

1 **Comparación de la variabilidad de especies reactivas de oxígeno entre**  
2 **poblaciones silvestres de Calafate según localidades de la zona Sur de**  
3 **Chile.**

4 **Daniela Peña<sup>1</sup>, Karina Godoy<sup>2</sup>, Marjorie Reyes-Diaz<sup>3</sup>, Pamela Ibarra<sup>1</sup>,**

5 <sup>1</sup>Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales, Universidad de La Frontera,  
6 Casilla 54-D. Temuco, Chile.

7 <sup>2</sup>Center of Environmental Biotechnology, Scientific and Technological Bioresource Nucleus  
8 (BIOREN), Universidad de La Frontera, Casilla 54-D. Temuco, Chile.

9 <sup>3</sup>Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Universidad de La Frontera, Casilla  
10 54-D. Temuco, Chile.

11 **RESUMEN.**

12 La distribución del calafate en Chile es desde Curicó a Tierra del Fuego y a diferentes  
13 alturas sobre el nivel del mar (Hoffmann, 1991) lo que permite deducir que las  
14 características químicas de las hojas de calafate pueden variar según las condiciones  
15 climáticas y el lugar en el cual se desarrollan. Esto último, podría verse reflejado en su  
16 capacidad para generar niveles diferenciales de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las  
17 hojas. En este estudio, se identificaron ROS en hojas de calafate (*Berberis microphylla*  
18 Lam.) por citometría de flujo, se evaluó la producción de ROS derivados del peróxido de  
19 hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en cloroplastos, en cuatro localidades de Chile. La síntesis de ROS  
20 variaron significativamente, destacando la localidad de Lonquimay que alcanzo 596,00  
21 URF respecto de las otras localidades, donde no hubo diferencias significativas entre  
22 Temuco (323,75 URF), Mañihuales (393,75 URF) y El Blanco (369,50 URF). En esta  
23 investigación, se concluye que los extractos de hoja de calafate de las diferentes  
24 procedencias evaluadas presentan diferencias estadísticas significativas en su capacidad  
25 para generar ROS, variando de acuerdo a las condiciones geográficas.

26  
27 Palabras claves: estrés oxidativo, citometría de flujo, Berberis, aislamiento de cloroplastos.

28

29

30 **Introducción:**

31

32 Los tejidos vegetales, en especial frutas y hortalizas, contienen numerosos y diferentes  
33 compuestos químicos con diferentes capacidades y propiedades biológicas y  
34 farmacológicas. El interés creciente en el rol de los antioxidantes en la salud humana ha  
35 intensificado la búsqueda de nuevos productos naturales de origen vegetal, para ser  
36 utilizados en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. En este contexto, el  
37 calafate (*Berberis microphylla* Lam.), se presenta como un potencial biorrecurso y  
38 alternativa frutícola para el sur de Chile dada por su fruto que es una baya comestible, de  
39 color negro azulada con propiedades nutricionales y medicinales.

40

41 El exceso de especies reactivas de oxígeno puede dañar lípidos celulares, proteínas o ADN,  
42 inhibiendo su funcionamiento normal (Sharma *et al.*, 2012) asociándose a enfermedades  
43 cancerígenas, cardiovasculares y neurodegenerativas. En este sentido, los antioxidantes son  
44 importantes por la capacidad de neutralizar estos radicales libres y en consecuencia  
45 prevenir estas enfermedades (Slater, 1984, Halliwell, 1999).

46

47 El oxígeno molecular en estado basal es relativamente poco reactivo (Asada, 2000), sin  
48 embargo, existen formas “activadas” conocidas como “especies reactivas del oxígeno  
49 (ROS). Son especies químicas altamente oxidantes que, dependiendo de la especie ROS  
50 que se trate, pueden dañar diversos componentes celulares. Dentro del grupo de las ROS  
51 podemos encontrar radicales libres (especies químicas con uno o más electrones  
52 desapareados en sus orbitales externos), tales como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el radical  
53 hidroxilo ( $OH^\cdot$ ). Por otro lado, entre las formas no radicales encontramos el peróxido de  
54 hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el oxígeno singlete ( $O_2$ ). Las ROS son producidas en diversos lugares  
55 de la célula, como mitocondrias (Asada, 2000) y cloroplastos (Sharma *et al.*, 2012). Por lo  
56 tanto, si se produce un desequilibrio entre el balance de ROS y las defensas antioxidantes es  
57 cuando tiene lugar el daño en los tejidos y el estrés oxidativo (Sies, 1993).

