

795
c 1

**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y METABÓLICAS DE
SUSPENSIONES CELULARES DE CEBADA AL FRÍO Y
ESTRES HÍDRICO**

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Gustavo Emilio Zúñiga Navarro

Julio-1997

Director de Tesis: Dr. Luis Corcuera Pérez.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

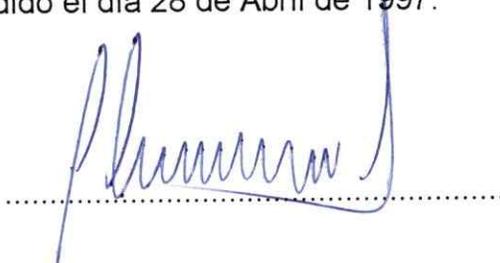
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

GUSTAVO EMILIO ZUÑIGA NAVARRO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de Abril de 1997.

Director de Tesis

Dr. Luis Corcuera P.

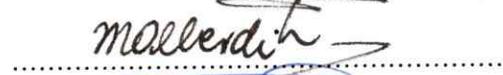


Comisión de Evaluación de la Tesis :

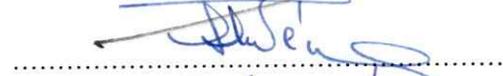
Dra. Liliana Cardemil (Presidente)



Dra. Miren Alberdi



Dra. Luz M. Pérez



Dr. Miguel Jordán



*A Ximena (mi jefa)
y a mis hijos Gustavo y Sergio*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Corcuera P. por su constante apoyo, amistad e incentivo brindado durante la realización de esta Tesis.

A la Dra. Miren Alberdi por brindarme su amistad y apoyo durante la realización de esta Tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias, por el apoyo y amistad brindada.

A la Dirección de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICYT), de Universidad de Santiago de Chile y al Departamento de Postgrado y Postítulo, Vicerrectoría Académica y Estudiantil de la Universidad de Chile.

ÍNDICE DE MATERIAS

TITULO.....	i
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE.....	v
LISTA DE FIGURA.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xiii
ABREVIATURAS.....	vix
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1.INTRODUCCION.....	1
1.1. Efecto de las bajas temperaturas sobre las plantas.....	2
1.1.1. Daños por enfriamiento.....	2
1.1.2. Daños por congelamiento.....	4
1.2. Efecto del déficit hídrico sobre las plantas.....	5
1.3. Aclimatación a las bajas temperaturas y al déficit hídrico.....	6
1.3.1 Aclimatación a las bajas temperaturas.....	6
1.3.2 Aclimatación al déficit hídrico.....	8
1.4. Cambios bioquímicos asociados con la aclimatación al frío y estrés hídrico.....	9
1.5. Papel del ABA en la aclimatación al frío y estrés hídrico.....	14

1.6. Uso del cultivo de tejidos en el estudio de respuestas a estrés.....	18
1.7. HIPOTESIS.....	21
1.8. Objetivos.....	21
1.8.1. Objetivo general.....	21
1.8.2. Objetivos específicos.....	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1. Obtención de suspensiones.....	23
2.2. Caracterización de las suspensiones celulares.....	23
2.2.1. Crecimiento.....	25
2.2.2. Viabilidad celular.....	25
2.2.3. Consumo de oxígeno.....	26
2.3. Aclimatación de las células a condiciones adversas.....	26
2.3.1. Temperatura.....	26
2.3.2. Déficit hídrico.....	27
2.3.3. Efecto del ABA sobre la aclimatación de células.....	27
2.3.4. Efecto del cloruro de colina sobre la aclimatación de células.....	27
2.4. Evaluación del grado de tolerancia.....	27
2.4.1. Tolerancia al congelamiento.....	28
2.4.2. Tolerancia al déficit hídrico.....	28
2.5. Caracterización bioquímica de las suspensiones celulares.....	29
2.5.1. Glucosa y sacarosa.....	29

