

PRINCIPALES OSMOPROTECTORES ENVUELTOS EN LA RESPUESTA A ESTRÉS HÍDRICO Y ESTRÉS TÉRMICO EN PAPAS

Eung-Jun Park
María Teresa Pino

Las plantas al enfrentar estreses del tipo abiótico, ya sea por sequía, salinidad, y/o temperaturas extremas, además de reducir significativamente su crecimiento y productividad, sufren una serie de cambios a nivel fisiológico, bioquímico y molecular, como mecanismos de respuesta frente a condiciones adversas (Serraj y Sinclair, 2002; Mahajan y Tuteja, 2005; Hu *et al.*, 2010; Fraire-Velázquez *et al.*, 2011). Algunas especies vegetales han desarrollado mayor tolerancia a este tipo de estreses, mostrando mejor capacidad de aclimatación como resultado de una exposición gradual al estrés en el tiempo. Ello, con la consecuente activación de varios mecanismos de respuesta como: cambios en la expresión de genes, síntesis de ácido absísico (ABA), alteración en la composición de la membrana, biosíntesis de anti-oxidantes, y acumulación de solutos compatibles, como azúcares solubles, amino ácidos libres, y otros (Hu *et al.*, 2010). Se ha observado que algunas especies de papas como *Solanum commersonii* Dun (una especie silvestre), tienen la capacidad de aclimatarse a bajas temperaturas, aumentando su tolerancia a heladas desde -4°C hasta -10°C, luego de ser expuesta a temperaturas cercanas a los 4°C durante una a dos semanas. En conjunto con esta respuesta, también se ha reportado en *S. commersonii* cambios a nivel fisiológico, bioquímico y molecular, incluyendo el aumento de osmoprotectores como prolina y azúcares solubles (Chen *et al.*, 1999; Pino *et al.*, 2008).

PRINCIPALES OSMOPROTECTORES Y SUS FUNCIONES EN ESTRÉS ABIÓTICO

Los solutos compatibles u osmoprotectores son sustancias de bajo peso molecular, incluyen la mayoría de los solutos osmóticamente activos, y están presentes en todas las células. Frente a estrés abiótico, estos solutos compatibles cumplen un importante rol en la protección de las plantas a nivel celular, manteniendo el ajuste osmótico y turgor de la célula. Actuarían como chaperonas, estabilizando enzimas, proteínas y membranas, destruyendo especies reactivas de oxígeno ROS (por su sigla en inglés, Reactive Oxygen Species) y estabilizando los complejos del fotosistema II. En términos generales, los solutos compatibles se clasifican en tres grupos: aminoácidos (ej. prolina), amino-cuaternarios (ej. glicina betaína, dimetilsulfoniopropionato), polioles (ej. manitol, sorbitol, mio-inositol) y azúcares solubles (ej. sacarosa, glucosa, trehalosa) (Chen y Murata, 2002; Wang *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2010).

PROLINA CUMPLIRÍA VARIAS FUNCIONES DURANTE EL ESTRÉS ABIÓTICO

Aun cuando el rol específico de la prolina no está bien definido, se sugiere que cumpliría varias funciones durante el estrés abiótico. La acumulación de prolina se ha asociado a la estabilización tanto de proteínas como de membranas, como fuente de carbono, nitrógeno y energía durante la rehidratación celular (Kishor *et al.*, 1995, 2005; Szabados y Savoure, 2010). La síntesis de prolina frente estrés abiótico ha sido reportada en varias especies, como *Phaseolus vulgaris* L. (Andrade *et al.*, 1995), *Nicotiana tabacum* (Kishor *et al.*, 1995), tomate (Claussen, 2005), *Capsicum annum* (Chaman, 2007), *Olea europaea* L. cv. *Chemlali* (Ahmed *et al.*, 2008), moras y frambuesas (Orlikowska *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2013). En papa (*Solanum tuberosum* L.), se ha observado un aumento en la concentración de prolina a nivel de hoja en respuesta a déficit hídrico (Bansal y Na-

garajan, 1986). Otro estudio también en papas, reportó acumulación de prolina en plantas transgénicas capaces de sintetizar fructanos frente a estrés hídrico (Knipp y Honermeier, 2006). También se ha observado acumulación de prolina en *S. commersonii* y *S. tuberosum* genéticamente transformada con factores de transcripción del tipo CBF o DREB (por su sigla en inglés, C-Repeat Binding Factors/ Dehydration Responsive Element Binding) en respuesta a bajas temperaturas (Pino *et al.*, 2008) y en respuesta a déficit hídrico *in vitro* (Pino *et al.*, 2013). Además, se ha reportado acumulación de prolina en hojas, tempranamente en variedades de papas susceptibles a sequía y tardíamente en variedades de papas tolerantes a sequía (Schafleitner *et al.*, 2007).

