



Immunolocalización de proteasas y cambios anatómicos asociados a los procesos de senescencia o fructificación en tomate

Immunolocalization of proteases and anatomic changes associated with the process of ovary senescence or fruit set in tomatoes

Marta S. Agüero
Gabriela Barral
María G. Klich

Originales
Recepción: 28/11/2007
Aceptación: 25/03/2008

RESUMEN

La antesis de una flor es un estadio crucial para el destino del ovario ya que estímulos endógenos -polinización o nivel hormonal elevado- o exógenos -aplicación hormonal- inducen el proceso de fructificación. En ausencia de estos estímulos el ovario deja de crecer e inicia un proceso de senescencia. Previamente se ha observado que, en ovarios no polinizados, la senescencia va acompañada por un incremento en la actividad/expresión de ciertas tiol-proteasas, parámetros que disminuyen durante la etapa temprana del desarrollo de frutos. El objetivo fue analizar la localización de proteasas y los cambios anatómicos asociados a los procesos de fructificación o senescencia que se producen durante la etapa temprana del desarrollo de los frutos de tomate obtenidos por polinización natural o por tratamiento con GA3. Durante el período en que los ovarios no polinizados mantienen su sensibilidad a la aplicación hormonal, se observó una acumulación de polipéptidos relacionados antigénicamente con la tiol-proteasa papaína, principalmente en la epidermis del pericarpio, sin evidenciarse alteraciones en la integridad de los tejidos. Frutos de 8 días de desarrollo obtenidos con GA3, en comparación con los polinizados, evidenciaron un incremento en el espesor del pericarpio relacionado principalmente con una mayor elongación de las células del mesocarpio.

SUMMARY

Flower anthesis is a crucial stage for the ovary's fate because endogenous stimuli -pollination or high hormonal level- or exogenous ones -hormonal application- induce the fruit set. In the absence of these stimuli, the ovary stops growing and starts the senescence process. It has previously observed that, in unpollinated ovaries, the senescence goes together with the increase in the activity/expression of certain thiolproteases, parameters that decrease during the early stage of fruit development. The objective was to analyze the location of proteases and anatomic changes associated with the fruit set or ovary senescence processes that take place during the early stage of the tomato fruit development obtained by natural pollination or by treatment with GA3. During the period in which the unpollinated ovaries keep their sensitivity to the hormone application, an accumulation of polypeptides related antigenically with papain thiolprotease was observed, mainly in the epidermis of the pericarp, showing no signs of alterations in the tissue integrity. Fruits of 8 days of development obtained with GA3, compared to the pollinated ones, showed an increase in the thickness of the pericarp related mainly with a higher enlargement of the mesocarp cells.

Palabras clave

senescencia • tiol-proteasa • desarrollo de frutos • tomate • pericarpio

Keywords

ovary senescence • thiolprotease • fruit development • tomato • pericarp

INTRODUCCIÓN

El proceso de senescencia en plantas corresponde a la etapa final del desarrollo vegetativo y reproductivo, e involucra la actividad de enzimas hidrolíticas que permiten la movilización y redistribución ordenada de nutrientes principalmente carbono, nitrógeno y fósforo, para ser utilizados en otras partes de la planta. La muerte celular sólo ocurre cuando se ha completado la remoción de las macromoléculas (7, 11, 13, 18).

El desarrollo del programa de senescencia involucra dos fases. Durante la primera, las células permanecen viables, se modifica la expresión de determinados genes y aunque se evidencian cambios en la estructura subcelular es factible revertir el proceso. La fase final, de naturaleza irreversible, concluye con la muerte celular y se caracteriza por la aparición de marcadores morfológicos y bioquímicos similares a los observados en otros procesos de muerte celular programada (13, 17, 20).

Se ha informado que las principales enzimas responsables de la movilización de nitrógeno en tejidos senescentes como parte de mecanismos de supervivencia pertenecen a la familia de las cisteín proteasas (9, 13, 16).