58

59 En plantas, varias perturbaciones ambientales, como por ejemplo, alta intensidad lumínica,  
60 salinidad, sequía, calor, frío, ozono, herbicidas, metales pesados, patógenos y

61 contaminantes atmosféricos, podrían generar una sobre producción de ROS que causaría  
62 daño celular oxidativo (Mittler, 2002; Torres *et al.*, 2002; Mittler *et al.*, 2004;  
63 Karuppanapandian *et al.*, 2006 a,b,c, 2009, 2011; Karuppanapandian and Manoharan,  
64 2008; Mafakheri *et al.*, 2010; Velloso *et al.*, 2010).

65

66 En Chile, el calafate es un valioso integrante nativo ampliamente distribuido en el sur  
67 (35°S, 70°W – 50°S, 73°W) donde las condiciones climáticas son variadas. Se propone  
68 como hipótesis de trabajo que: La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)  
69 difieren significativamente entre localidades del Sur de Chile. El objetivo de este estudio  
70 fue aislar cloroplastos y comparar la producción de ROS en hojas de calafate según cuatro  
71 localidades de la zona Sur de Chile.

72

### 73 **Materiales y métodos:**

74 **Material Vegetal:** El material utilizado fueron hojas de Calafate colectadas en la  
75 temporada 2011 en dos regiones de Chile: La región de La Araucanía y Aysén. La región  
76 de La Araucanía está representada por las localidades Lonquimay (Time 19. UTM  
77 coordinates 5739635 South 294256 East) y Temuco (Time 18. UTM coordinates 5698408  
78 South, 699751 East), mientras que la región de Aysén está representada por Mañihuales  
79 (Time 19. UTM coordinates 4580967 South West 7197553) y El Blanco Blanco (Time 19.  
80 UTM coordinates 4581011 South West 7197522).

81 Las hojas fueron tratadas con etanol 70% v/v durante 30 segundos. Luego fueron lavadas  
82 tres veces con agua destilada estéril, luego se desinfectaron con una solución de HOCl<sub>2</sub> 5%  
83 v/v, finalmente se volvieron a lavar tres veces y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

84 **Aislamiento de cloroplastos:** El aislamiento de cloroplastos se realizó de acuerdo al  
85 protocolo de SIGMA (Cloroplasto Iso Kit) modificado para Calafate. Se pesó 1g de hojas,  
86 y se agregaron 10 mL de CIB 1X con BSA. Luego se suavizó el tejido en un mortero hasta  
87 obtener una muestra sólido-líquida. La muestra se hizo atravesar gradualmente por un filtro  
88 de 40 µm para eliminar células enteras y los desechos del rompimiento celular. El filtrado  
89 se puso en tubos eppendorf y se centrifugaron durante 3 minutos a 200g en frío. Se transfirió

90 el sobrenadante a otros tubos y se volvió a centrifugar durante 7 minutos a 1000g en frío.  
91 Se obtuvo un precipitado verde, que corresponde a los cloroplastos. Finalmente, el  
92 precipitado se resuspendió en 500 µl de buffer CIB 1X sin BSA. Los tubos se almacenaron  
93 a 4°C hasta que se usaron.

94 **Purificación de cloroplastos Intactos:** La muestra de cloroplastos fue tratada con un 40%  
95 de suspensión de Percoll. Para ello se puso en un tubo eppendorf 600 µl de muestra y 400  
96 µl de Percoll y se centrifugó. Los cloroplastos intactos formaron un precipitado verde,  
97 mientras que los cloroplastos rotos formaron una banda en la parte superior de la capa de  
98 Percoll. Se eliminó la fase superior. El precipitado fue resuspendido en 0,5 mL de CIB 1X  
99 sin BSA. La suspensión de cloroplastos se mantuvo almacenada en oscuridad y hielo hasta  
100 su posterior uso. Las muestras de cloroplastos aislados se observaron en el CLSM Fluoview  
101 1000, y las imágenes de las muestras fueron analizadas por Olympus FV 100 Software  
102 Japon.