AZÚCARES SOLUBLES ACTÚAN COMO OSMOPROTECTORES FRENTE A ESTRÉS OSMÓTICO

Los azúcares solubles y la síntesis de oligosacáridos derivados de la sacarosa, como los fructanos, actúan como osmoprotectores frente a estrés osmótico y fuente de reserva de carbono. Un estudio, en plantas transgénicas de tabaco y remolacha azucarera capaces de inducir acumulación de fructanos fueron más tolerantes a sequía que aquellas que no producían fructanos (Pilon-Smits *et al.*, 1995; Pilon-Smits *et al.*, 1999). Plantas transgénicas de papa y tabaco capaces de inducir trehalosa, mostraron mayor tolerancia a sequía respecto a sus controles (Chen y Murata, 2002). Otro estudio que comparó clones de papas tolerantes (397077.16) y susceptibles (Canchan) a sequía, mostró en el clon tolerante mayor síntesis de galactinol y rafinosa (Legay *et al.*, 2011). Otros estudios comparando *S. commersonii* (genotipo tolerante a heladas) y *S. tuberosum* (genotipo susceptible a heladas), reportaron un incremento en azúcares solubles totales en las hojas de *S. commersonii* al ser sometidas a bajas temperaturas y a sequía (Pino *et al.*, 2008; Pino *et al.*, 2013). Otro estudio reciente, mostró en *S. commersonii* una mayor acumulación fructosa, glucosa y sucrosa bajo estrés abiótico respecto a su control susceptible (Folgado *et al.*, 2013).

LOS POLIOLES HAN SIDO RELACIONADOS CON ESTRÉS ABIÓTICO

Los polioles o hidratos de carbono con grupos cíclicos (ej. manitol, sorbitol, mio-inositol), también han sido relacionados con estrés abiótico, en el ajuste osmótico y reserva de carbono. Por ejemplo, plantas transgénicas con genes que inducen la síntesis de manitol, han sido principalmente asociadas a estrés salino y a sequía en especies como *Nicotiana tabacum*, *Populus tormentosa* y *Arabidopsis*. En papas, se ha observado que las líneas transgénicas con el gen mtID (manitol-1-fosfato-deshidrogenasa) mejoraron la tolerancia a estrés salino (Askari y Pepoyan, 2012). Por otra parte, el sorbitol se ha asociado al ajuste osmótico en plantas sometidas a estrés salino, a sequía y también a bajas temperaturas en especies como tomate, arroz, y manzano (dos Reis *et al.*, 2012). En *Arabidopsis*, líneas mutantes acumuladoras de sorbitol, knock-out para el gen responsable de la catálisis de sorbitol AtSDH (por su sigla en inglés, Sorbitol Deshidrogenasa), fueron más tolerantes a condiciones de estrés por deshidratación, presentando una tasa de sobrevivencia 50% mayor que plantas control (Aguayo *et al.*, 2013).

GLICINA BETAÍNA

Glicina betaína (GB) es uno de los solutos compatibles más conocido. GB es bipolar, pero de carga neutra a pH fisiológico. Estudios *in vitro* han mostrado que no es tóxico, y es un osmolito que ayuda al equilibrio osmótico intracelular cuando la célula es expuesta a un estrés inducido de hiper-osmosis, su síntesis puede ser inducida tanto por estrés hídrico como por estrés salino (Gorham, 1995). El mecanismo de acción de GB no ha sido completamente establecido aún. Sin embargo, existen dos hipótesis contrastantes; la primera sugiere que GB protegería las proteínas, a través de la formación de una película de agua alrededor de las mismas (Arakawa y Timasheff, 1983), y la segunda sugiere que GB estabilizaría proteínas por directa interacción con ellas (Schobert, 1977). Se ha reportado

