lectin from potato tubers, a hydroxi proline-containing glycoprotein. *Biochem. J.* 135, 307-314.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Cardemil, L., and Riquelme, A. (1991). Expression of cell wall proteins in seeds and during early seedling growth of Araucaria araucana is a response to wound stress and is developmentally regulated. *J. Exp. Bot.* 42, 415-421.

Cassab, G.I., Nieto-Sotelo, J., Cooper, J.B. van Holts, G.J., and Varner, J.E. (1985). A developmentally regulated hydroxyproline-rich glycoprotein from the cell walls of soybean seed coats. *Plant. Physiol.* 77, 532-535.

Cassab, G.I., and Varner, J.E. (1988). Cell wall proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 321-353.



Cassab, G., and Varner, J.E. (1987). Immunocytolocalization of extensin in developing Soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper. *The Journal of Cell Biology*. 105, 2581-2588.

Chen, J., and Varner, J.E. (1985a). Isolation and characterization of cDNA clones for carrot extensin and a proline-rich 33- KDa protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4399-4403.

Chen, J., and Varner, J.E. (1985b). An extracellular matrix protein in plants: characterization of a genomic clone for carrot extensin. *EMBO J.* 4, 2145-2151.

Chrispeels, M.J., Sadava, D., and Cho, Y.P. (1974). Enhancement of extensin biosynthesis in aging discs of carrot storage tissue. *J. Exp. Bot.* 25, 1157-1166.

Clarke, A.E., Anderson, R.L., and Stone, B.A. (1979). Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry* 18, 521-540.

Condit, C.M., and Meagher, R.B. (1986). A gene encoding a novel glycine-rich structural protein of petunia. *Nature* 323, 178-181.

Condit, C.M., and Keller, B. (1990). The glycine-rich cell wall proteins of higher plants. In organization and Assembly of Plant and Animal Extracellular Matrix, W.S. Adair and R.P. Mecham, eds (New York: Academic Press), pp. 119-135.

Cooper, J.B., and Varner, J.E. (1983). Insolubilization of hydroxyproline-rich cell wall glycoprotein in aerated carrot root slices. Bioch. and Biophys. Res. commun. 112. (1),161-167.

Cooper, J.B., and Varner J.E. (1984). Cross-linking of soluble extensin in isolated cell walls. Plant Physiol. 76, 414-417.

Cornish-Bowden, A. (1983). Relating proteins by aminoacid composition. In Hirs, C.H.W, Timasheff, S.N. (Eds) Methods in Enzimology, vol. 91. "Enzyme structure", Part I pp.60-75.

Crétin, C.M., and Meagher, R.B. (1986). A gene encoding a novel glycine-rich structural protein in petunia. Nature 323, 178-181.

Corbin, D.R., Sauer, N., and Lamb, C. (1987). Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. *Molec. and Cellular Biol.* 7, 4337-4344.

Darvill, A., McNeil, M., Albersheim, P., and Delmer, D.P. (1980). The primary cell walls of flowering plants. In the *Biochemistry of Plants*. ed. N. E. Tolbert, 1, 91-162. New York: Academic Press. 705 pp.

Datta, K., Schmidt, A. & Marcus, A. (1989). Characterization of two soybean repetitive proline-rich proteins and a cognate cDNA from germinated axes. *Plant Cell* 1, 945-952.

Dougall, D.K., and Shimbayashi, K. (1960). Factors affecting growth of tobacco callus tissue and its incorporation of tyrosine. *Plant Physiol.* 35, 396-404.

Ecker, J.R., and Davis, R.W. (1987). Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5202-5206.

Eckhardt, A.E., Hayes, C.E., and Goldstein, I.J. (1976). A sensitive fluorescent method for the detection of glycoproteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 192-197.

Esquerré-Tugayé, M.T., Lafitte, C., Mazau, D., Toppan, A., Touzé, A. (1979). Cell surface in plants micro-organism interactions. II evidence for the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in the cells wall of diseased plants as a defence mechanism. *Plant Physiol.* 64, 320-326.

