

UCH-FC
MAB-B
R457r
C-2

RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y METABÓLICAS DE *Deschampsia*
antarctica Desv. AL ESTRES TERMICO

Tesis

Entrega a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

María Antonieta Reyes Carreño

1998

Directores de tesis: Dr. Luis Corcuera P.
Dra. Liliana Cardemil O.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la
Tesis de Magister presentada por la candidata

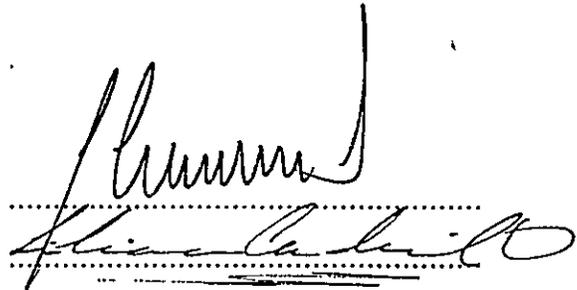
MARIA ANTONIETA REYES CARREÑO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como
requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología,
en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día 3 de Agosto de 1998

Directores de Tesis:

Dr. Luis Corcuera Pérez

Dra. Liliana Cardemil Oliva



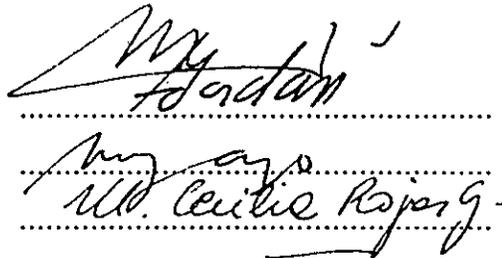
.....
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Miguel Jordán

Dra. Mary Kalin A.

Dra. Cecilia Rojas



.....
.....
.....



*A quienes amo,
en especial a mi madre, a mi hijo en espera y a Luis*

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a quienes contribuyeron con su apoyo y consejos durante estos años de estudio y desarrollo de tesis.

A mi tutor Dr. Luis Corcuera P. por su orientación y comentarios en la realización de este trabajo.

A mi tutora Dra. Liliana Cardemil O. por sus aportes críticos que permitieron enriquecer la estructura de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio por sus colaboraciones desinteresadas en el intercambio de ideas en nuestro diario quehacer, como también de los entretenidos momentos compartidos durante los descansos.

Agradezco a mi familia y a mis amigos incondicionales que me han apoyado en todo momento.

A Luis por creer en mí, por su valiosa ayuda e incondicional estímulo para la finalización de esta tesis.

Finalmente, quisiera agradecer el financiamiento otorgado por la Vicerrectoría Académica, Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile (Beca PG020/96) y Fondecyt (Proyecto 1940858).

INDICE

	página
Título	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Indice	iv
Lista de tablas	vii
Lista de figuras	viii
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xvi
1.0 Introducción	1
1.1 Distribución y características de <i>Deschampsia antarctica</i> Desv.	1
1.2 Estrés térmico	4
1.3 Alteraciones celulares frente al estrés térmico	6
1.4 Inducción de proteínas de estrés térmico y termotolerancia	8
1.5 Característica y funciones de las HSPs	10
1.6 Síntesis de HSP70 en respuesta a estrés térmico	12
1.7 Recambio proteico mediado por ubiquitina	15
1.8 Ubiquitina como una proteína de estrés térmico	17
1.9 Ruta de degradación vía ubiquitina	17
1.10 Presencia de proteínas de estrés térmico en condiciones de temperaturas bajas	19
Hipótesis	22
1.11 Objetivo general	23

1.12	Objetivos específicos	23
2.0	Materiales y métodos	24
2.1	Material vegetal	24
2.2	Análisis fisiológicos	25
2.2.1	Determinación de temperaturas letales (TL ₅₀) mediante conductividad eléctrica	25
2.2.2	Determinación de temperaturas letales (TL ₅₀) mediante reducción de TTC	26
2.3	Contenido de agua en <i>D. antarctica</i>	27
2.4	Tratamientos térmicos	28
2.5	Extracción y separación de proteínas solubles totales	28
2.6	Análisis de Western blot	29
2.7	Análisis estadísticos	30
3.0	Resultados	31
3.1	Análisis fisiológicos	31
3.1.1	TL ₅₀ mediante conductividad eléctrica	31
3.1.2	TL ₅₀ mediante reducción de TTC	33
3.2	Contenido de proteínas	36
3.3	Variación del contenido de agua en plantas sometidas a estrés calórico	38
3.4	Ubiquitina en plantas crecidas a 13°C y sometidas a estrés calórico	38
3.5	Ubiquitina en plantas aclimatadas a 4°C y sometidas a estrés calórico	44
3.6	Detección de HSP70 en plantas crecidas a 13°C	47
3.7	Detección de HSP70 en plantas aclimatadas a 4°C	51
3.8	Cinética de expresión de HSP70	53
3.9	Cinética de expresión de ubiquitina	58

4.0	Discusión	66
4.1	Acumulación de conjugados de ubiquitina en plantas de <i>D. antarctica</i> sometidas a estrés calórico	70
4.2	Acumulación de HSP70 en plantas de <i>D. antarctica</i> sometidas a estrés calórico	73
5.0	Conclusiones	78
6.0	Anexo	80
6.1	Análisis del crecimiento en plantas de <i>D. antarctica</i> en distintos sustratos	80
7.0	Bibliografía	83

LISTA DE TABLA

	página
Tabla 1 Temperatura a las que se alcanza el 50% de daño (TL ₅₀) en los ensayos de conductividad y reducción de TTC.....	35

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1 Variación diaria de la temperatura foliar en <i>D. antarctica</i> y ambiental en la caleta Coppermine, Isla Robert.....	5
Figura 2 Daño provocado por tratamientos térmicos en plantas aclimatadas a 4°C y plantas crecidas a 13°C.....	32
Figura 3 Evaluación del daño foliar por reducción del TTC (A_{530}) en plantas de <i>D. antarctica</i>	34
Figura 4 Contenido de proteínas en extractos foliares de <i>D. antarctica</i>	37
Figura 5 Determinación del contenido de agua en los extractos foliares de <i>D. antarctica</i>	39
Figura 6 Patrón de proteínas solubles separadas por SDS- PAGE al 15% en extractos foliares de <i>D. antarctica</i> crecidas a 13°C.....	41
Figura 7 Análisis de Western blot de las proteínas solubles a partir de extractos foliares de <i>D. antarctica</i> crecidas a 13°C.....	42
Figura 8 Análisis densitométrico a partir de las bandas detectadas con el anticuerpo contra ubiquitina libre en el Western blot en plantas de <i>D. antarctica</i> crecidas a 13°C.....	43
Figura 9 Patrón de proteínas solubles separadas en SDS- PAGE al 12% en extractos foliares de <i>D. antarctica</i> aclimatadas a 4°C.....	45
Figura 10 Análisis de Western blot de las proteínas solubles a partir de extractos foliares de <i>D. antarctica</i> aclimatadas a 4°C.....	46
Figura 11 Análisis densitométrico a partir de las bandas detectadas con el anticuerpo contra ubiquitina libre en el Western blot en plantas de <i>D. antarctica</i> aclimatadas a 4°C.....	48

Figura 12	Western blot del estándar de la proteína pura de ubiquitina en diferentes diluciones.....	49
Figura 13	Presencia de HSP70 en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de <i>D. antarctica</i> crecidas a 13°C.....	50
Figura 14	Presencia de HSP70 en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de <i>D. antarctica</i> aclimatadas a 4°C.....	52
Figura 15	Patrón de separación de proteínas solubles en SDS-PAGE al 10% en extractos foliares de <i>D. antarctica</i> crecidas a 13°C y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C.....	54
Figura 16	Presencia de HSP70 en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de <i>D. antarctica</i> crecidas a 13°C y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C.....	55
Figura 17	Patrón de separación de proteínas solubles en SDS-PAGE al 10% en extractos foliares de <i>D. antarctica</i> aclimatadas a 4°C y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C.....	56
Figura 18	Presencia de HSP70 en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de <i>D. antarctica</i> aclimatadas a 4°C y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C.....	57
Figura 19	Patrón de separación de proteínas solubles en SDS-PAGE al 10% en extractos foliares de <i>D. antarctica</i> aclimatadas a 4°C y no aclimatadas y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C.....	59
Figura 20	Detección de HSP70 en las proteínas solubles a partir de extractos foliares de <i>D. antarctica</i> aclimatadas a 4°C y no aclimatadas y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C.....	60
Figura 21	Presencia de HSP70 en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de <i>D. antarctica</i> crecidas a 13°C y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C.....	61

Figura 22	Presencia de HSP70 en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de <i>D. antarctica</i> aclimatadas a 4°C y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C.....	62
Figura 23	Acumulación de ubiquitina conjugada en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de <i>D. antarctica</i> crecidas a 13°C y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C.....	64
Figura 24	Acumulación de ubiquitina conjugada en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de <i>D. antarctica</i> aclimatadas a 4°C y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C.....	65
Figura 25	Efecto de cuatro tipos de sustratos sobre el número de brotes en plantas de <i>D. antarctica</i>	80
Figura 26	Porcentaje de biomasa en plantas de <i>D. antarctica</i> crecidas en cuatro tipos de suelo.....	81

ABREVIATURAS

Arcsen	arcoseno
BCIP	bromo cloro indolil fosfato
BSA	suero de albúmina de bovino
D.O.	absorbancia
HSE	elementos de estrés térmico
HSF	factores de transcripción de estrés térmico
HSG	gránulos de estrés térmico
HSPs	proteínas de estrés térmico
IgG	inmunoglobulina
NBT	azul de nitrotetrazolio
RE	retículo endoplasmático
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en dodecil sulfato de sodio
TBS	solución tampón Tris salino
TL ₅₀	temperatura letal
TTBS	solución tris salino conteniendo Tween 20
TTC	cloruro de trifenil tetrazolio
UB	ubiquitina

RESUMEN

Deschampsia antarctica Desv. (Poaceae) es una gramínea perenne, que junto a *Colobanthus quitensis* habita en las condiciones extremas del ecosistema antártico, con temperaturas medias diarias de 0°C en el mes de Enero (verano). Aún cuando también se le encuentra en latitudes menores en el continente Americano, se ha sugerido que esta especie ha desarrollado diversas adaptaciones bioquímicas en respuesta al frío. Entre estas adaptaciones, se han descrito aumentos de los contenidos de lípidos y azúcares solubles. También se ha observado un incremento en la temperatura foliar en varios grados con respecto al ambiente, con lo cual esta especie alcanza las condiciones óptimas de asimilación de CO₂. En plantas de *D. antarctica* la máxima tasa fotosintética se observa a los 13°C, reduciéndose ésta sólo a un 30% bajo temperaturas de 0°C. Un efecto de reducción de la fotosíntesis se observa a temperaturas sobre 13°C.

La propagación de *D. antarctica*, comúnmente vegetativa o a través de semillas, ocurre en época de verano período en el cual la planta se encuentra constantemente expuesta a las variaciones climáticas. Por ejemplo, en los días de sol, la temperatura de las hojas resulta ser más alta que la temperatura óptima de asimilación de CO₂ (13°C). De este modo, se postula que esta planta sufre adicionalmente un estrés térmico durante los ciclos diurnos en las condiciones del verano antártico con temperaturas superiores a 13°C, sin conocerse que clase de mecanismos estarían involucrados para hacer frente a esta condición de estrés. La inducción de proteínas de estrés térmico (HSP), tales como las denominadas HSP70 y

ubiquitina, son respuestas comúnmente asociadas a la protección y recambio de otras proteínas dañadas en condiciones de temperaturas diferentes de las óptimas de desarrollo. Así entonces, en este estudio se pretendió evaluar la siguiente hipótesis: *D. antarctica* Desv. frente a temperaturas mayores o menores que su óptimo de asimilación de CO₂ (13°C), responde con la acumulación de proteínas de estrés térmico. Esta acumulación sería modulada por las diferencias entre la temperatura de crecimiento (4°C y 13°C) y la de estrés (sobre 13°C).

El trabajo experimental consistió en exponer grupos de plantas de *D. antarctica* Desv crecidas a 13°C y 4°C, por 2 horas a tratamientos térmicos de 25°, 30°, 35°, 40°, 45°, 50° y 60°C. De estos tratamientos, se procedió a evaluar la temperatura necesaria para obtener el 50% de muerte celular sobre el control (TL₅₀), definido por los métodos de conductividad electrolítica y de reducción del cloruro de trifetil tetrazolio (TTC). Por el método de conductividad, el TL₅₀ determinado fue de 48.3°C ± 0,3 en ambos grupos de plantas crecidas a 13° y aclimatadas a 4°C. Con el método de reducción de TTC, el TL₅₀ fue de 47,8°C ± 0,6 para las plantas aclimatadas a 4°C y de 46,5°C ± 0,6 en las plantas crecidas a 13°C.

Análisis de Western fueron realizados con las proteínas solubles de hojas de *D. antarctica* provenientes de plantas sometidas a estrés desde 13° hasta 45°C por 2 horas, usando un anticuerpo policlonal anti ubiquitina y un anticuerpo monoclonal anti HSP70. El Western con el anticuerpo anti-ubiquitina reveló la acumulación de conjugados de ubiquitina en respuesta al daño celular por altas temperaturas. En plantas crecidas a 13°C y expuestas a 40°C por 2 horas, se detectó un conjugado de ubiquitina de 166 kDa, cuya acumulación se incrementa en un 49% durante el tratamiento a 45°C. En estas plantas fue igualmente detectado un posible tetrámero

de 34 kDa de ubiquitina libre, cuya acumulación disminuye en un 45% después del aumento de temperatura de 13°C a 45°C, posiblemente para unirse a proteínas dañadas por el tratamiento calórico. En las plantas aclimatadas a 4°C y expuestas a similares tratamientos de temperatura, no se detectó el posible tetrámero de ubiquitina de 34 kDa y sólo se observaron conjugados de ubiquitina - proteína, especialmente un conjugado de 62 kDa que se acumuló entre los 25°C y 45°C de temperatura. A pesar de la presencia y acumulación de conjugados de ubiquitina asociados al estrés calórico no fue posible detectar el monómero de ubiquitina libre en ambos grupos de plantas, al menos hasta el límite de detección de la proteína (10 ng), lo cual sugiere el activo funcionamiento del sistema de ubiquitinación necesario para el recambio de las proteínas dañadas durante el tratamiento de calor.

Los análisis de Western con el anticuerpo anti-HSP70 mostraron que la mayor inducción de HSP70 fue observada a los 35°C de temperatura en plantas crecidas a 13°C y 4°C. Estudios cinéticos de acumulación de HSP70 en plantas aclimatadas a 4°C y expuestas a 35°C por 120 minutos, demostraron una acumulación de la proteína desde los 25 minutos de tratamiento. Tratamientos similares en plantas crecidas a 13°C, presentaron una acumulación de HSP70 recién a los 50 minutos de estrés térmico. Ambos grupos de plantas presentaron la mayor acumulación de HSP70 a los 100 minutos de exposición a 35°C de temperatura. La acumulación más rápida de HSP70 se observó en las plantas pretratadas a 4°C respecto de las crecidas a 13°C, lo cual concuerda con un menor grado de daño celular por el estrés calórico en las primeras evidenciado por una menor pérdida de agua foliar y un mayor valor de TL50 en la reducción de TTC.

Períodos más largos de exposición (20 horas) de las plantas a 35°C de temperatura, indujeron una segunda acumulación de HSP70 a las 12 y 16 horas en las plantas aclimatadas a 4°C y en las crecidas a 13°C, respectivamente. La respuesta de acumulación de HSP70 en las plantas mantenidas a 4°C, fue también 4 veces más intensa que la acumulación de HSP70 en las plantas crecidas a 13°C. Esta segunda acumulación de HSP70, podría estar relacionada a un proceso de reparación de proteínas dañadas por el calor, la cual parece ser más eficiente en las plantas aclimatadas a 4°C.

Estos resultados sugieren que la inducción y acumulación de proteínas de estrés térmico, HSP70 y conjugados de ubiquitina, constituyen elementos fundamentales en un mecanismo de protección y reparación de proteínas dañadas derivadas del aumento de temperatura en plantas de *D. antarctica*. La tolerancia al calor adquirida en esta planta estaría relacionada al umbral de inducción de HSP70, que parece depender de la diferencia entre la temperatura de crecimiento y la temperatura de estrés.

ABSTRACT

Deschampsia antarctica Desv. (Poaceae) is a perennial grass inhabiting extreme conditions of the Antarctic ecosystem with average daily temperatures of 0°C in the month of January (summer). Even though it is also found at lower latitudes on the American continent, it has been suggested that this plant has developed diverse biochemical adaptations in response to cold. Among these adaptations, has been described an increase in lipids and soluble sugars contents. An increase in leaf temperature by several degrees over atmospheric temperature to reach optimal conditions of CO₂ assimilation has also been observed. In plants of *D. antarctica* the maximum photosynthetic rate is observed at 13°C, decreasing by 30% at temperatures under 0°C.

Reproduction of *D. antarctica*, commonly vegetative or by seeds, occurs in the summer season when the plant is exposed to climatic variations. For instance, in sunny days leaf temperature may be higher than the optimal temperature of CO₂ assimilation. Thus, it is postulated that this plant suffers temperature stress during the daily cycle under conditions of the antarctic summer with temperatures over 13°C. The induction of heat shock proteins (HSP), such as ubiquitin and HSP70 proteins is a response usually associated with the protection and turnover of other damaged proteins in plants under temperature conditions different from the optimal growth temperature.

Therefore, this study was carried out to evaluate the following hypothesis: *D. antarctica* in front of higher or lower temperatures than its optimum for CO₂ assimilation (13°C), responds with the accumulation of heat shock proteins. This accumulation would be modulated by the difference between the growing (4°C and 13°C) and stress temperatures (over 13°C).

Groups of *D. antarctica* Desv. plants kept at 13°C and 4°C, were exposed for 2 hours to heat treatments of 25°, 30°, 35°, 40°, 45°, 50° and 60°C. For these treatments the temperature necessary to achieve the 50% of cellular death (LT₅₀), was evaluated by measuring electrolytic conductivity and triphenyltetrazolium chloride (TTC) reduction. Using the conductivity method, the LT₅₀ value was 48.3°C ± 0.3 in both groups of plants grown at 13°C and acclimated at 4°C. With the TTC reduction method, the LT₅₀ value was 47.8° C ± 0.6 for plants acclimated to 4°C and 46.5°C ± 0.6 for plants grown at 13°C.

Western analysis of soluble proteins from leaves of *D. antarctica* plants with an anti-ubiquitin polyclonal antibody and anti-HSP70 monoclonal antibody, was carried out upon heat treatment from 13° to 45°C for 2 hours. Western analysis with anti-ubiquitin antibody revealed the accumulation of ubiquitin conjugates in response to the cellular injury by high temperatures. In plants grown at 13°C and exposed to 40°C for 2 hours, an ubiquitin conjugate of 166 kDa was detected, increasing its level by 49% upon heat treatment at 45°C. In these plants a possible 34 kDa tetramer of free ubiquitin was detected, decreasing its levels by 45% when temperature was increased from 13° to

45°C, possibly because free ubiquitin binds damaged proteins upon heat treatment. In plants acclimated at 4°C and exposed to similar temperature treatments, the possible ubiquitin tetramer of 34 kDa was not detected but an ubiquitin conjugate of 62 kDa was accumulated between 25°C and 45°C. In spite of the presence and accumulation of ubiquitin conjugates associated with heat stress it was not possible to detect the free ubiquitin monomer in both groups of plants, at least up to the detection limit of the protein (10 ng), which suggests the active operation of the ubiquitination system as required by the turnover of damaged proteins after heat treatment.

Western analysis with anti-HSP70 monoclonal antibody showed that the highest HSP70 accumulation was observed at 35°C, both in plants grown and acclimated at 13° and 4°C, respectively. Kinetic studies of HSP70 accumulation in acclimated plants at 4°C and exposed at 35°C for 120 minutes showed an accumulation of the protein after 25 minutes of treatment. Similar treatments in plants grown at 13°C, showed HSP70 accumulation only after 50 minutes of heat stress. Both groups of plants showed the highest HSP70 accumulation after 100 minutes of heat treatment. The faster HSP70 accumulation occurred in plants pretreated at 4°C than those grown at 13°C, which agrees with the lowest cellular damage found in the former plants upon heat stress, as evaluated by determinations of the water content and TL₅₀.

Long time exposure of plants at 35°C induced a second peak of HSP70 accumulation at 12 hours for the plants acclimated at 4°C and at 16 hours for

those grown at 13°C. The second peak of HSP70 accumulation in plant maintained at 4°C, was four times more intense than the accumulation peak shown by plants grown at 13°C. This second HSP70 accumulation response could be related to a repair process of damaged proteins by heat which seems to be more efficient in plants acclimated at 4°C.

These results suggest that the induction and accumulation of the heat stress proteins, HSP70 and ubiquitin conjugate, are important protective and repair mechanisms of the damaged proteins produced with the temperature increase in plants of *D. antarctica*. The acquired tolerance to heat stress in this species would be related to the threshold of induction of HSP70 which seems to depend on the difference between growing and heat stress temperatures.

1.0 INTRODUCCION

1.1 Distribución y características de *Deschampsia antarctica* Desv.

Deschampsia antarctica Desv. pertenece a la familia Poaceae. Es una planta perenne que se distribuye por el norte en Argentina en las zonas de Mendoza y Santa Cruz y en Chile ocupa sectores de Tierra del Fuego e islas asociadas; además, se encuentra en las Islas Falkland, islas antárticas, subantárticas y costa oeste de la Península Antártica (Correa, 1978). Esta gramínea y *Colobanthus quitensis* (Kunt) Bartl. son las únicas plantas vasculares que habitan bajo las condiciones extremas del ecosistema antártico (Komárková y col., 1990; Moore, 1970), en donde las temperaturas mínimas existentes fluctúan entre 0 y -6°C con un rango máximo entre 0 y 6°C en Enero, siendo la media diaria de 0°C (Edwards y Lewis-Smith, 1988). En estas condiciones *Deschampsia antarctica* debe soportar el rigor del ambiente Antártico, desarrollándose por medio de la germinación de semillas o propagación vegetativa. Esta especie forma densos cojines de hasta 50 cm de diámetro y 10 cm de altura (Correa, 1978; Casaretto, comunicación personal), presenta hojas convolutas o plegadas con láminas de 0,3 a 1,5 mm de ancho y una lígula acuminada y membranosa de 2 a 8 mm (Moore, 1970). La variación de estos caracteres morfológicos asociados a la distribución geográfica son los rasgos intraespecíficos más sobresalientes de *Deschampsia antarctica* (Moore, 1970). Por ejemplo, las poblaciones de esta especie en la Península Antártica

a diferencia de las poblaciones de Tierra del Fuego e Islas Fakland, presentan lígulas más cortas y angostas, además de hojas fuertemente convolutas con culmos de menos de 2 cm que no exceden el largo de la inflorescencia (Moore, 1970). En las poblaciones antárticas de estas plantas, el inicio de la floración así como el de las espigas fértiles, son observadas en el mes de Enero. A mediados del mes de Febrero una gran mayoría de las plantas ha fructificado (Correa, 1978).

Se han observado poblaciones de *D. antarctica* creciendo en la Antártida durante el verano en suelos de origen glacial sin nieve, sugiriendo que esta planta ha desarrollado diversas adaptaciones metabólicas, fisiológicas y morfológicas inducidas por el frío, que le han permitido ser una especie colonizadora (Casaretto y col., 1993).

