

MACHÍN-SUARÉZ, A; CHÁVEZ-SÁNCHEZ, E; HÉCTOR-ARDISANA, EF; SANTOS-CERVANTES, ME; PÉREZ ÁLVAREZ, S. 2017. Actividad de enzimas del estrés oxidativo en plantas de tomate cv. Amalia en respuesta al plomo. *Horticultura Brasileira* 35: 216-223. DOI - <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620170210>

Actividad de enzimas del estrés oxidativo en plantas de tomate cv. Amalia en respuesta al plomo

Alianna Machín Suárez¹; Esteban Sánchez-Chávez²; Eduardo F Héctor Ardisana³; María E Santos-Cervantes⁴; Sandra Pérez Álvarez⁴

¹Universidad Agraria de la Habana “Fructuoso Rodríguez Pérez”, Mayabeque, Cuba; alianne_machin@unah.edu.cu; ²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC, Unidad Delicias, Cd. Delicias, Chihuahua, Mexico; esteban@ciad.mx; ³Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador; hectorardisana@gmail.com; ⁴Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, Guasave, Sinaloa, México; perezalvarezsandra2015@gmail.com (autor para correspondencia)

RESUMEN

La contaminación de los suelos por metales pesados es un resultado de la actividad humana, agricultura e industria. Entre los metales pesados el plomo es un contaminante potencial que en las plantas ocasiona numerosos síntomas de toxicidad como por ejemplo, crecimiento atrofiado, ennegrecimiento del sistema radical y clorosis generalizada. La actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) y glutatión reductasa (GR; EC 1.8.1.7) se determinaron en hojas y tallos de plantas de tomate cv. Amalia utilizando tres concentraciones de plomo (PbAc₂) (0, 50 y 100 mg/kg). Las plantas de tomate se sembraron en el periodo de septiembre-diciembre del 2010 en condiciones de invernadero, las aplicaciones del metal se realizaron dos veces por semanas a partir de la aparición de la primera hoja verdadera y hasta el comienzo de la fase reproductiva, momento en el cual se colectaron las muestras para las evaluaciones. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas entre los diferentes tratamientos en las hojas y en el tallo el contenido de proteínas fue menor en la máxima concentración de PbAc₂. En hojas y tallos, con 50 mg/kg de PbAc₂ se obtuvo la mayor actividad para ambas enzimas evaluadas sin embargo en el tallo no existieron diferencias significativas con esta concentración. En el tallo se observó una menor actividad de la SOD a la mayor concentración utilizada (100 mg/kg de PbAc₂) siendo significativamente diferente con el control y 50 mg/kg de PbAc₂. La tinción de las enzimas antioxidantes estudiadas en un gel de poliacrilamida (PAGE) mostró tres isoformas de SOD (una Mn-SOD y dos Fe-SOD) tanto en tallo como en hojas y cuatro isoformas de GR en hojas y tres en el tallo. La expresión relativa de la SOD fue analizada mediante la PCR en tiempo real encontrándose tanto en las hojas como en el tallo una mayor expresión a 100 mg/kg de PbAc₂. La cv. Amalia con 50 mg/kg de PbAc₂ activa su sistema de defensa antioxidante protegiendo a la planta de los daños que el metal pesado plomo pudiera causar.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*, metales pesados; superóxido dismutasa, glutatión reductasa, isoenzimas.

ABSTRACT

Enzyme activity of oxidative stress in tomato plants cv. Amalia in response to lead

Contamination of soils by heavy metals is a result of human activity, agriculture and industry. Among heavy metals, lead is a potential pollutant that in plants causes numerous symptoms of toxicity such as stunted growth, blackening of the root system and generalized chlorosis. The activity of superoxide dismutase enzyme (SOD; EC 1.15.1.1) and glutathione reductase (GR; EC 1.8.1.7) were determined in leaves and stem of tomato plants cv. Amalia using three lead (PbAc₂) concentrations (0, 50 and 100 mg/kg). Plants were sown in the period from September to December 2010 at greenhouse conditions, metal was applied twice a week since the first true leaf appeared until reproductive phase beginning, time at which samples were collected for evaluations. Significant differences were not found in protein concentration between treatments on leaves; its content in stems was reduced under the maximum concentration of PbAc₂. In leaves and stems the higher activity for both enzymes was at 50 mg/kg of PbAc₂, however no significant differences were found in stems. In stems a less activity of SOD was observed at the higher concentration used (100 mg/kg of PbAc₂) being significant different with the control and 50 mg/kg of PbAc₂. Staining of the antioxidant enzymes studies on polyacrylamide gel (PAGE) showed three different SOD isoforms in leaves and stems (one Mn-SOD and two Fe-SOD) and four GR isoforms in leaves and three in stems. The relative expression of SOD was analyzed with Real Time PCR and a higher expression at 100 mg/kg of PbAc₂ was found in leaves and stems. The cv. Amalia at 50 mg/kg of PbAc₂ activate its antioxidant defense system protecting plant from the damage that lead heavy metal could produce.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, heavy metals, superoxide dismutase, glutathione reductase, isoenzymes.

Received on April 6, 2016; accepted on November 11, 2016

El estudio de las interacciones planta-metales pesados contribuye a la seguridad ambiental y a reducir los riesgos asociados con la introducción

de trazas de metales en la cadena alimenticia. Entre estos metales se incluyen aluminio, cadmio, zinc, cobre, manganeso, níquel y plomo (Bidar *et*

al., 2007).

El plomo (Pb) y otros metales pesados son tóxicos para plantas, animales y seres humanos y concentraciones

excesivas suprimen en las plantas el metabolismo y la translocación de materiales de reserva para zonas en desarrollo y su subsecuente utilización. Muchos productos como la gasolina, las baterías de autos, los fertilizantes, las pinturas y otros que contienen Pb son indispensables para la vida humana, por lo cual la contaminación de los suelos con este metal no disminuirá en un futuro cercano (Yan *et al.*, 2009).

Las plantas presentan un intervalo amplio de mecanismos de protección celular para eliminar las moléculas reactivas de oxígeno (ROS, del Inglés Reactive Oxygen Species) o controlar su exceso antes de causar daños al metabolismo y la estructura celular. Este sistema de defensa incluye componentes antioxidantes enzimáticos como catalasas (CAT), peroxidasas, superóxido dismutasas (SOD) y las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión como la ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR) (Thirupathi *et al.*, 2011). Pero los mecanismos bioquímicos y moleculares activados o desactivados por acción de los metales se han estudiado sólo parcialmente.