En frutos de tomate, Schaffer y Fischer (21, 22) estudiaron la presencia de proteasas en respuesta al estrés causado por temperatura. Observaron que se acumula el C14-ARNm que codificaría para una cisteín proteasa de la familia de la papaína, cuya función estaría relacionada con la degradación de polipéptidos desnaturalizados por exposición a altas y bajas temperaturas.

Diversos autores coinciden en manifestar que, en arveja, los factores que inducen la fructificación y desarrollo de los frutos controlan la actividad proteolítica y su localización (7, 9, 13).

Estudios realizados en tomate indican que durante el período en que se mantiene la sensibilidad a la aplicación de ácido giberélico (AG3), se incrementa la actividad proteolítica sobre azocaseína, los niveles de polipéptidos detectados con el anticuerpo contra papaína y la tiol proteasa C14, y en la expresión del gen C14 tiol-proteasa. Por el contrario, durante la etapa de desarrollo de los frutos fertilizados o tratados con AG3, se produce una disminución de estos parámetros (1, 2).

Durante el desarrollo de frutos de tomate obtenidos por autopolinización, el análisis de los niveles endógenos de hormonas evidencia dos picos de acumulación de giberelinas, que coinciden con la activación de la división celular temprana en la fase inicial de formación del ovario y con la expansión celular durante el desarrollo de frutos, en los que el crecimiento es máximo y los niveles de auxina decrecen (12, 15).

Es posible inducir la fructificación partenocárpica artificialmente por aplicación de reguladores de crecimiento en la pared del ovario de flores emasculadas. El tratamiento consiste en provocar la acumulación de reguladores en niveles adecuados para permitir el proceso de división y agrandamiento celular que conduce al establecimiento y desarrollo de frutos, aun antes de lo que ocurriría en ovarios autopolinizados (4, 10, 12, 19).

Objetivo

- Analizar la localización de proteasas y los cambios anatómicos asociados a los procesos de fructificación o senescencia que se producen durante la etapa temprana del desarrollo de los frutos de tomate obtenidos por polinización natural o por tratamiento con AG3.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cultivar Rutgers. El cultivo se desarrolló en una cabina de invernadero con temperatura controlada que, de acuerdo con las condiciones ambientales, fluctuó estrictamente entre 12 a 30°C y un fotoperíodo de 16 horas. Las plantas se regaron con solución nutritiva de Hoagland N° 1 que contiene los oligoelementos de Hewitt (14). La conducción del cultivo se realizó a un solo tallo eliminando los brotes laterales.

En los ensayos se utilizaron únicamente cinco flores de las tres primeras inflorescencias, eliminándose el resto. La tercera flor de cada inflorescencia se empleó para la obtención de frutos en desarrollo, ya fuera permitiendo la polinización natural o induciendo la fructificación partenocárpica por aplicación de 20 µl de AG3 preparado en 0,1% Tween 20 a flores emasculadas obtenidas por eliminación de pétalos y estambres dos días antes de la antesis. El resto de las flores se emascularon a efectos de permitir el desarrollo de solamente un fruto por racimo. Los tratamientos hormonales se realizaron a 0 días post antesis (dpa), registrándose el momento de aplicación hormonal o la fecha de antesis como día cero del período de desarrollo de los frutos partenocárpicos o polinizados, respectivamente.

El material vegetal destinado a la caracterización anatómica del pericarpio se fijó en forma periódica en FAA (alcohol etílico:agua destilada:formol:ácido acético glacial, 10:7:2:1). En una etapa posterior, el material fue deshidratado en una serie de etanol-alcohol terbutílico (TBA) hasta llegar al 100% de TBA y se incluyó en Paraplast (parafina sintética insoluble en agua). Las secciones de 10 µm de espesor fueron obtenidas con un micrótopo rotatorio tipo Minot, se tiñeron con safranina en etanol 50% y se montaron en Bálsamo de Canadá (8).

La caracterización anatómica del pericarpio se realizó por observación microscópica considerando número y espesor del pericarpio. Se utilizó como indicador del número de capas celulares, el número de células presentes en la parte media de la hoja carpelar entre la superficie del fruto y la capa más interna del mismo (23).