Felker, P., Clark, P.R., Nash, P., Osborn, J.F., and Cannell, G.H. (1982). Screening *Prosopis* (Mesquite) for cold tolerance. *Forest Sci.* 28, 556-562.

Fincher, G.B., Stone, B.A., and Clarke, A.E. (1983). Arabinogalactan-proteins: precursors, biosynthesis, and function. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34, 47-70.

Fry, S.C. (1982). Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell wall glycoproteins. *Biochem. J.* 204, 449-455.

Fuentes, E.R., Avilés, R., and Segura, A. (1989). Landscape change under indirect effects of human use: the Savanna of Central Chile. *Landscape Ecol.* 2, 73-80.

Gleeson, P.A., McNamara, M., Wettenhall, E.H., Stone, B.A., Fincher, G.B. (1989). Characterization of the hydroxyproline-rich protein core of an arabinogalactan-protein secreted from suspension cultured Lolium multiflorum (Italian rygrass) endosperm cells. *Biochem. J.* 264, 857-862.

Hammerschmidt, R., Lamport, D.T.A., Muldoon, E. P. (1984). Cell wall hydroxyproline enhancement and lignin deposition as an early event in the resistance of cucumber to Cladoporium cucumerinum. *Physiol. Plant Pathol.* 24, 43-47.

Heckman, J.W., Terhune, Jr. B.T., and Lamport, D.T.A. (1988). Characterization of native and modified extensin monomers oligomers by electron microscopy and gel filtration. *Plant Physiol.* 86, 848-856.

Hood, E.E., Shen, Q.X., and Varner, J.E. (1988). A developmentally regulated hydroxyproline-rich glycoprotein in maize pericarp cell walls. *Plant Physiol.* 87, 138-142.

Hong, J.C., Nagao, R.T., and Key, J.L. (1989). Developmentally regulated expression of soybean proline-rich cell wall protein genes. *Plant Cell* 1, 937-943.

Huber, D.J., and Nevins, D.J. (1981). *Physiol. Plant* 53, 533.

Jensen, W.A. (1962). *Botanical Histochemistry*. Printed in the United States of America. 1-408 pp.

Johnson, C. (1983). *Ecología, control e identificación de insectos que infestan semillas de Prosopis (Leguminosiae)*. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación.

Keller, B., Sauer, N., and Lamb, C.J. (1988). Glycine-rich cell wall proteins in bean: gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO J.* 7, 3625-3633.

Keller, B., Templeton, M.D., and Lamb, C.J. (1989b). Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein protoxylem cells of the vascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1529-1533.

Gómez, J., Sánchez-Martínez, D., Stiefel, V., Rigau, J., Puigdomènech, P., and Pagés, M. (1988). A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature* 334, 262-264.

Keller, B., Templeton, M.D., and Lamb, C. (1989). Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 1529-1533.

Kieliszewski, M., and Lamport, D.T.A. (1987). Purification and partial characterization of a hydroxyproline-rich glycoprotein in a graminaceous monocot, Zea mays. Plant Physiol. 92, 316-326.

Kieliszewski, M., and Lamport, D.T.A. (1986). Cross-reactivities of polyclonal antibodies against extensin precursors determined via ELISA techniques. Phytochemistry, 25, 673-677.

Kieliszewski, M.J., Leykam, J.F., and Lamport, D.T.A. (1990). Structure of the threonine-rich extensin from Zea mays. Plant Physiol. 92, 316-326.

Kleis San Francisco, S.M., and Tierney, M.L. (1990). Isolation and characterization of a proline-rich cell wall protein from soybean seedlings. Plant Physiol. 94, 1897-1902.

Klis, F.M. (1976). Glycosylated seryl residues in wall protein of elongating pea stems. Plant Physiol. 57, 224-226.

Klis, F.M., Rootjes, M., Groen, S., and Stegwee, D. (1983). Accelerated accumulation of wall-bound hydroxyproline in artificially induced lesions on bean hypocotyl sections. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 110, 301-307.