En esta importante hortaliza se han desarrollado diversos estudios relacionados con los metales pesados analizando fundamentalmente raíces y hojas. Akinci *et al.* (2010) observaron que en plantas de tomate que crecían en concentraciones de Pb de 300 mg/L podían acumularse 1022, 1750 y 2520 mg/kg de Pb en brotes, hojas y raíces, respectivamente cantidades que provocan daños oxidativos en el cultivo. Gratão *et al.* (2008) estudiaron el estrés oxidativo en plantas de tomate cv. Micro Tom expuestas a diferentes concentraciones de cadmio encontrado cambio en las enzimas estudiadas (CAT, guayacol peroxidasa-GPOX, GR y SOD) a medida que la concentración del metal aumentaba en raíces, hojas y frutos. Wang *et al.* (2008) en hojas de tomate expuestas a concentraciones de Pb de 0 y 500 mg/kg hallaron un aumento en la SOD a medida que la biodisponibilidad del metal se incrementaba.

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los vegetales más cultivados y en Cuba es la principal hortaliza y

se consume en fresco o en conservas. El cultivar Amalia presenta buen comportamiento agromorfológico y buen rendimiento agrícola (10 t/ha) al compararla con cultivares como Campell-28 y Claudia entre otras por lo que es uno de los cultivares más sembrados en el país (Amador & Rodríguez, 2012), pero el tomate se considera una planta hiperacumuladora (Lin-Yan *et al.*, 2009) por lo que resulta relevante desarrollar este estudio por primera vez en esta variedad teniendo en cuenta que los niveles del metal pesado Pb en suelos cubanos (36-44 mg/kg) (Sobrinho *et al.*, 2013) sobrepasa los umbrales informados en la literatura internacional (Ballesta *et al.*, 2010).

El objetivo de este estudio fue evaluar en plantas de tomate cv. Amalia el efecto del metal pesado plomo en la actividad de dos enzimas antioxidantes claves en el estrés oxidativo. Esta investigación permitirá además comprender mejor las respuestas específicas de las isoenzimas las cuales podría utilizarse como marcadores de los niveles de plomo lo cual no es posible si solamente se determina la actividad total de las enzimas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las semillas de plantas de tomate cv. Amalia se sembraron en bandejas que contenían una mezcla 1:1 (v/v) de vermiculita suplementada con NPK (nitrógeno, fósforo y potasio) 10:10:10 (g) y un producto comercial (Plantmax HT Eucatex, Sao Paulo, Brasil) al 2% peso:volumen. La siembra se realizó en el período comprendido entre septiembre del 2010 y diciembre del 2011 en un invernadero ubicado en la Universidad de Sao Paulo/Escuela Superior de Agricultura, Brasil. Después de aparecer el primer par de hojas verdaderas las plántulas se trasplantaron a recipientes Leonard de 1 L (unidad experimental) conteniendo arena y se establecieron tres tratamientos (0, 50 y 100 mg/kg de acetato de plomo, PbAc₂) con tres repeticiones cada uno. Estas concentraciones de plomo se utilizaron teniendo en cuenta que las concentraciones de este metal en la

superficie de los suelos en el mundo varían entre 10 y 67 mg/kg (Pendias & Pendias, 2001).

Las soluciones de PbAc₂ se aplicaron a las plantas de tomate a razón de 50 mL dos veces por semana hasta que comenzó la fase reproductiva (16 veces en 60 días) comenzando el día del trasplante; culminadas las aplicaciones se colectaron hojas y tallos como representativos de la fase vegetativa (crecimiento y desarrollo), se lavaron con agua desionizada y se almacenaron separadamente a -80°C para posteriores análisis.

Extracción y análisis de enzimas antioxidantes

Para la determinación enzimática se trabajó a 4°C. Hojas y tallos separadamente fueron homogenizadas en un mortero con 100 mM de buffer de potasio (pH 7.5) conteniendo 1 mM ácido etilendiamintetracético (EDTA), 3 mM DL-ditioneitol y 5% (P/V) de PVPP a razón de 2:1 (volumen del tampón/peso fresco). Las muestras fueron centrifugadas 30 min a 10.000 x g y el sobrenadante se almacenó en alícuotas separadas a -80°C (Azevedo *et al.*, 1998).

Determinación de la actividad de la GR

La actividad de la GR (EC 1.8.1.7) se determinó espectrofotométricamente a 30°C en una mezcla que contenía 3 mL de 100 mM del buffer de fosfato de potasio (pH 7.5) con 1 mM de ácido nitrobenzoico, 1 mM de GSSG y 0.1 mM de NADPH. La reacción comenzó con la adición de 50 µL del extracto vegetal. El valor de la reducción de la GSSG se monitoreó mediante el incremento de la absorbancia a 412 nm por 2 min (Gomes-Junior *et al.*, 2006a). La actividad de la GR se expresa en µmol/min/mg de proteína.

Determinación de la actividad de la SOD

La actividad de la SOD (EC 1.15.1.1) se determinó al monitorear la inhibición de la reacción fotoquímica del nitro azul tetrazolium (NBT) (Beyer & Fridovich, 1987), donde una unidad de actividad SOD se definió como la cantidad de enzima necesaria para provocar 50% de

la inhibición de la reducción del NBT monitoreado a 560 nm. La actividad de la SOD se expresa en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

Para todas estas determinaciones se empleó un espectrofotocolorímetro modelo Ray Leigh UV-2601 (República Popular de China).

Electroforesis en gel de poliacrilamida

El análisis electroforético se desarrolló en un gel de poliacrilamida al 8% no-desnaturalizado y una constante de 20 mA/gel durante 4 h. Cantidades iguales de proteínas (60 mg) se cargaron en cada línea del gel (Gomes-Junior *et al.*, 2007).

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de las proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina bovina (BSA) como estándar.

PCR en tiempo real

Como procedimiento molecular se realizó la extracción del ARN total utilizando el mini Kit para plantas GeneElute™ (Sigma-Aldrich®), y la concentración del ARN fue determinada utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000, Thermo Scientific, USA).