Para los valores asumidos por las variables espesor y número de capas celulares del pericarpio se realizó un análisis de la varianza y posteriormente un test de comparación de medias (Tukey, $p < 0,0002$) para cada tratamiento.

Para los estudios de localización inmunohistoquímica de proteasas, el material se fijó en p-formaldehído 4%. La inmunolocalización de proteasas se llevó a cabo empleando anticuerpos policlonales obtenidos en conejo contra papaína de *Carica papaya* como antígeno (6) y antirabbit-IgG-alkaline phosphatase (Boehringer, Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) como segundo anticuerpo. El revelado se realizó empleando nitro blue tetrazolium (NBT) y bromo-cloro-indolyl-fosfato (BCIP) (Boehringer, Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), como sustrato de la fosfatasa alcalina. Se analizaron ovarios y frutos en desarrollo de 0, 8 y 14 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previamente se observó que en ovarios no polinizados del cv. Rutgers fue posible inducir el desarrollo partenocárpico de frutos por aplicación de AG3 hasta por lo menos 13 dpa. Estos resultados indicarían que el estadio fisiológico de los ovarios corresponde a la etapa reversible de la senescencia (1, 3).

El análisis del rol que poseen ciertas proteasas y particularmente algunas tiol-proteasas en la regulación de los posibles destinos del ovario de tomate -senescencia o desarrollo del fruto- evidenció que los anticuerpos contra papaína permitían detectar una banda de 58 kDa cuyos niveles se incrementaban en ovarios no polinizados y desaparecía gradualmente durante la etapa temprana del desarrollo de los frutos (1, 2).

Con el objeto de analizar la localización histológica de estas proteasas y su vinculación con los cambios anatómicos asociados a estos procesos, se realizaron estudios de inmunolocalización de proteínas relacionadas antigénicamente con papaína, en cortes de tejido provenientes de ovarios no polinizados o frutos en desarrollo recolectados a 0 y 8 dpa.

Como se observa en la foto 1 (pág. 61), el patrón de respuesta fue similar al verificado en extractos de tejidos al analizar la evolución de proteasas (1, 2). En los ovarios no polinizados la señal se localizó principalmente en la epidermis del pericarpio, mientras que en los frutos obtenidos por polinización natural o aplicación de AG3, la marcación fue prácticamente nula.

Es importante destacar que, a pesar de la acumulación de proteínas relacionadas antigénicamente con la proteasa papaína, los ovarios no polinizados de 8 dpa no mostraron signos de deterioro celular, lo cual estaría de acuerdo con el estadio fisiológico correspondiente a la etapa reversible de la senescencia.

Estos resultados sugerirían un control hormonal de la actividad de ciertas tiol-proteasas y de su localización en los ovarios de tomate durante los procesos alternativos de fructificación o senescencia.