que GB estabilizaría complejos del tipo proteína-pigmento como el PSII y protegería tanto enzimas como membranas en condiciones de estrés (Papageorgiou y Murata, 1995). La ruta metabólica desde glicina a GB fue primeramente descrita en microorganismos extremadamente halófilos, *Ectothiorhodospira halochloris* y *Actinopolyspora halophila*. En estos microorganismos, GB es generada por dos S-adenosilmetionina dependiente metiltransferasa, GSMT y SDMT (Nyysölä *et al.*, 2000). A pesar de ello, GB se acumula en una amplia variedad de organismos bajo condiciones de estrés abiótico. En plantas, la enzima colina monooxigenasa (CMO) convierte la colina en betaína aldehído y luego mediante una enzima dependiente de NAD⁺, betaína aldehído deshidrogenasa (BADH), produce GB. Este tipo de enzimas son principalmente encontradas en el estroma del cloroplasto y su actividad se incrementa en respuesta a estrés salino. En *E. coli*, GB es sintetizada por la enzima colina-deshidrogenasa con BADH. Mientras que en bacterias de suelo como *Arthrobacter globiformis*, colina-oxidasa-A (codA) convierte colina en GB y H₂O₂ en un único paso. La biosíntesis de GB no sólo es inducida por estrés también su concentración varía entre especies, fluctuando entre 40 a 400 µmol g⁻¹ peso seco, por eso también se conoce como un acumulador natural en condiciones de estrés (Rhodes y Hanson, 1993). La papa al igual que en otras especies vegetales, no es capaz de sintetizar ni acumular GB en forma natural. Sin embargo, la aplicación exógena de GB en algunas especies ha mostrado ser efectiva, mejorando la tolerancia a estrés abiótico en ellas; por ejemplo, en algunas solanáceas como tomate (Park *et al.*, 2007) y papas (Cheng *et al.*, 2013). Un estudio que transformó genéticamente papas (*S. tuberosum*), con el gen codA, mostró que su expresión permitió la síntesis de GB en papas transgénicas y su acumulación (12 µmol GB por g⁻¹ peso fresco) bajo estrés abiótico (Cheng *et al.*, 2013); también se observó síntesis H₂O₂, mayor actividad enzimática anti-oxidante, mayor eficiencia fotosintética, mayor potencial hídrico de la hoja, mayor contenido de clorofilas y bajo MDA. Similares resultados han sido publicados en tomates transgénicos (con el gen codA) sometidos a estrés abiótico (Park *et al.*, 2007).

LITERATURA CONSULTADA

- Aguayo, M. F., Ampuero, D., Mandujano, P., Parada, R., Muñoz, R., Gallart, M., and Handford, M. (2013).** Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 205, 63-75. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.01.012
- Ahmed, C. B., Rouina, B. B., and Boukhris, M. (2008).** Changes in water relations, photosynthetic activity and proline accumulation in one-year-old olive trees (*Olea europaea L. cv. Chemlali*) in response to NaCl salinity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(4), 553-560.
- Andrade, J. L., Larque-Saavedra, A., and Trejo, C. L. (1995).** Proline accumulation in leaves of four cultivars of *Phaseolus vulgaris L.* with different drought resistance. *Phyton-Revista Internacional de Botanica Experimental*, 57(2), 149-158.
- Arakawa, T., and Timasheff, S. N. (1983).** Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 224(1), 169-177.
- Askari, A., and Pepoyan, A. (2012).** Overexpression of mtID gene in potato (*Solanum tuberosum L.*), cv. Arinda improves salt tolerance. *Advances in Environmental Biology*, 6(10), 2646-2653.
- Bansal, K. C., and Nagarajan, S. (1986).** Leaf water content, stomatal conductance and proline accumulation in leaves of Potato (*Solanum tuberosum L.*) in response to water stress. *Indian J. Plant Physiol*, 29(4), 397-404.
- Chaman, M.M.E. (2007).** Variaciones en el contenido relativo de agua y la concentración de prolina en *Capsicum annuum L.* inducido por NaCl. *Arnaldoa*, 14(2), 251- 258.

- Chen, T. H., and Murata, N. (2002).** Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 250-257.
- Chen, Y. K., Palta, J. P., and Bamberg, J. B. (1999).** Freezing tolerance and tuber production in selfed and backcross progenies derived from somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. commersonii*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(1-2), 100-107.
- Cheng, Y. J., Deng, X. P., Kwak, S. S., Chen, W., and Eneji, A. E. (2013).** Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing choline oxidase in chloroplasts against water stress. *Botanical Studies*, 54(1), 30. doi:10.1186/1999-3110-54-30
- Claussen, W. (2005).** Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science*, 168 (1), 241-248.
- dos Reis, S. P., Lima, A. M., and de Souza, C. R. B. (2012).** Recent molecular advances on downstream plant responses to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8628-8647.
- Folgado, R., Panis, B., Sergeant, K., Renaut, J., Swennen, R., and Hausman, J. F. (2013).** Differential Protein Expression in Response to Abiotic Stress in Two Potato Species: *Solanum commersonii* Dun and *Solanum tuberosum* L. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4912-4933.
- Fraire-Velázquez, S., Rodríguez-Guerra, R., and Sánchez-Calderón, L. (2011).** Abiotic and Biotic Stress Response Crosstalk in Plants. *In: Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*, Arun Shanker and B. Venkateswarlu (Eds.), ISBN: 978-953-307-672-0, InTech, 346pp. <http://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-response-in-plants-physiological-biochemical-and-geneticperspectives/>