La primera cadena de ADNc se sintetizó con el sistema a SuperScript™ (Invitrogen life technologies). Se realizó una PCR (Termociclador Applied Systems 2720, USA) con un ciclo a 42°C por 5 min, 50°C por 50 min y 70°C por 15 min.

La expresión diferencial del gen que codifica para la SOD se analizó por PCR en tiempo real. Los cebadores se diseñaron con el programa Primer Express 2.00 (Applied Biosystems Software), con base a secuencias seleccionadas de la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI).

Para el PCR en tiempo real se utilizó Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMIX-UDG (Invitrogen, USA) y un programa con ciclos estándar para instrumentos ABI. El programa empleado fue un ciclo a 95°C por 15 min, 40 ciclos a 95°C por 15 min, 60°C por 60 min y finalmente un ciclo a 95°C

por 15 min y 60°C por 60 min.

Las condiciones de la reacción (volumen de 10 mL) se optimizaron para incrementar la eficiencia del PCR cambiando las concentraciones de los cebadores y la temperatura de hibridación para minimizar la formación de dímeros. La ausencia de cebadores-dímeros o la acumulación de productos inespecíficos se comprobó mediante una curva de fusión. La eficiencia del PCR se determinó utilizando una curva estándar con diluciones en serie del ADNc usando la Ubiquitina como gen de referencia. El gen de mantenimiento Ubiquitina también se utilizó como referencia interna para la normalización de los genes. Cada muestra se analizó por triplicado. La expresión génica se calculó utilizando el método delta-delta CT ($\Delta\Delta\text{CT}$) (Livak & Schmittgen, 2001).

Al principio, los ciclos umbral (CT) de los resultados triplicados de la PCR en tiempo Real de cada gen se promediaron y se usaron para la cuantificación de los transcritos. Luego el promedio de los valores CT del gen Ubiquitina (UBQ5) se sustrajo de la media del valor de CT del gen diana para obtener el valor ΔCT . El valor $2\Delta\Delta\text{CT}$ permite estimar la tasa de la expresión relativa de cada gen. Una desviación estándar fue dada a cada valor y los resultados fueron analizados por la prueba Tuckey. Un valor $P \leq 0.05$ fue considerado significativo.

Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar con tres niveles de PbAc₂ (0, 50 y 100), con tres repeticiones, y un total de 10 unidades experimentales. Con los datos se realizó un ANOVA de clasificación simple y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) usando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis bioquímico realizado mostró diferencias en la actividad de las enzimas antioxidantes estudiadas aunque no se observaron cambios o alteraciones en el fenotipo de las plantas (fotos no mostradas).

En los tratamientos analizados no se encontraron diferencias significativas en las hojas en cuanto al contenido de proteínas totales, pero en el tallo la mayor concentración (100 mg/kg) fue significativamente mayor que el control en un 135.1% y que el tratamiento con 50 mg/kg de PbAc₂ (136.59%), provocando una sensible disminución de la variable analizada en ambos tratamientos (0 y 50 mg/kg de PbAc₂) (Figura 1A y B). Este aumento en el contenido de proteínas solubles totales en la máxima concentración de PbAc₂ utilizada podría deberse a una saturación en los mecanismos de retención del Pb en el tallo, y consecuentemente la capacidad finita de este órgano para actuar como reservorio del metal (Abreu *et al.*, 2016), el cual continúa hacia las hojas, donde, aunque sin diferencias significativas el contenido de proteínas disminuyó en la máxima concentración probada. Mohan & Hosetti, (1997) plantean que el contenido de proteínas disminuye cuando el Pb se acumula (hojas) y a medida que la concentración del metal aumenta.

La actividad de la GR ante la presencia de diferentes concentraciones de PbAc₂ muestra un aumento en ambas partes de la planta analizada siendo significativa en las hojas (Figura 2A y B).

La actividad de la GR en las hojas mostró diferencias significativas para los tres tratamientos, con un aumento al usar 50 mg/kg de PbAc₂ de 157.8% comparado con el control, es decir, con esta concentración la actividad de la enzima responde al estrés por Pb, debido posiblemente a un requerimiento por glutatión en la forma reducida como un sustrato para la incorporación en fitoquelatinas o el ciclo del ascorbato-glutatión para remover el H₂O₂ (Gomes-Junior *et al.*, 2006b), sin embargo es necesario realizar investigaciones futuras sobre la síntesis de fitoquelatinas y otros sistemas antioxidantes incluyendo metabolitos como el glutatión, ascorbato y amino ácidos los que podrían verse alterados en respuestas al Pb (Sharma & Dubey, 2005).