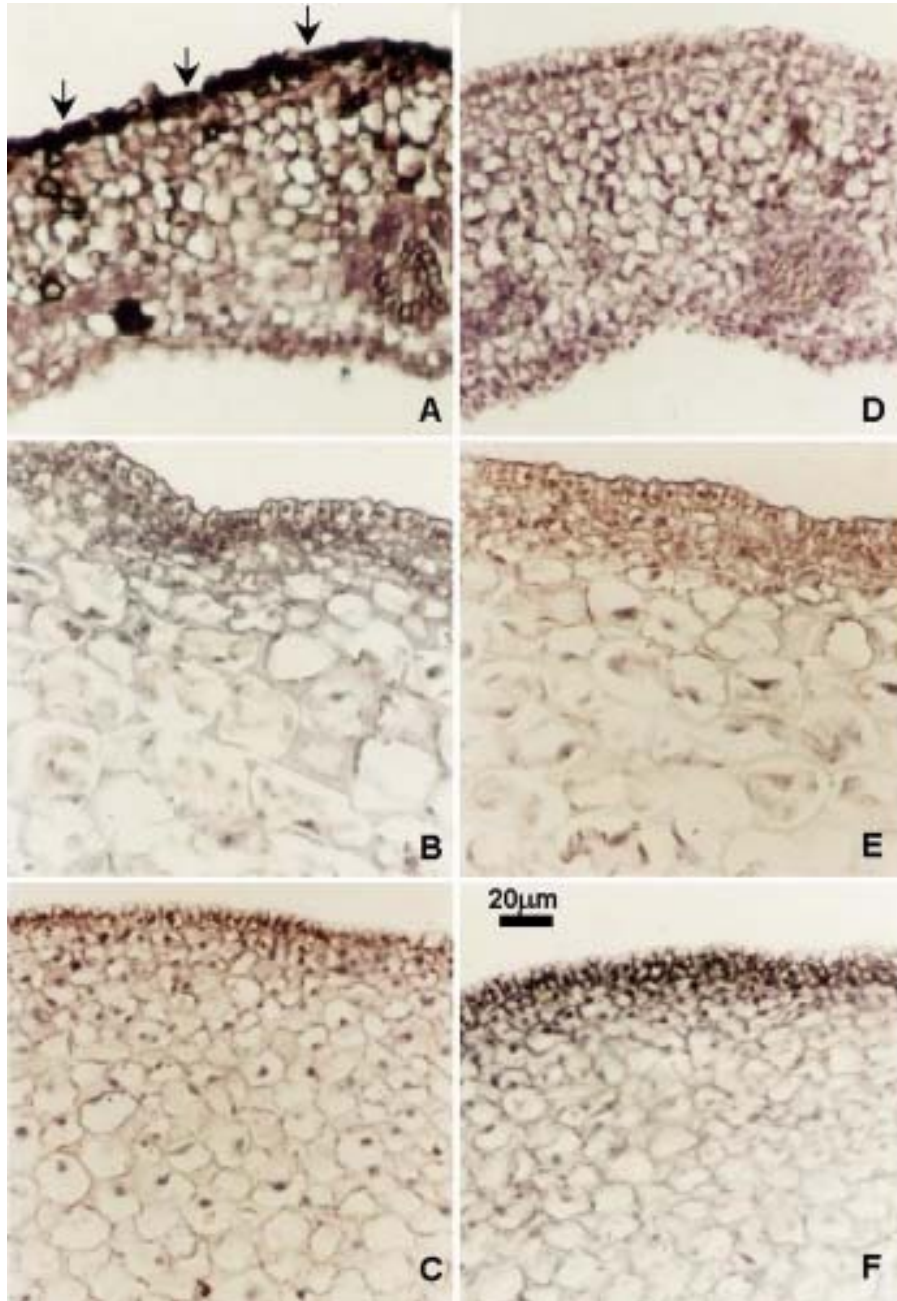


Foto 1. Inmunolocalización de proteínas con anticuerpos contra papaína en cortes transversales de ovarios no polinizados (A, D), frutos en desarrollo por tratamiento con AG3 (B, E) o por autopolinización (C, F), recolectados luego de 8 días de desarrollo. A, B, C: suero antipapaína. D, E, F: control, suero preinmune. La flecha indica la localización de proteínas relacionadas antigénicamente con la proteasa papaína.

Se analizaron además los cambios anatómicos producidos en los ovarios no polinizados y frutos en desarrollo tras el tratamiento hormonal, realizándose recuento de número y espesor de las capas celulares que conforman la pared de los carpelos, tal como se muestra en la siguiente tabla.

Evaluación del espesor y número de capas celulares del pericarpio de ovarios no polinizados recolectados a 0 y 8 dpa (E0 y E8), frutos de 8 días de desarrollo obtenidos por polinización natural (P8) o por aplicación de 100 ppm de AG3 (G8).

Tratamiento	Espesor	Capas	n
E0	90,96 ± 12,80 a	11,20 ± 1,20 a	10
E8	165,22 ± 14,44 a	12,91 ± 2,11 a	10
P8	427,66 ± 64,86 c	22,13 ± 2,60 b	11
G8	763,46 ± 139,00 b	25,90 ± 6,30 b	13

La comparación de medias se realizó aplicando el test de Tukey ($p < 0,0002$)

Los ovarios provenientes de flores emasculadas recolectados hasta 8 dpa presentaron prácticamente el mismo número de capas celulares en las hojas carpelares, mientras que el espesor del pericarpio se incrementó en aproximadamente el 50%. Analizando en forma conjunta la evolución del peso fresco de los ovarios no polinizados informados previamente (1, 2, 3) y cotejando con estas observaciones, es posible indicar que el desarrollo en esta fase se relacionaría, a nivel celular, con la etapa de agrandamiento celular.