2.5.2. Prolina y glicina-betaína.....	29
2.5.3. Lípidos.....	32
2.5.4. Análisis de fosfolípidos.....	32
2.5.5. Análisis de ácidos grasos.....	33
2.5.6. Análisis de ABA.....	33
2.5.7. Análisis de lipoperoxidación.....	35
2.5.8. Análisis enzimáticos.....	35
2.5.9. Cuantificación de proteínas.....	36
2.6. Análisis estadísticos.....	37
3. RESULTADOS.....	38
3.1 Obtención y caracterización de suspensiones celulares y/o callos...	38
3.1.1. Caracterización fisiológica.....	38
3.1.2. Crecimiento.....	38
3.1.3. Consumo de oxígeno.....	41
3.1.4. Consumo de sacarosa.....	44
3.1.5. Supervivencia a bajas temperaturas.....	46
3.1.6. Tolerancia al déficit hídrico.....	49
3.1.7. Obtención de una suspensión celular tolerante al frío.....	49
3.1.8. Consumo de sacarosa en células tolerantes al frío.....	53
3.1.9. Eficiencia en el uso del carbono.....	53
3.1.10. Tolerancia al congelamiento en células tolerantes al frío.....	56

3.1.11. Comparación de la tolerancia al déficit hídrico en células crecidas a 4° y 28 °C.....	56
3.1.12. Tolerancia al congelamiento y al estrés hídrico en callos a 4 °C.....	59
3.2 Caracterización bioquímica.....	63
3.2.1. Contenido de solutos en células a diferentes temperaturas.....	63
3.2.2. Acumulación de solutos en células y callos tolerantes al frío.....	63
3.3. Aclimatación al frío.....	66
3.3.1. Contenido de solutos durante la aclimatación.....	71
3.3.2. Tolerancia al déficit hídrico en células aclimatadas a 4 °C.....	80
3.4. Efecto del ABA sobre la aclimatación.....	82
3.4.1. Tolerancia al déficit hídrico en células aclimatadas a ABA.....	89
3.5. Aclimatación de las células al déficit hídrico inducido por PEG-8000.....	89
3.5.1. Efecto del déficit hídrico sobre la sobrevivencia de células de cebada.....	91
3.5.2. Tolerancia al congelamiento y acumulación de solutos en células aclimatadas al déficit hídrico.....	91
3.5.3 Efecto de la aclimatación al déficit hídrico sobre el contenido de fosfolípidos.....	98
3.6 Efecto del cloruro de colina sobre la tolerancia al congelamiento y déficit hídrico.....	98
3.6.1. Tolerancia al déficit hídrico.....	100

3.6.2 Efecto del cloruro de colina sobre la acumulación de solutos.....	103
3.6.3 Efecto del cloruro de colina sobre el contenido de fosfolípidos.....	103
4. DISCUSION.....	109
5. CONCLUSIONES.....	126
6. REFERENCIAS.....	127

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Cromatograma de azúcares solubles mediante HPLC.....	30
Fig. 2. Cromatograma del ácido abscísico mediante HPLC.....	34
Fig. 3. Células de cebada cv Atlas 68.....	39
Fig. 4. Crecimiento de suspensiones celulares de cebada.....	40
Fig. 5. Crecimiento de una suspensión celular a diferentes temperaturas	42
Fig. 6. Absorción de sacarosa a 28 °C.....	45
Fig. 7. Efecto de la temperatura sobre la sobrevivencia	47
Fig. 8. Efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno	48
Fig. 9. Tolerancia al déficit hídrico en células crecidas a 28 °C.....	50
Fig. 10. Crecimiento de células a 4 y 28 °C	51
Fig. 11. Contenido de agua y materia seca en células a 4 y 28 °C.....	52
Fig. 12. Absorción de sacarosa a 4 y 28 °C	54
Fig. 13. Eficiencia en el uso del carbono.....	55
Fig. 14. Efecto de la temperatura sobre la sobrevivencia de células crecidas a 4 y 28 °C.....	57
Fig. 15. Tolerancia al déficit hídrico en células crecidas a 4 y 28 °C.....	58
Fig. 16. Callo crecido a 4 °C.....	60
Fig. 17. Tolerancia al congelamiento en células y callos a 4 °C.....	61
Fig. 18. Tolerancia al déficit hídrico en células y callos a 4 °C.....	62
Fig. 19. Sobrevivencia durante la aclimatación a 4 °C.....	67