En un estudio realizado en plantas de tomate a medida que aumentó la

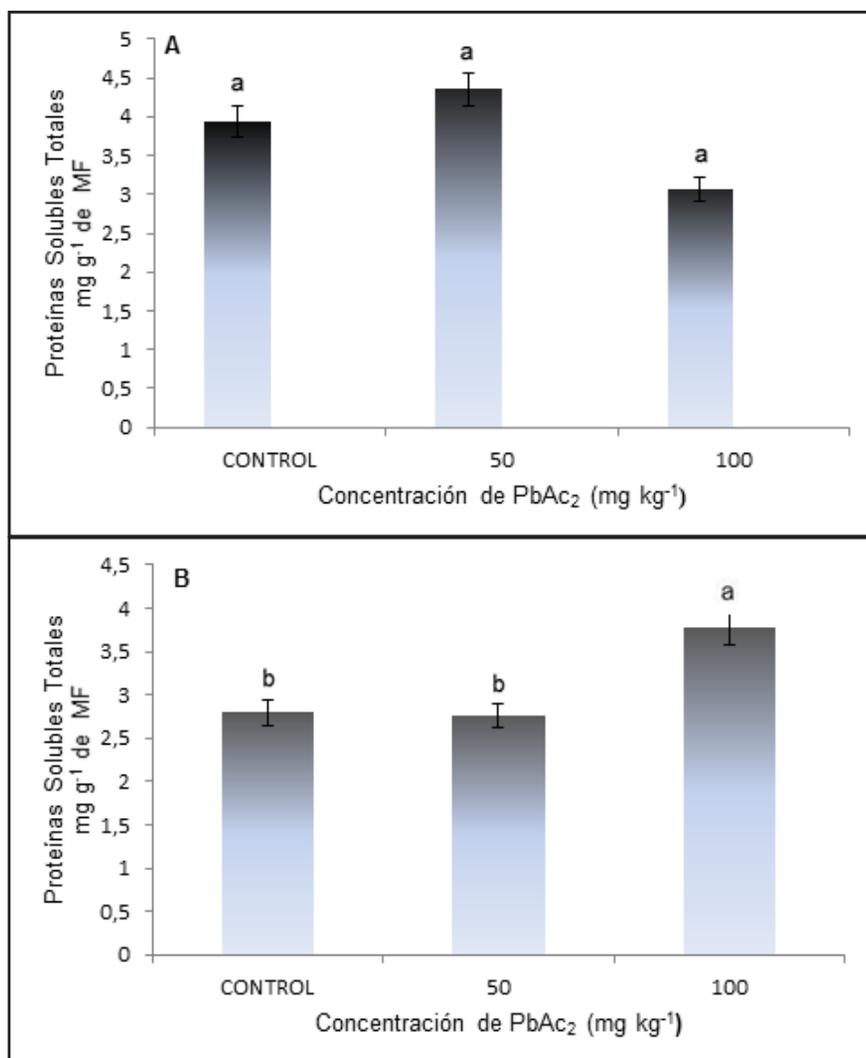


Figura 1. Proteínas solubles totales (mg/g de MF); A) proteínas hojas; B) proteínas tallos de *S. lycopersicum* cv. Amalia. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) {total soluble proteins (mg/g of MF); A) protein in leaves; B) protein in stems of *S. lycopersicum* cv. Amalia. Different letters indicated significant differences ($p \leq 0.05$)}. Piracicaba, ESALQ, 2010-2011.

concentración de plomo (100, 150 y 200 μM) aumentaron los niveles de GR en las hojas (Rady & Osman, 2012), resultados similares se obtuvieron en el mismo cultivo cv. Micro Tom donde la actividad de la GR aumentó en las hojas con la mayor concentración probada (10 mg/kg) (Pérez *et al.*, 2013), aunque en nuestro estudio en la mayor concentración se reduce la actividad de la enzima probablemente por la toxicidad del metal.

Resultados similares fueron obtenidos por Verma & Dubey (2003) en plantas de arroz (*Oryza sativa*) cultivadas en arena con concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ entre 0.5 y 1 mM donde tanto en hojas como en raíces obtuvieron

un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes como la Glutatión reductasa. También en plantas de *Atriplex hortensis* y *Atriplex rosea* se obtuvo que bajo condiciones de estrés causadas por Pb la actividad de la GR aumentó (Kachout *et al.*, 2009).

La presencia de estas enzimas en el control podría deberse a que aún en condiciones normales las plantas producen ROS, las cuales desempeñan una función clave en el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Bagjuz & Hayat, 2009).

La actividad de la SOD fue significativamente diferente en las hojas en todos los tratamientos probados (Figura 2C) siendo mayor la actividad a

50 mg/kg de PbAc_2 en 342.47% respecto al control, seguido por el tratamiento de 100 mg/kg que aumentó en un 227.40%, un resultado similar al obtenido por Ammar *et al.* (2008) en plantas de tomate donde con el metal pesado cadmio la mayor actividad de la enzima se obtuvo en las hojas comparado con la raíz. En tomate cv. Micro Tom Pérez *et al.* (2013) obtuvieron la mayor actividad de la enzima con 10 mg/kg, la máxima concentración utilizada teniendo en cuenta que este cultivar en menos de dos meses está fructificando, esto demuestra una vez más el papel detoxificante de la SOD.

El Pb indujo una mayor actividad de la SOD en las hojas, lo cual, según Lozano *et al.* (1996) puede deberse a que en situaciones de estrés aumenta la síntesis de esta proteína enzimática. Wang *et al.* (2008) señalan que la activación de esta enzima puede ser usada para mitigar el estrés por Pb.

En los tallos se encontraron diferencias significativas entre la máxima concentración de PbAc_2 (100 mg/kg) y los otros tratamientos (Figura 2D) encontrándose los menores valores de la enzima (43.43% menos que el control) en dicho tratamiento (100 mg/kg); mientras que con la menor concentración de Pb no hubo diferencias con el control.

En las hojas el comportamiento de ambas enzimas fue similar aumentando en la concentración de 50 mg/kg y disminuyendo en la máxima concentración utilizada del metal demostrado que esta concentración para esta variedad de tomate es tóxica pues inhibe o reduce la actividad de ambas enzimas.

En el tallo no se observaron diferencias significativas en la actividad de la GR y si en la actividad de la SOD siendo mucho menor en esta última en la máxima concentración probada, este comportamiento se debe a que ambas enzimas tienen funciones diferentes para combatir el estrés oxidativo, la SOD se identifica como una protectora enzimática contra las reacciones de peroxidación que ocurren en la planta (Monk *et al.*, 1989) y la GR es un componente indispensable de la vía enzimática ascorbato-glutatión