En los frutos polinizados, el estímulo hormonal endógeno proveniente de la polinización natural indujo un incremento en el espesor del pericarpio aun mayor que en ausencia de estos estímulos: a los 8 días el espesor resultó cuatro veces superior y el número de capas celulares se duplicó, por lo que este aumento se debería no sólo a agrandamiento celular sino también a división.

Los frutos partenocárpicos de 8 días de desarrollo obtenidos por aplicación exógena de AG3, en comparación con los frutos resultantes de la autopolinización, mostraron un notable incremento en el espesor, aunque el número de capas no se diferenció significativamente. El efecto de las giberelinas sobre el número de capas sería el equivalente al producido por el balance hormonal endógeno desencadenado por la polinización, mientras que a nivel del agrandamiento celular el efecto fue más pronunciado.

Se analizó además si estas tendencias se mantenían a lo largo del desarrollo de los frutos partenocárpicos. A los 14 días de desarrollo, los frutos partenocárpicos obtenidos por aplicación de giberelinas presentaron un mesocarpio conformado por células más alargadas que sus análogas de frutos con semillas, haciéndose más pronunciadas las diferencias hacia el interior del lóculo (foto 2, pág. 63).

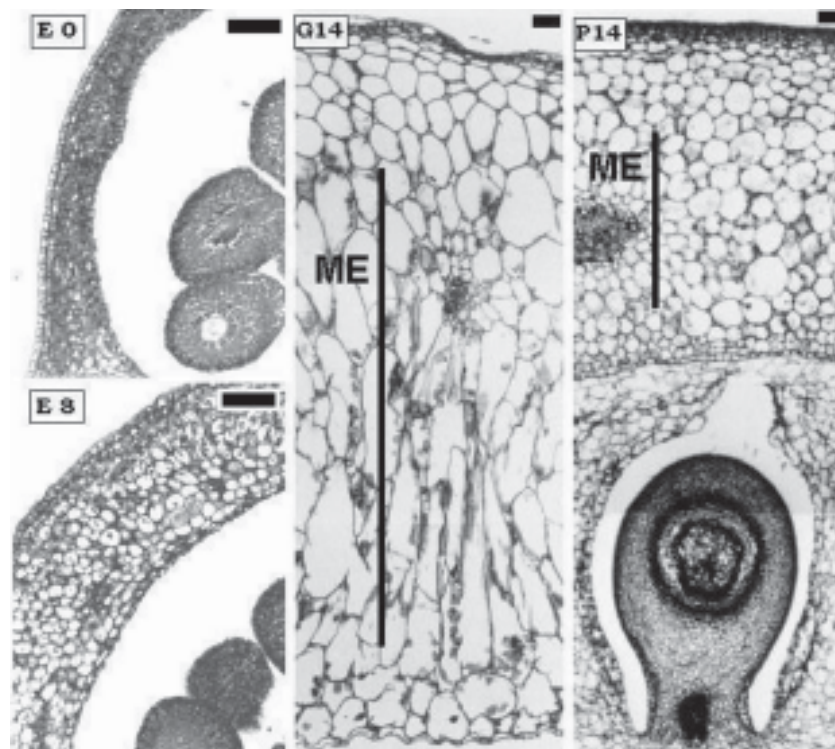


Foto 2. Microfotografías de cortes transversales de ovarios no polinizados recolectados a 0 y 8 dpa (E0 y E8), frutos de 14 días de desarrollo obtenidos por aplicación de 100 ppm de AG3 (G14) o por polinización natural (P14). Se observa mayor elongación de las células del mesocarpio (ME) en los frutos partenocárpico de 14 días de desarrollo (G14).