Fig. 20. Tolerancia al congelamiento durante la aclimatación a 4 °C....	68
Fig. 21. Consumo de oxígeno durante la aclimatación a 4 °C.....	69
Fig. 22. Variación en el contenido de MDA durante la aclimatación a 4 °C.....	72
Fig. 23 Actividad peroxidasa y catalasa durante la aclimatación a 4 °C.....	73
Fig. 24 Acumulación de prolina durante la aclimatación a 4 °C.....	74
Fig. 25 Acumulación de sacarosa durante la aclimatación a 4 °C.....	76
Fig. 26. Contenido de proteínas solubles durante la aclimatación a 4 °C.....	77
Fig. 27. Variación en el contenido de ABA durante la aclimatación a 4 °C.....	78
Fig. 28. Variación en el contenido de agua y materia seca durante la aclimatación a 4 °C.....	79
Fig. 29. Efecto de la aclimatación a 4 °C sobre la tolerancia al déficit hídrico.....	81
Fig. 30. Efecto del ABA sobre la tolerancia al congelamiento.....	83
Fig. 31. Efecto del ABA sobre la acumulación de prolina.....	86
Fig. 32. Efecto del ABA sobre la acumulación de sacarosa	87
Fig. 33. Efecto del ABA sobre la acumulación de fosfolípidos	88
Fig. 34. Efecto del ABA sobre la tolerancia al déficit hídrico	90
Fig. 35. Efecto del déficit hídrico sobre la sobrevivencia de las células.....	92
Fig. 36. Efecto de la aclimatación al déficit hídrico sobre la tolerancia a bajos potenciales hídricos.....	93

Fig. 37.	Efecto de la aclimatación al déficit hídrico sobre la tolerancia al congelamiento.....	94
Fig. 38.	Efecto de la aclimatación al déficit hídrico sobre la acumulación de prolina.....	95
Fig. 39.	Efecto de la aclimatación al déficit hídrico sobre la acumulación de ABA.....	96
Fig. 40.	Efecto de la aclimatación al déficit hídrico sobre la acumulación de sacarosa.....	97
Fig. 41.	Efecto de la aclimatación al déficit hídrico sobre el contenido de fosfolípidos.....	99
Fig. 42.	Efecto de la aclimatación con ChCl sobre la tolerancia a bajas T°.....	101
Fig. 43.	Efecto de la aclimatación con ChCl sobre la tolerancia al congelamiento.....	102
Fig. 44.	Efecto de la aclimatación con ChCl sobre la tolerancia al déficit hídrico.....	104
Fig. 45.	Efecto de la aclimatación con ChCl sobre el contenido de fosfolípidos.....	106

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Uso de suspensiones celulares para estudios metabólicos.....	20
Tabla 2.	Medio de cultivo utilizado en el cultivo de suspensiones celulares.....	24
Tabla 3.	Efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno.....	43
Tabla 4.	Contenido de solutos en suspensiones celulares crecidas a diferentes temperaturas.....	64
Tabla 5.	Contenido de solutos en células crecidas a 4° y 28 °C.....	65
Tabla 6.	Efecto del incubación con ABA sobre la tolerancia al congelamiento.....	85
Tabla 7.	Efecto de la aclimatación con ChCl sobre el contenido de solutos.....	105
Tabla 8.	Proporción de ácidos grasos en la fracción de fosfatidilcolina.....	107