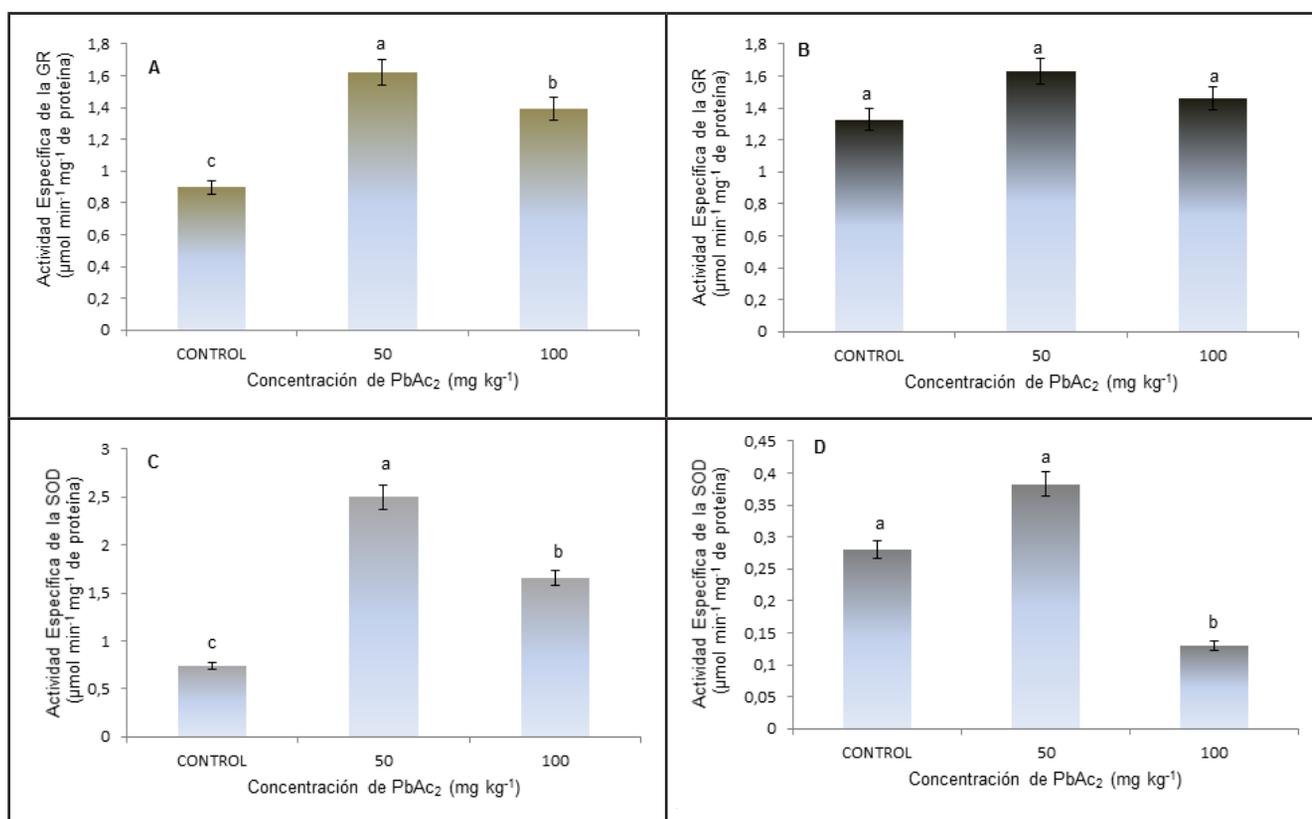


Figura 2. Actividad de enzimas ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína); A) GR hojas, B) GR tallos, C) SOD hojas, D) SOD tallos de *S. lycopersicum* cv. Amalia. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) {enzymes activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein); A) GR in leaves, B) GR in stems, C) SOD in leaves, D) SOD in stem of *S. lycopersicum* cv. Amalia. Different letters indicated significant differences ($p \leq 0.05$)}. Piracicaba, ESALQ, 2010-2011.

para eliminar el H_2O_2 que se produce fundamentalmente en los cloroplastos para mantener el estado redox de la célula (Asada, 1992), indicando que la función mayoritaria de la GR es en las hojas.

La actividad de la SOD y la GR en los extractos de las plantas que crecieron con dos concentraciones de Pb (50 y 100 mg/kg) y un control, se determinó basándose en la separación de las isoenzimas en un gel de poliacrilamida no-desnaturalizado (Figura 3 y 4).

En las plantas se identifican tres formas básicas de SOD que se clasifican por su sitio activo y el ion de metal: manganeso mitocondrial (MnSOD), cobre/zinc citosol y cloroplastos (Cu/ZnSOD) y la forma de hierro del cloroplasto (FeSOD). Estas isoenzimas difieren en su sensibilidad por el H_2O_2 y KCN y se pueden diferenciar fácilmente por gel electroforesis (Bowler *et al.*, 1994).

Las bandas de la SOD se clasificaron teniendo en cuenta la inhibición por

peróxido de hidrogeno y KCN, como Mn-SOD (SOD I-resistente a los dos inhibidores) y Fe-SOD (SOD II-inactivada por uno de los inhibidores). La actividad de tñido de la SOD mostró tres isoformas de una Mn-SOD y dos Fe-SOD tanto en tallo como en hojas no encontrándose diferencias en las bandas ni por las concentraciones de Pb utilizadas ni por las partes de la planta (Figura 2).

En el cultivar de tomate Micro-Tom se encontraron por Gratão *et al.* (2008) diferencias entre las hojas (tres bandas) y raíces y frutos (dos bandas), además en un estudio desarrollado en un semillero de tomate con un suelo contaminado por Pb se encontraron dos bandas de SOD en las hojas analizadas en todos los tratamientos probados (12.25, 25, 50, 250, 500 mg/kg) incluyendo el control (Wang *et al.*, 2008).

Para todos los tratamientos utilizados en esta investigación la actividad fue similar en todas las bandas y no se puede atribuir ningún cambio

específico para una isoenzima en particular destacándose que las bandas encontradas caracterizan a la variedad Amalia pues en los estudios antes mencionados en tomate la cantidad de bandas encontradas difiere en todos los estudios.

El número de isoenzimas de cada forma básica de SOD cambia de planta a planta (Bowler *et al.*, 1994), aunque con esta investigación encontramos que varía incluso entre variedades o cultivares de una misma especie.

En cuanto a la GR se identificaron cuatro isoformas en hojas y tres en el tallo (Figura 3) pero la actividad no varió mucho debido a que las isoformas III y IV que representan la mayor actividad de la enzima, muestran niveles similares de actividad en cuanto a la concentración de Pb y el control durante la duración del experimento, destacando que la forma IV no aparece en el tallo. Una diferencia en la intensidad de la banda en la isoforma III en el control y la concentración de 50 mg/