- Gorham, J.O.H. (1995).** Betaines in higher plants – biosynthesis and role in stress metabolism. *In: Amino Acids and Their Derivatives in Higher Plants.* Wallsgrave, R.M. (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge, 171–203.
- Hu, X. J., Zhang, Z. B., Xu, P., Fu, Z. Y., Hu, S. B., and Song, W. Y. (2010).** Multifunctional genes: the cross-talk among the regulation networks of abiotic stress responses. *Biologia Plantarum*, 54(2), 213-223.
- Kishor, P. K., Hong, Z., Miao, G. H., Hu, C. A. A., and Verma, D. P. S. (1995).** Overexpression of [delta]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 108(4), 1387-1394.
- Kishor, P. K., Sangam, S., Amrutha, R. N., Laxmi, P. S., Naidu, K. R., Rao, K. R. S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., and Sreenivasulu, N. (2005).** Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 88(3), 424-438.
- Knipp, G., and Honermeier, B. (2006).** Effect of water stress on proline accumulation of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* L.) generating fructans. *Journal of Plant Physiology*, 163(4), 392-397.
- Legay, S., Lefèvre, I., Lamoureux, D., Barreda, C., Luz, R. T., Gutierrez, R., Quiroz R., Hoffmann, L., Hausman, JF., Bonierbale, M., Evers, D., and Schafleitner, R. (2011).** Carbohydrate metabolism and cell protection mechanisms differentiate drought tolerance and sensitivity in advanced potato clones (*Solanum tuberosum* L.). *Functional and Integrative Genomics*, 11(2), 275-291.
- Mahajan, S., and Tuteja, N. (2005).** Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444 (2), 139-158.

- Morales, C. G., Pino, M. T., and del Pozo, A. (2013).** Phenological and physiological responses to drought stress and subsequent re-hydration cycles in two raspberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 162, 234-241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.07.025>.
- Nyssölä, A., Kerovuo, J., Kaukinen, P., von Weymarn, N., and Reinikainen, T. (2000).** Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 22196-22201.
- Orlikowska, T., Kucharska, D., and Horbowicz, M. (2009).** The reaction of raspberry and blackberry cultivars to drought stress simulated *in vitro* by polyethylene glycol (PEG) 6000. *In: I International Symposium on Biotechnology of Fruit Species: BIOTECHFRUIT 2008*, 337-342.
- Papageorgiou, G. C., and Murata, N. (1995).** The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynthesis Research*, 44(3), 243-252.
- Park, E. J., Jeknic, Z., Pino, M. T., Murata, N., and Chen, T. H. H. (2007).** Glycinebetaine accumulation is more effective in chloroplasts than in the cytosol for protecting transgenic tomato plants against abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 30(8), 994-1005.
- Pilon-Smits, E. A., Ebskamp, M. J., Paul, M. J., Jeuken, M. J., Weisbeek, P. J., and Smeekens, S. C. (1995).** Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology*, 107(1), 125-130.
- Pilon-Smits, E. A., Terry, N., Sears, T., and van Dun, K. (1999).** Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(4), 313-317.

- Pino, M. T., Skinner, J. S., Jeknic, Z., Hayes, P. M., Soeldner, A. H., Thomashow, M. F., and Chen, T. H. (2008).** Ectopic AtCBF1 over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato. *Plant, Cell and Environment*, 31(4), 393-406.
- Pino, M. T., Ávila, A., Molina, A., Jeknic, Z., and Chen, T. H. H. (2013).** Enhanced *in vitro* drought tolerance of *Solanum tuberosum* and *Solanum commersonii* plants overexpressing the ScCBF1 gene. *Cien. Inv. Agr.*, 40, 171-184.
- Rhodes, D., and Hanson, A. D. (1993).** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44(1), 357-384.
- Schafleitner, R., Gaudin, A., Rosales, R. O. G., Aliaga, C. A. A., and Bonierbale, M. (2007).** Proline accumulation and real time PCR expression analysis of genes encoding enzymes of proline metabolism in relation to drought tolerance in Andean potato. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(1), 19-26.
- Schobert, B. (1977).** Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants? *Journal of Theoretical Biology*, 68(1), 17-26.
- Serraj, R., and Sinclair, T. R. (2002).** Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell and Environment*, 25(2), 333-341.
- Szabados, L., and Savouré, A. (2010).** Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89-97.
- Wang, W., Vinocur, B., and Altman, A. (2003).** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218 (1), 1-14.