ABREVIATURAS

ABA	:	Acido abscísico
BSA	:	Sero albumia de bovino
ChCl	:	Cloruro de colina
cv.	:	cultivar
<i>Cor</i>	:	Genes regulados por frío
Fig.	:	Figura
HPLC	:	Cromatografía de alta eficiencia
PEG-8000	:	Polietilenglicol 8000
PE	:	Fosfatidiletanolamina
PI	:	Fosfatidilinositol
PC	:	Fosfatidilcolina
TL ₅₀	:	Temperatura letal para el 50% de las células
TTC	:	Cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio

RESUMEN

En condiciones naturales, las plantas tienen la capacidad de aumentar su tolerancia cuando son expuestas a una condición desfavorable en forma gradual.. Este fenómeno se conoce con el nombre de aclimatación. La mayor parte de los estudios realizados para determinar los factores involucrados en la aclimatación han utilizado plantas completas. En cereales como la cebada, se desconoce con exactitud los mecanismos involucrados en la aclimatación al frío y al estrés hídrico a nivel celular. El propósito de esta tesis fue desarrollar un sistema de suspensiones celulares de cebada para estudiar su capacidad para aclimatarse al frío y al déficit hídrico.

Se obtuvieron suspensiones celulares a partir de dos cultivares de cebada Aramir y Atlas 68. El cv. Atlas 68 presentó una tasa de crecimiento mayor que la variedad Aramir, razón por la cual fue elegido para realizar los estudios. La capacidad de esta suspensión para tolerar el congelamiento fue medida por su capacidad para reducir el cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC), y determinando la actividad respiratoria de las células a bajas temperaturas. El grado de tolerancia estuvo en el rango determinado utilizando hojas (-6,2 °C), aunque los métodos empleados fueron diferentes. La tolerancia al déficit hídrico de las células fue medida por la mantención de la actividad respiratoria en presencia de PEG-8000.

Durante el desarrollo experimental de esta tesis, se obtuvo una suspensión tolerante al frío (4 °C), manteniendo las células a esa temperatura alrededor de 45 días. La capacidad de estas células para tolerar el congelamiento aumentó en aproximadamente 4 °C, mientras que la capacidad para tolerar el estrés hídrico aumentó en aproximadamente un 80%, respecto de las células susceptibles al frío. En esta suspensión, los contenidos de ácido abscísico y sacarosa fueron mayores que los encontrados a 28 °C (en un 55% y un 190%, respectivamente). Esta suspensión resulta importante, pues se dispone de un material a partir del cual se podrían obtener plantas tolerantes.

La suspensión celular crecida a 28 °C fue capaz de aclimatarse al frío (4 °C) y al déficit hídrico inducido por PEG-8000 (2%). Durante la aclimatación al frío la sobrevivencia disminuyó hasta un 40 % respecto del control, y la TL_{50} disminuyó desde -6,2 °C hasta -9,5 °C, lo cual es indicativo del fenómeno de aclimatación. Durante la aclimatación de las células se produjo un estrés oxidativo, caracterizado por un aumento en los niveles de malodialdehído (230%), del cual las células fueron capaces de recuperarse aumentando la actividad de las enzimas catalasa (250%) y peroxidasa (400%) . En este proceso se observó una acumulación de prolina, ABA y sacarosa (500%, 260% y 300%, respectivamente).

Las células aclimatadas al frío toleraron mejor el estrés hídrico inducido por PEG-8000. Esto sugiere la existencia de mecanismos comunes de tolerancia al frío y al estrés hídrico.

La tolerancia de las células al frío o al déficit hídrico, aumentó al incubarlas con ABA. En este caso la tolerancia al congelamiento aumentó en una proporción mucho mayor que la observada en las células aclimatadas o tolerantes y en un período de tiempo menor (desde -6,2 °C en células control a -31 °C en células tratadas con ABA 100 µM, durante 7 días). Estas células toleraron en mejor forma el déficit hídrico, pues la concentración de PEG-8000 necesaria para reducir la respiración celular en un 50% aumento en un 100%.