Lamport, D.T.A., and Northcote, D.H. (1960). Hydroxyproline in primary cell walls of higher plants. *Nature* 118, 665-666.

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.

Lamport, D.T.A., Katona, L., and Roering, S. (1973). Galactosylserine in extensin. *Biochem. J.* 133, 125-131.

Lamport, D.T.A. (1974). The role of hydroxyproline-rich proteins in the extracellular matrix of plants. Presented at 30th Symp. Soc. Dev. Biol. pp. 113-130. New York: Academic Press.

Leach, J.E., Cantrell, M.A., and Sequeira, L. (1982). A hydroxyproline-rich bacterial agglutinin from potato: extraction, purification, and characterization. *Plant Physiol.* 70, 1353-1358.



Ludevid, M.D., Ruiz-Avila, L., Vallés, M.P., Stiefel, V., Torrent, M., Torné, J.M., and Puigdomènech, P. (1990). Expression of gene for cell-wall proteins in dividing and wounded tissues of Zea mayz L. *Planta*, 180, 524-529.

Mellon, J.E., and Helgeson, J.P. (1982). Interaction of a hydroxyproline-rich glycoprotein from tobacco callus with potential pathogens. *Plant. Physiol.* 70, 401-405.

Memelink, J., Hoge, J.H.C., and Schilperoort, R.A. (1987). Cytokinin Stress changes the developmental regulation of several defence-related genes in tobacco. *EMBO J.* 6, 3579-3583.

Mundy, J., and Chua, N.H. (1988). Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7, 2279-2286.

Norman, P.M., Kjellbom, P., Bradley, D.J., Hahn, M.G., and Lamb, C.J. (1990). Immunoaffinity purification and biochemical characterization of plasma membrane arabinogalactan-rich glycoproteins of Nicotiana glutinosa. *Planta* 181, 365-373.

Pennel, R.I., Knox, J.P., Scofield, G.N., Selvendran, R.R., and Roberts, K. (1989). A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. *J. Cell Biol.* 108, 1967-1977.

Pearson, W.R., and Lipman, D.J. (1988). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444.

Roby, D., Toppan, A. and Esquerré-Tugayé, M.T. (1985). Cell surface in plants-microorganism interactions: V. Elicitors of fungal and of plant origin trigger the synthesis of ethylene and of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins in plants. *Plant Physiol.* 77, 700-704.

Rumeau, D., Maher, E.A., Jelman, A., and Showalter, A.M. (1990). Extensin and phenylalanine ammonia-lyase gene expression altered in potato tubers in response to wounding, hypoxia and *Erwinia carotovora* infection. *Plant Physiol.* 93, 1134-1139.

Russell, L.W., Wallner, S.J., and Waddell, J.W. (1990). Cell wall and extensin mRNA changes during cold acclimation of pea seedlings. *Plant. Physiol.* 93, 1021-1026.

Sadava, D., and Chrispeels, M.J. (1973). Hydroxyproline-rich cell wall protein (extensin): Role in the cessation of elongation in excised pea epicotyls. *Devel. Biol.* 30, 49-55.

Seegers, R., and LaRue, T. (1985). Legume agglutinin that bind to Rhizobium meliloti. *Journal of Bacteriology*. Vol 162, Núm. 2, p. 784-789.

Showalter, A.M. (1992) Structure and function of plant cell wall proteins. In press.

Showalter, A.M., Bell, J.N., Cramer, C.L., Bailey, J.A., Varner, J.E., and Lamb, C.J. (1985). Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNA in response to fungal elicitor and infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6551-6555.

Showalter, A.M., and Varner, J.E. (1987). Molecular details of plants cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein expression during wounding and infection. *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.* NS 48, 375-392.

Showalter, A.M., and Varner, J.E. (1989). Plant hydroxyproline-rich glycoproteins. In *The Biochemistry of Plants*, Vol. 15, P.K. Stumpf and E.E. Conn, eds (New York: Academic Press), pp. 485-520.