103 **Análisis de citometría de flujo: Especies reactivas de Oxígeno (ROS):** Los cloroplastos  
104 purificados se incubaron con 10µM de la sonda fluorescente 2',7'  
105 dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) (Invitrogen) en oscuridad durante 30  
106 minutos a 37°C. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) fueron analizadas  
107 usando citómetro de flujo (Beckton Dickinson, FACs Canto IISN:V96101286,USA),  
108 equipado con láser azul de 488 nm y 633 nm láser rojo. Se midió la intensidad de  
109 fluorescencia a 530 nm. Se uso como Control positivo una suspensión de cloroplastos  
110 incubados con 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para la detección de los cloroplastos funcionales se utilizó  
111 como marcador interno la emisión de Clorofila (autofluorescencia) mediante citometría de  
112 flujo en 650-700nm. El análisis de datos se realizó utilizando el software FACs Diva,  
113 versión 2.0.

114

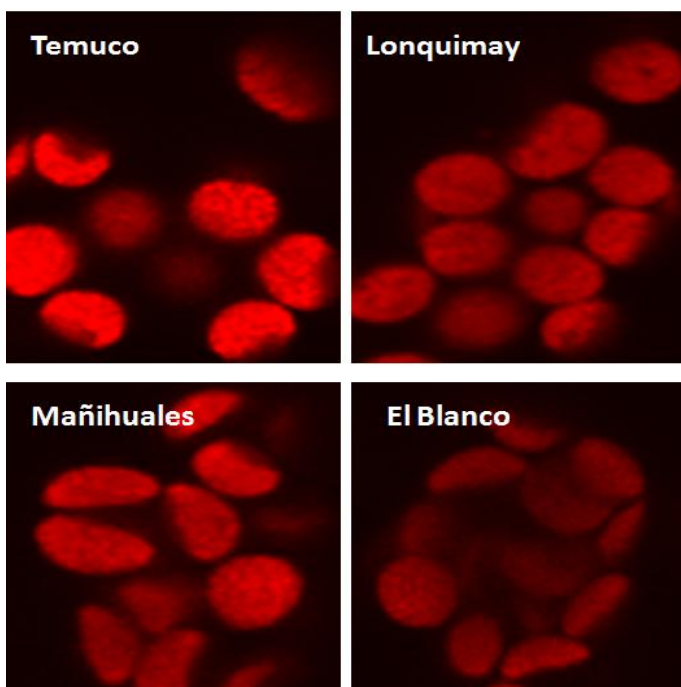
115 **Análisis estadístico:** Para determinar diferencias entre la producción de ROS en hojas de  
116 calafate y las diferentes localidades, los datos fueron analizados por ANOVA. Las medias  
117 se compararon mediante la prueba de rango múltiple de Tukey, con un nivel de  
118 significancia de  $p \leq 0,05$ . Se utilizó el software Statistica versión 7.0.

119

## 120 **Resultados y discusión**

### 121 **Aislamiento de cloroplastos:**

122 El aislamiento de cloroplastos se realizó de acuerdo al protocolo de SIGMA (Chloroplast  
123 Iso Kit) con modificaciones. Las muestras de aislamiento desde tejido vegetal fresco fueron  
124 visualizadas mediante microscopía laser confocal (CLSM), obteniendo en población de  
125 cloroplastos de aproximadamente 5-7  $\mu\text{m}$  de tamaño, presentan patrón de fluorescencia  
126 emisión entre 650-750 nm, característico de presencia de clorofila. La Figura 1 muestra una  
127 fotografía de cloroplastos de Calafate obtenida a través del Microscopio confocal Olympus  
128 UPLSAPO 40x Imagen 512\*512,  $\lambda$  excitation/emission 633/ 650-750 nm.



129

130 Figura 1: Cloroplastos de Calafate aislados de hojas colectadas en cuatro localidades del sur  
131 de Chile.

### 132 **Producción de especies reactivas de oxígeno:**

133 Se detectó diferencia significativa entre los ecotipos de las localidades para la temporada  
134 2011. El rango promedio para la producción de ROS derivados del peróxido de hidrógeno  
135 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en cloroplastos de hojas de Calafate alcanzó valores de intensidad de fluorescencia  
136 entre 323,75 y 596,00 Unidades relativas de fluorescencia (URF).

137 Al comparar las localidades se observa en general que la producción de ROS en la  
138 localidad de Lonquimay fue significativamente mayor (596,00 URF) respecto a las otras  
139 localidades, las cuales no difirieron significativamente.

140 La producción de ROS para las otras localidades fué 323,75 URF para Temuco, 393,75  
141 URF para Mañihuales y 369,50 URF para El Blanco.