La aclimatación con ABA provocó cambios en los niveles de prolina, sacarosa y fosfolípidos. El nivel de prolina alcanzado, fue inferior al nivel alcanzado durante la aclimatación a 4 °C, mientras que los niveles de ABA y sacarosa fueron mayores que los alcanzados a 4 °C (260% y 355%, respectivamente).

Las células de cebada crecidas en suspensión fueron capaces de aclimatarse al déficit hídrico inducido por PEG-8000 (2%). Sin embargo, la capacidad de estas células para tolerar potenciales hídricos menores aumentó en una magnitud inferior a la observada, por ejemplo a 4 °C. De igual modo, la capacidad de las células para tolerar el congelamiento

aumento en aproximadamente 1,5 °C. Los niveles de sacarosa y ABA acumulados en estas condiciones fueron inferiores a los alcanzados a 4 °C, mientras que la acumulación de prolina fue similar. El estrés hídrico también provocó cambios en los niveles de fosfolípidos en una proporción menor que la inducida por ABA.

La tolerancia de las células al frío o al estrés hídrico puede ser modulada alterando las propiedades de la membrana plasmática. Por esta razón, las células fueron incubadas en presencia de cloruro de colina, un precursor de glicina-betaína y fosfatidilcolina. La tolerancia al congelamiento o al déficit hídrico aumentó en forma significativa. Sin embargo en este caso los niveles de ABA no experimentaron cambios significativos, mientras que los niveles de prolina aumentaron en una proporción menor que la observada a 4 °C. de las sustancias que podrían experimentar cambio producto de la aplicación exógena de cloruro de colina, los niveles de fosfatidilcolina, aumentaron en forma significativa. esta fracción mostró además, un enriquecimiento importante en ácido linolenico (18:3), lo cual estaría modificando la fluidez de las membranas.

El hecho que en este caso el ABA no halla experimentado cambios significativos sugiere que las células disponen de mecanismo de tolerancia independiente que pueden actuar en forma sinérgica. Entre estos mecanismos está la acumulación de ABA, sacarosa y fosfolípidos.

Finalmente se puede concluir que las suspensiones celulares de cebada son capaces de aclimatarse a condiciones adversas, experimentando cambios similares a los observados en plantas completas. Esto sugiere, que no es necesaria la organización tisular para lograr la aclimatación. De igual modo, los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la hipótesis acerca de la existencia de mecanismos comunes de tolerancia a diferentes condiciones de estrés.

Por lo tanto, las suspensiones celulares de cebada constituyen sistema adecuado para identificar a nivel celular los factores responsables de la aclimatación a condiciones desfavorables. A partir de estas células se podría identificar los genes responsables de tales factores, con lo cual se podría mejorar los cultivos en tiempos mucho menores que los requeridos por los procedimientos de fitomejoramiento actualmente en uso.

ABSTRACT

Under natural conditions plants have the capacity to increase their tolerance when they are gradually exposed to an adverse condition. This process is called acclimation. Most of the studies carried out to determine the factors involved in the acclimation process have used whole plants. In cereals, such as barley, the mechanisms involved in the acclimation at the cellular level are not precisely known. The proposal of this work was to develop a system of cellular suspensions of barley to study acclimation to cold and drought.

Cellular suspensions were induced from callus obtained from radicular tips of barley cultivars Atlas 68 and Aramir. The growth of cv. Atlas 68 was higher than the growth of cv Aramir. The capacity of this suspension to tolerate freezing was determined measuring the reduction of TTC and the respiratory capacity of cells at low temperatures. The LT_{50} of cells were similar to those found in leaves although the methodology used for leaves was different. The tolerance to drought induced by PEG-8000 was determined by measuring the respiratory capacity of cells.

During the experimental development of this work a cellular suspension tolerant to cold (4 °C) was obtained. The freezing tolerance (LT_{50}) of the cells decreased about 4 °C, while the capacity to tolerate drought increased about 80% with respect to susceptible cells. In this cells the content of ABA and

sucrose were higher than the content found in cells growing at 28 °C (55% and 190%, respectively). From this tolerant suspension it could be obtained tolerant plants against cold or drought.