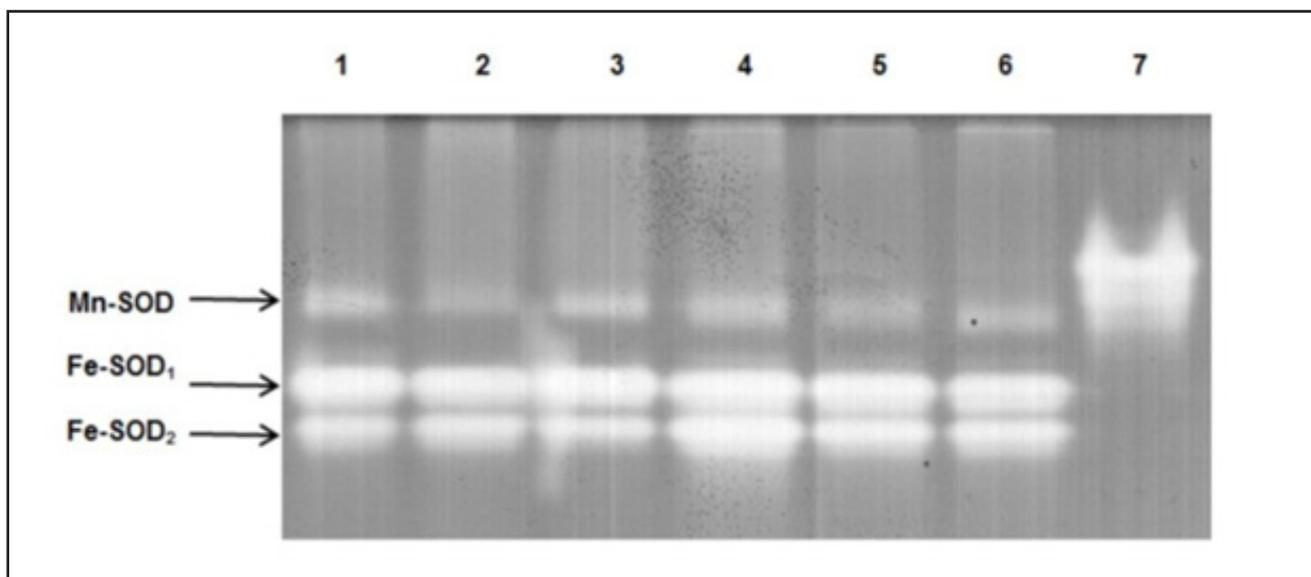


Figura 3. Actividad de tñido para la SOD en gel de poliacrilamida donde línea 1-3 hojas con 0, 50 y 100 mg/kg de PbAc₂ respectivamente; línea 4-6 tallos con 0, 50 y 100 mg/kg de PbAc₂ respectivamente; línea 7 Standard de SOD bovina (SOD staining activity in polyacrylamide gel where line 1-3 leaves with 0, 50 and 100 mg/kg of PbAc₂ respectively; line 4-6 stems with 0, 50 and 100 mg/kg of PbAc₂ respectively; line 7 Bovine SOD standard). Piracicaba, ESALQ, 2010-2011.

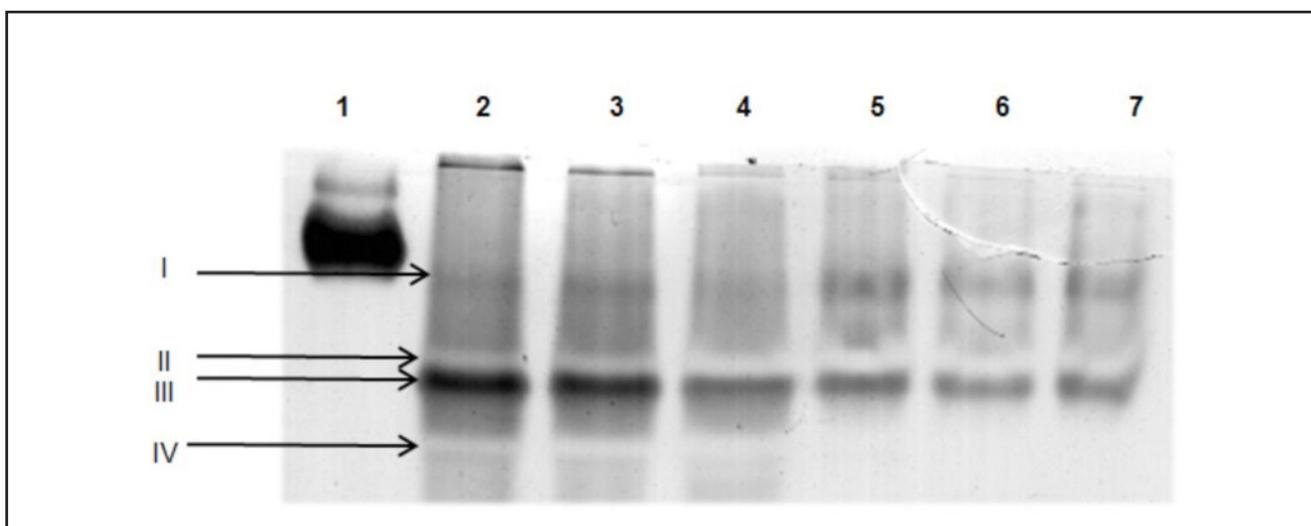


Figura 4. Actividad de tñido para la GR en gel de poliacrilamida donde línea 1 es standard de *Saccharomyces cerevisiae* GR; línea 2-4 hojas con 0, 50 y 100 mg/kg de PbAc₂ respectivamente; línea 5-7 tallos con 0, 50 y 100 mg/kg de PbAc₂ respectivamente (GR staining activity in polyacrylamide gel where line 1 *Saccharomyces cerevisiae* GR standard; 2-4 leaves with 0, 50 and 100 mg/kg of PbAc₂ respectively; line 5-7 stems with 0, 50 and 100 mg/kg of PbAc₂ respectively). Piracicaba, ESALQ, 2010-2011.

kg se puede apreciar en las hojas pudiendo no deberse al estrés por el metal debido a que se observa el mismo comportamiento que en el control.

En las plantas se han identificado GR citosólica y plastídica (Xiang & Oliver, 1998) predominando en nuestro caso la plastídica por los tejidos fotosintéticos predominantes.

Para profundizar en las respuestas

moleculares al estrés oxidativo causado por el metal pesado Pb se estudió la expresión relativa de la SOD encontrándose diferentes niveles de expresión dependiendo de las concentraciones de PbAc₂ usadas y la parte de la planta recolectada (Figura 5A y B).

La SOD fue mayoritariamente inducida a 100 mg/kg tanto en las hojas

(Figura 5A) como en el tallo (Figura 5B) aunque en este último la expresión fue marcadamente mayor. Esta expresión en la máxima concentración utilizada fue significativamente diferente al control y a 50 mg/kg.