Showalter, A.M., Zhou, J., Rumeau, D., Worst, S.G., and Varner, J.E. (1991). Tomato extensin and extensin-like cDNAs: structure and expression to wounding. *Plant Mol. Biol.* 16, 547-565.

Showalter, A.M., Butt, A.D., and Kim, S. (1992). Molecular details of tomato extensin and glycine-rich protein gene expression. *Plant Mol. Biol.*, in press.

Smith, J.J., Muldoon, E.P., and Lamport, D.T.A. (1984). Isolation of extensin precursors by direct elution of intact tomato cell suspension cultures. *Phytochemistry*. 23, 1233-1239.

Smith, J.J., Muldoon, E.P., Willard, J.J., and Lamport, D.T.A. (1986). Tomato extensin precursors P1 and P2 are highly periodic structures. *Phytochemistry*. 25, 1021-1030.

Smith, M.A. (1981). Characterization of carrot cell wall protein. I. Effect of  $\alpha,\alpha'$ -dipyridil on cell wall protein synthesis and secretion in incubated carrot discs. *Plant Physiol.* 68, 956-963.

Stafstrom, J.P., and Staehelin, A. (1988). Antibody localization of extensin in cell walls of carrot storage roots. *Planta* 174, 321-332.

Stafstrom, J.P., and Staeheli, A. (1986). Cross-linking patterns in salt-extractable extensin from carrot cell wall. *Plant Physiol.* 81, 234-241.

Stiefel, V., Pérez-Grau, L., Albericio, F., Giralt, E., Ruiz-Avila, L., Ludevid, M.D., and Puigdomènèch, P. (1988). Molecular cloning of cDNAs encoding a putative cell wall protein from *Zea mays* and immunological identification of related polypeptides. *Plant Mol. Biol.* 11, 483-496.

Stiefel, V., Ruiz-Avila, L., Raz, R., Vallès, M.P., Gómez, J., Pagés, M., Martínez-Izquierdo, J.A., Ludevid, J.A., Nelson, T., and Puigdomènèch, P. (1990). Expression of a maize cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in early leaf and root vascular differentiation. *Plant Cell.* 2, 785-793.

Stuart, D.A., and Varner, J.E. (1980). Purification and characterization of a salt-extractable hydroxiprolin-rich glycoprotein from aerated carrot discs. *Plant Physiol.* 66, 787-792.

Thomas, J.M., and Hodes, M.E. (1981). A new discontinuous buffer system for electrophoresis of cationic proteins at near-neutral pH. *Anal. Biochem.* 118, 194-196.

Towbin, H.T., Staehelin, and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350.

Rodhe, W., Rosch, K., Kröger, K., and Salamini, F. (1990). Nucleotide sequence of a Hordeum vulgare gene encoding a glycine-rich protein with homology to vertebrate cytoqueratins. *Plant Mol. Biol.* 14, 1057-1059.

Tierney, M.L., and Varner, J.E. (1980). The Extensins. *Plant Physiol.* 84, 1-2.

Van Holts, G.J., and Varner, J.E. (1984). Polyproline II conformation in the protein component of arabinogalactan-protein from Lolium multiflorum. *Plant Physiol.* 75, 1163-64.

Van Holst, G.J., Klis, F.M., Bouman, F., and Stegwee, D. (1980). Changing cell wall compositions in hypocotyls of dark-grown bean seedlings. *Planta* 149, 209-212.

Varner, J.E., and Cassab, G.I. (1986). A new protein in petunia. *Nature* 323, 110.

Wyatt, R.E., Nagao, R.T., and Key, J. (1992). Patterns of Soybean proline-rich protein gene expression. *The Plant Cell*, 4, 99-110.

Ye, Z.H., Varner, J.E. (1991). Tissue-specific expression of cell wall proteins in developing soybean tissues. *The Plant Cell*, 3, 23-37.