The cellular suspension growing at 28 °C was able to acclimate to cold (4 °C) and drought (2 % PEG-8000). During the acclimation at 4 °C, the survival of cells decreased to 40%, while the TL_{50} decreased from -6.2 °C to -9.5 °C, which is indicative that acclimation has occurred. During the initial phase of the acclimation an oxidative process detected measuring the level of MDA. Cells were able to stop this stress by increasing the activity of catalase (250%) and peroxidase (400%). The levels of proline, ABA and sucrose, increased during the acclimation of cells (500%, 260%, 300%, respectively). Cold acclimated cells were more tolerant to drought induced by PEG-8000. This result suggest the existence of common tolerance mechanism to cold and water stress.

Cold and water stress tolerance of cells may be improved incubating them in presence of ABA. In this case, the tolerance increased in higher proportion than that observed in acclimated cells and in a shorter period of time (from -6,2 °C to -31 °C in 100 µM ABA acclimated during 7 days). These cells were more tolerant to water deficit induced by PEG-8000, since the concentration of PEG-8000 necessary to reduce the cellular respiration in a 50% increased in 100%. During the acclimation with ABA, the endogenous levels of ABA and

sucrose were higher than the levels found at 4 °C (260% and 355%, respectively).- In addition, the levels of phospholipids and proline also increased.

Cellular suspensions were also able to acclimate to drought induced by 2% PEG-8000. However, the capacity of these cells to tolerate lower water potentials was lower than those found in cells grown at 4 °C. The LT_{50} decreased only in 1,5 °C. The levels of sucrose and ABA accumulated in these cells were lower than the levels found at 4 °C, while the level of proline was similar. .

The tolerance of cells could be modulated changing the properties of membranes. For this reason, the cells were incubated with choline chloride (ChCl) a precursor of both glycine-betaine and phosphatidylcholine. The tolerance to freezing and water stress increased significantly. However, in this case the level of ABA remains unchanged, while proline levels increased less than at 4 °C. Within the substances that could be experimentally changed with the endogenous application of ChCl, phosphatidylcholine levels increased significantly. Besides, this fraction showed an important enrichment of linolenic acid (18:3), which could modify the fluidity of membranes.

The fact that ABA has not experienced significant changes suggests that cells have independent mechanisms of tolerance that could act synergically.

Within these mechanisms the accumulation of ABA, sucrose and phospholipids may be important

Finally, it is concluded that cellular suspensions of barley are able to acclimate to unfavorable conditions, undergoing biochemical changes similar to those observed in whole plants. It is suggested, that the organization as a tissue is not necessary condition to acclimate.

Therefore, cellular suspensions of barley represent an appropriate system to identify the factors responsible of the acclimation to adverse conditions, at cellular level. From these cells it could be identified the genes responsible of the tolerance, to introduce in susceptible plants.

1. INTRODUCCIÓN

Durante la evolución, muchas plantas se han adaptado con éxito a la amplia diversidad de estreses ambientales, como son: las temperaturas bajas y altas, la sequía, la salinidad y la toxicidad de metales, entre otros (Larcher, 1995).

Tanto las temperaturas bajas como el déficit hídrico (sequía), ejercen un fuerte impacto sobre la distribución geográfica, el crecimiento y la productividad de muchas plantas (Hsiao, 1973; Levitt, 1980, Turner, 1986). Las plantas adquieren una temperatura similar a la del ambiente que las rodea. Si estas son desfavorables, es decir si se ubican por sobre o debajo de los rangos térmicos tolerados por ellas, se produce un efecto negativo sobre los procesos bioquímicos generándose un desbalance entre las diversas vías metabólicas que operan en el organismo (Larcher, 1995). En el ámbito de la agricultura, se ha detectado una reducción en la producción de trigo de un 30%, cuando la temperatura media anual disminuye en 1 °C (Fowler *et al.*, 1981). Por lo tanto, el poder seleccionar plantas capaces de tolerar un par de grados centígrados menos, significaría poder aumentar la productividad en forma significativa y extender las áreas de cultivo.