Entre las consecuencias metabólicas involucradas en la respuesta de las plantas al estrés de frío se incluyen modificaciones en la organización y composición lipídica de las membranas (Alberdi y col., 1991), en el contenido de proteínas (Gindin y col., 1992), carbohidratos (Chatterton y col., 1989) y en el balance de fitohormonas (Mohapatra y col., 1988; Talanova y Titov, 1994). En gramíneas de ambientes fríos en respuesta a las temperaturas bajas, se observado una pronunciada tendencia a la acumulación de carbohidratos no estructurales, tales como fructanos, sacarosa y almidón (Chatterton y col., 1989). Estudios realizados en *D. antarctica* demostraron un aumento del contenido de azúcares solubles en los ciclos diurnos a lo largo del verano. Esta

acumulación es mayor a finales de Febrero en comparación al mes de Enero, sugiriendo que esta planta almacena fuentes de carbohidratos en respuesta a la época invernal. (Zúñiga, 1992).

Plantas de regiones frías aumentan el contenido de galactolípidos, fosfolípidos y de ácidos grasos insaturados en las membranas (Alberdi y col., 1991). En hojas de *D. antarctica*, los niveles de galactolípidos son mayores que los encontrados en raíces de la misma planta (Zúñiga y col., 1994). En tanto, de los fosfolípidos analizados, sólo el fosfatidil glicerol fue encontrado en niveles significativamente mayores en las raíces que en las hojas de *D. antarctica*. Además, en la fracción fosfatidil inositol de las hojas, se observó un alto cociente de insaturación de lípidos (ácidos grasos insaturados / ácidos grasos saturados) de 3.3, que podría conferir una eficiente protección contra el frío a esta planta (Zúñiga, 1992; Zúñiga y col., 1994).

Una importante adaptación que determina en esta gramínea su alto grado de aclimatación al frío es el aumento de la temperatura foliar en varios grados con respecto al ambiente, alcanzando de esta forma las condiciones óptimas de asimilación de CO₂. Su máxima tasa fotosintética se obtiene a los 13°C y el 30% de esta tasa se observa a 0°C (Edwards y Lewis-Smith, 1988). Otro estudio concuerda con estos resultados, señalando que durante la recolección de plantas de *D. antarctica* Desv. en Febrero, la temperatura de las hojas al interior de la champa era de 9.4°C, mientras la temperatura del aire correspondía a 2.8°C (Zuñiga y col., 1994). Sin embargo, en época de verano

en la cual ocurre la propagación de esta gramínea, ella se ve expuesta a variaciones climáticas. En algunos días de sol puede establecerse un microclima foliar con temperaturas por sobre 13°C, que es el óptimo de asimilación de CO₂. La figura 1 muestra el registro promedio de la variación térmica foliar en *D. antarctica* con respecto a la temperatura ambiental. Estos datos fueron tomados *in situ* durante 3 días en el mes de enero de 1997, en la Isla Robert de la Península de Coppermine. Es posible observar que la temperatura de las hojas durante 6 horas superó en varios grados a la temperatura óptima de fotosíntesis, es decir, 13°C (Fig. 1B) Entonces, es posible suponer que en algunas ocasiones del verano Antártico, esta especie se encuentra bajo algún grado de estrés térmico.

1.2 Estrés térmico

Por definición estrés es considerado como una desviación significativa de las condiciones óptimas de vida para el organismo, el cual induce cambios y respuestas funcionales a todos los niveles, pudiendo ser estos transitorios o permanentes (si la perturbación es constante). De esta manera el organismo se adecua a un ambiente desfavorable (Larcher, 1995; Taiz y Zeiger, 1991). Una vez ocurrido el estrés, se produce una señal que es seguida por una alteración de las condiciones que mantienen la estructura de proteínas y membranas, así como de las funciones en que ellas participan (procesos bioquímicos, metabolismo energético) (Larcher, 1995). Durante esta señal predominan las

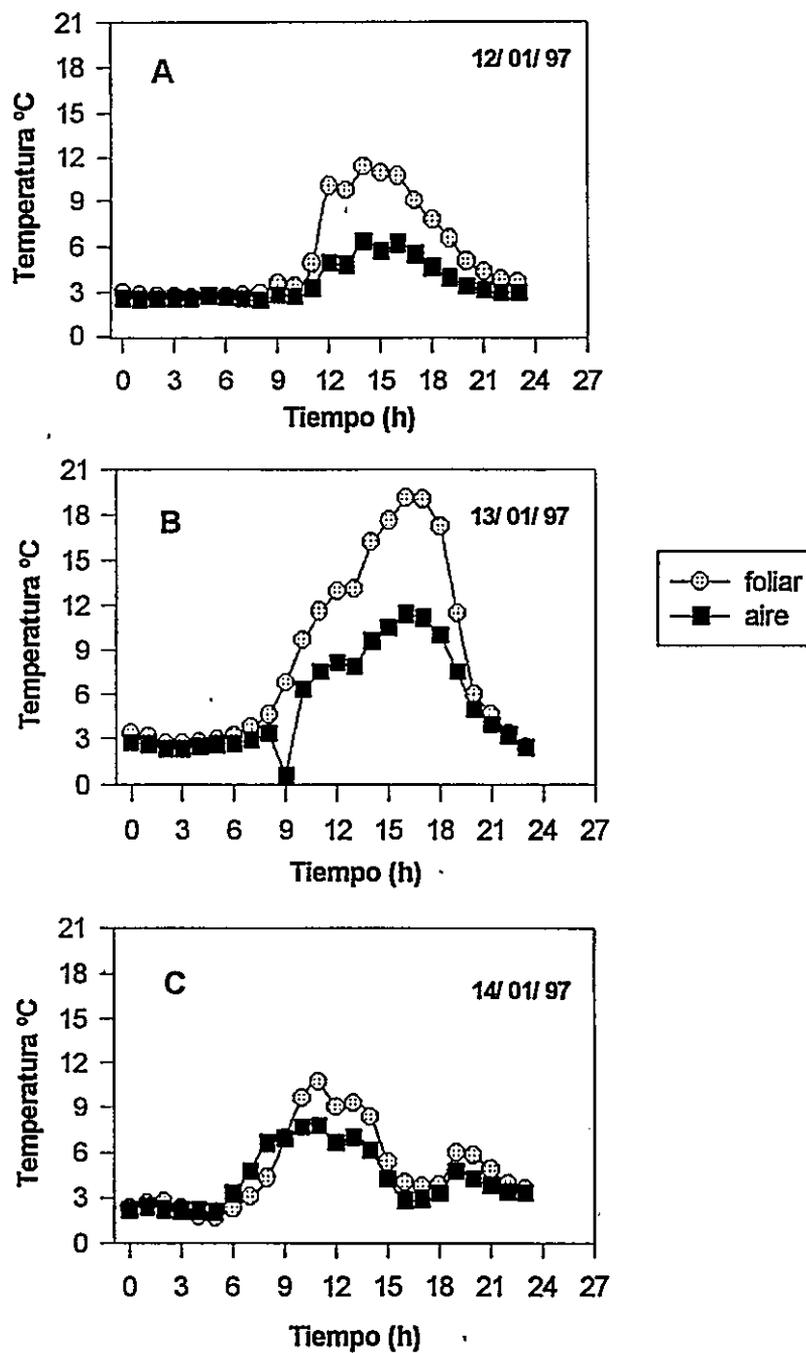


Fig. 1 Variación diaria de la temperatura foliar en *D. antarctica* Desv. y ambiental en la caleta Coppermine, Isla Robert, Península Antártica. Datos facilitados por Dr. Gustavo Zuñiga.

proteínas o síntesis de novo de sustancias de protección), los cuales conducen a la fase de resistencia (Larcher, 1995; Brodl, 1989). Bajo estrés continuo, esta resistencia puede incrementarse (endurecimiento) hasta alcanzar las condiciones normales, es decir, la adaptación al estrés. Si los límites de tolerancia son excedidos y la capacidad adaptativa es sobrepasada, el daño es permanente o deviene la muerte (Larcher, 1995).

1.3 Alteraciones celulares frente al estrés térmico.

Las membranas son barreras físicas y selectivas que separan las actividades celulares del medio ambiente; además regulan el movimiento interno de metabolitos entre los compartimientos celulares (Pareek y col., 1997).

En general, los efectos de tratamientos severos de frío y calor influyen sobre el aparato fotosintético, siendo el principal blanco la membrana del tilacoide (Terashima y col., 1994). Por ejemplo, cloroplastos aislados de trigo sometidos a tratamientos de fotoinhibición y estrés térmico, presentaron una reducción en la emisión de fluorescencia de la clorofila y un aumento de la peroxidación de los lípidos constituyentes de las membranas tilacoidales (Mishra y Singhal, 1993). Se ha sugerido que la cuantificación del daño a las membranas sería un índice bioquímico adecuado para establecer la capacidad de resistencia de las plantas a las condiciones estresantes (Palta, 1990).

En células foliares de arroz sometidas a estrés térmico se ha observado discontinuidad de la membrana plasmática y gránulos electrónicamente densos asociados a estos sitios dañados. (Pareek y col., 1997). Además, algunas membranas del retículo endoplásmico (R.E.) que aún se mantienen metabólicamente activas pueden reordenarse para formar densos complejos con ribosomas. Estos complejos inducen la síntesis específica de proteínas de estrés térmico (Pareek y col., 1997).

En cultivos celulares de maíz y tomate, el tratamiento térmico indujo la formación de gránulos asociados al citoesqueleto alrededor del núcleo, denominados gránulos de estrés térmico (HSG) (Nover y col., 1983, 1989). Estos gránulos pueden contener mRNAs de proteínas normales y proteínas de estrés térmico (HSPs70) (Nover y col., 1983, 1989), los cuales mantendrían la estabilidad de estos mRNA durante el período de estrés (Gallie y col., 1995). Estos autores sugieren que la inestabilidad de los mRNA frente a las condiciones de estrés térmico se debe a la pérdida de sinergismo entre el cap y la cola poly(A) de estos para funcionar como elementos regulatorios que promueven la iniciación de la traducción.

La respuesta de algunas células secretoras al estrés térmico comprende la interrupción de la síntesis normal de las proteínas, además se observa inestabilidad de los mRNA. Este proceso puede ser resultado de una alteración estructural de las membranas del RE durante el período de estrés térmico (Brodí, 1989). Este es el caso de la extensina, una proteína de la pared celular,

que es secretada a través del RE en respuesta al daño mecánico (Brodl y col., 1987). Al exponer tejidos heridos mecánicamente al estrés térmico de parénquima radicular de zanahoria, se induce la síntesis de HSPs, pero la síntesis y secreción de extensina es eliminada (Brodl y col., 1987).

1.4 Inducción de proteínas de estrés térmico y termotolerancia

La respuesta común de protección en la mayoría de los organismos frente a temperaturas por sobre los rangos normales de crecimiento es la inducción de cambios en el patrón de la expresión génica (Bond y Schlesinger, 1985; Lindquist y Craig, 1988; Nieto-Sotelo y col., 1990). Esta inducción promueve la activación de la transcripción de un grupo pequeño de genes (genes de estrés térmico), que codifican para las denominadas proteínas de estrés térmico (HSPs) (Cardemil, 1985; Bond y Schlesinger, 1985; Nieto-Sotelo y col., 1990; Vierling, 1991).

La inducción de HSPs es gatillada por un aumento abrupto de 5 a 10°C por sobre la temperatura normal de crecimiento (Kimpel y Key, 1985; Vierling, 1991). La acumulación de estas proteínas está correlacionada con la adquisición de termotolerancia en los organismos que las sintetizan (Key y col., 1981; Lindquist y Craig, 1988). Es decir, breves exposiciones a temperaturas subletales, seguidas de un período de recuperación son suficiente para iniciar la síntesis de HSP e inducir tolerancia a temperaturas superiores o letales (Bettany, 1995; Goycolea y Cardemil, 1991; Medina y Cardemil, 1993).

Las plantas, como otros organismos, también responden al incremento térmico induciendo la síntesis de HSPs. En plántulas de soja, breves pretratamientos a 40°C por 10 a 20 minutos inducen la síntesis de elevados niveles de HSP, otorgando termoprotección a 45°C (Lin y col., 1984). En cultivos celulares de *Lolium temulentum*, se observan cambios en la expresión de genes asociados con la inducción de termotolerancia, entre 15 a 60 minutos a 37°C. Sin embargo, en este estudio se requirió un período previo de recuperación a 25°C para adquirir tolerancia a la temperatura de 45°C (Bettany, 1995). También es posible adquirir tolerancia a una temperatura extrema mediante un moderado estrés calórico previo o incrementando gradualmente la temperatura de estrés (Yeh y col., 1994). Además, la termotolerancia puede ser adquirida a temperaturas no estresantes (25°C), mediante tratamientos químicos que imitan la inducción de HSPs. En plántulas de soja los pretratamientos de arsenito (50 µM) agregado al medio de incubación otorgan termoprotección a 45°C, sin haber sido sometidas a temperaturas subletales (Lin y col., 1984).

La intensidad de la respuesta al estrés calórico está determinado por algunos factores, como la velocidad de variación térmica, la duración de la exposición y la magnitud de la temperatura (Cheng y col., 1982). Estos factores sugieren la presencia en los organismos de una temperatura umbral para la activación de los genes de HSPs, dependiendo de las condiciones ambientales

de crecimiento, genotipo y estado de aclimatación del organismo (Vayda y Yuan, 1994)

Al inducir la síntesis de HSPs durante el estrés térmico, a menudo se disminuye o elimina una porción de la síntesis normal de proteínas celulares producidas sin estrés calórico (Brodl, 1989). Este efecto del estrés térmico sobre la síntesis normal de proteínas varía en relación al organismo y el tejido examinado (Brodl, 1989). En plantas de soja sometidas a estrés calórico, se ha observado una notable disminución en la expresión de proteínas que normalmente están presentes en la célula (Key y col., 1981). El patrón de proteínas normales en ápices radiculares de maíz incubadas a 40°C durante 2 horas se ve levemente afectado en comparación al control (25°C) (Cooper y col., 1984). Sin embargo, se observan diferencias sustanciales en el patrón proteico del tejido foliar de maíz expuesto al calor, con respecto al normal (Cooper y col., 1984). Así también, las temperaturas altas producen una elevada degradación de proteínas en las raíces del trigo (Ferguson, 1990).

1.5 Características y funciones de las HSPs

Las HSPs encontradas en eucariontes y algunas veces en procariontes muestran una alta similitud en la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos (Yeh y col., 1994), perteneciendo a miembros de familias altamente conservadas a través de la evolución (Vierling, 1991; Hartl y col., 1994).

Las principales clases de HSPs identificadas en los eucariontes han sido divididas en proteínas de alta masa molecular de 60 a 115 kDa y proteínas de baja masa molecular, con un rango entre los 16 a 30 kDa (Lindquist y Craig, 1988; Kimpel y Key, 1985). Estas últimas son particularmente abundantes en las plantas, las cuales se clasifican en cuatro familias multigénicas; dos de ellas se encuentran en el citoplasma y las restantes en el cloroplasto y el sistema endomembranoso (Yeh y col., 1994). Las HSPs también pueden estar presentes en las células no estresadas en bajos niveles (Brodl, 1989; Dai y col., 1993). La rápida inducción y acumulación de las HSPs permitiría la sobrevivencia celular durante los períodos de estrés térmico. Se cree que estas estarían involucradas en los mecanismos que minimizan o reparan el daño celular, causado por desnaturación térmica porque pueden actuar como chaperonas moleculares (Morimoto, 1993; Georgopoulos y Welch, 1993). Estas proteínas facilitarían el correcto plegamiento y ensamblaje de proteínas sometidas a estrés, previniendo que ellas formen agregados irreversibles y sin formar parte de la estructura final de ellas (Rothman, 1989; Gatenby y col., 1990; Hartl y col., 1994; Miernyk, 1997). Es sabido que la mayoría de estas chaperonas moleculares, expresadas por cambios térmicos bruscos u otras condiciones de estrés, poseen contrapartes que son expresadas constitutivamente. Estas chaperonas son esenciales para la viabilidad celular en condiciones de crecimiento normal y su expresión no es aumentada por la temperatura (Gatenby y col., 1990; Vierling, 1991; Hartl y col., 1994).

Otra proteína perteneciente a las HSPs que es inducida en respuesta a las condiciones de estrés térmico es la ubiquitina (Bond y Schlessinger, 1985; Viestra, 1987)

1.6 Síntesis de HSP70 en respuesta a estrés térmico.

Un grupo importante de proteínas de estrés termico, descritas como chaperonas moleculares, es la familia de 70 kDa (Miernyk, 1997). Estas proteínas son identificadas fácilmente, a causa de su alto grado de conservación. La proteína DnaK de *E. coli*, homóloga de las HSPs70, y la proteína de humanos presentan un 46% de identidad en las posiciones y un 65% de similitud a nivel de aminoácidos (Rensing y Maier, 1994). Los análisis de secuencia de aminoácidos en HSP70 de maíz, muestran un 68% de homología en *Drosophila*; esta aumenta a un 75% al compararlas con la de *Xenopus* y de humanos (Rochester y col., 1986).

Los estudios de Rensing y Maier (1994), confirman que cerca de un 75% de las secuencias proteicas de HSP70 han sido conservadas en las diferentes líneas a través de la evolución. La demostración de esta conservación es la inducción térmica de un gen híbrido de HSP70 aislado de maíz (monocotilédonea) y expresado en petunia (dicotilédonea) (Rochester y col., 1986). En la mayoría de los eucariontes investigados, estas proteínas están presentes en los diferentes compartimientos celulares y pertenecen a miembros de una familia de multigenes (Lindquist y Craig, 1988). En *Arabidopsis* las

proteínas de estrés de 70 kDa presentes en el citoplasma son codificadas por 4 a 6 genes (Miernyk, 1997).

Se han establecido para las HSP70 tres dominios funcionales. El dominio amino terminal de aproximadamente 44 kDa (Georgopoulos y Welch, 1993; Hartl y col., 1994); un dominio de ATPasa que contiene el sitio de unión a ATP. De hecho, una de las principales características de estas proteínas es su gran afinidad por ATP (Lindquist y Craig, 1988). Distante a este dominio se encuentra una región de 15 kDa, que contiene el sitio de reconocimiento y unión al péptido, es decir a las superficies hidrofóbicas expuestas de las proteínas afectadas por el estrés (Hartl, 1994; Miernyk, 1997). El dominio carboxilo terminal de la proteína de 10 kDa tendría un papel regulador; siendo el más variable en estructura y secuencia (Miernyk, 1997).

De acuerdo a la regulación de su expresión, algunos investigadores sugieren que las HSP70 serían un "tipo de termómetro", por el cual la célula percibe un estrés metabólico particular (Georgopoulos y Welch, 1993). En presencia de un estrés calórico, las proteínas normales nacientes y las maduras comienzan a desplegarse parcialmente y/o agregarse (Lindquist y Craig, 1988). Este hecho es debido a la exposición de sus grupos hidrofóbicos, produciéndose interacciones con dominios intra e intermoleculares proteína-proteína (Lindquist y Craig, 1988; Hartl y col., 1994), aún en presencia de concentraciones proteicas relativamente bajas (Hartl y col., 1994). Las proteínas de HSP70 tendrían la capacidad de reparar y renaturalizar las

proteínas inactivadas por el tratamiento calórico, volviéndolas a su conformación nativa (Georgopoulos y Welch, 1993; Yeh y col., 1994). Ellas secuestrarían los sitios reactivos del resto de las superficies reactivas presentes en la vecindad, previniendo la aglutinación y favoreciendo la ruta de plegamiento nativa apropiada (Georgopoulos y Welch, 1993).

El modelo de acción propuesto para HSP70 en levadura, *Drosophila* y humanos frente a un estrés calórico consiste en el reconocimiento de proteínas desplegadas. Las HSP70 se unen a estas proteínas dañadas. De esta forma, se produce una disminución de los niveles disponibles de las chaperonas moleculares de 70 kDa, activándose los factores de transcripción de estrés térmico (HSF) a un estado oligomérico (Sorger, 1991; Morimoto, 1993). Estos HSF se acumulan en el núcleo para unirse a los genes blanco, es decir, a los elementos de estrés térmico (HSE) (Morimoto, 1993). Estos HSE corresponden a una secuencia específica de reconocimiento del DNA, localizada en el extremo 5' de los genes que responden al estrés (Morimoto, 1993). La respuesta es rápida, ocurriendo pocos minutos después de la elevación térmica (Morimoto, 1993). Luego, se produce la fosforilación de este complejo multimérico, conduciendo a la activación de la transcripción, síntesis y acumulación de HSP70 (Sorger, 1991; Georgopoulos y Welch, 1993; Morimoto, 1993). La célula al retomar las condiciones normales, estimula la conversión de los HSF al estado inactivo, manteniéndose éstos en interacciones transitorias

con HSP70. Al volver a su distribución subcelular normal, determinan una regulación negativa para estos HSF (Morimoto, 1993).

La activación transcripcional es atenuada bajo una exposición prolongada de las células a una temperatura subletal de estrés o recuperación de la temperatura a las condiciones normales. Con ello, se inactivan los HSF ; sin embargo, luego de exposiciones prolongadas a temperaturas extremas, se observa una sostenida transcripción de los genes de estrés térmico y la activación de HSF para unirse al DNA (Morimoto, 1993). En plantas, se han aislado algunos genes en células de tomates que expresarían 2 o más proteínas con propiedades de HSF (Sorger, 1991).

1.7 Recambio proteico mediado por ubiquitina

El recambio proteico es un proceso fundamental en todos los organismos. Este consiste en dos eventos separados:

1. síntesis de proteínas a partir de aminoácidos y procesamiento de éstas a formas maduras.
2. desensamblaje o degradación de las proteínas maduras, especialmente en las proteínas de vida corta, de tal forma de restituir los aminoácidos (Viestra, 1987).

En las plantas, la degradación proteica ocurre en la germinación de semillas, desetiación, desarrollo de cloroplastos, nutrición mineral, senescencia y sobrevivencia a diversos estreses (Viestra, 1987).

Los agentes estresantes influyen en los nuevos polipéptidos sintetizados causando mal plegamiento y desnaturación de estos, los que deben ser eliminados de la célula (Viestra, 1987). Esta actividad proteolítica es llevada a cabo en los eucariontes por la ubiquitina (Bond y Schlesinger, 1985), proteína pequeña que contiene 76 residuos de aminoácidos. Ubiquitina es altamente conservada y participa en la respuesta proteolítica causada por las altas temperaturas (Jentsch, 1992). Esta proteína se encuentra en forma libre o unida covalentemente a las proteínas citoplasmáticas, nucleares e integrales de membrana destinadas a la degradación por proteasas dependientes de ATP (Agell y col., 1988; Baichmair y Varshavsky, 1989; Rothman, 1989).

Estudios inmunocitoquímicos realizados en protoplastos de *Vicia faba* y *Solanum nigrum* apoyan los resultados de otros investigadores sobre la localización de ubiquitina en las plantas, encontrándose en el citoplasma, mitocondria, R.E., núcleo, cloroplasto, plasmodesmos y en las vacuolas, pero ausentes de paredes celulares (Ehlers y col., 1996).