La elevada expresión de la SOD a 100 mg/kg en hojas y tallos (367.44 y 1331% respectivamente) indican que a esta concentración las plantas de tomate

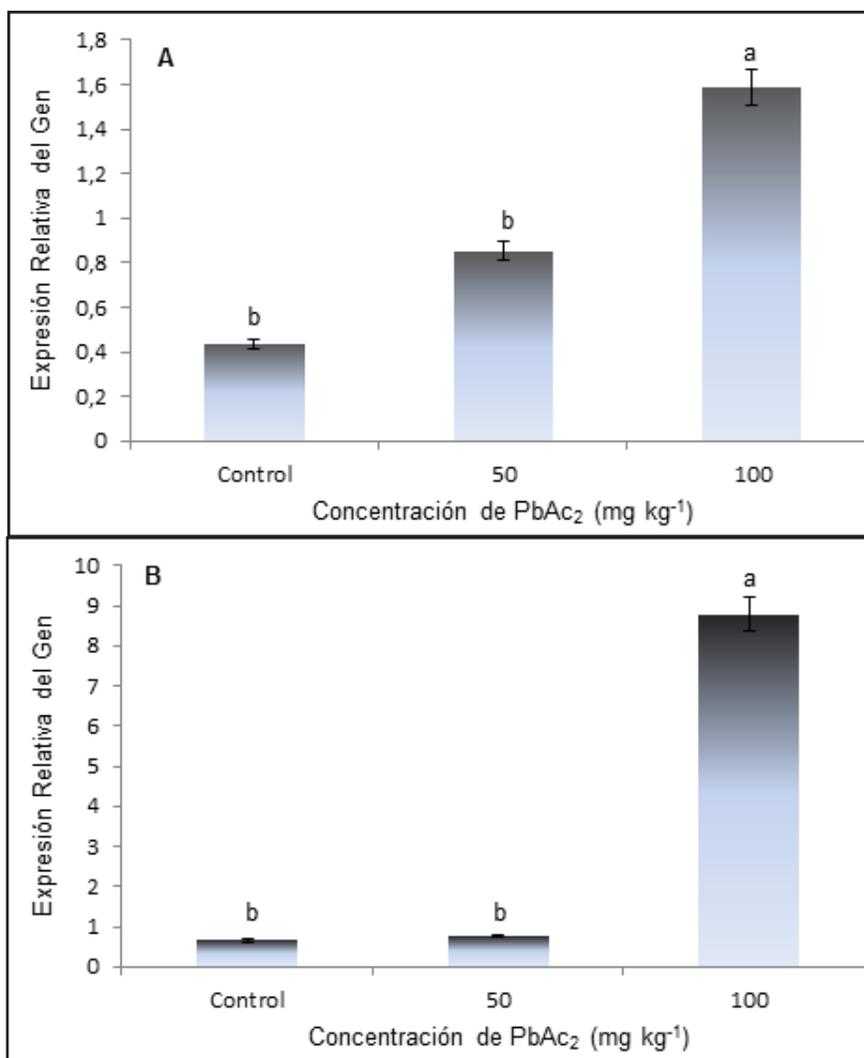


Figura 5. Expresión relativa de la SOD, A: Hojas; B: Tallos de *S. lycopersicum* cv. Amalia. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) {SOD relative expression, A) leaves; B) stems of *S. lycopersicum* cv. Amalia. Different letters indicated significant differences ($p \leq 0.05$)}. Piracicaba, ESALQ, 2010-2011.

experimentan un estrés oxidativo por el metal activando su sistema de defensa donde la SOD representa la primera línea de este sistema (Elstner, 1991; Ray & Husain, 2002).

Pérez *et al.* (2013) analizaron la expresión relativa de la SOD en plantas de tomate cv. Micro-Tom con concentraciones de PbAc₂ inferiores a las utilizadas en este estudio (0, 5 y 10 mg/kg) encontrando que en este cultivar la expresión relativa de la enzima fue superior en la concentración de Pb más baja (5 mg/kg) independientemente de la fase de desarrollo del cultivo. En otro estudio realizado con Pb Ibrahim & Bafeel (2009) en hojas de *Lipidium sativum* (mastuerzo) investigaron los

efectos de la toxicidad por el metal en la expresión génica de la SOD encontrando que a medida que aumentaban las concentraciones (400 y 600 ppm) la expresión diferencial aumentaba, similar a nuestro estudio donde aumentos en la concentración conllevaron a aumentos en la expresión relativa del gen SOD. Estos resultados destacan que la expresión de este gen no solo va a depender del metal sino también del cultivo e incluso de la variedad o cultivar utilizado.

Los estudios realizados referentes al estrés oxidativo en plantas a nivel molecular indican que el cambio en la expresión de los genes producto al estrés es importante para la adaptación de la

planta al ambiente en el que se encuentra (Xu *et al.*, 2016) pudiendo considerarse la expresión génica como un marcador de estrés en estudios ecofisiológicos (Tausz *et al.*, 2004).

En el estudio bioquímico realizado se obtuvo que la concentración de 50 mg/kg de PbAc₂ activa el sistema de defensa antioxidante conformado por la SOD y GR y la concentración de 100 mg/kg de PbAc₂ a nivel molecular induce la expresión de la SOD en tallos y hojas. En ambos estudios se observa que aún a la máxima concentración de Pb utilizada el sistema de defensa de la planta es eficiente pues no se observaron daños fenotípicos durante la fase de desarrollo analizada.

La caracterización isoenzimática de la SOD permitió concluir que las diferentes isoformas en la planta de tomate difieren en las variedades o cultivares y en este estudio no dependió ni de las concentraciones de Pb utilizadas ni de la parte de la planta, y en cuanto a la GR las isoformas identificadas dependieron de la parte de la planta estudiada.

Es recomendable realizar estudios con esta variedad con concentraciones de Pb superiores para delimitar la concentración que comience a dañar la planta, incluyendo análisis del fruto.

AGRADECIMIENTOS

Estamos muy agradecidos a TWAS (Academia de Ciencias para los países en Desarrollo) y CNPq por brindar la oportunidad de realizar esta investigación en la Universidad de São Paulo/ Escuela de Agricultura "Luiz de Queiros" en Brasil.