Por otra parte, el contenido hídrico de las plantas está regulado por el estatus hídrico del suelo, lo cual determina su desarrollo (Larcher, 1995). En este contexto, la productividad vegetal en ambientes con escasa disponibilidad hídrica puede ser aumentada mediante el desarrollo de cultivares tolerantes a la sequía.

La obtención de plantas cultivadas tolerantes al frío y el estrés hídrico, junto al conocimiento de las respuestas fisiológicas y bioquímicas inducidas frente a una condición desfavorable tiene una gran importancia agronómica, y constituye en la actualidad un requisito básico en la aplicación de la ingeniería genética para mejorar los cultivos.

1.1 Efecto de las temperaturas bajas (frío y heladas) sobre las plantas.

Cuando se estudia la acción de las temperaturas bajas sobre el organismo vegetal debe tenerse en cuenta que ellas pueden producir daños por enfriamiento y por congelamiento.

1.1.1. Daños por enfriamiento. Algunas especies, como aquellas de origen tropical, sufren daños a temperaturas por sobre el punto de congelamiento. En especies sensibles, esto ocurre cuando las plantas son sometidas a temperaturas entre 0° y 10 °C. Los daños por enfriamiento dependen de la etapa de crecimiento y desarrollo en que se encuentra la planta, siendo en general las etapas juveniles y los órganos reproductivos muy sensibles a este factor (Levitt, 1980; Larcher y Bauer, 1981; Larcher, 1995).

Entre los procesos fisiológicos, la fotosíntesis es uno de los primeros procesos en ser afectado cuando las plantas son enfriadas. Martin *et al.*, (1980) demostraron que cuando hojas de tomate son puestas en oscuridad a 1 °C durante 16 horas, y luego iluminadas, la asimilación de CO₂ se redujo en un 60 % con respecto a las plantas mantenidas a 25 °C. Esta inhibición se debería a la modificación de los componentes del fotosistema II producto del enfriamiento. Por otra parte, la transpiración en plantas cuyas raíces son sometidas a temperaturas de enfriamiento, también decrece. Esto se explica en base a una menor conductividad estomática y una menor conductividad hidráulica de la raíz (Running y Read, 1980). Como consecuencia de la menor tasa transpiratoria, se ve también afectada la absorción de nutrientes desde el suelo (Levitt, 1980).

1.1.2. Daños por congelamiento. Las temperaturas bajo 0 °C, reducen el metabolismo de las células, inhibiendo las funciones fisiológicas más importantes (Levitt, 1980). Si la temperatura de la planta es inferior a la del punto de congelación, la fase acuosa del apoplasto de sus células comienza a congelarse (hielo extracelular) debido a que la concentración de solutos es muy baja. Dado que la tensión de vapor de los cristales de hielo formados es menor que la de la solución interna sobreenfriada, éstos extraen agua desde el interior de la célula hasta que las tensiones se igualan, con lo que el movimiento de agua cesa. Este proceso provoca un desecamiento celular. Si

el descenso térmico continúa, los cristales de hielo formado se extienden entonces al simplasto (hielo intracelular) ocasionando daños irreversibles (Larcher, 1995). Al igual que en el enfriamiento, uno de los principales sitios de daño celular por efecto de la congelación son las membranas (Levitt, 1980; Steponkus, 1984). Williams *et al.*, (1981) han presentado evidencias que apoyan algunas hipótesis respecto al daño de las membranas por congelación, a saber: a) el desecamiento celular produce un aumento en la concentración interna de iones (estrés osmótico), lo que sería la causa primaria del daño por congelamiento; b) El estrés osmótico provoca daños irreversibles en el material lipídico de la membrana durante la plasmólisis inducida por el desecamiento; c) la tolerancia al congelamiento es causada por una pérdida inicial de ciertos componentes de membrana (por ej. proteínas transportadoras), los que pueden ser almacenados en sitios intracelulares y recapturados por las membranas durante la hidratación y desplasmólisis. Cuando el hielo extracelular se derrite las células se rehidratan y expanden. Si la membrana es capaz de regular el flujo de agua, la célula puede sobrevivir al congelamiento (Steponkus, 1984).