Las ubiquitinas son proteínas termoestables, que poseen una estructura globular empaquetada y su secuencia primaria es la más conservada, observándose sólo tres aminoácidos de diferencia entre las secuencias de levaduras y humanos (Jentsch, 1992). Esta proteína de 8,5 kDa es codificada por dos clases diferentes de genes. La primera codifica poliubiquitinas en tandas repetidas de secuencias (alineadas de cabeza a cola). La segunda clase, codifica directamente el monómero de ubiquitina fusionada por su amino

terminal a 2 extensiones diferentes de proteínas ribosomales de las subunidades mayor y menor (Jentsch, 1992; von Kampen, 1996).

1.8 Ubiquitina como una proteína de estrés térmico

La conjugación de ubiquitina a proteínas dañadas durante el período de estrés térmico, es uno de los principales eventos para la degradación de aquellas proteínas alteradas. Por ejemplo, raíces de trigo expuestas a 40°C, presentaron elevados niveles de conjugados de ubiquitina con proteínas de alta masa molecular y bajos niveles de ubiquitina libre (Ferguson y col., 1990). Paralelamente, el tratamiento a 40°C disminuyó la vida media de las proteínas totales a 23 horas, de 51 horas a 22°C. Esto sugiere un aumento en el recambio proteico mediado por la inducción de ubiquitina durante el período de estrés térmico a 40°C (Ferguson y col., 1990).

1.9 Ruta de degradación vía ubiquitina

La conjugación de las proteínas a ubiquitina es un paso obligado para la hidrólisis de proteínas de corta vida, desnaturalizadas, o anormales, como de ciertos reguladores del ciclo celular (Hochstrasser, 1996; von Kampen, 1996). La unión de este complejo se realiza por enlaces isopeptídicos (covalentes) entre el carboxilo terminal de la ubiquitina y los grupos ϵ - amino de la lisina de las proteínas (Hochstrasser, 1996). Los estudios indican que las cadenas de multiubiquitinas se forman por la unión de la lisina 48 de una molécula de

ubiquitina con la molécula anterior; en condiciones de estrés esta multiubiquitinación ocurre a partir de la lisina 63 (von Kampen, 1996). La ruta de degradación vía ubiquitina en los diversos eucariontes requiere la participación de varias reacciones enzimáticas (Jentsch, 1992). Esta comienza con la activación del carboxilo terminal de la ubiquitina previo a la formación del enlace isopeptídico, mediante la enzima E_1 . Esta enzima adenila a la ubiquitina en presencia de ATP, para luego formar un enlace tioéster E_1 -ubiquitina (Jentsch, 1992; Hochstrasser, 1996). A diferencia de las levaduras y mamíferos, en plantas se han reportado múltiples proteínas E_1 (Hatfield y Vierstra, 1989; von Kampen, 1996). En el siguiente paso, la ubiquitina activada es transferida a un residuo específico de cisteína de una enzima E_2 que conjuga a ubiquitina, formando un tioéster de ubiquitina- E_2 (Jentsch, 1992; Hochstrasser, 1996). El tercer paso, es el reconocimiento del amino terminal de las proteínas destinadas a proteólisis; esta función es realizada por la enzima E_3 (proteína ligasa). La enzima E_3 se une tanto a la proteína blanco, como al conjugado de ubiquitina-enzima E_2 . Luego las cadenas de ubiquitinas son transferidas desde el complejo ubiquitina- E_2 - E_3 a esta proteína blanco, en el cual el residuo de glicina del carboxilo terminal de la ubiquitina se une por enlace isopeptídico a un residuo de lisina interno de la proteína (Jentsch, 1992; von Kampen, 1996). También es posible que la enzima E_2 catalice la adición de ubiquitina a las proteínas blanco, sin la participación de la proteína ligasa (E_3) (Jentsch, 1992; Hochstrasser, 1996). Finalmente, la proteína marcada y

conjugada a esta cadena de ubiquitinas, es degradada por un complejo multicatalítico de proteinasas llamado proteosoma de 26S. El proteosoma de 26S está formado por una partícula cilíndrica hueca que contiene 4 anillos apilados con 6 polipéptidos cada uno (20S) y 2 complejos de subunidades polares regulatorias (19S), dependiente de ATP (Jentsch, 1992; von Kampen, 1996). En el interior del proteosoma de 20S, la proteína conjugada a ubiquitina se rompe en péptidos más cortos y se reciclan nuevamente las moléculas de ubiquitina (Hochstrasser, 1996; von Kampen, 1996). Alternativamente, los conjugados de ubiquitina pueden ser desensamblados por isopeptidasas, liberando a las ubiquitinas, así como a la proteína conjugada intacta. Incluso, los conjugados de ubiquitina pueden mantenerse estables en el tiempo (Hochstrasser, 1996)

1.10 Presencia de proteínas de estrés térmico en condiciones de temperaturas bajas

A partir de los antecedentes previos, se ha determinado que la temperatura a la cual son inducidos los genes que codifican HSP es característica para cada organismo y sus condiciones de crecimiento (Vayda y Yuan, 1994). Es así que, *Plocamium cartilagineum* (L. Dix.), alga roja que habita las aguas submariales de la Península Antártica con variaciones térmicas de +0,3°C en el verano a -1,8°C en el invierno, manifiesta inducción de mRNA HSP70 y transcritos de poliubiquitina, cuando el alga es incubada a los 5°C,

siendo la temperatura de máxima inducción de HSP70 a los 10°C (Vayda y Yuan, 1994). En otro estudio efectuado en un ecotipo termotolerante de *Laminaria saccharina*, que vive en la costa sur de Nueva York a 12°C (excepto en los meses de verano), se pudo observar que la exposición de esta alga a 20°C, determinó un aumento del contenido de proteínas como de HSP90, siendo tres a cuatro veces superior la inducción de HSP90 con respecto a las algas susceptibles al calor (Gerard y col., 1997).

Cabané y col. (1993) demostraron la síntesis de proteínas que presentan alta homología con miembros de la familia de proteínas de estrés térmico de 70 kDa (HSP70), en plantas de soja aclimatadas a 8°C. El primer reporte de aumento en la síntesis de estas proteínas de HSP70 inducidas por las bajas temperaturas fue hecho en plantas de espinaca aclimatadas a 5°C (Neven y col., 1992). La inducción y acumulación de estas proteínas durante la aclimatación al frío pueden representar la contraparte de las HSP70 que han sido detectadas en abundancia relativa bajo condiciones normales, es decir, proteínas relacionadas a esta familia de estrés, las que pueden tener un importante valor adaptativo durante la aclimatación al frío (Cabané y col., 1993). Estos autores plantean la posibilidad de que la tolerancia a las bajas y altas temperaturas involucren mecanismos similares.

Las HSP70, bajo condiciones de estrés calórico, actúan uniéndose a proteínas desnaturalizadas, forzando el plegamiento a la conformación nativa y evitando que proteínas dañadas se agreguen (Georgopoulos, 1993). Dado que las bajas

temperaturas también inducen cambios en el plegamiento de las proteínas (Guy y col., 1994), es posible sugerir que en *D. antarctica* las HSP70 pueden proteger y prevenir el daño celular, producido por la acumulación de proteínas desnaturalizadas por frío y/o calor (Cabané y col., 1993; Vayda y Yuan, 1994). Se ha demostrado también, que el estrés de frío induce un aumento de conjugados de ubiquitina-proteínas en extractos foliares de *Clerodendrum speciosum* (Gindin y Borochoy, 1992).

Tanto la acumulación de proteínas de HSP70 como el incremento del contenido total de ubiquitina conjugada en plantas sometidas a temperaturas bajas y altas, tiene una gran importancia para la sobrevivencia de la célula (Bond y Schlesinger, 1985; Gindin y Borochoy, 1992).

Se han establecido algunos parámetros anteriormente mencionados que determinarían la tolerancia al frío en *D. antarctica*, pero se desconocen los antecedentes que indiquen el comportamiento o las estrategias utilizadas frente a un estrés de calor, que efectivamente pareciera presentarse en la época de verano, en la cual esta especie es más vulnerable a temperaturas superiores a 13°C, temperatura en la que obtiene su máxima tasa fotosintética (Edwards y Smith, 1988).

Ya que la acumulación de proteínas de estrés térmico parece ser un mecanismo común de respuesta frente a altas y bajas temperaturas diferentes de las óptimas de crecimiento, en esta tesis se evaluó la siguiente hipótesis:

Deschampsia antarctica Desv. frente a temperaturas mayores o menores que su óptimo de asimilación de CO₂ (13°C), responde con acumulación de proteínas de estrés térmico. Esta acumulación será modulada por la diferencia entre la temperatura de crecimiento y la de estrés. Para probar esta hipótesis, se evaluó la acumulación de las proteínas de estrés térmico ubiquitina y HSP70, asociada a los tratamientos de temperatura en dos grupos de plantas de *D. antarctica*: uno mantenido a 13°C y el otro aclimatado a 4°C por 15 días.

Si la hipótesis es correcta, entonces como corolario de ella podría esperarse que a mayores diferencias entre la temperatura de crecimiento y la de estrés, mayor debería ser el grado de termotolerancia adquirida.

1.11 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la tolerancia al calor a través de respuestas fisiológicas y determinar la expresión de proteínas de estrés térmico, en plantas de *Deschampsia antarctica* Desv. sometidas a condiciones de altas temperaturas.

1.12 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Determinar la susceptibilidad de *Deschampsia antarctica* Desv. a distintos tratamientos calóricos mediante el ensayo de TL50 por conductividad eléctrica y reducción del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) como indicadores fisiológicos.
2. Determinar la presencia de proteínas de estrés térmico (HSP70, ubiquitina) en plantas de *D. antarctica* Desv., sometidas a tratamientos de estrés calórico.
3. Evaluar en el tiempo la presencia de HSP70 en plantas *D. antarctica* Desv. sometidas a una temperatura subletal.
4. Evaluar diferencias en los niveles de HSP70 y ubiquitina inmunodetectable en respuesta al estrés calórico en *D. antarctica*.

2.0 MATERIALES Y METODOS

2.1 Material Vegetal:

Se usaron plantas *D. antarctica* Desv., procedentes de la Antártida marítima, colectadas en la Península de Coppermine en la Isla Robert (62°22' S, 59°43' W), durante los meses de Enero de 1996-97. Las plantas fueron crecidas y multiplicadas en condiciones de laboratorio en potes plásticos. Se ensayaron cuatro tipos de sustratos para determinar que tipo de suelo era el más adecuado. El ensayo se inició con 40 plantas individuales, homogéneas, puestas en cada maceta durante 3 meses y medio. Las evaluaciones se realizaron a las 3, 6, 12 y 14 semanas, donde se muestrearon 40, 30, 20, 10 plantas respectivamente, para el análisis de brotes y 10 plantas cada vez para materia seca. Los sustratos ensayados fueron:

1. corteza de pino lixiviada + perlita estéril (3:1)
2. turba + tierra de hoja estéril (1:1)
3. turba estéril
4. tierra de hoja + turba + perlita estéril (2:2:1)

Las plantas fueron mantenidas en una cámara de cultivo Heraeus Vösch a $13^{\circ}/11^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ día/noche respectivamente, con un fotoperíodo de 12 horas luz, intensidad de $125 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ y una humedad relativa del 70% (ver resultados en el anexo).

A partir de este ensayo se eligió multiplicar las plantas en turba + tierra de hoja estéril (1:1), las que fueron fertilizadas con una solución de 0,12 g/l de phostrogen y regadas cada 3 días. Se seleccionó un grupo de plantas al azar para ser aclimatadas por 15 días a 4°C.

2.2 Análisis fisiológicos:

2.2.1 Determinación de temperaturas letales (TL₅₀) mediante conductividad eléctrica

Plantas de *D. antarctica* Desv. en constante crecimiento a 13°C y aclimatadas a 4°C durante 15 días en cámaras de crecimiento con una intensidad de 70 $\mu\text{mol/ m}^2\text{s}^{-1}$ y fotoperíodo de 12 horas, fueron sometidas por 2 horas a temperaturas de: 20°, 25°, 30°, 35°, 40°, 45°, 50°, 60° y 65°C, respectivamente. Para determinar el TL₅₀, es decir, la temperatura en la cual se logra un 50% de eliminación de electrolitos en relación a la conductividad del tejido muerto, que corresponde al 100% se utilizó una modificación del protocolo de Martineau y col. (1979). Se tomaron 200 mg de tejido foliar de plantas crecidas a 4° y 13°C, cortadas a 1 cm de largo, que fueron colocadas en frascos con 4 ml de agua desionizada y se les sometió a los tratamientos de estrés en baños termoregulados. Luego, las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente, el volumen se completó a 6 ml con agua destilada. Estas muestras fueron incubadas en agitación a 15°C, durante 18 horas en oscuridad, para permitir la difusión de electrolitos desde los tejidos a la

solución externa. Después de este período los frascos fueron mantenidos a temperatura ambiente, procediéndose a registrar la conductividad inicial de las soluciones. Una vez finalizada esta operación, las muestras se autoclavaron por 35 minutos a 1,2 Kg/cm² y 121° C, para matar el tejido foliar. Todos los frascos fueron llevados a temperatura ambiente, para registrar nuevamente la conductividad final de las soluciones. El grado de daño inducido por los tratamientos térmicos fue calculado según:

$$\% \text{ daño} = \left\{ 1 - \frac{1 - (T_1/T_2)}{1 - (C_1/C_2)} \right\} \times 100$$

donde los subíndices 1 y 2 se refieren respectivamente a las conductividades antes y después de matar en autoclave las muestras controles (C) y sometidas a temperaturas (T).

2.2.2 Determinación de temperaturas letales (TL₅₀) mediante reducción de TTC

Para determinar el daño por efecto de la temperatura a nivel enzimático (deshidrogenasas), se ensayó la capacidad de las plantas estresadas para reducir el cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC). La metodología usada es una modificación descrita por Steponkus y Lanphear (1967). Un grupo de plantas de *D. antarctica* Desv. crecidas a 13°C fueron aclimatadas a 4°C durante 2 semanas. Posteriormente, 100 mg de hojas de ambos grupos de plantas (4° y 13°C) fueron cortadas a 1 cm de largo y colocadas en frascos oscuros con 1 ml de agua desionizada. Las muestras fueron sometidas a tratamientos calóricos

en baños termoregulados a 13°, 30°, 35°, 40° y 45°C, respectivamente, por 2 horas siendo 25°C la temperatura control para ambos grupos de plantas. Luego del tratamiento térmico, el tejido se infiltró al vacío con 0,6% P/v de TTC en tampón fosfato (0,05 M, pH 7,4) durante 5 minutos. Después de 20 horas en oscuridad a temperatura ambiente y agitación, el TTC reducido fue extraído del tejido con 7 ml de etanol (95%) caliente por 5 minutos. Los extractos fueron enfriados a temperatura ambiente y aforados hasta volumen total de 10 ml con etanol. Finalmente, el extracto fue cuantificado espectrofotométricamente a 530 nm. El porcentaje de daño en cada tratamiento se expresó como:

$$\% \text{ daño} = 1 - (A_{530} \text{ hojas tratadas} / A_{530} \text{ hojas controles}) \times 100$$

donde, A_{530} corresponde a la absorbancia debida al TTC reducido.

2.3 Contenido de agua en *Deschampsia antarctica*

Después de cada tratamiento térmico, 100 mg de hojas de *D. antarctica* fueron secadas en estufa a 80°C hasta peso constante y luego pesadas. El porcentaje de agua fue calculado como:

$$(P_f - P_s / P_f) \times 100$$

donde P_f y P_s corresponden a peso fresco y peso seco, respectivamente

2.4 Tratamientos térmicos:

Grupos de plantas aclimatadas a 4°C durante 2 semanas, como crecidas a 13°C fueron expuestas por 2 horas a temperaturas de 25°, 30°, 35°, 40° y 45°C para proceder a la extracción de proteínas totales.

Se efectuó una cinética de inmunodetección con el anticuerpo de HSP70 para ambos grupos de plantas a la temperatura subletal de 35°C, desde 2 hasta 20 horas y se repitió la cinética de 20 horas para ubiquitina libre.

2.5 Extracción y separación de proteínas solubles:

Terminado el tratamiento térmico, 100mg de tejido foliar fueron macerados en frío y homogeneizado en 3 volúmenes de un tampón de extracción Tris-HCl 0,06 M pH 6.8; SDS 1%; β -mercaptoetanol 2,5 % y glicerol 5%, descrito por Laemmli (1970). Los extractos fueron hervidos por 2 minutos y centrifugados por 7 minutos en una microcentrífuga. En el sobrenadante se cuantificó las proteínas solubles por el método de Bradford (1976), mediante una curva de calibración con BSA (Sigma) como estándar. Las proteínas de estos extractos fueron separadas y analizadas en geles desnaturantes SDS al 10%, 12.5% y 15% de acrilamida (SDS-PAGE), descritos por Laemmli (1970), agregando en cada pocillo del gel 15 μ g de proteínas. Se aplicó un voltaje de 100 volts al gel concentrador y 200 volts al gel separador durante 1 hora, utilizando una cámara Mini - Protean II (Bio - Rad). Como estándares de masa molecular se incluyeron proteínas preteñidas, de un kit comercial de amplio

rango (Bio labs), estas fueron: β - galactosidasa (175 kDa), paramiosina (83 kDa), glutámico deshidrogenasa (62 kDa), aldolasa (47,5 kDa), triosa fosfatoisomerasa (32,5 kDa), β - lactoglobulina A (25 kDa), lisozima (16,5 kDa) y aprotinina (6,5 kDa). Los mini geles fueron teñidos con Azul de Coomassie y luego desteñidos en una solución de 7,5% de ácido acético y 5% de metanol. Finalmente los geles fueron secados entre papel filtro y papel celofán en un secador de geles (Drygel modelo SE540, Hoefer Scientific Instrument).

2.6 Análisis de Western blot:

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa para efectuar los análisis de inmunoblot según el protocolo descrito por Guy y col. (1992), utilizando una celda de transferencia semi seca (Bio - Rad) por 40 minutos a 450 mA. Efectuada la transferencia de las proteínas, las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 10% en un tampón Tris- HCl 20 mM pH 7.5 y NaCl 500 mM (TBS) durante una hora en agitación. Se procedió a efectuar la incubación con el primer anticuerpo, ya sea con el suero policlonal Anti-Ubiquitina libre (Sigma) desarrollado en conejo contra ubiquitina de globulos rojos de bovino conjugada a hemocianina (KLH) (dilución 1:200 en TBS) o empleando un anticuerpo monoclonal anti HSP70, que reconoce la forma inducible HSP72 de bovino (dilución 1:500 en TBS). La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C, posteriormente se hicieron tres lavados de 20 minutos cada uno en TTBS (Tween al 0,1% en TBS). La

membrana fue incubada en el segundo anticuerpo que fueron ambos generados en cabra (anti IgG) y conjugado a fosfatasa alcalina por una hora a temperatura ambiente. La visualización de las bandas se realizó a partir de la incubación de las membranas en una solución de revelado (Tampón Tris 100 mM pH 9.5; NaCl 100 mM y $MgCl_2$ 5 mM) junto a los sustratos de la fosfatasa alcalina, azul de nitrotetrazolio (NBT) y bromo cloro indolil fosfato (BCIP). La intensidad de las bandas proteicas en los Western blot fueron evaluados densitométricamente usando un scanman Logitech modelo 256 y en el software IQ25. Los resultados fueron traducidos en intensidad relativa (unidades de densidad óptica $\times mm^2 \times \mu g$ de proteína⁻¹). Repeticiones independientes del mismo experimento mostraron patrones de expresión similares.

2.7 Análisis estadísticos:

Se realizó un análisis de varianza para los ensayos de sustratos y el test de Tukey (1951). Se efectuó una transformación angular (arcsen) para la determinación de los porcentajes de biomasa : $\text{Peso fresco} - \text{Peso seco} / \text{Peso fresco} \times 100$. Mediante el test de Kruskal - Wallis se analizó el TL_{50} de las plantas crecidas a 4° y 13° C.

3.0 RESULTADOS

3.1 Análisis Fisiológicos

3.1.1 TL₅₀ mediante conductividad eléctrica

El método de conductividad desarrollado por Martineau y col. (1979) fue utilizado para determinar el TL₅₀ durante el tratamiento de temperaturas superiores a 4° o 13°C, tanto en el grupo de plantas aclimatadas a 4°C durante 15 días como en las crecidas a 13°C, respectivamente. Los análisis de varianza efectuados para comparar los valores de estos dos grupos de plantas sometidas a las altas temperaturas de estrés indican que no existen diferencias significativas en sus conductividades, según prueba de Kruskal - Wallis ($p \leq 0,05$) (Fig. 2). Se observó una tendencia sigmoïdal de las curvas de daño foliar en *D. antarctica* en función de la temperatura. Por ello la temperatura promedio necesaria para alcanzar el 50% de daño (valores obtenidos a partir del software Table Curve, Jandel Sc.) en las plantas aclimatadas a 4°C fue de 48,3°C \pm 0,3 (Fig. 2). Este valor coincidió con el del grupo de plantas crecidas a 13 °C (48,3°C \pm 0,1). Además, se observó un menor porcentaje de daño en las plantas aclimatadas a 4° entre los 25° a 45°C (temperaturas sub-letales) con respecto a las no aclimatadas. Por ejemplo, a los 45°C de exposición se alcanzó un 21% de daño en las plantas crecidas a 13°C, con respecto a un 12% de daño en las plantas aclimatadas a 4°C (Fig 2).

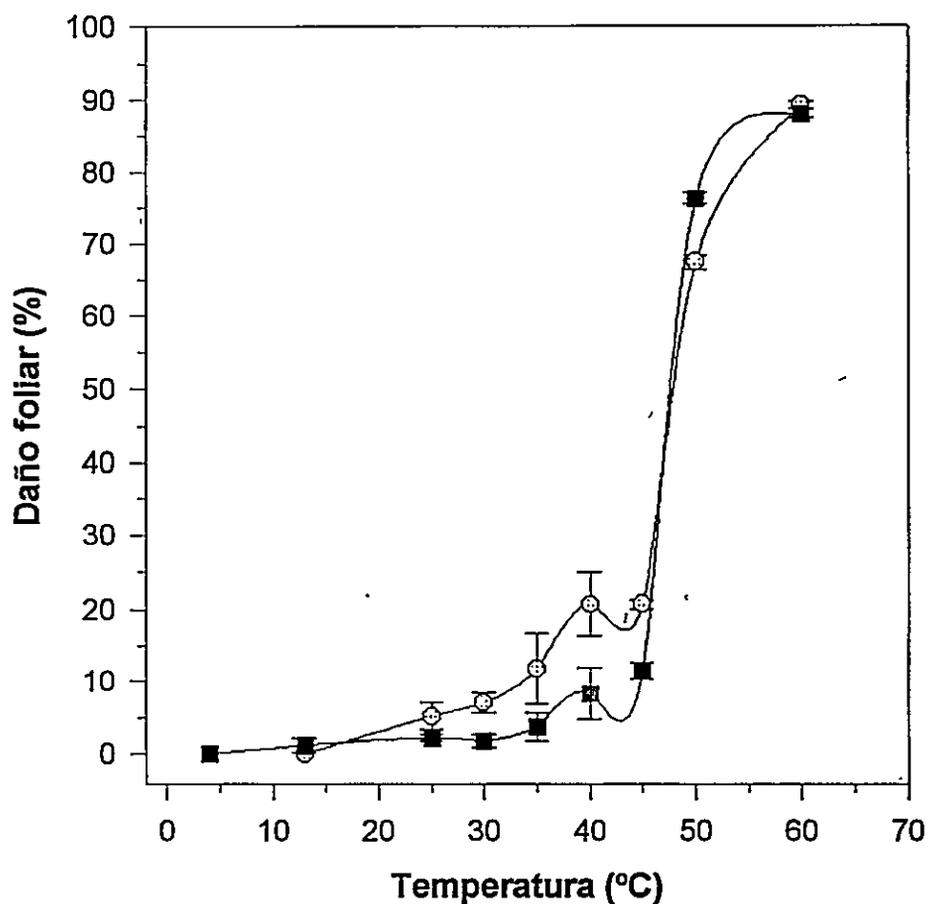


Fig 2. Daño provocado por tratamientos térmicos en plantas aclimatadas a 4°C durante 15 días (■) y plantas mantenidas a 13°C^(○). Estas fueron sometidas a los tratamientos térmicos por 2 horas. El grado de daño fue calculado: $\left\{ 1 - \frac{1 - (T_1/T_2)}{1 - (C_1/C_2)} \right\} \times 100$, donde T y C corresponden a los tratamientos y controles respectivamente y los subíndices 1 y 2 se refiere a las conductividades inicial y final, respectivamente. Mediante el test de Kruskal - Wallis se analizó el TL₅₀ de las plantas crecidas a 4° y 13° C. Los valores corresponden al promedio de 6 mediciones independientes \pm error estándar.