En base a estas observaciones y considerando lo informado por Gillaspay et al. (12), el mayor agrandamiento de las células del mesocarpio se relacionaría con el momento en que se efectuaron los tratamientos con AG3. En los frutos polinizados, este momento correspondería al segundo pico de acumulación de giberelinas durante la fase de expansión celular.

Es de remarcar que a pesar de este notable aumento inicial en el espesor del pericarpio inducido por la aplicación de AG3, al alcanzar el tamaño final, los frutos no evidenciaron diferencias significativas en el espesor del pericarpio ni en el número de capas celulares que lo conforman.

De acuerdo con lo caracterizado previamente para este cultivar (5), el tamaño final de los frutos tratados con AG3 fue considerablemente menor en comparación con los autopolinizados, lo cual podría estar relacionado con la contracción de los lóculos producida por la ausencia de placentas y semillas, más que a diferencias en la constitución de las paredes del carpelo.

CONCLUSIONES

- ❖ Los resultados obtenidos indicarían que en los ovarios no polinizados de tomate, la expresión y/o actividad de proteasa/s de la familia de la papaína es regulada temporal y espacialmente durante los procesos alternativos de senescencia o fructificación.
- ❖ El estadio fisiológico de los ovarios no polinizados a los 8 días de desarrollo correspondería a la etapa reversible de la senescencia, no observándose signos de deterioro celular a pesar de la acumulación de polipéptidos relacionados antigénicamente con la papaína, en la epidermis del pericarpio.
- ❖ El proceso de fructificación desencadenado por aplicación de AG3, en comparación con los obtenidos por polinización natural, se relaciona a nivel celular con una mayor elongación de las células del mesocarpio sin alterar significativamente el número de capas celulares que conforman el pericarpio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agüero, M. S. 2003. Fructificación partenocárpica en tomate: Efecto del ácido giberélico sobre la proteólisis. Tesis de Doctorado. Biblioteca Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires. 165 p.
2. _____; Granell, A.; Carbonell, J. 1996. Expression of thiol proteases decreases in tomato ovaries after fruit set induced by pollination or gibberellic acid. *Physiol. Plant.* 98: 235-240.
3. Alabadí, D.; Agüero, M. S.; Pérez-Amador, M. A.; Carbonell, J. 1996. Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase and polyamines in tomato ovaries. *Plant Physiol.* 112: 1237-1244.
4. Bohner, J.; Bangerth, F. 1988. Effects of fruits sequence and defoliation on cell number, cell size, and hormone levels of tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.) within a truss. *Plant Growth Regul.* 7: 141-155.
5. Castillo, O. E.; Barral, G.; Rodríguez, G. E.; Miguelisse, N. E.; Agüero, M. S. 2005. Establecimiento y desarrollo en el cultivo forzado de tomate: Efecto de fitoreguladores. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNCuyo.* 37(2) 83-91.
6. Cercós, M.; Carbonell, J. 1993. Purification and characterization of a thiol-protease induced during senescence of unpollinated ovaries of *Pisum sativum*. *Physiol. Plant.* 88: 267-274.
7. _____; Santamaría, S.; Carbonell, J. 1999. Cloning and characterization of TPE4A, a thiol-protease gene induced during ovary senescence and seed germination in pea. *Plant Physiol.* 119: 1341-1348.
8. D'Ambrogio de Argüeso, A. 1986. Manual de técnicas en Histología Vegetal. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. 83 p.
9. Drake, R.; John, I.; Farrel, A.; Cooper, W.; Schuch, W.; Grierson, D. 1996. Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* 30: 755-767.
10. Fos, M.; Proaño, K.; Alabadí, D.; Nuez, F.; Carbonell, J.; García-Martínez, J. L. 2003. Polyamine metabolism is altered in unpollinated parthenocarpic pat-2 tomato ovaries. *Plant Physiol.* 131: 359-366.
11. Gan, S.; Amasino, R. M. 1997. Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol.* 113: 313-319.
12. Gillaspay, G.; Ben-David, H.; Gruissem, W. 1993. Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell* 5: 1439-1451.
13. Granell, A.; Harris, N.; Pisabarro, A.; Carbonell, J. 1992. Temporal and spatial expression of a thiolprotease gene during pea ovary senescence, and its regulation by gibberellin. *Plant J.* 2: 907-915.