142 Mañihuales y El Blanco, dos localidades geográficamente próximas y con condición  
143 geográfica y tipo de suelo diferente, no difieren significativamente en la producción de  
144 ROS. ( Fig 2.).

145 El parámetro estándar de producción de ROS utilizado en otras investigaciones es de 100  
146  $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ , por lo que se puede decir que los ecotipos de Calafate son capaces de resistir  
147 fuertes condiciones de estrés ya que todas muestran niveles de generación de ROS muy por  
148 sobre los 100  $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ .

149

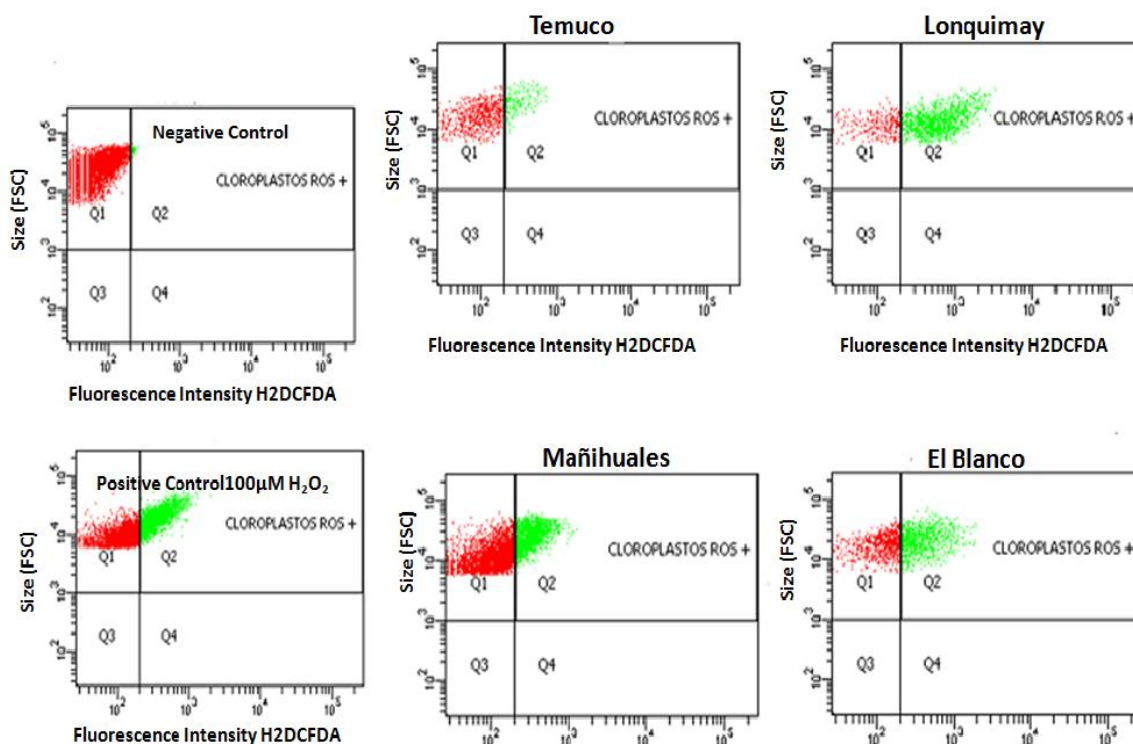
150 Tabla 1: Producción de especies reactivas de oxígeno. Letras diferentes en las filas indican  
151 diferencias significativas entre la producción de ROS y las localidades de acuerdo con el  
152 análisis de comparación de medias con la prueba de rango múltiple de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

	Temuco	Lonquimay	Mañihuales	El Blanco
ROS $\text{H}_2\text{O}_2$	323,75 $\pm$ 25,72b	596,00 $\pm$ 95,00a	393,75 $\pm$ 57,28b	369,50 $\pm$ 48,79b

153

154

155



156

157 Figura 2: Análisis por citometría de flujo. Diagrama de puntos que muestra la relación entre  
 158 el tamaño de los cloroplastos de hojas de calafate provenientes de cuatro localidades del sur  
 159 de Chile y la intensidad de fluorescencia de la sonda H<sub>2</sub>DCFDA. Para el control positivo se  
 160 utilizó 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Las especies oxígeno reactivas son constantemente generadas in vivo para propósitos específicos. Así, para prevenir los posibles daños a moléculas biológicas, especialmente ADN, lípidos y proteínas, todos los organismos consumen compuestos antioxidantes, los que se integran al sistema antioxidante del cuerpo, que incluye enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, y glutatión peroxidasa, ácido ascórbico, beta caroteno, entre otros.