Los análisis de varianza señalan diferencias significativas para los ensayos de 40°C (ANDEVA, $F[1,10]=5,1185, p<0,05$) y 45°C (ANDEVA, $F[1,10]=44,2032, p<0,05$) de estas dos curvas (Fig. 2)

3.1.2 TL₅₀ mediante reducción de TTC

Para comparar los resultados obtenidos en la determinación de TL₅₀ por conductividad eléctrica, se efectuó otra determinación por el método de reducción del cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) y así, establecer posibles diferencias de TL₅₀ entre plantas aclimatadas a 4° y crecidas a 13°C que pudieran haber no sido detectadas por el método de conductividad eléctrica (Fig 3). La estimación de esta temperatura, a partir del software Table Curve, Jandel Sc. para el ensayo de reducción del TTC señala que la temperatura crítica para alcanzar el 50% de daño en las plantas aclimatadas a 4°C fue a los 47.8°C ± 0.6 mientras que en las plantas crecidas a 13°C fue a los 46,5°C ± 0.6 (Fig 3). Estos valores de temperatura no muestran diferencias significativas en el ensayo de reducción de TTC, según prueba de Kruskal - Wallis ($p<0,05$). Sin embargo, se debe mencionar que los TL₅₀ determinados por el método de reducción de TTC presentaron valores de temperaturas de 0,5°C a 1,8°C menores que en los TL₅₀ determinados por el método de conductividad, para ambos grupos de plantas analizados (Tabla 1). Además, se observó, un menor porcentaje de daño en las plantas aclimatadas a 4°C, en comparación a las plantas crecidas a 13°C en las temperaturas subletales (Fig. 3), lo cual fue

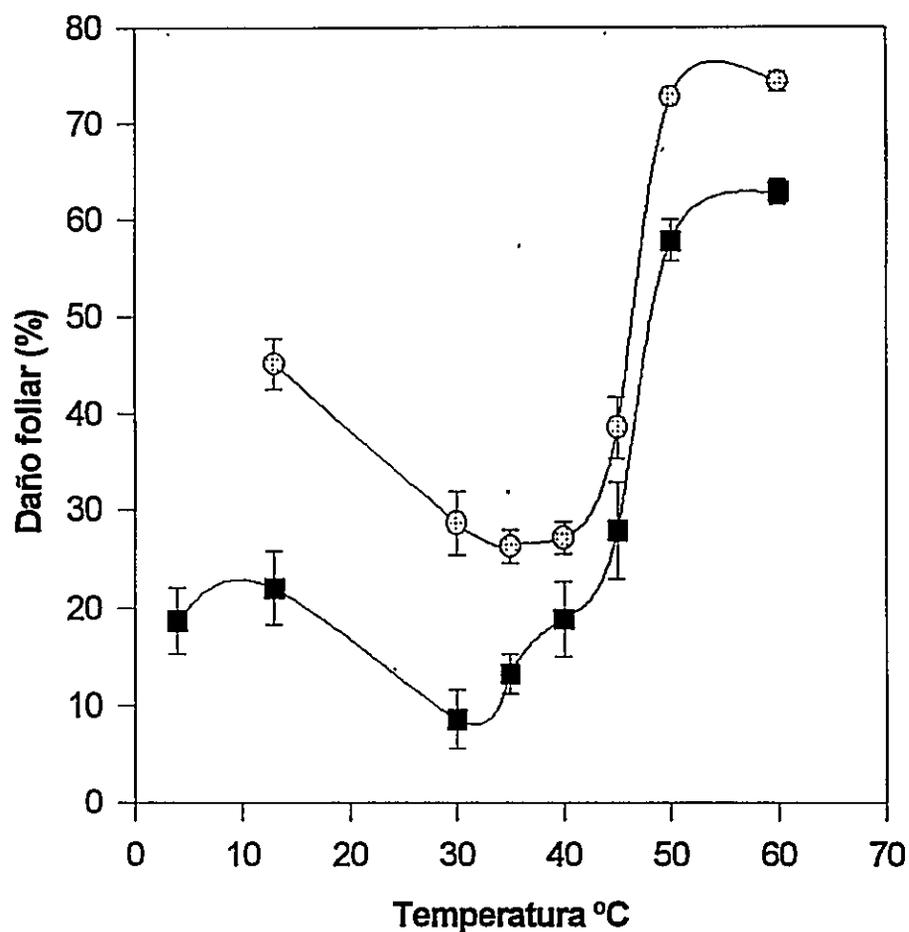


Fig 3 Evaluación del daño foliar por reducción del TTC en plantas de *Deschampsia antarctica*, aclimatadas a 4°C durante dos semanas (■) y crecidas a 13°C (⊙), después de los tratamientos térmicos de 2 horas. El porcentaje de daño es expresado como: $1 - \frac{A_{530} \text{ hojas tratadas}}{A_{530} \text{ hojas controles}} \times 100$, donde A corresponde a la absorbancia a 530 nm. Los valores corresponden al promedio de 6 mediciones independientes \pm error estándar.

Tabla 1. Temperatura a las que se alcanza el 50% de daño (TL₅₀) en los ensayos de conductividad y reducción de TTC para grupos de plantas crecidas a 13°C y plantas aclimatadas a 4°C por 15 días. Los valores corresponden a los promedios de 6 repeticiones independientes \pm error estándar y fueron calculados con el software Table Curve (Jandel Scientific).

Temperatura de crecimiento previo al estrés en Plantas de <i>D.antarctica</i> (°C)	TL ₅₀ Conductividad (°C)	TL ₅₀ Reducción de TTC (°C)
13	48,3 \pm 0,1	46,5 \pm 0,6
4	48,3 \pm 0,3	47,8 \pm 0,6

coincidente con las curvas presentadas en el ensayo de conductividad. El análisis de varianza confirma que el daño foliar evaluado por el método de reducción de TTC a los 13°C, es significativamente menor en las plantas aclimatadas a 4°C con respecto a las crecidas a 13°C (ANDEVA, $F[1,10]=22,4363$, $p<0,05$) (Fig. 3).

3.2 Contenido de proteínas

Las proteínas solubles fueron cuantificadas en los extractos foliares de la gramínea mantenidas a 13°C y a 4°C, y posteriormente expuestas a estrés calórico por dos horas. El efecto de los tratamientos calóricos causó una reducción del contenido de proteínas solubles en las plantas de *D. antarctica*, en comparación a los controles. Sin embargo, el mayor contenido proteico se observó en el grupo de plantas crecidas a 13°C, en todos los tratamientos térmicos al compararlos con el grupo de plantas aclimatadas a 4°C (Fig. 4). Este último grupo presentó, además, una disminución de proteínas a partir de los 13°C hasta los 45°C, observándose una reducción de un 12% a los 45°C en comparación al 2% determinado para el grupo crecido a 13°C a esa temperatura de estrés. En ambos casos el porcentaje descrito es en relación a la temperatura control de 4°C y 13°C, respectivamente.

Se observó un pequeño aumento del 2% de proteínas a 30°C para las plantas crecidas a 13° (Fig. 4), en comparación a la temperatura control (13°C).

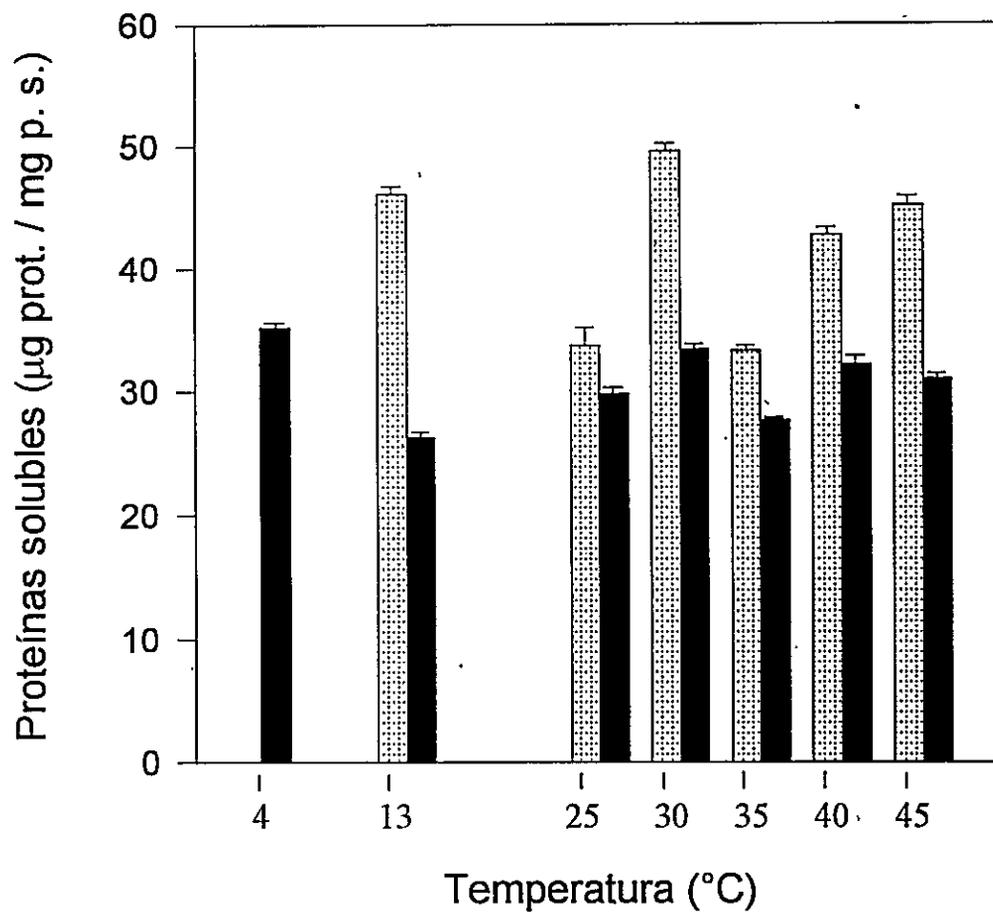


Fig. 4 Contenido de proteínas en extractos foliares de *D. antarctica* aclimatada a 4°C (■) y crecida a 13°C (▨) y posterior exposición a estrés calórico por dos horas. Los valores corresponden al promedio de tres réplicas independientes \pm error estándar.

3.3 Variación del contenido de agua en plantas sometidas a estrés calórico

El contenido de agua en hojas de *D. antarctica* para ambos grupos experimentales de plantas (4°C y 13°C), presentó una disminución a medida que aumentó la temperatura de estrés (Fig. 5). Se observó una disminución significativa entre los 45°C y 48°C, siendo la máxima pérdida de agua a los 48°C, que fue similar en ambos grupos de plantas. Sin embargo, comparando el contenido de agua a los 48°C con respecto al observado en cada grupo de plantas antes del tratamiento térmico, la pérdida de agua con el aumento de temperatura fue un 5% menor en las plantas aclimatadas a 4°C que en las crecidas a 13°C (Fig. 5).

Las plantas aclimatadas a 4°C presentaron un contenido de agua de un 7% menor con respecto a las crecidas a 13°C. Esta disminución del contenido de agua podría interpretarse como un síntoma de daño durante el pretratamiento a 4°C que ya ha puesto en funcionamiento algún mecanismo que proteja al tejido contra una mayor deshidratación durante el aumento de temperatura.

3.4 Ubiquitina en plantas crecidas a 13°C y sometidas a estrés calórico

Las proteínas solubles provenientes de los extractos de las hojas de *D. antarctica* crecidas a 13°C y tratadas por 2 horas a diferentes temperaturas entre 25°C a 45°C, fueron analizadas por electroforesis en un gel desnaturalante

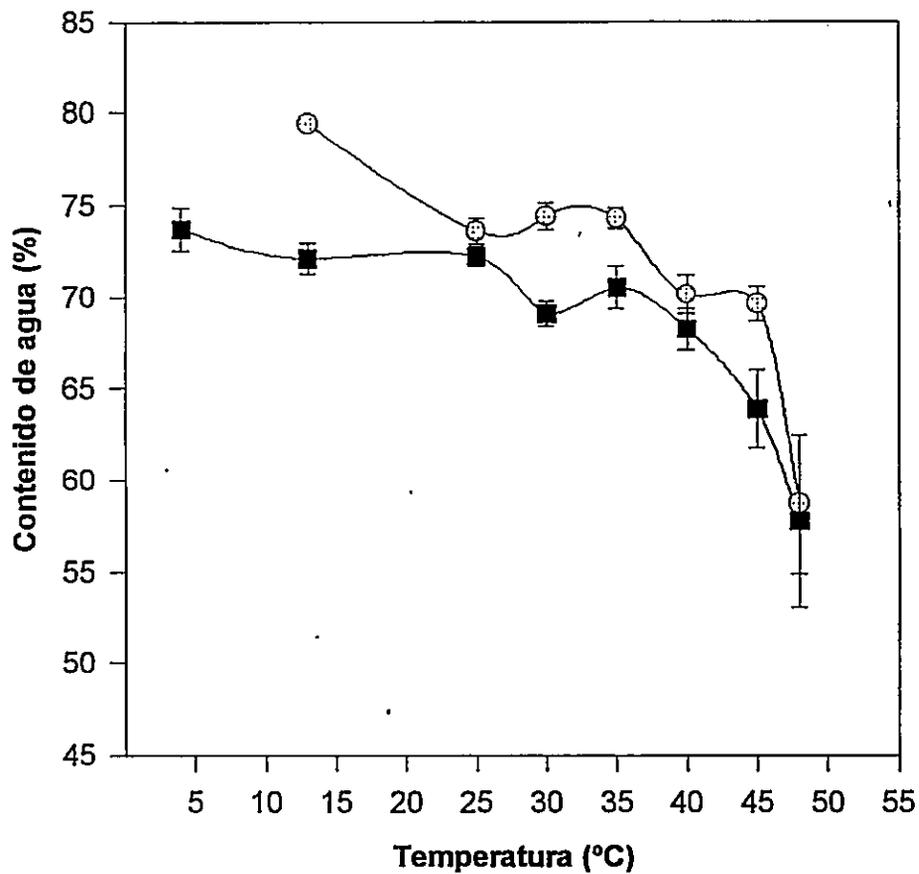


Fig. 5 Determinación del contenido de agua en los extractos foliares de *D. antarctica* acclimatadas a 4°C (■) y crecidas a 13° (○) y posterior exposición a las condiciones de estrés durante dos horas. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar de tres réplicas independientes.

SDS al 15% de acrilamida incluyendo un estándar de ubiquitina de aproximadamente 8,5 kDa extraído de glóbulos rojos de bovino (Fig. 6). Al analizar este gel mediante Western blot con un anticuerpo policlonal contra ubiquitina no se detectó el monómero de ubiquitina, pero sí una banda de aproximadamente 34 kDa en todas las temperaturas ensayadas (Fig. 7). Considerando que la masa molecular del monómero de ubiquitina es de aproximadamente 8,5 kDa, esta banda podría corresponder al tetrámero de ubiquitina (Fig. 7), aún cuando esta banda no coincide exactamente con la migración del tetrámero del estándar de ubiquitina (32 kDa), posiblemente debido a alguna diferencia inherente al origen animal de la proteína estándar. A medida que aumenta la temperatura de estrés la banda de 34 kDa se hizo más tenue (Fig. 7), lo que permite especular que esta banda correspondería el tetrámero de ubiquitina, ya que el pool de ubiquitina tiende a disminuir al conjugarse a proteínas dañadas formando complejos de ubiquitina - proteína (Jentsch, 1992). La reducción en intensidad del tetrámero fue cuantificada densitométricamente, presentando las plantas control (13°C) una intensidad relativa de 6,73 (D.O. $\times \mu\text{g proteína}^{-1}$), la cual disminuyó a la mitad a los 45°C de estrés calórico (Fig. 8A).

El anticuerpo usado contra ubiquitina libre también pudo detectar conjugados de ubiquitina con otras proteínas, en respuesta al daño inducido por las temperaturas ensayadas. Por ejemplo, en las plantas crecidas a 13°C y expuestas a 40°C por 2 horas, apareció un conjugado de 166 kDa que aumentó

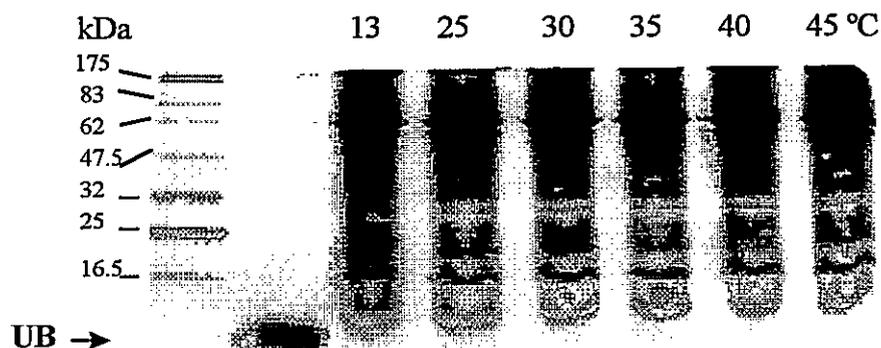


Fig. 6 Patrón de proteínas solubles separadas por electroforesis en un gel desnaturalante SDS al 15% de acrilamida, en extractos foliares de *D. antarctica* crecidas a 13°C. El primer carril corresponde a los estándares de peso molecular y el segundo a la proteína pura de ubiquitina de aproximadamente 8,5 kDa, los siguientes carriles representan las temperaturas de tratamiento calórico entre 25° y 45°C, en cada uno de ellos se agregaron 15 μ g de extractos proteicos. Las proteínas fueron visualizadas con azul de coomassie. UB: ubiquitina

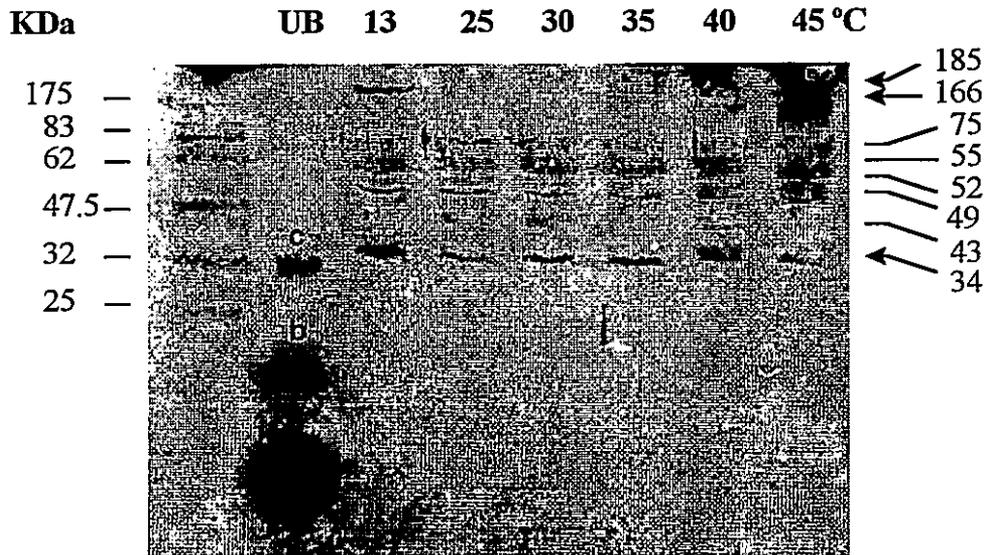


Fig. 7 Análisis de Western blot de las proteínas solubles a partir de extractos foliares de *D. antarctica* crecidas a 13°C y luego sujetas a los tratamientos calóricos, entre 25° y 45°C durante 2 horas. La incubación fue realizada con el anticuerpo comercial contra ubiquitina libre en una dilución de 1:200. El primer carril corresponde a los estándares de peso molecular y el segundo (UB) al estándar de la proteína pura de ubiquitina en la forma de monómero (a), dímero (b) y tetrámero (c). Los restantes carriles corresponde a los tratamientos calóricos. Las líneas y flechas a la derecha indican las masas aparentes de los conjugados de ubiquitina - proteínas, a excepción de la banda de 34kDa que puede representar al tetrámero de ubiquitina libre.

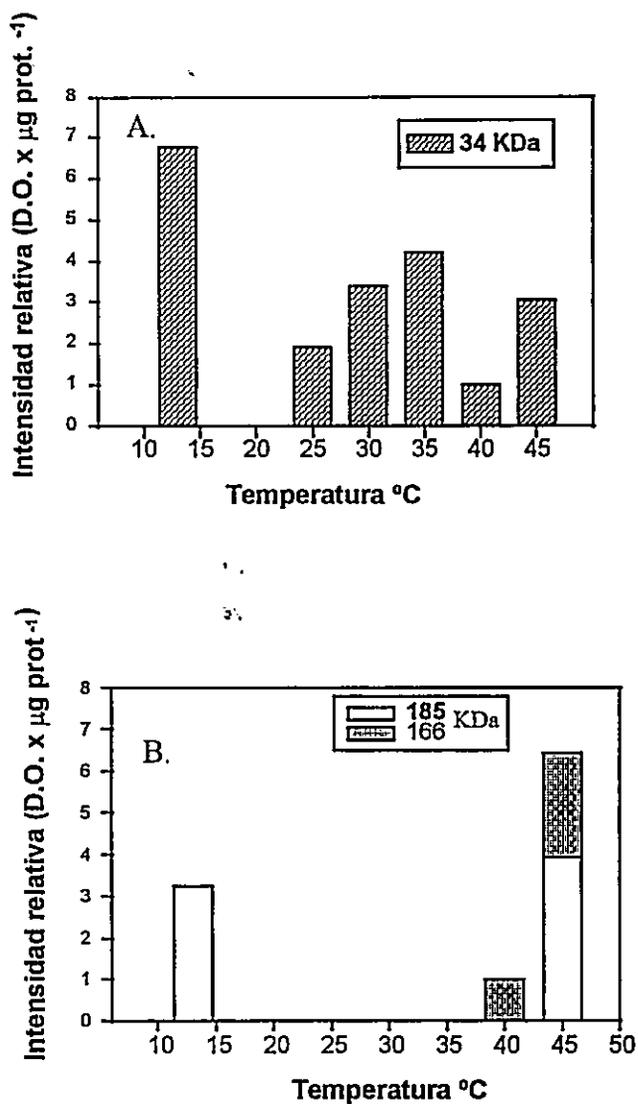


Fig. 8 Análisis densitométrico a partir de las bandas detectadas con el anticuerpo contra ubiquitina libre en el Western blot (Fig.7), en plantas de *D. antarctica* crecidas a 13°C y posterior tratamiento calórico entre 25° y 45°C durante 2 horas. A, representa el análisis del posible tetrámero de 34kDa y B, los conjugados de ubiquitina - proteína.

en intensidad al someter las plantas a 45°C (Fig. 8B). Estas masas moleculares son aparentes porque corresponden a la proteína asociada probablemente a varias moléculas de ubiquitina. En general, se observan conjugados de ubiquitina en un rango de 43 a 187 kDa., que dan cuenta de la activación del sistema de ubiquitinación por efecto de las temperaturas altas (Fig.7). Algunos de estos conjugados son observados a 13°C, lo cual sugiere un papel relevante de ubiquitina en el recambio normal de proteínas en sistemas no sometidos a estrés por temperaturas, como ha sido postulado por Ginding y Borochoy (1992).