Inmunolocalización de proteasas y cambios anatómicos en tomate

14. Hewitt, E. J. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. 2nd. ed. Famham Royal, Bucks, Commonwealth Agricultural Bureaux.
15. Ho, L. C. 1996. Tomato. In: Zamski, E.; Schaffer, A. A. Photoassimilate distribution in plants and crops, source-sink relationships. Eds. Marcel Dekker, Inc. New York. 30: 709-728.
16. Ho, S. L.; Tong, W.-F.; Yu, S.-M. 2000. Multiple mode regulation of a cysteine proteinase gene expression in rice. *Plant Physiol.* 122: 57-66.
17. Orzáez, D.; Granell, A. 1997. DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in *Pisum sativum*. *Plant J.* 11: 137-144.
18. Pennell, R. I.; Lamb, C. 1997. Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 9: 1157-1168.
19. Picken, A. J. F. 1984. A review of pollination and fruit set in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. Hortic. Sci.* 59: 1-13.
20. Sánchez-Beltrán, M. J.; Carbonell, J.; García-Martínez, J. L.; López-Díaz, I. 1992. Gene expression during two alternative pathways of ovary development in *Pisum sativum*: fruit development and ovary senescence. *Physiol. Plant.* 85: 476-482.
21. Schaffer, M.; Fischer, R. L. 1988. Analysis of mRNAs that accumulate in response to low temperature identifies a thiol protease gene in tomato. *Plant. Physiol.* 87: 431-436.
22. _____; Fischer, R. L. 1990. Transcriptional activation by heat and cold of a thiol protease gene in tomato. *Plant Physiol.* 93: 1486-1491.
23. Takeno, K.; Ise, H.; Minowa, H.; Dounowaki, T. 1992. Fruit growth induced by benzyladenine in *Cucumis sativus* L.: Influence of benzyladenine on cell division, cell enlargement and indole-3-acetic acid content. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 60: 915-920.



**Doctor
Germán Mendivelzúa
1912 - 1982**

**Primer Profesor Titular
Cátedra de Química Orgánica y Biológica
Facultad de Ciencias Agrarias
(1941)**

Nació en el Barrio de Palermo, Buenos Aires, el 25 de abril de 1912. Sus padres fueron Germán Mendivelzúa y Amparo Rodríguez y tuvo una sola hermana, llamada Helena.

Cursó los estudios primarios en la escuela N° 5, Distrito escolar 14 de Capital Federal, y los secundarios también los realizó en Buenos Aires. Se recibió de Doctor en Química el 1 de marzo de 1940 en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Destacado estudiante e inquieto investigador, en 1933 obtuvo el premio Enrique Herrero Ducloux por su trabajo: *Estudio sobre la síntesis de la di-metoxi-difenil-alanina*, distinción que recibió de manos del Dr. Bernardo Houssay (futuro Premio Nobel de Medicina y Fisiología, 1947), quien en ese momento se desempeñaba como Director del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de Buenos Aires.

Poco tiempo después viajó a Mendoza contratado como técnico por la empresa Caico, de Bunge y Born, que industrializaba subproductos de la uva. Hizo importantes avances en los estudios cromatográficos en vinos.

Contrajo matrimonio con Elba Mercader el 5 de abril de 1940 y tuvieron dos hijos: Jorge (1942) y Ana Inés (1944).

En abril de 1941 fue contratado por la Facultad de Ciencias Agrarias (entonces Escuela de Agronomía) para desempeñar el cargo de Profesor Titular de la Cátedra de Química Orgánica, función que desempeñó hasta 1948. Luego reemplazó al Ing. Giovanni Garoglio en la Cátedra de Industrias Agrarias, hasta octubre de 1953.

Falleció en Buenos Aires, el 1 de abril de 1982.

F. A. Melis

Fuentes:
Archivos de la Facultad de Ciencias Agrarias.
Entrevista a Jorge Mendivelzúa (hijo).