En este estudio se demostró la variación que hubo en la producción de ROS entre cuatro localidades.

Según Howard *et al.*, 2003, las diferencias encontradas, se explicarían, además de una posible variación genética, por factores ambientales fluctuantes. Estos factores serían temperatura, humedad del suelo, disponibilidad de nutrientes y variados estrés. En este sentido, ampliamente reportado es el efecto positivo que ejerce la radiación solar y

temperatura sobre el metabolismo de compuestos fenólicos. Así lo demuestran estudios de calafate por Mariangel *et al.*, 20112, quienes reportaron que los polifenoles totales y la capacidad antioxidante variaron significativamente de acuerdo a la localidad.

Estos resultados permiten indicar que el lugar donde crecen las plantas de forma natural, sin intervención ni manejo agronómico, tuvo influencia sobre la producción de ROS, lo que indicaría una marcada influencia de los factores abióticos.

**Agradecimientos:** Al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales y al BIOREN-UFRO de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, por facilitar las dependencias para la realización de esta investigación.

#### **Referencias:**

Asada K. 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1419–1431.

Hoffman, A. 1991. *Flora Silvestre de Chile: Zona Araucana*. 2ª edición. Editorial Claudio Gay, Santiago-Chile. (1997).

Howard, R. Clark, R. y Brownmiller. C. 2003. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture (USA)*. 83: 1238 - 1247.

Mariangel E.; Reyes M.; Lobos W.; Bensch E.; Schalchli H, and Ibarra P. 2012. Antioxidant properties of Calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in southern Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*.

Mittler,R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci*. 7 405-410.



Mittler R., Vanderauwera S. Gollery M. Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490–498.

Karuppanapandian, T. Sinha, PB. Kamarul Haniya, A. Manoharan, K. 2006a. Differential antioxidative responses of ascorbate-glutathione cycle enzymes and metabolites to chromium stress in green gram (*Vigna radiata* L. Wilczek) leaves. *J Plant Biol* 49:440–447.

Karuppanapandian, T. Sinha ,PB. Kamarul Haniya, A. Premkumar, G. Manoharan, K. 2006b. Aluminium-induced changes in antioxidative enzyme activities, hydrogen peroxide content and cell wall peroxidase activity in green gram (*Vigna radiata* L. cv. Wilczek) roots. *J Plant Biol* 33:241–246.

Karuppanapandian, T. Sinha, PB. Premkumar, G. Manoharan, K. 2006c. Chromium toxicity: Correlated with increased in degradation of photosynthetic pigments and total soluble protein and increased peroxidase activity in green gram (*Vigna radiata* L.) seedlings. *J Swamy Bot-CI* 23:117–122.

Karuppanapandian, T. Manoharan, K. 2008. Uptake and translocation of tri- and hexavalent chromium and their effects on black gram (*Vigna mungo* L. Hepper cv. Co4) roots. *J Plant Biol* 51:192–201.

Karuppanapandian, T. Sinha, PB. Kamarul Haniya, A. Manoharan, K. 2009 Chromium-induced accumulation of peroxide content, stimulation of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in green gram (*Vigna radiata* L. cv. Wilczek) leaves. *Afr J Biotechnol* 8:475–479.

Karuppanapandian, T. Wang, HW., Prabakaran, N. Jeyalakshmi, K. Kwon, M. Manoharan, K. Kim, W. 2011. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles. *Plant Physiol Biochem* 49:168–177.

Karuppanandian, T. Moon, J. Kim, Ch. Manoharan, K. Kim, W. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. A review. *Australian Journal of Crop Science*, 5 (6): 709- 725.

Mafakheri, A. Siosemardeh, A. Bahramnejad, B. Struik, PC. Sohrabi, Y. 2010 Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Aust J Crop Sci* 4:580–585.

Sharma, P. Bhushan, A. Shanker, R. Pessarakli, M. 2012. A review article. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions.

Vellosillo, T. Vicente, J. Kulasekaran, S. Hamberg, M. Castresana, C. 2010. Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. *Plant Physiol* 154:444–448.