3.5 Ubiquitina en plantas aclimatadas a 4°C y sometidas a estrés calórico

El análisis electroforético de las proteínas desnaturalizadas de *D. antarctica* aclimatadas a 4°C por dos semanas y sometidas a tratamientos térmicos desde 13°C a 45°C durante 2 horas fueron visualizados en la figura 9. El análisis del Western blot para este gel mostró principalmente conjugados de ubiquitina - proteína (Fig. 10). En este ensayo no fue posible detectar la banda de 34 kDa presentes en las plantas crecidas a 13°C y que posiblemente corresponda al tetrámero de ubiquitina. El Western blot de la figura 10 se realizó en ausencia del estándar de la proteína de ubiquitina en el gel, a fin de evitar la reducción en la concentración efectiva del anticuerpo disponible para reaccionar con la ubiquitina presente en las muestras analizadas.

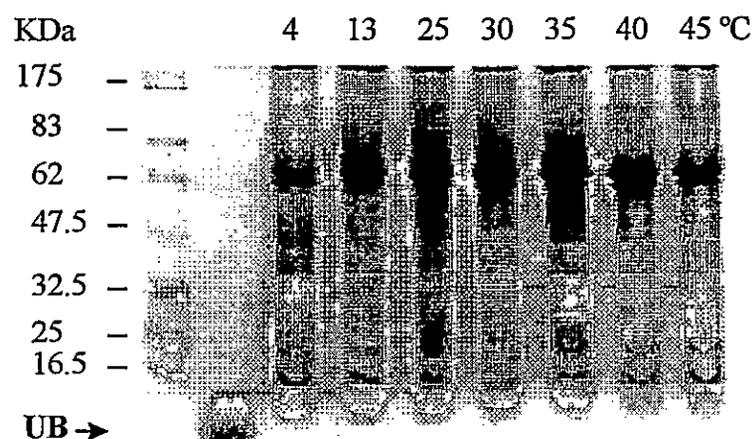


Fig. 9 Patrón de proteínas solubles separadas en SDS - PAGE al 12% de acrilamida, en extractos foliares de *D. antarctica* aclimatadas a 4°C, durante 15 días. El primer carril corresponde a los estándares de peso molecular y el segundo a la proteína pura de ubiquitina (UB) de aproximadamente 8,5 kDa; los números en los siguientes carriles representan las temperaturas de tratamiento calórico entre 13° y 45°C durante 2 horas. En cada uno de ellos se agregaron 15 μ g de extractos proteicos de cada tratamiento. Las proteínas fueron visualizadas con azul de coomassie.

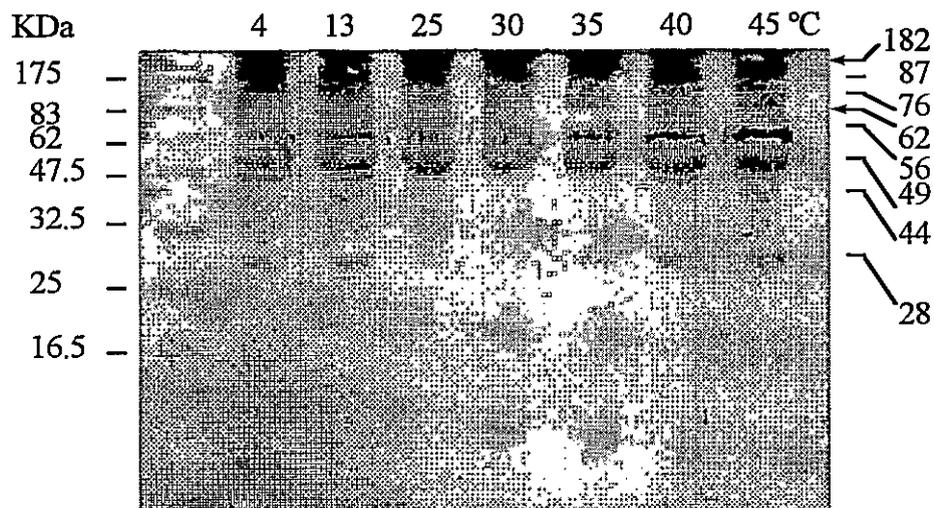


Fig. 10 Análisis de Western blot de las proteínas solubles a partir de extractos foliares de *D. antarctica* aclimatadas a 4°C, durante 15 días y luego sujetas a los tratamientos calóricos entre 13° y 45°C durante 2 horas. La incubación fue realizada con el anticuerpo comercial contra ubiquitina libre en una dilución de 1:200. El primer carril corresponde a los estándares de peso molecular, los restantes carriles a los tratamientos calóricos. Las líneas y flechas a la derecha indican las masas aparentes de los conjugados de ubiquitina - proteínas.

Al examinar las bandas de conjugados de ubiquitina por densitometría, especialmente las que poseen una masa aparente de 62 y 182 kDa, se observó que esta última está presente en la mayoría de los tratamientos térmicos, aumentando considerablemente entre 30°C y 35°C (Fig. 11). La banda de 62 kDa presentó una intensidad creciente a medida que aumentó la temperatura de estrés, específicamente entre los 35° a 45°C (Fig 11).

En este experimento, como en los restantes ensayos realizados con el anticuerpo contra ubiquitina no se pudo detectar el monómero, el dímero, ni el trimero de esta proteína en plantas de *D. antarctica*. Para descartar problemas de concentración mínima en el rango de detección del anticuerpo, se realizó un análisis de Western con una serie de diluciones a partir del estándar de la proteína de ubiquitina pura, que luego fue incubada con el anticuerpo contra ubiquitina libre (1:200). Este Western blot de prueba indicó que el anticuerpo puede detectar tanto al monómero como al dímero de ubiquitina, hasta un límite de 10 ng de la proteína cargada en el gel (Fig. 12).

3.6 Detección de HSP70 en plantas crecidas a 13°C

El análisis de Western Blot de las proteínas solubles con el anticuerpo monoclonal HSP70, mostró la presencia de esta proteína en todos los tratamientos térmicos para las plantas crecidas a 13°C (Fig. 13A). Sin embargo, la intensidad de la banda de 70 kDa fue mínima a los 13°C (temperatura control) con una intensidad de 0,163 de D.O. $\mu\text{g proteína}^{-1}$ como se demuestra

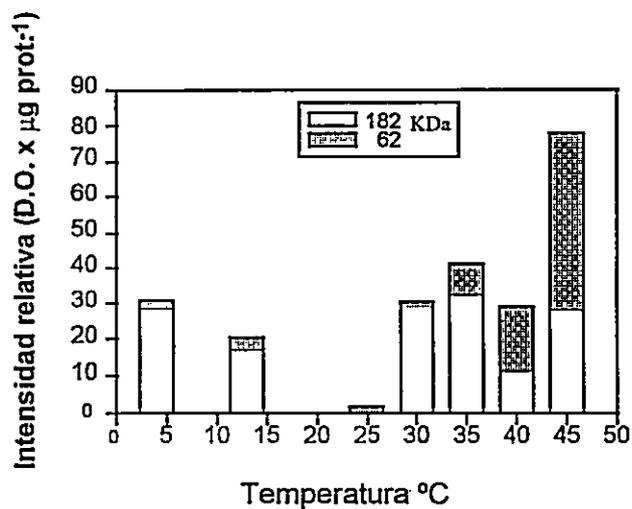


Fig. 11 Análisis densitométrico a partir de las bandas detectadas con el anticuerpo contra ubiquitina libre en el Western blot (Fig 10), en plantas de *D. antarctica* aclimatadas a 4°C, durante 15 días y posterior tratamiento calórico entre 13° y 45°C durante 2 horas. Las barras representan la intensidad relativa de los conjugados de ubiquitina - proteína en cada temperatura.

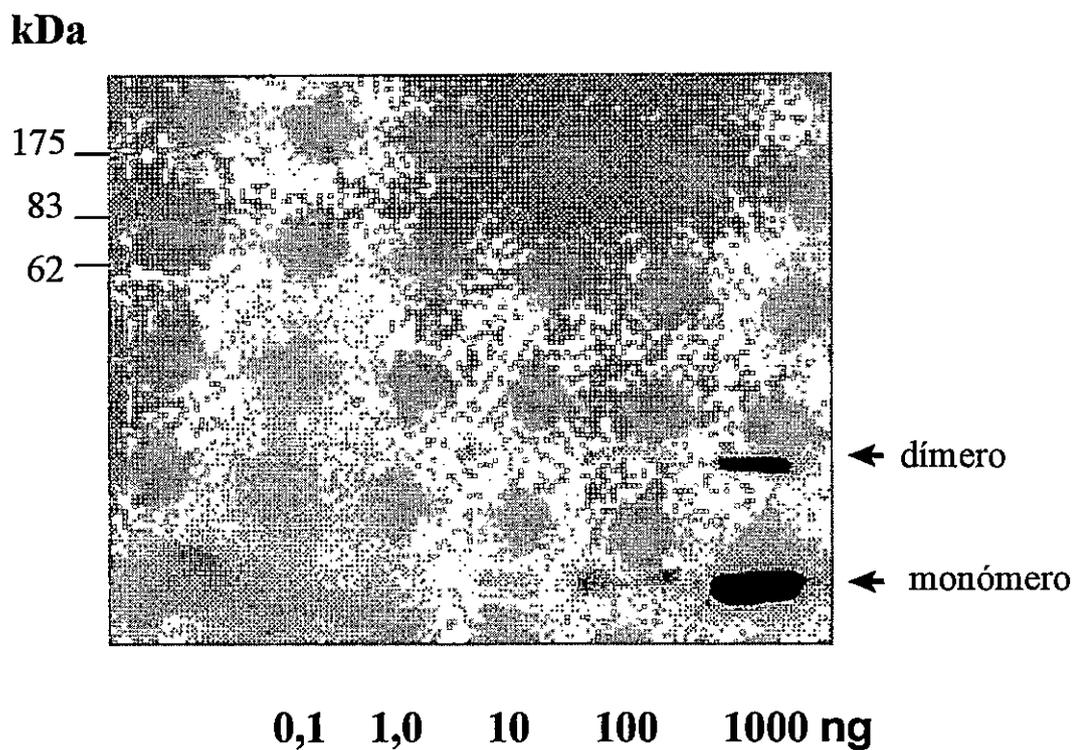


Fig. 12 Western blot del estándar de la proteína pura de ubiquitina en diferentes diluciones entre 0,1 y 1000 ng. La membrana de nitrocelulosa transferida fue incubada con el anticuerpo policlonal contra ubiquitina libre (1: 200). El primer carril corresponde al estándar de peso molecular. Las flechas indican el monómero y dímero de la proteína.

A.

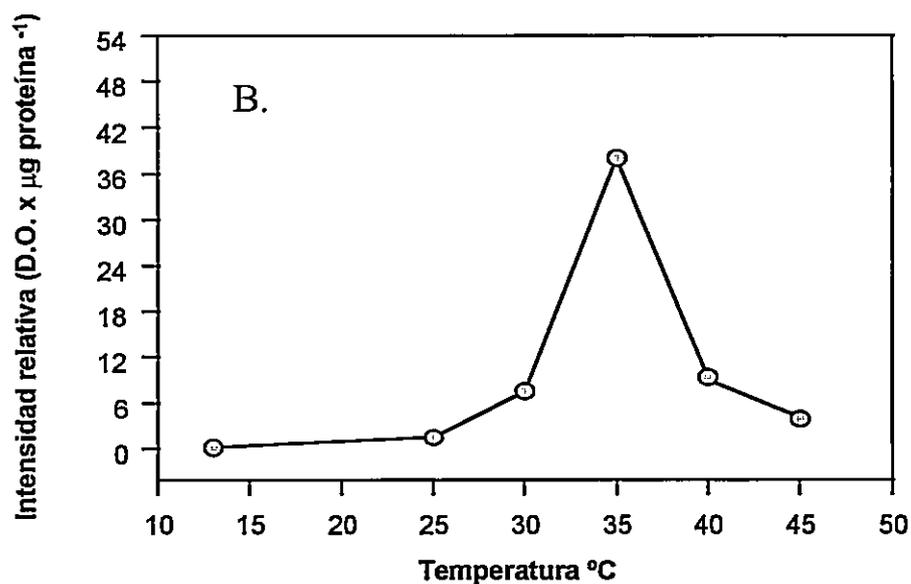
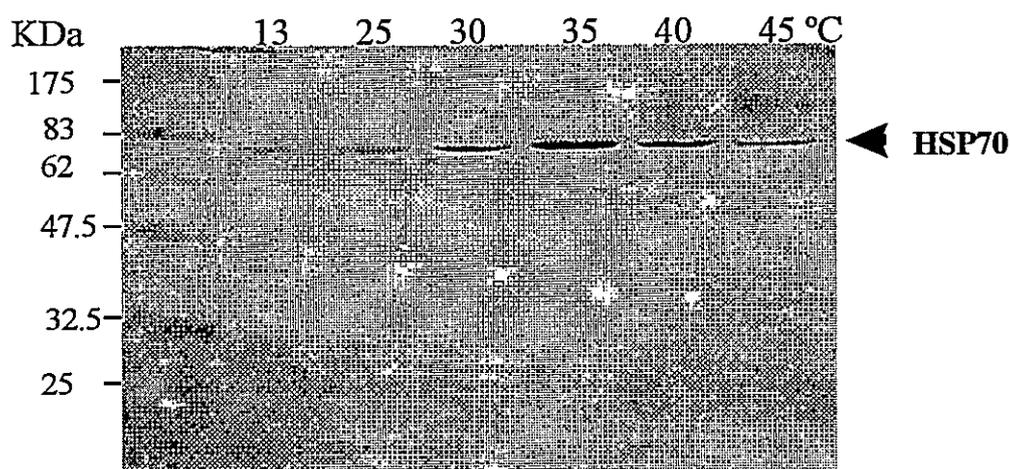


Fig. 13 Presencia de HSP70 en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de *D. antarctica* crecidas a 13°C y luego expuestas a los tratamientos calóricos entre 25° y 45°C durante 2 horas. **A**, análisis de Western blot con la incubación del anticuerpo monoclonal contra HSP70 en una dilución de 1: 500. El primer carril corresponde a los estándares de peso molecular y los restantes a los tratamientos de temperatura. La flecha indica la presencia de la proteína. **B**, análisis densitométrico de las bandas detectadas por el anticuerpo contra la proteína de estrés de 70 kDa; los círculos representan la intensidad relativa en cada temperatura del ensayo.

en el análisis densitométrico (Fig.13B). Posteriormente, la acumulación de la proteína aumentó con la temperatura de exposición entre los 30° y 35°C, presentando la mayor acumulación a los 35°C, siendo unas 35 veces superior al nivel basal (13°C) y 5 veces más que la intensidad a los 30°C (Figs. 13A y B). Esta intensidad disminuyó a los 40° y 45°C, sin alcanzar el nivel de intensidad de la temperatura control (Fig.13B).

3.7 Detección de HSP70 en plantas aclimatadas a 4°C

En las plantas aclimatadas a 4°C y luego sometidas a las temperaturas de estrés, se observó un patrón de expresión de HSP70 similar al visualizado en plantas de *D. antarctica* crecidas a 13°C, (Fig. 14A). La proteína fue observada en todas las temperaturas ensayadas, sin embargo, la proteína se acumuló más en plantas aclimatadas a 4°C que en las plantas crecidas a 13°C. Por ejemplo, en la temperatura control a 4°C la banda de la proteína mostró una intensidad relativa de 1,66 (D.O. $\mu\text{g proteína}^{-1}$) en comparación a 0,163 (D.O. $\mu\text{g proteína}^{-1}$), observada en la temperatura control de 13°C (Figs. 13B y 14B). La máxima acumulación de la HSP70 entre los 30°C y 35°C en las plantas aclimatadas a 4°C coincidió con la observada en las plantas crecidas a 13°C; sin embargo, en las primeras se obtuvo una acumulación 45 veces mayor con respecto al control a los 35°C de temperatura (Fig. 14B). La acumulación de la proteína decayó entre los 40°C y 45°C, no obstante la disminución de la proteína a los 40°C fue más abrupta en el grupo de plantas aclimatadas a 4°C,

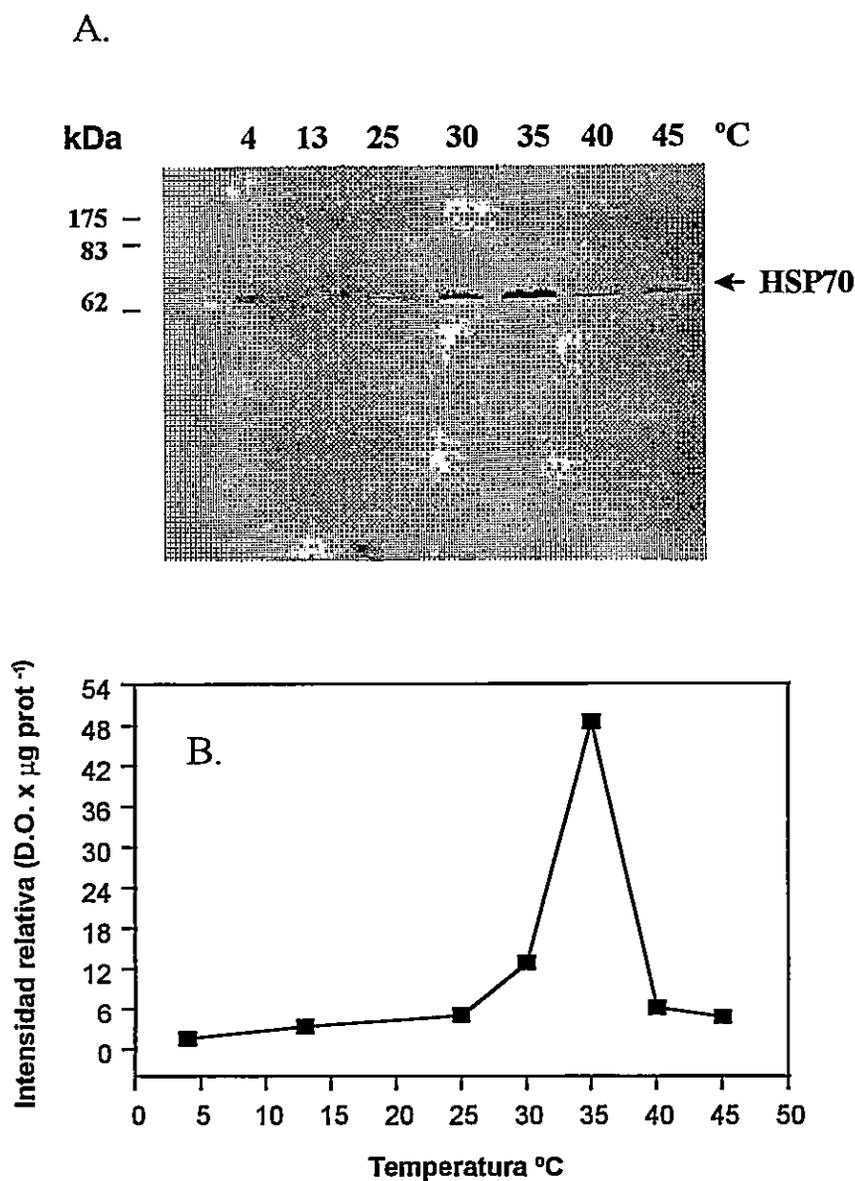


Fig. 14 Presencia de HSP70 en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de *D. antarctica* aclimatadas a 4°C durante 15 días y luego expuestas a los tratamientos calóricos entre 13° y 45°C durante 2 horas. **A**, análisis de Western blot con la incubación del anticuerpo monoclonal contra HSP70 en una dilución de 1: 500. El primer carril corresponde a los estándares de peso molecular y los restantes a los tratamientos de temperatura. La flecha indica la presencia de la proteína. **B**, análisis densitométrico de las bandas detectadas por el anticuerpo contra la proteína de estrés de 70 kDa, los cuadrados representan la intensidad relativa en cada temperatura del ensayo.

siendo unas 40 veces menor en comparación a la disminución ocurrida en las plantas crecidas a 13°C (30 veces menor).

3.8 Cinética de expresión de HSP70

Determinaciones de cinética de expresión de HSP70, permiten establecer el tiempo mínimo de expresión de esta proteína una vez comenzado el estrés. También permite determinar el tiempo de expresión máxima y período transitorio de expresión.

Para establecer este tiempo mínimo de expresión, máximo y transitorio, se realizaron estudios de cinética de expresión de HSP70 en plantas mantenidas a 13°C y posteriormente expuestas a 35°C durante 120 minutos, tomando muestras de tejido en intervalos de 10, 15, 20 y 25 minutos. Se puede observar el patrón proteico de *D. antarctica* en un gel desnaturalante de SDS al 10% de acrilamida a los distintos tiempos de extracción (Fig. 15). El ensayo de Western blot detectó la presencia de esta proteína desde los 50 minutos de iniciado el estrés, observándose la mayor acumulación a los 100 minutos (Fig. 16A y B). Luego esta respuesta descendió hasta un tercio del umbral máximo observado (Fig. 16B). En tanto, el grupo de plantas aclimatadas a 4°C y sometidas al mismo tratamiento anterior (Fig. 17) mostró un aumento detectable de HSP70 a los 25 minutos doblando en cantidad con respecto al tiempo inicial, coincidiendo con una máxima acumulación a los 100 minutos. La cantidad de esta proteína disminuyó hasta un tercio de la respuesta máxima (Fig. 18A y B).