REFERENCIAS

- ABREU, CB; SACRAMENTO, BL; TEIXEIRA, AA; CARDIM, SM; SANTOS, MP; AZEVEDO AD. 2016. Nutritional and biochemical changes induced by lead in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Ciências Agrárias* 37: 1229-1242.
- AKINCI, IE; AKINCI, S; YILMAZ, K. 2010. Response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead toxicity: Growth, element uptake, chlorophyll and water content. *African Journal Agriculture Research* 5: 416-423.

- AMADOR, A; RODRÍGUEZ, R. 2012. El efecto económico de la salinidad en el cultivo del tomate en la provincia Granma. *Observatorio de la Economía Latinoamericana* 169: 1-9.
- AMMAR, W; NOUAIRI, M; ZARROUK, M; GHORBEL, H; JEMAL, F. 2008. Antioxidative response to cadmium in roots and leaves of tomato plants. *Biologia Plantarum* 52: 727-73.
- ASADA, K. 1992. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Plant Physiology* 85: 235-241.
- AZEVEDO, RA; ALAS, RM; SMITH, RJ; LEA, PJ. 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104: 280-292.
- BAGJUZ, A; HAYAT, S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 1-8.
- BALLESTA, RJ; BUENO, PC; RUBÍ, JAM; GIMÉNEZ, RG. 2010.pedo-geochemical baseline content levels and soil quality reference values of trace elements in soils from the Mediterranean (Castilla La Mancha, Spain). *Central European J. Geosciences* 2: 441.
- BEYER, W; FRIDOWICH, FI. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161: 559-566.
- BIDAR, G; GARCON, G; PRUVOT, C; DEWAELE, D; CAZIER, F; DOUAY, F; SHIRALI, P. 2007. Behaviour of Trifolium repens and Lolium perenne growing in a heavy metal contaminated field: plant metal concentration and phytotoxicity. *Environmental Pollution* 147: 546-553.
- BOWLER, C; CAMP, WV; MONTAGU, MV; INZE, D. 1994. Superoxide dismutase in plants. *Critical Review Plant Species* 13: 199-218.
- BRADFORD, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- ELSTNER, EF. 1991. Mechanism of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: PELL, EJ; STEFFEN, KL (eds). *Active oxygen/oxidative stress and plants metabolism*. Rockville: American Society of Plant Physiologists. p.13-25.
- GOMES JUNIOR, RA; GRATÃO, PL; GAZIOLA, SA; MAZZAFERA, P; LEA, PJ; AZEVEDO, RA. 2007. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. *Functional Plant Biology* 34: 449-456.
- GOMES-JUNIOR, RA; MOLDES, CA; DELITE, FS; GRATÃO, PL; MAZZAFERA, P; LEA, PJ; AZEVEDO, RA. 2006a. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 420-429.
- GOMES-JUNIOR, RA; MOLDES, C; DELITE, F; POMPEU, G; GRATÃO, PL; MAZZAFERA, P; LEA, P; AZEVEDO, R. 2006b. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* 65: 1330-1337.
- GRATÃO, PL; MONTEIRO, CC; ANTUNES, AM; PERES, LEP; AZEVEDO, RA. 2008. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. *Annals of Applied Biology* 153: 321-333.
- IBRAHIM, MM; BAFEEL, SO. 2009. Alteration of gene expression, superoxide anion radical and lipid peroxidation induced by lead toxicity in leaves of *Lepidium sativum*. *Journal of Animal and Plant Sciences* 4: 281-288.
- KACHOUT, SS; MANSOURA, AB; LECLERC, JC; JAFFEL, K; REJEB, MN; OUEGHI, Z. 2009. Effects of heavy metals on antioxidant activities of *Atriplex hortensis* and *Atriplex rosea*. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 83: 37-43.
- LIVAK, KJ; SCHMITTGEN, TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT}. *Method. Methods* 25: 402-408.
- LOZANO, R; AZCON, R; PALMA, JM. 1996. Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. *New Phytologist* 136: 327-333.
- MOHAN, BS; HOSETTI, BB. 1997. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. *Environmental Pollution* 98: 233-238.
- MONK, LS; FAGERSTEDT, KV; CRAWFORD, RMM. 1989. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiologia Plantarum* 76: 456-459.
- PENDIAS, AK; PENDIAS H. 2001. *Trace metals in soils and plants*. Florida: Boca Raton, 2nd ed.
- PÉREZ, SA; AHMED, IS; CABEZAS, DM. 2013. Molecular and biochemical characterization in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants cv. Micro-Tom related to lead (Pb)-induced stress. *Revista Biotecnología Aplicada* 30: 194-198.
- RADY, MM; OSMAN, ASH. 2012. Response of growth and antioxidant system of heavy metal-contaminated tomato plants to 24-epibrassinolide. *African Journal of Agricultural Research* 7: 3249-3254.
- RAY, G; HUSAIN, SA. 2002. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian Journal of Experimental Biology* 40: 1213-32.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT 9.1 2004. User's Guide. Cary: SAS Institute Inc.
- SHARMA, P; DUBEY, RS. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 35-52.
- SOBRINHO, A; GONZÁLEZ, F; LÓPEZ, YP; GUEDES, JN; MAGALHÃES, MOL; ZOFFOLI, HJO. 2013. Contenido natural de metales pesados en suelos de regiones ganaderas de las provincias de Mayabeque y Artemisa en Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 47: 209-216.
- TAUSZ, M; ŠIRCELJ, H; GRILL, D. 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid?. *Journal of Experimental Botany* 55: 1955-1962.
- THIRUPATHI, K; JUN-CHEOL, M; CHANGSOO, K; KUMARIAH, M; WOOK, K. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science* 5: 709-725.
- VERMA, S; DUBEY, RS. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645-655.
- WANG, CH; WANG, X; TIAN, Y; XU, Y; XU, X; SUI, Y; YU, H. 2008. Oxidative stress and potential biomarkers in tomato seedlings subjected to soil lead contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 685-691.
- XIANG, C; OLIVER, DJ. 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 1539-1550.
- XU, Q; ZHU, C; FAN, Y; ZHIHONG, S; XING, SH; LIU, W; YAN, J; SANG, T. 2016. Population transcriptomics uncovers the regulation of gene expression variation in adaptation to changing environment. *Scientific Reports* 6: 1-1.
- YAN, HL; JIN, CHZ; DI, RG; FENG, ZHY; MENG, Q; FANG, HX. 2009. Increased cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1343-1348.