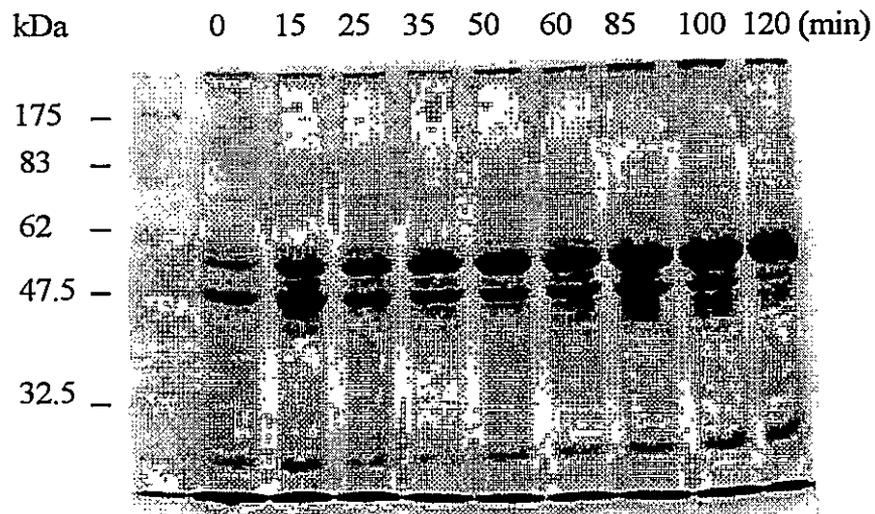


Fig. 15 Patrón de separación de proteínas solubles en SDS - PAGE al 10% de acrilamida, en extractos foliares de *D. antarctica* crecidas a 13°C y expuestas a la temperatura subletal de 35°C durante 120 minutos. El primer carril representa los pesos moleculares y los restantes carriles a los distintos tiempos de extracción de las muestras. Las bandas proteicas fueron teñidas con azul de coomassie.

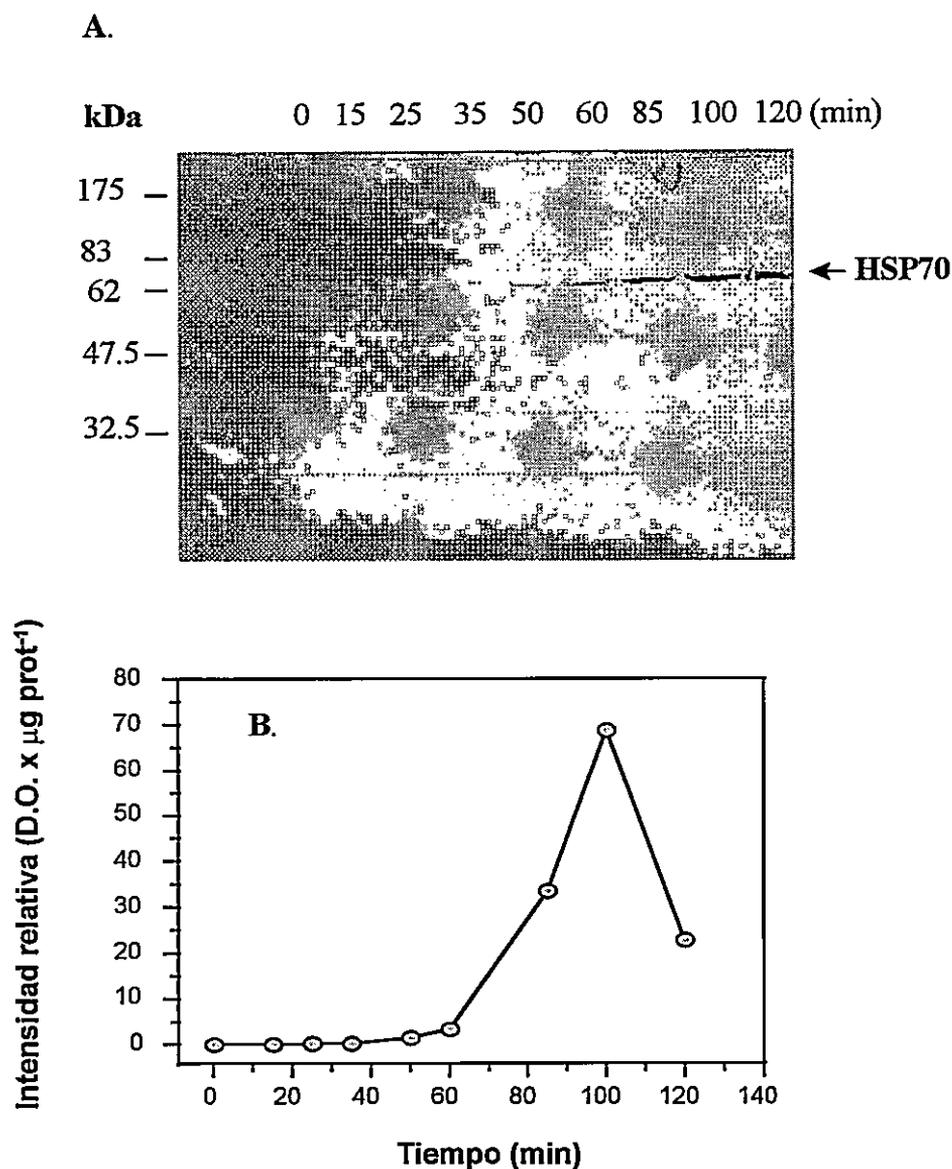


Fig. 16 Presencia de HSP70 en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de *D. antarctica* crecidas a 13°C y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C durante 120 minutos. **A**, análisis de Western blot con la incubación del anticuerpo monoclonal contra HSP70 en una dilución de 1: 500. El primer carril corresponde a los estándares de peso molecular y los restantes a los distintos tiempos de extracción de las muestras. La flecha indica la presencia de HSP70. **B**, análisis densitométrico de las bandas detectadas con el anticuerpo contra HSP70, los círculos representan la intensidad relativa en cada tiempo del ensayo.

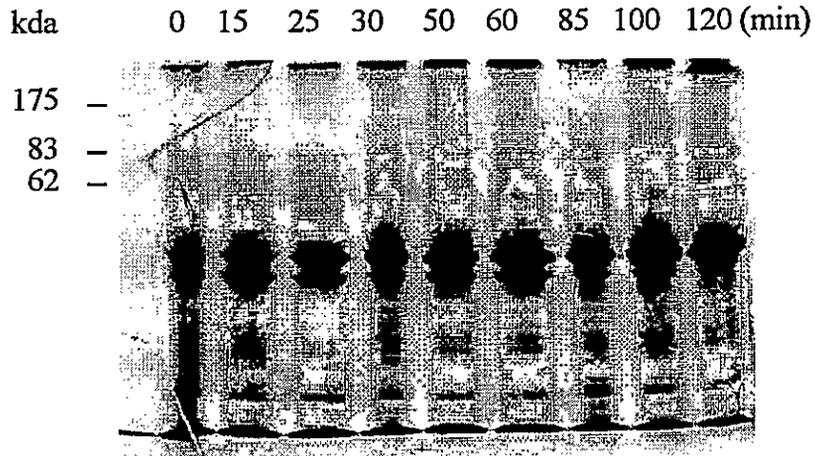


Fig. 17 Patrón de separación de proteínas solubles en SDS - PAGE al 10% de acrilamida, en extractos foliares de *D. antarctica* aclimatadas a 4°C durante 15 días y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C durante 120 minutos. El primer carril representa los pesos moleculares y los restantes carriles los distintos tiempos de extracción de las muestras. Las bandas proteicas fueron teñidas con azul de coomassie.

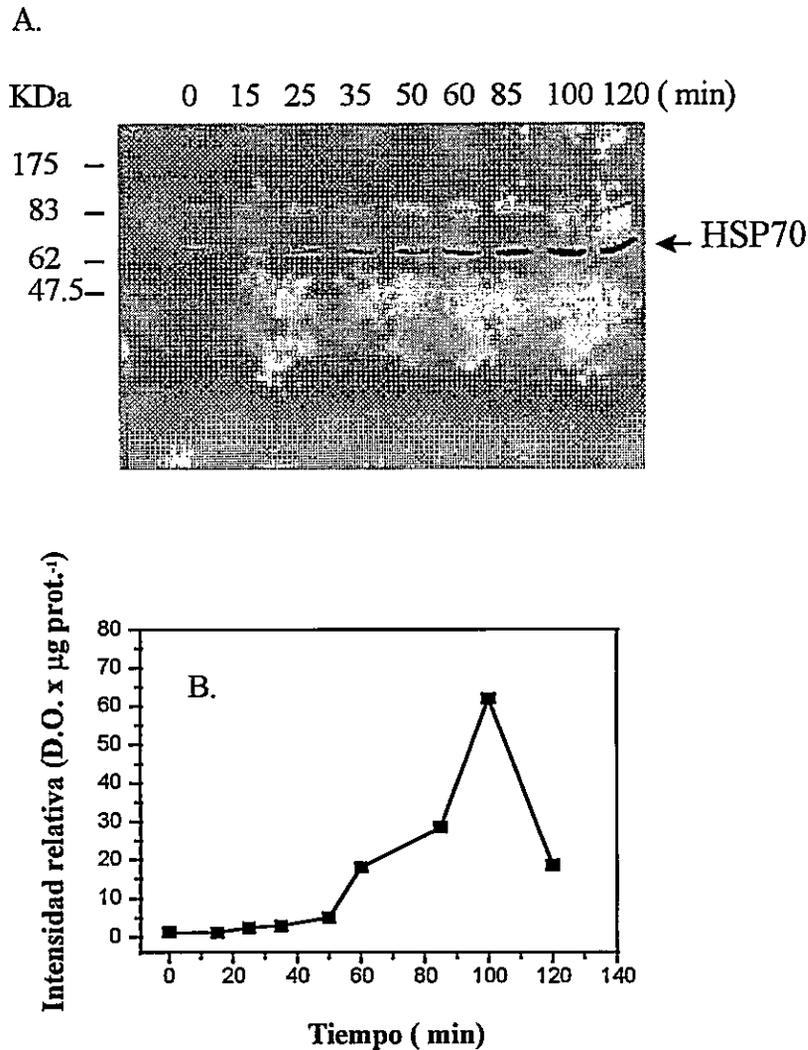


Fig. 18 Presencia de HSP70 en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de *D. antarctica* aclimatadas a 4°C durante 15 días y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C durante 120 minutos. **A**, análisis de Western blot con la incubación del anticuerpo monoclonal contra HSP70 en una dilución de 1: 500. El primer carril corresponde a los estándares de peso molecular y los restantes a los distintos tiempos de extracción de las muestras. La flecha indica la presencia de HSP70. **B**, análisis densitométrico de las bandas detectadas con el anticuerpo contra HSP70, los cuadrados representan la intensidad relativa en cada tiempo del ensayo.

Cinéticas realizadas durante 8 horas de exposición a 35°C (Fig. 19) en plantas aclimatadas a 4°C, revelaron un pronunciado aumento de la proteína entre las 5 y 8 horas, con respecto al tratamiento de 2 horas, siendo la reacción con el anticuerpo de HSP70 unas 6 veces mayor después de 8 horas de estrés (6,5 D.O. x $\mu\text{g proteína}^{-1}$) (Fig. 20A y B). En cambio, plantas crecidas a 13°C mostraron un leve incremento de la proteína de 1,6 veces a las 8 horas (4,72 D.O. $\mu\text{g proteína}^{-1}$) en comparación a la intensidad de la banda a las 2 horas de tratamiento a 35°C (Fig. 20A y B).

Después de 20 horas a 35°C, ambos grupos de plantas presentaron un aumento progresivo de HSP70 (Figs. 21A-B y 22A-B), presentando la máxima acumulación de la proteína a las 16 horas en las plantas crecidas a 13°C y a las 12 horas en las plantas aclimatadas a 4°C. Además, la máxima expresión de HSP70 con respecto a las 2 horas del tratamiento térmico, fue 40 y 32 veces mayor en las plantas mantenidas a 13°C y 4°C, respectivamente (Figs. 21A-B y 22A-B). En ambos casos se detectó una disminución del nivel de HSP70 a las 20 horas de estrés continuo a 35°C, presentando una reducción del 39% para las plantas a 13°C y un 83% para las plantas aclimatadas a 4°C (Figs. 21A-B y 22A-B).

3.9 Cinética de expresión de ubiquitina

Se determinó la expresión de ubiquitina a la temperatura subletal de 35°C durante 20 horas en ambos grupos de plantas (13° y 4°C), obteniéndose

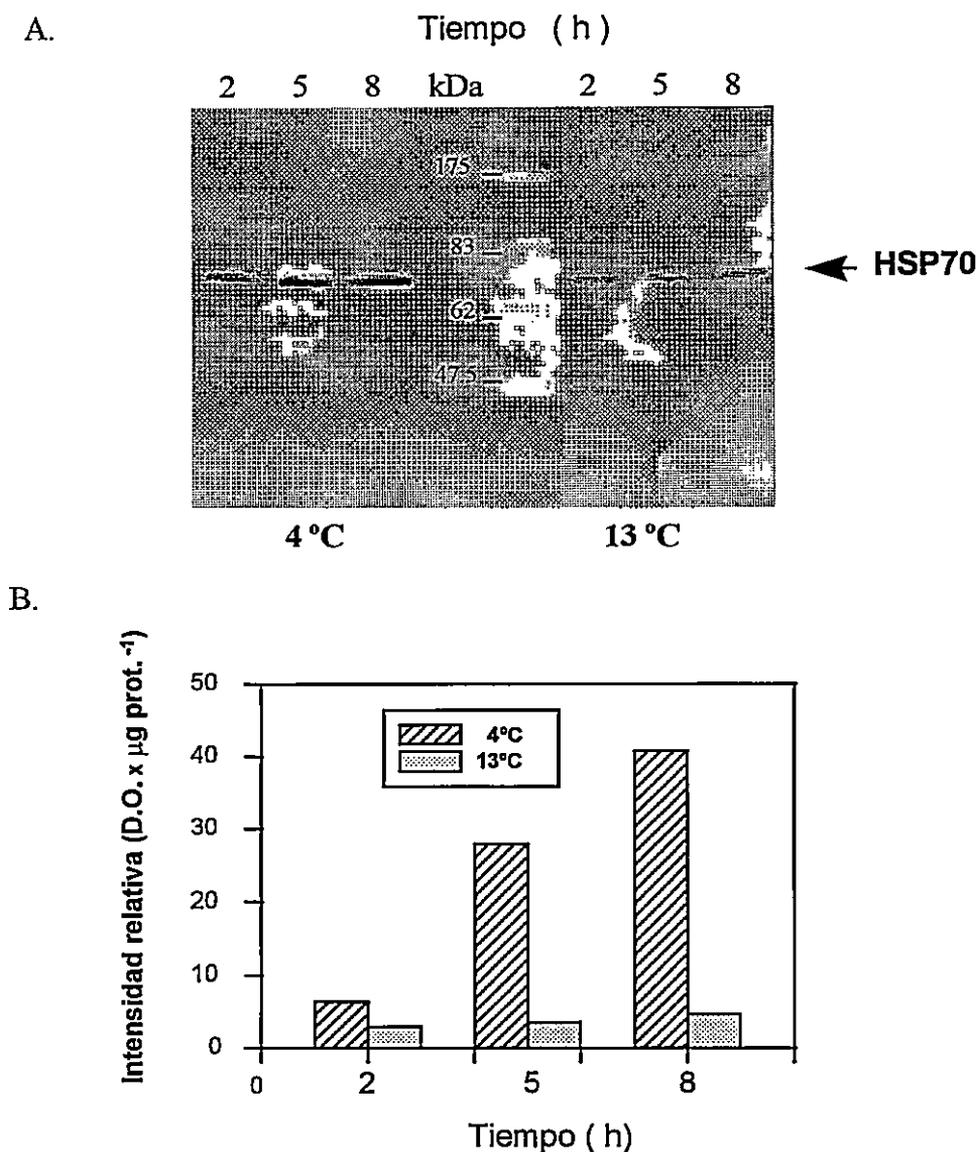


Fig. 20 Detección de HSP70 en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de *D. antarctica* aclimatadas a 4°C y no aclimatadas a 4°C y posteriormente expuestas a la temperatura subletal de 35°C durante 8 horas. **A**, análisis de Western blot con la incubación del anticuerpo monoclonal contra HSP70 en una dilución de 1: 500. Los tres primeros carriles corresponden a las tiempos de exposición en las plantas aclimatadas a 4°C y los últimos tres a las plantas crecidas a 13°C, separadas por los estándares de peso molecular. **B**, análisis densitométrico de las bandas detectadas en el Western blot.

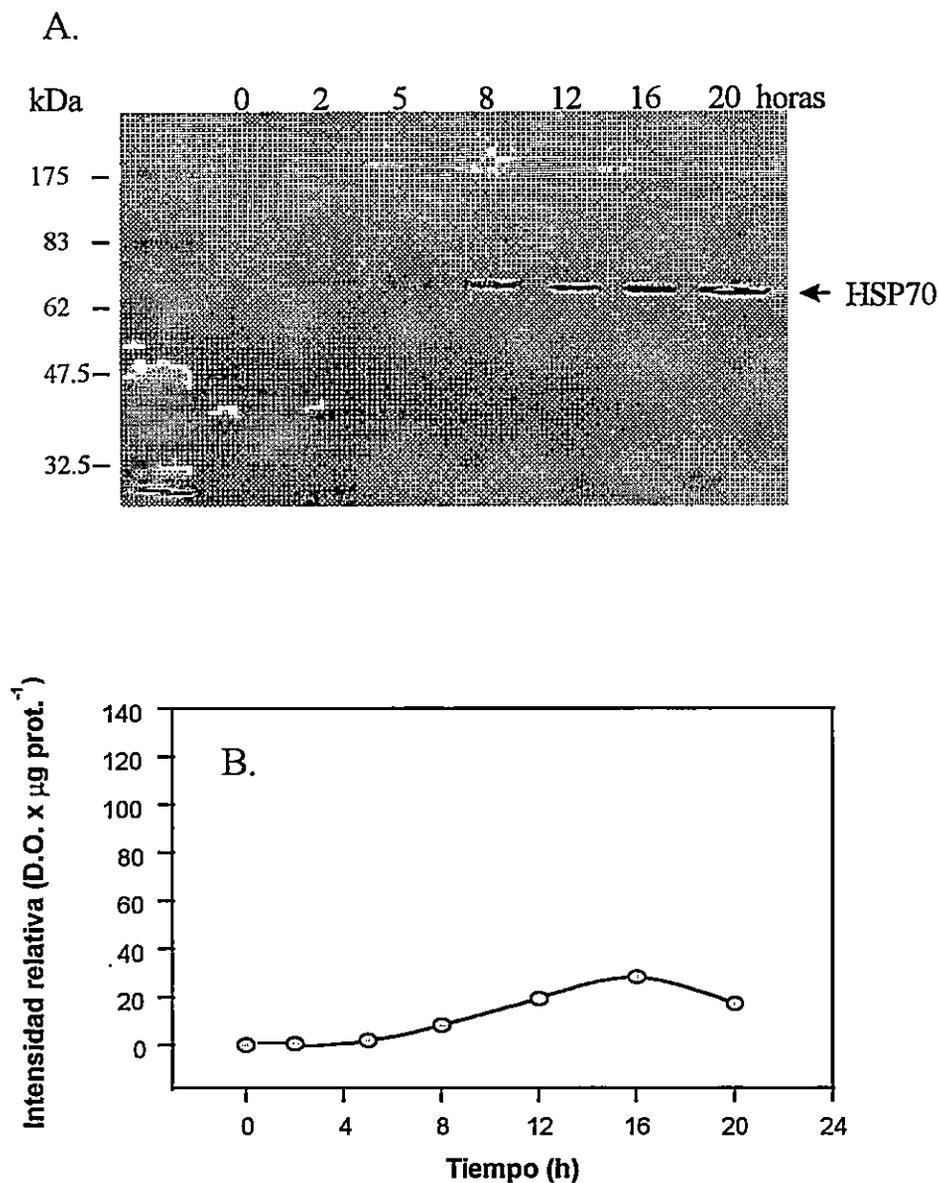


Fig. 21 Presencia de HSP70 en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de *D. antarctica* crecidas a 13°C y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C durante 20 horas. **A**, análisis de Western blot con la incubación del anticuerpo monoclonal contra HSP70 en una dilución de 1: 500. El primer carril corresponde a los estándares de peso molecular y los restantes a los distintos tiempos de extracción de las muestras. La flecha indica la presencia de HSP70. **B**, análisis densitométrico de las bandas detectadas con el anticuerpo contra HSP70, los círculos representan la intensidad relativa en cada tiempo del ensayo.

A.

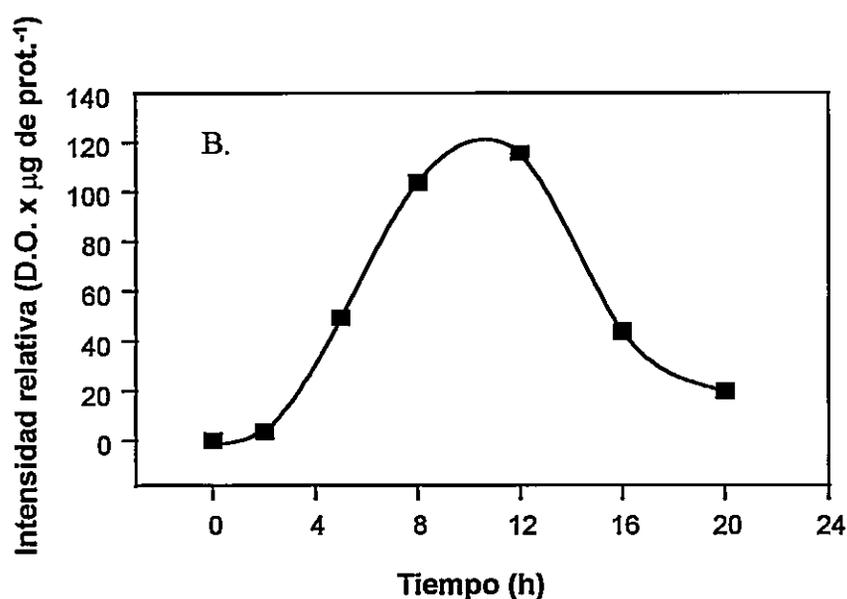
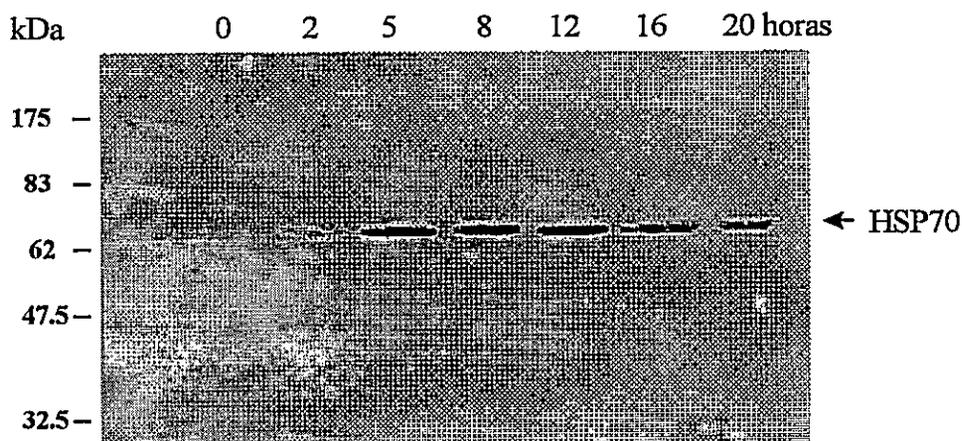


Fig. 22 Presencia de HSP70 en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de *D. antarctica* aclimatadas a 4°C durante 15 días y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C durante 20 horas. **A**, análisis de Western blot con la incubación del anticuerpo monoclonal contra HSP70 en una dilución de 1: 500. El primer carril corresponde a los estándares de peso molecular y los restantes a los distintos tiempos de extracción de las muestras. La flecha indica la presencia de HSP70. **B**, análisis densitométrico de las bandas detectadas con el anticuerpo contra HSP70, los cuadrados representan la intensidad relativa en cada tiempo del ensayo.

solo dos conjugados de proteína - ubiquitina con masas moleculares aparentes de 192 y 62 kDa (Figs. 23A y 24A). Sin embargo, se observaron diferencias en el patrón de expresión de estos conjugados en cada grupo de plantas; por ejemplo, el conjugado de 62 kDa fue detectado a las 5 horas de tratamiento en las plantas a 13°C y a las 2 horas en las plantas aclimatadas a 4°C (Figs. 23A-B y 24A-B). Luego, la máxima acumulación de este conjugado en ambos grupos de plantas fue a las 12 horas, con un 56% de aumento para las plantas crecidas a 13°C y sobre 55 veces en las aclimatadas a 4°C, con respecto a la intensidad inicial detectada a las 5 y 2 horas, respectivamente. El conjugado de 192 kDa presentó una intensidad máxima a las 5 horas en las plantas mantenidas a 13°C y en las aclimatadas a 4°C a las 2 y 20 horas de exposición a 35°C (Figs. 23A - B y 24A - B).

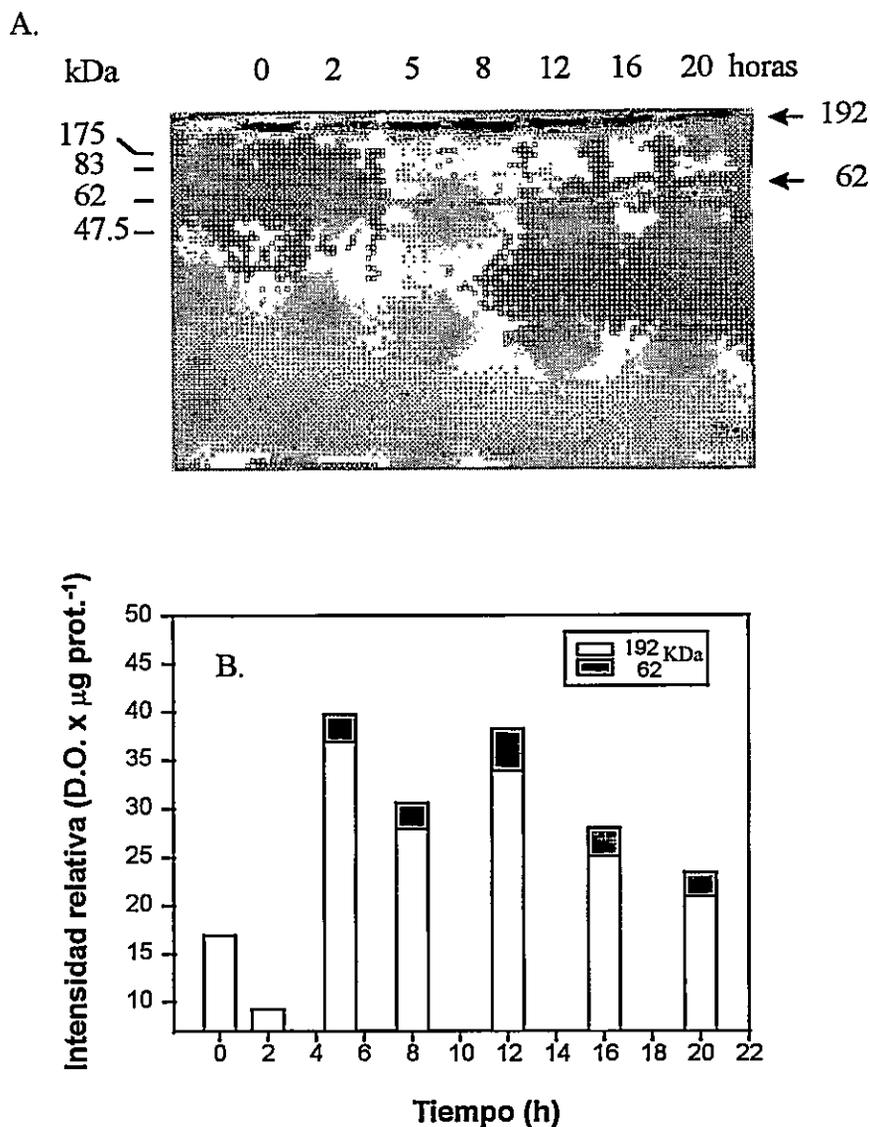


Fig. 23 Acumulación de ubiquitina conjugada en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de *D. antarctica* crecidas a 13°C y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C durante 20 horas. **A**, análisis de Western blot con la incubación del anticuerpo policlonal anti ubiquitina libre (1:200). El primer carril corresponde a los pesos moleculares y los restantes carriles a los distintos tiempos de extracción de las muestras. Las flechas indican las masas moleculares de los conjugados de ubiquitina. **B**, análisis densitométricos de los conjugados detectados con el anticuerpo en el Western blot.

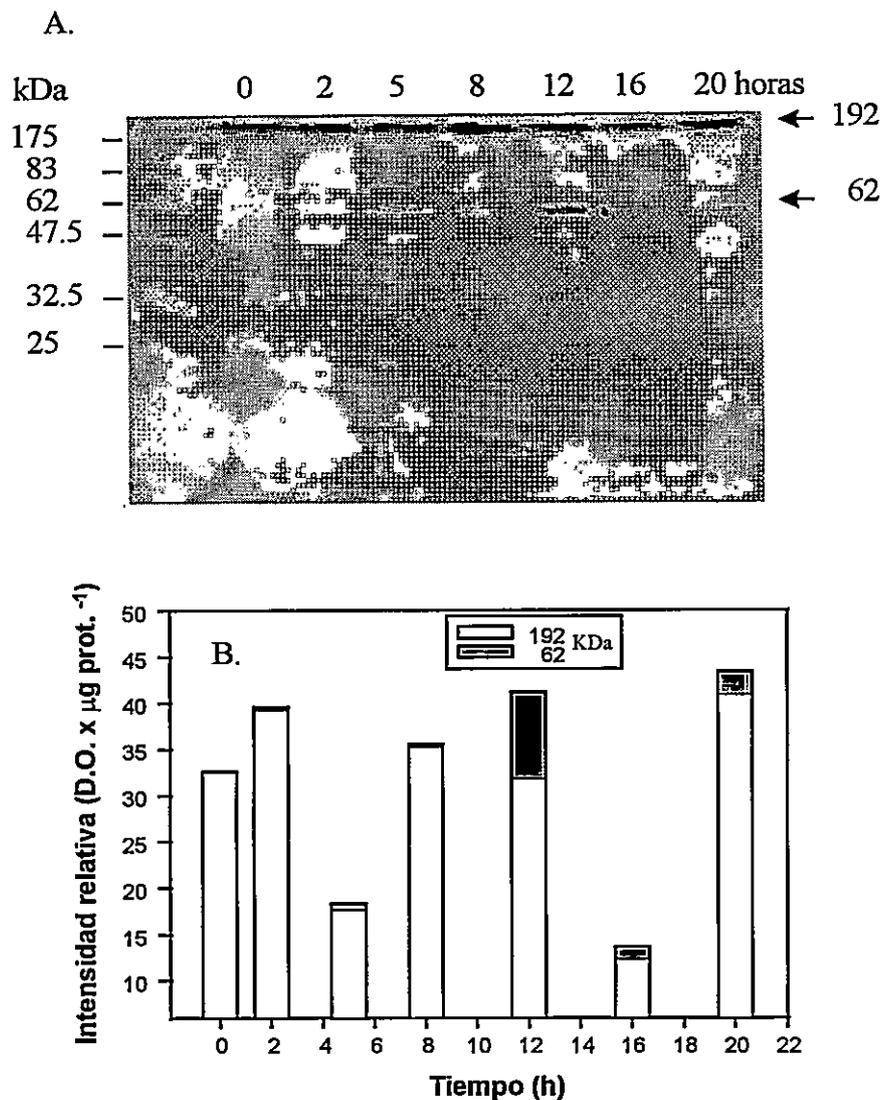


Fig. 24 Acumulación de ubiquitina conjugada en las proteínas solubles, a partir de extractos foliares de *D. antarctica* aclimatadas a 4°C por 15 días y luego expuestas a la temperatura subletal de 35°C durante 20 horas. **A**, análisis de Western blot con la incubación del anticuerpo policlonal anti ubiquitina libre (1:200). El primer carril corresponde a los pesos moleculares y los restantes carriles a los distintos tiempos de extracción de las muestras. Las flechas indican las masas moleculares de los conjugados de ubiquitina. **B**, análisis densitométricos de los conjugados detectados con el anticuerpo en el Western blot.

4.0 DISCUSION

Las plantas que habitan ambientes extremos requieren cambios radicales en su fisiología celular, para compensar las condiciones estresantes (Brodli, 1989). Es así, como *Deschampsia antarctica* es más vulnerable durante las pocas semanas del deshielo a principios de primavera y durante la época de verano; esta es la estación de crecimiento de esta gramínea, y por lo tanto, determina su distribución en la región antártica (Edwards y Smith, 1988).

Los principales sitios de daño en los sistemas biológicos frente a las condiciones estresantes son las membranas y proteínas (Palta, 1990; Brodli, 1989). La desorganización de la estructura de membranas puede alterar el movimiento de agua, iones y solutos orgánicos, fotosíntesis y respiración. El daño de las proteínas produce directa o indirectamente inactivación de las enzimas, causando daño metabólico y reducción del crecimiento. (Cheng y col., 1982; Ferguson y col., 1990).

El tejido foliar dañado por la exposición de las altas temperaturas presenta un aumento de la permeabilidad de las membranas y difusión de electrolitos fuera de la célula. Esta pérdida de iones puede ser evaluada midiendo la conductancia eléctrica (Martineau y col., 1979). Sin embargo, el método de reducción de TTC, también puede registrar el daño por estrés

calórico, pues es un índice de la estabilidad e inactividad de las enzimas oxidorreductasas (Cheng y col., 1982).

Se debe destacar que ambas técnicas de TTC y conductividad eléctrica, dieron resultados similares en la determinación del TL_{50} en las plantas de *D. antarctica*, tanto para las plantas crecidas a 13°C, como para las aclimatadas a 4°C. De hecho, el test de conductividad ha sido usado para seleccionar genotipos de soja, tolerantes a las altas temperaturas (Martineau y col., 1979). En cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. fueron probadas ambas técnicas, para estimar diferencias genotípicas en respuesta al calor (Schaff y Clayberg, 1987). Estos autores, encontraron que ambas técnicas se correlacionaron moderadamente bien entre sí, al estimar la temperatura que causa el 50% de muerte celular en 26 cultivares de frejol ($r = 0,72$ $p < 0,01$), a pesar de que cambios en la conductividad de electrolitos es un índice de la termoestabilidad de la membrana plasmática y el TTC mide la actividad de las enzimas que participan en la transferencia de electrones. Sin embargo, Schaff y Clayberg (1987) determinaron que el método de conductividad fue más sensible que la reducción de TTC al correlacionar el efecto de la temperatura sobre el rendimiento de campo de estos cultivares, bajo condiciones de estrés. Ellos encontraron una alta correlación entre el rendimiento y la temperatura que causa el 50% de muerte celular, solo para la técnica de conductividad (Schaff y Clayberg, 1987).

La respuesta observada en la gramínea antártica frente al estrés calórico con estos dos métodos (TTC y conductividad) fue una típica curva sigmoideal de grado de daño frente a los tratamientos térmicos. Este tipo de curva ha sido observada anteriormente en soja (Martineau y col., 1979), pera (Wu y Wallner, 1983), frejol (Schaff y Clayberg, 1987) y algarrobo (Ortíz y col., 1995).

En *D. antarctica* ambos métodos permitieron establecer las temperaturas que causan el 50% de muerte celular. El TL₅₀ por conductividad fue 48,3°C ± 0,3 en las plantas aclimatadas y no aclimatadas a 4°C. En el TTC se alcanzó un rango térmico de 46,5° y 47,8° ± 0,6 con un intervalo de 1.3°C, para las plantas crecidas a 13°C y las aclimatadas a 4°C, respectivamente. En comparación al método de conductividad, el de reducción de TTC fue más sensible para detectar el daño inducido por los tratamientos calóricos, lo cual sugiere que la alteración estructural de membranas es posterior a la alteración estructural de algunas enzimas.

Martineau y col. (1979), en sus estudios de TL₅₀ por conductividad, indicaron que las condiciones ambientales previas del cultivar de soja ensayado, tienden a aclimatar o "endurecer" las membranas. Como consecuencia de este efecto, se observa un desplazamiento en la respuesta de las curvas en el eje de la temperatura. Esta respuesta también pudo observarse en *D. antarctica* a las temperaturas subletales en el grupo de plantas aclimatadas a 4°C, ya que presentaron un porcentaje de daño menor con ambos métodos. Sin embargo, estas diferencias desaparecen a la temperatura

letal. Los resultados con porcentajes de daño menor a las temperaturas subletales indican, que la aclimatación previa a 4°C en *D. antarctica* otorgaría una respuesta de protección cruzada frente a temperaturas mayores. En *D. antarctica* esta respuesta parece estar relacionada a la inducción transitoria de HSPs a bajas temperaturas, las cuales podrían reparar y estabilizar estructuras lábiles durante el tratamiento a altas temperaturas. Dado que proteínas, particularmente enzimas redox son más sensibles al daño que las estructuras de membranas durante el aumento de temperatura en plantas de *D. antarctica*, la inducción de HSP durante el pretratamiento a 4°C, explicaría el aumento en 1,3°C de TL50 en las plantas aclimatadas a 4°C medido por el método de reducción de TTC.

Ya ha sido demostrado que ciertos tipos de estrés comparten interacciones fisiológicas comunes, lo que se ha denominado adaptación cruzada (Pareek y col., 1997). Tejidos preadaptados a un determinado estrés, por ejemplo, a la salinidad mostrarán una termotolerancia mayor en comparación a tejidos que no han sido pretratados (Pareek y col., 1997; Collins y col., 1993).

Del mismo modo, Collins y col. (1993), observaron que se requiere una mínima cantidad de proteínas de estrés térmico, para iniciar la protección contra el daño al congelamiento y la duración de esta protección depende de la cantidad de proteína producida. Estos resultados fueron obtenidos por la exposición previa de hipocotilos de *Vigna radiata* a temperaturas altas. Esta

sensibilidad menor al congelamiento fue medida como disminución de la pérdida de iones (Lafuente y col., 1991; Collins y col., 1993).

4.1 Acumulación de conjugados de ubiquitina en plantas de *D. antarctica* sometidas a estrés calórico.

La presencia de proteínas anormales y desnaturalizadas por efecto de las altas temperaturas estimula a los sistemas de reparación celular. Finley y Varshavky (1985) propusieron que la ruta proteolítica dependiente de ubiquitina y las proteínas de estrés térmico se encuentran acopladas en regulación y función. Estos dos sistemas serían complementarios y responderían al estrés térmico, previniendo el daño celular que estas proteínas alteradas pueden ocasionar. La síntesis de ubiquitina provee los mecanismos para aminorar el daño provocados durante el estrés calórico, removiendo las proteínas desnaturalizadas (Viestra, 1987). En *D. antarctica*, al igual que en otros sistemas vegetales estudiados, existe un nivel basal de conjugados en las temperaturas normales, asumiendo que la ubiquitina juega un papel en el recambio normal de proteínas. Sin embargo, el aumento de temperatura indujo la acumulación de distintos conjugados de ubiquitina con proteínas de alta masa molecular. El rango de masas moleculares aparentes de conjugados fue de 62 y 182 kDa en plantas aclimatadas a 4°C y de 166 y 185 kDa en las plantas crecidas a 13°C. Estos conjugados de ubiquitina de alta masa molecular sugieren la acumulación de agregados proteicos derivados de

proteínas dañadas estructuralmente durante el aumento de la temperatura, los cuales son unidos para su remoción de la actividad celular. Asimismo, se ha observado en células de mamíferos, pollo y algas verdes sometidas a las temperaturas de estrés, un incremento de las concentraciones intracelulares de conjugados de ubiquitina-proteína de alta masa molecular (Ferguson y col., 1990).

En respuesta al estrés calórico, se observan cambios en el contenido relativo de las ubiquitinas libres y conjugadas (Ferguson y col., 1990). Es decir, la transferencia de ubiquitina desde el pool libre molecular a la forma conjugada aumenta por efecto de las temperaturas altas. Esta respuesta también fue observada en raíces de trigo bajo exposiciones térmicas crecientes, junto a la disminución de los conjugados de baja masa molecular e inducción de HSPs (Ferguson y col., 1990). Estos autores sugieren que debería existir una reducción considerable en la concentración de ubiquitina libre para inducir un aumento en la expresión de genes de poliubiquitinas.

En *D. antarctica* no fue posible detectar el monómero de ubiquitina, al menos hasta el límite de detección de 10 ng en las condiciones ensayadas. Es decir, la cantidad de ubiquitina libre en el total de proteínas solubles de los extractos, puede ser menor a 10 ng o inexistente. Sin embargo, en plantas crecidas a 13°C se detectó una banda de 34 kDa que podría corresponder al tetrámero de ubiquitina y que disminuye después de los 35°C de tratamiento, con el aumento en la acumulación de conjugados de ubiquitina con proteínas

de alta masa molecular. La posible ausencia de ubiquitina libre en las plantas aclimatadas a 4°C, podría deberse a que en estas plantas el sistema de ubiquitinación es muy activo y por lo tanto, ubiquitina se encuentra mayoritariamente conjugada a proteínas y ubiquitina libre en una cantidad menor a 10 ng. Análisis realizados por Gindin y Borochoy (1992), en extractos foliares de *Clerodendrum sp.* expuestas a 3°C por 48 horas, demuestran la disminución del contenido de ubiquitina libre en un 90%, a pesar de la alta concentración de mRNA detectado. En contraste en este estudio se observó un aumento de los conjugados ubiquitina-proteína (Gindin y Borochoy 1992).

La acumulación de conjugados de ubiquitina durante el aumento de temperatura en las plantas de *D. antarctica*, sugiere la inducción consecuente de la actividad proteolítica de degradación de las proteínas ubiquitinadas (Bond y Schlensinger, 1985). Esta inducción ocurre con una disminución o eliminación de una parte de las proteínas celulares existentes (Brodí, 1989).

La eficiencia transcripcional y traduccional, como la estabilidad de las proteínas determina el rendimiento final de estas, que puede ser superior o inferior al contenido alcanzado en la temperatura control por efecto del estrés térmico. Un estrés calórico mediano causa un pequeño aumento en estos dos parámetros, resultando un incremento en el contenido proteico (Gallie y col., 1995). Posiblemente, este evento aislado ocurrió en el grupo de plantas crecidas a 13°C cuando fueron expuestas a 30°C, el rendimiento final de las proteínas a esa temperatura fue superior al rendimiento producido a la

temperatura control. Sin embargo, la disminución del contenido de proteínas totales, tanto en plantas aclimatadas a 4°C y crecidas a 13°C durante el tratamiento de temperaturas, apoya una relación causal entre la acumulación de conjugados de ubiquitina y la degradación de las proteínas dañadas con el estrés calórico.

4.2 Acumulación de HSP70 en plantas de *D. antarctica* sometidas a estrés calórico

En diferentes plantas la inducción de proteínas de estrés térmico muestra distintos óptimos térmicos (Pareek y col., 1995). Estudios de expresión de HSP70 en plántulas tolerantes a las altas temperaturas de *Prosopis chilensis*, expuestas a temperaturas de 25° a 50°C por dos horas, mostraron que la máxima acumulación de esta proteína se observa sobre los 40°C (Ortíz y col., 1995). Otros ejemplos de plantas que crecen en temperaturas más cálidas como soja y maíz, expresan la mayor acumulación de HSP70 entre los 40° y 45°C. Mientras otras plantas de estaciones frías como arveja, muestran la máxima expresión de HSP70 a los 37°C (Vayda y Yuan, 1994). En *D. antarctica*, la temperatura de máxima inducción de HSP70 se detectó a los 35°C. Sin embargo, en ambos grupos de plantas (aclimatadas y no aclimatadas a 4°C) en los distintos tratamientos térmicos, se observó un desplazamiento en el umbral térmico de percepción de la expresión de esta proteína. Esto significa que la inducción de HSP70 en las plantas crecidas a 13°C durante el

tratamiento calórico comenzó a detectarse desde los 25°C y para las plantas aclimatadas a 4°C desde los 13°. Estos resultados concuerdan con la proposición que la aclimatación a 4°C, sensibiliza el tejido foliar para adquirir tolerancia a mayores temperaturas a través de la efectiva inducción de HSPs. La adquisición de esta sensibilidad para responder al daño por el aumento de temperaturas, fue también evidente durante los estudios cinéticos de expresión de máxima acumulación de HSP70 a los 35°C. Estos estudios indicaron que la inducción fue transitoria y en dos fases. La fase temprana fue observada cuando plantas aclimatadas a 4°C presentaron una acumulación detectable de HSP70 con 25 minutos de antelación que las plantas crecidas a 13°C. En la fase tardía la acumulación de HSP70 podría representar un extensivo proceso de reparación de las estructuras dañadas durante el estrés calórico, respuesta que comienza a declinar a las 20 horas en ambos grupos de plantas. Sin embargo, fue posible establecer nuevamente diferencias en el tiempo e intensidad de acumulación, siendo esta respuesta previa y cuatro veces más intensa en las plantas aclimatadas a 4°C con respecto a las crecidas a 13°C. La mayor acumulación de HSP70 en las plantas aclimatadas a 4°C, parece ser consecuencia de su temprana capacidad de acumular HSP70 que protege la maquinaria biosintética necesaria para hacer frente eficazmente a un estrés térmico prolongado a 35°C. Wisniewski y col. (1996) sugieren que las HSP70 estarían involucradas en la mantención de la homeostasis celular durante la aclimatación al frío.

La disminución en intensidad de la banda de HSP70 observada a los 40° y 45°C de tratamiento en ambos grupos de plantas, sugiere que a estas temperaturas la síntesis y/o acumulación de HSP70 disminuye, quizás porque se ha excedido el límite de reparación del sistema de proteínas de estrés térmico. Esta posibilidad puede ser apoyada en los estudios de expresión de HSP70 a 35°C durante 20 horas, en el cual se observa una acumulación creciente de la proteína por sobre 8 horas, sin embargo, bastaron 2 horas de exposición a 40° y 45°C para disminuir su expresión. Si los límites de tolerancia son excedidos y la capacidad adaptativa es sobrepasada, el daño es permanente o deviene la muerte (Larcher, 1995).

La HSP70 es codificada por una familia multigénica (Vierling, 1991) donde hay genes constitutivos y genes inducibles por calor. En *P. chilensis* usando el mismo anticuerpo, se puede detectar dos bandas de proteína, una de 69 kDa y la otra de 71 kDa, siendo la de 69 kDa constitutiva y la de 71 kDa inducida por calor (Medina y Cardemil, 1993). En *D. antarctica* se detectó una sola banda de proteína HSP70. Sin embargo, no es posible descartar que haya más de un gen codificante para la proteína, probablemente inducibles y que codifiquen para proteínas de igual masa molecular.

La presencia de HSP70 favorecería la mantención de la integridad celular y las diferencias en su acumulación en ambos grupos de plantas, explicarían el menor daño en las plantas aclimatadas a 4°C a las temperaturas subletales. Esta evidencia fue observada en las mediciones de TL₅₀, ya sea por

un menor porcentaje de daño medido por la reducción TTC, así como un menor daño a la estructura de membranas medido por la liberación de electrolitos. Más aún, se ha descrito que durante el estrés calórico o estrés al frío, se produce en forma frecuente una pérdida de agua de los tejidos (Palta, 1990, Wisniewski y col., 1996). Sin embargo, a pesar que tal pérdida de agua fue observada en todos los tratamientos calóricos ensayados, la deshidratación fue menor en un 21,5% en las plantas aclimatadas a 4°C en comparación a las crecidas a 13°C. Los daños celulares derivados de la deshidratación generalmente están relacionados a daños provocados en la membrana, en especial a cambios en las interacciones lípido - proteínas, pérdidas de iones y solutos (Palta, 1990). Además, la deshidratación produce desnaturalización de algunas macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos (Wisniewski y col., 1996). Estos antecedentes, junto con la menor deshidratación de las plantas aclimatadas a 4°C concuerda con el menor daño a membranas y proteínas durante el estrés térmico en comparación a las plantas crecidas a 13°C, como se discutió anteriormente.

Así entonces, tomando estos resultados en conjunto es posible pensar que la activación de genes que responden al estrés térmico (HSPs) es una función de una temperatura umbral ajustable dependiente de las condiciones ambientales de crecimiento (Vayda y Yuan, 1994). Esto sugiere que *D. antarctica* en su habitat puede inducir niveles crecientes de HSP70 de acuerdo a la diferencia entre la temperatura de crecimiento y la de estrés. Estas

proteínas de estrés térmico permitirían la reparación y recuperación en forma muy eficiente de proteínas y estructuras celulares dañadas por el aumento térmico durante algunas horas en la época de verano.

A partir de los resultados es posible sugerir que la inducción y acumulación de la proteína de estrés térmico HSP70 y conjugados de ubiquitina, son probablemente mecanismos de protección y reparación de las proteínas dañadas por efecto de la temperatura en *D. antarctica*.

5.0 CONCLUSIONES

A partir de los resultados es posible concluir:

1. *D. antarctica* Desv. presenta inducción y acumulación de proteína HSP70 frente a un estrés térmico.
2. Las plantas de *D. antarctica* Desv. presentan inducción y acumulación de conjugados de ubiquitina frente a un estrés térmico.
3. En las plantas aclimatadas a 4°C, la inducción de HSP70 y ubiquitina conjugada fue más rápida y a una temperatura inferior que en las crecidas a 13°C, sugiriendo que el umbral de temperatura para la acumulación de estas proteínas cambia por la aclimatación a 4°C.
4. De acuerdo al análisis cuantitativo del Western blot, la temperatura de máxima acumulación de HSP70 fue a 35°C. Esta acumulación fue transitoria y en dos fases, una temprana (minutos) y otra más tardía (horas). En ambas fases la acumulación de HSP70 fue mayor en las plantas aclimatadas a 4°C.
5. No se detectó el monómero de ubiquitina libre (límite de detección = 10 ng); sólo se detectó una banda que podría corresponder a un tetrámero de

ubiquitina libre en plantas a 13°C. La disminución de la intensidad de la banda de este posible tetramero con el aumento de temperatura, podría reflejar la formación de conjugados de ubiquitina con proteínas dañadas durante el estrés calórico.

6.0 ANEXO

6.1 Análisis del crecimiento de plantas de *D. antarctica* en distintos sustratos

El análisis de varianza efectuado para el estudio de diferentes sustratos en el crecimiento de *D. antarctica*, indica la existencia de diferencias significativas en el número de brotes dependiendo del sustrato utilizado. Sin embargo, al analizar *a posteriori* los datos en el test de Tukey (Fig 25), se observa que la relación de 3 :1 de corteza de pino lixiviada + perlita estéril (sustrato 1), no es significativamente diferente de turba estéril (sustrato 3) (Fig 25). Las diferencias significativas ($P < 0.001$) se observan al comparar estos sustratos con turba + tierra de hoja estéril en relación 1:1 (sustrato 2) y tierra de hoja + turba + perlita estéril relación 2:2:1 (sustrato 4); sin embargo, estos últimos no presentan diferencias significativas entre ellos.

Al realizar la evaluación del porcentaje de biomasa, con respecto a los distintos sustratos ensayados (Fig. 26), se observan tendencias similares a las mostradas en el gráfico del número de brotes (Fig. 25). Los mayores incrementos de peso fresco se establecen en las plantas crecidas en los sustratos 2 y 4 ($P < 0.001$), en relación a los sustratos 1 y 3. Entre estos últimos sustratos no se encontraron diferencias significativas. En tanto, el sustrato 4 presenta mayores valores de biomasa al compararlos con el sustrato 2, la diferencia entre estos reside en la perlita. Este es un compuesto inerte cuya propiedad es dar aireación a los suelos.

De acuerdo a los resultados, los sustratos 2 y 4 son los más adecuados para el crecimiento de *D. antarctica*, en condiciones de laboratorio.

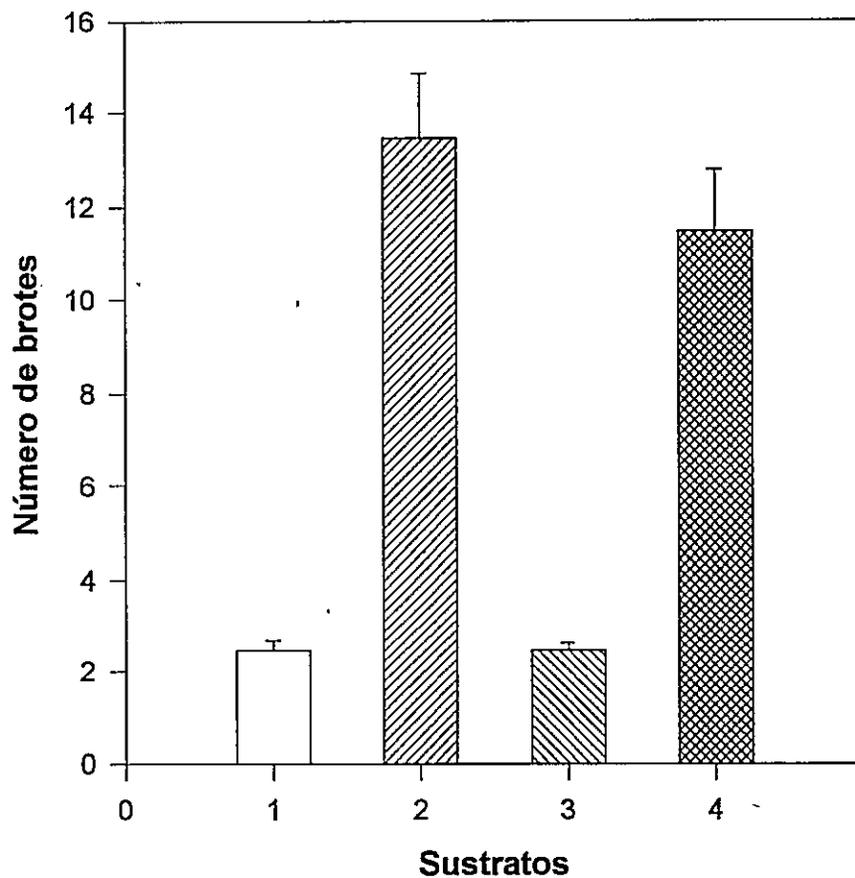


Fig.25 Efecto de cuatro tipos de sustratos sobre el número de brotes en plantas de *D. antarctica*. Los sustratos 1, 2, 3 y 4 corresponden: corteza de pino lixiviada + perlita (3:1); turba + tierra de hoja (1:1); turba y tierra de hoja + turba + perlita (2:2:1), respectivamente. Los valores representan el promedio de 40 mediciones \pm error estándar, realizadas a las 3, 6, 12 y 14 semanas de ensayo.

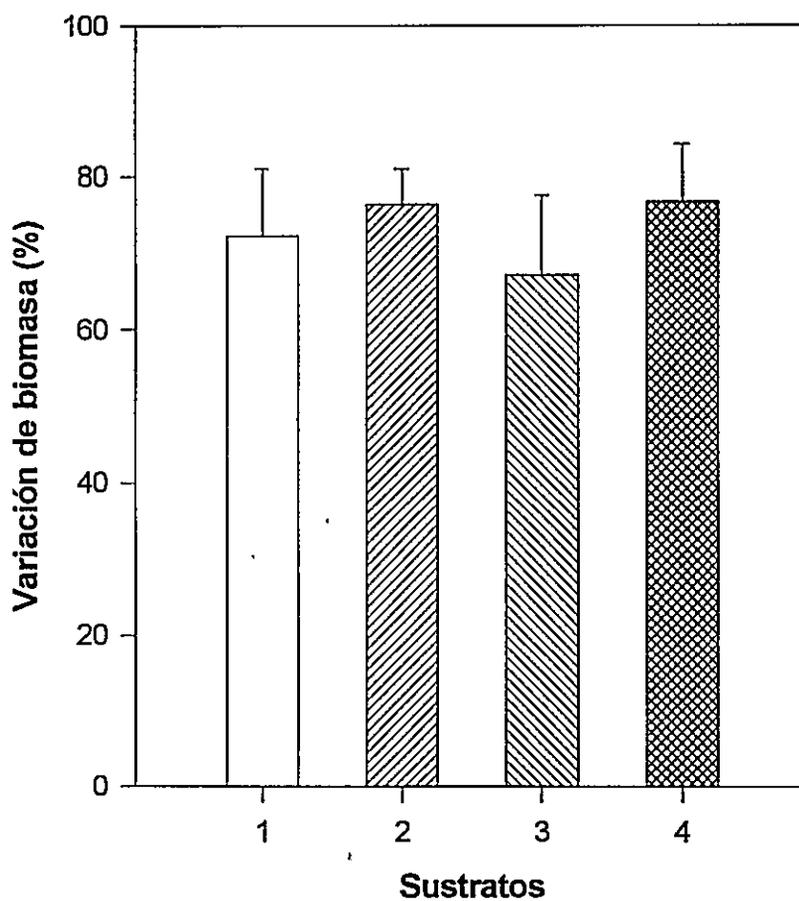


Fig.26 Porcentaje de biomasa en plantas de *D. antarctica* bajo cuatro tipos de suelo (1, 2, 3 y 4), que corresponden a: corteza de pino lixiviada + perlita (3:1); turba + tierra de hoja (1:1); turba y tierra de hoja + turba + perlita (2:2:1), respectivamente. Los valores representan a 10 mediciones \pm error estándar de un total de 40 réplicas realizadas a las 3, 6, 12 y 14 semanas.

7.0 BIBLIOGRAFIA

Agell, N., Bond, U. y Schlesinger, M.J. (1988). In vitro proteolytic processing of a diubiquitin and a truncated diubiquitin formed from in vitro-generated mRNAs. Proc. Acad. Sci. USA. 85: 3693-3697.

Alberdi, M., Meza-Basso, L., Fernández, J., Cristi, R. y Romero, M. (1991). Lipid composition of chloroplasts from cold-acclimated and non-acclimated *Nothofagus dombeyi*. Phytochemistry 30: 763-768.

Baichmair, A. y Varshavsky, A. (1989). The degradation signal in short-lived protein. Cell 56: 1019-1032.

Bettany, A. J. E. (1995). Stress responses in cell cultures of *Lolium temulentum*. II. Induction of thermotolerance and associated changes in gene expression. J. Plant Physiol. 146: 183 - 189.

Bond, U. y Schlesinger, M.J. (1985). Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. Mol. Cell. Biol. 5: 949-956.

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

Broid, M. R. (1989). Regulation of synthesis of normal cellular proteins during heat shock. Physiol. Plant. 75: 439-443.

Broid, M. R., Tierney, M., Ho, T.-H.D. y Varner, J.E. (1987). Heat shock in wounded carrot root disks disrupts the synthesis and secretion of HRGP. *Plant Physiol.* 83 (suppl.): 78a

Cabané, M., Calvet, P., Vincens, P. y Boudet, A.M. (1993). Characterization of chilling-acclimation-related proteins in soybean and identification of one as a member of the heat shock protein (HSP 70) family. *Planta* 190: 346-353.

Cardemil, L. (1985). Inducción de termotolerancia en plantas. *Medio Ambiente.* 7: 3-14.

Casaretto, J.A., Corcuera, L.J., Serey, I. y Zuñiga, G. (1993). Size structure of a population of *D. antarctica* Desv. in Robert Island, maritime Antarctica. *Ser. Cient. INACH* 44: 61-66.

Collins, G.G., Nie, X-L y Saltveit, M.E.Jr. (1993). Heat shock increases chilling tolerance of mung bean hypocotyl tissue. *Physiol. Plant* 89: 117 - 124.

Cooper, P., Ho, T-H. D. y Hauptmann, R. H. (1984). Tissue specificity of the heat-shock response in maize. *Plant Physiol.* 75: 431 - 441.

Correa, M. (1978). Flora Patagónica. Parte III. Graminae. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina.

Chatterton, N.J., Harrison, P.A., Bennett, J.H. y Asay, K.H. (1989). Carbohydrate partitioning in 185 accessions of Gramineae grown under warm and cool temperatures. *J. Plant Physiol.* 134: 169-179.

Cheng, H. H., Shen, Z. Y. y Li, P. H. (1982). Adaptability of crop plants to high temperature stress. *Crop Sci.* 22: 719 - 725.

Dai, H., Lo, Y-S., Wang, C-H., Chern, C-G., Ruddat, M. y Chiang, K-S. (1993). Absence of heat- shock protein synthesis in isolated rice (*Oryza sativa* L.) mitochondria. *Int. J. Plant Sci.* 154: 290 - 297.

Edwards, J.A. y Lewis-Smith, R.I. (1988). Photosynthesis and respiration of *C. quitensis* (Kunt) Bartl. and *D. antarctica* Desv. from the maritime Antarctic. *Br. Antarct. Surv. Bull.* 81: 43-63.

Ehlers, K., Schulz, M. y Kollmann, R. (1996). Subcellular localization of ubiquitin in plant protoplasts and the function of ubiquitin in selective degradation of outer - wall plasmodesmata in regenerating protoplasts. *Planta* 199: 139 - 151.

Ferguson D. L., Guikema, J. A. y Paulsen, G. M. (1990). Ubiquitin pool modulation and protein degradation in wheat roots during high temperature stress. *Plant Physiol.* 92: 740 - 746.

Finley, D. y Varshavsky, A. (1985). The ubiquitin system: functions and mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 10: 343 - 346

Gallie, D. R., Caldwell, C. y Pitto, L. (1995). Heat shock disrupts cap and poly (A) tail function during translation and increases mRNA stability of introduced reporter mRNA. *Plant Physiol.* 108: 1703 - 1713.

Gatenby, A.A., Viitanen, P.V. y Lorimer, G.H. (1990). Chaperonin assisted polypeptide folding and assembly: implications for the production of functional proteins in bacteria. *Trends Biotechnol.* 8: 354-357.

Georgopoulos, C. y Welch, W.J. (1993). Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 601 - 634.

Gerard, V.A., Davison, I.R. y Driscoll, T. (1997). Heat shock proteins in the kelp *Laminaria saccharina*: comparison of heat - tolerant and heat - susceptible strains and effects of nitrogen - limitation (en prensa)

Gindin, E. y Borochoy, A. (1992). Ubiquitin conjugation to protein increases following chilling of *Clerodendrum* leaves. *Plant Physiol.* 100: 1392-1395.

Goycolea, C. y Cardemil, L. (1991). Expression of shock protein in seeds and during seedling growth of *Araucaria araucana* as a response to thermal stress. *Plant Physiol. Biochem.* 29: 213-222.

Guy, CH.L., Anderson, J.V., Haskell, D.W. y Li, Q-B. (1994). Caps, Cors, Dehydrins, and molecular chaperones: Their relationship with low temperature responses in spinach. In *Biochemical and Cellular Mechanism of Stress Tolerance in Plants.* (Eds. J.H. Cherry) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 479-499.

Guy, C., Haskell, D., Neven, L., Klein, P. and Smelser, C. (1992). Hydration-state responsive protein link cold and drought stress in spinach. *Planta* 188: 265 - 270.

Hartl, F-U., Hlodan, R. y Langer, T. (1994). Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem. Sci.* 19: 20-25.

Hatfield, P.M. y Vierstra, R.D. (1989). Ubiquitin-dependent proteolytic pathway in wheat germ: isolation of multiple forms of ubiquitin-activating enzyme, E1. *Biochemistry.* 28: 735-742.

Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin - dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30: 405 - 439.

Jentsch, S. (1992). The ubiquitin - conjugation system. *Annu. Rev. Genet.* 26: 179 - 207.

Key, J. L., Lin, C-Y. y Chen, Y. M. (1981). Heat shock proteins of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3526 - 3530.

Kimpel, J. A. y Key, J. L. (1985). Heat shock in plants. *Trends Biochem. Sci.* 10: 353 - 357.

Komárková, V.; Poncet, S. y Poncet, J. (1990). Additional and revisited localities of vascular plants *D. antarctica* Desv. and 12 in the Antarctic peninsula area. *Arctic and Alpine Research.* 22: 108-113.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)* 227: 680-688.

Lafuente, M.T., Belver, A., Guye, M.G. y Saltveit, M.E.Jr. (1991). Effect of temperature conditioning on chilling injury of cucumber cotyledons: Possible role of ABA and heat shock proteins. *Plant Physiol.* 95: 443 - 449.

Larcher W. (1995). *Physiological Plant Ecology*. Springer Berlin Heidelberg New York, pp 320 - 448.

Lin, C-Y., Roberts, J. K. y Key, J. L. (1984). Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings: synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. *Plant Physiol.* 74: 152 - 160.

Lindquist, S. y Craig E. A. (1988). The heat- shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-677.

Martineau, J. R., Specht, J. E., Williams, J. H. y Sullivan, C. Y. (1979). Temperature tolerance en soybeans. I. Evaluation of technique for assessing cellular membrane thermostability. *Crop Sci.*, 19: 75 - 78.

Medina, C. y Cardemil, L. (1993). *Prosopis chilensis* is a plant highly tolerant to heat shock. *Plant, Cell and Environment.* 16: 305-310.

Miernyk, J. A. (1997). The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones. *Trends Plant Sci.* 2: 180 - 186.

Mishra, R.K y Singhal, G.S. (1993). Photosynthetic activity and peroxidation of thylakoid lipids during photoinhibition and temperature treatment of isolated wheat chloroplasts. *J. Plant Physiol.*, 141: 286-292.

Mohapatra, S.S., Poole, R.J. y Dhindsa, R.S. (1988). Detection of two membrane polypeptides induced by abscisic acid and cold acclimation: possible role in freezing tolerance. *Plant Cell Physiol.* 29: 727-730.

Moore, D.M. (1970). Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunt) Bartl. and *Deschampsia antarctica* Desv.: II. Taxonomy, distribution and relationships. Br. Antarct. Surv. Bull. 23: 63 - 80.

Morimoto, R. I. (1993). Cells in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. Science 259: 1409 - 1410.

Neven, L.G., Haskell, D.W., Guy, CH.L., Denslow, N., Klein, P.A., Green, L.G. y Silverman, A. (1992). Association of 70-Kilodalton heat-shock cognate proteins with acclimation to cold. Plant Physiol. 99: 1362-1369.

Nieto-Sotelo, J., Vierling, E. y Ho, T-H.D. (1990). Cloning, Sequence analysis, and expression of a cDNA encoding a plastid-localized heat shock protein in maize. Plant Physiol. 93: 1321-1328.

Nover, L., Scharf, K-D. y Neumann, D. (1983). Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. Mol. Cell Biol. 3: 1648- 1655..

Nover, L., Scharf, K-D. y Neumann, D. (1989). Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. Mol. Cell Biol. 9: 11298- 1308.

Ortíz, C.A., Bravo, L.A., Pinto, M. y Cardemil, L. (1995). Physiological and molecular responses of *Prosopis chilensis* under field and stimulation conditions. Phytochemistry 40: 1375 - 1382

Palta, J.P. (1990). Stress interactions at the cellular and membrane levels HortSci. 25: 1377 - 1381.

Pareek, A., Singla, S.L. y Grover, A. (1995). Immunological evidence for accumulation of two high- molecular- weight (104 and 90 kDa) HSPs in response to different stresses in rice and in response to high temperature stress in diverse plant genera. *Plant Mol. Biol.* 29: 293 - 301

Pareek, A., Singla, S. L. y Grover, A. (1997). Short - term salinity and high temperature stress- associated ultrastructural alterations in young leaf cells of *Oryza sativa* L. *Annals of botany* 80: 629 - 639

Rensing, S. A. y Maier, U. G. (1994). Phylogenetic analysis of the stress- 70 protein family. *J. Mol. Evol.* 89: 80 - 86.

Rochester, D. E., Winer, J. A. y Shah, D. M. (1986). The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. *EMBO J.* 5: 451 - 458.

Rothman, J.E. (1989). Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell.* 59: 591-601.

Schaff, D.A., Clayberg, C.D. (1987). Comparison of TTC and electrical conductivity heat tolerance screening techniques in *Phaseolus*. *HortSci.* 22: 642 - 645.

Sorger, P. K. (1991). Heat shock factor and the heat shock response. *Cell.* 65: 363 - 366.

Steponkus, P. L. y Lanphear, F. O. (1967). Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.* 42: 1423 - 1426.

Talanova, V.V. y Titov, A.F. (1994). Endogenous abscisic acid content in cucumber leaves under the influence of unfavourable temperatures and salinity. *J. Exp. Bot.* 45: 1031-1033.

Taiz, L. y Zeiger, E. (1991). Stress Physiology. In *Plant Physiology* (de. The Benjamin/ Cummins Publ. Co. Inc.), pp 630-632

Terashima, I., Funayama, S. y Sonoike, K. (1994). The site of photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. at low temperatures is photosystem I, not photosystem II. *Planta* 193: 300-306.

Tukey, J. W. (1951). Quick and dirty methods in statistics, part I I, Simple analyses for standard designs. En Sokal and Rohlf : *Biometria. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica* . Ediciones H Blume pp 382.

Vayda, M. E. y Yuan, M. L. (1994). The heat shock response of an Antarctic alga is evident at 5°C. *Plant Mol. Biol.* 24: 229 - 233.

Vierling, E. (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579 - 620.

Vierstra, R.D. (1987). Ubiquitin, a key component in the degradation of plant proteins. *Physiol. Plantarum.* 70: 103-106.

von Kampen, J., Wettern, M. y Schulz, M. (1996). The ubiquitin system in plants. *Physiol. Plant.* 97: 618 - 624.

Wisniewski, M., Close, T.J., Artlip, T. and Arora, R. (1996). Seasonal patterns of dehydrins and 70-kDa heat-shock proteins in bark tissues of eight species of woody plants. *Physiol. Plant.* 96:496 - 505.

Wu, M.T. y Wallner, S.J. (1983). Heat stress responses in cultured plant cells. *Plant Physiol.* 72: 817 - 820.

Yeh, K. W., Jinn, T. L., Yeh, C. H., Chen, Y. M. y Lin, C. Y. (1994). Plant low-molecular-mass heat-shock proteins: their relationship to the acquisition of thermotolerance in plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 19: 41 - 49.

Zúñiga, G. (1992). Content of lipids and crioprotector solutes in *Deschampsia antarctica* Desv. XXXV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile y Sociedades afiliadas. Puyehue. Chile.

Zúñiga, G., Alberdi, M., Fernández, J., Montiel, P. y Corcuera, L.J. (1994). Lipid content in leaves of *Deschampsia antarctica* Desv. from the maritime antarctic. *Phytochem.* 37: 669-672.