El grado de fluidez de la membrana afecta la capacidad de las células para sobrevivir y funcionar (Steponkus y Weist, 1979). En términos generales la fluidez de la membrana aumenta con el aumento de la temperatura ambiente y decrece con la caída de ésta. Sin embargo, tanto la estructura de

la membrana como su composición determinan el umbral bajo el cual la temperatura afecta la fluidez.

1.2. Efecto del déficit hídrico sobre las plantas. La respuesta mas apreciable de las plantas frente a la sequía es la detención del crecimiento celular (Levitt, 1980). En especies como el maíz, una disminución leve del potencial hídrico (-0,2 bares) induce una disminución de la elongación celular, mientras que descensos más severos inhiben el crecimiento (Acevedo *et al.*, 1970). En muchas especies, se ha descrito una relación lineal entre el crecimiento y el potencial de turgor (Cleland, 1971; Eastman *et al.*, 1984). Potenciales de turgor bajos, ocasionados por déficit hídrico, son responsables también del cierre de los estomas, con lo cual se afecta la fijación de CO₂. Sin embargo, plantas sometidas a estrés hídrico abren sus estomas a la misma presión de turgor que plantas bien hidratadas, como ocurre en maíz (Turner, 1975), reduciéndose así los efectos dañinos del déficit hídrico. La síntesis de proteínas y aminoácidos también es reducida por efecto de la sequía. Una de las enzimas más afectadas es la nitrato reductasa (Hsiao, 1973). Períodos breves de déficit hídrico provocan una caída cercana al 20% en la actividad enzimática, mientras que períodos más prologados de estrés producen un descenso a aproximadamente el 50% (Hsiao, 1973). Esta es una de las causas de porqué el contenido de nitrato en plantas fertilizadas aumenta en condiciones de déficit hídrico.

Un estrés hídrico leve induce la inhibición del crecimiento de los brotes y al mismo tiempo estimula el crecimiento de las raíces. De esta manera se reduce la transpiración y el mayor crecimiento radicular permite explotar reservas adicionales de agua en el suelo (Levitt, 1980). En condiciones de estrés suave a severo, puede producirse la destrucción de los compartimientos celulares, con la concomitante liberación de hidrolasas que actúan sobre sustratos que normalmente se encuentran protegidos en compartimientos específicos. El déficit hídrico también provoca cambios en el mecanismo fotosintético y en la ultraestructura del cloroplasto (Boyer y Bowen, 1970).

1.3. Aclimatación a las temperaturas bajas y al déficit hídrico en plantas superiores.

1.3.1. Aclimatación a las temperaturas bajas. Muchas plantas pueden incrementar su tolerancia a las temperaturas bajas cuando son expuestas a temperaturas bajas no congelantes. Este proceso es conocido como **aclimatación** o **endurecimiento** (Sakai y Larcher, 1987). Según Guy (1990), en la aclimatación a las temperaturas bajas participan dos procesos principales: El primero corresponde a la adaptación metabólica inducida en algunas especies cuando son expuestas a temperaturas moderadas, como por ejemplo, 14 °C por varios días (Cabané *et al.*, 1993; Prasad *et al.*, 1994). Este proceso corresponde a la aclimatación al frío (no congelante). El

segundo proceso se relaciona con la inducción de tolerancia al congelamiento (Steponkus, 1984). Una clara manifestación de este proceso es el aumento de la tolerancia al congelamiento que ocurre de otoño a invierno en muchas especies vegetales en sus hábitat naturales (Levitt, 1980, Sakai y Larcher, 1987, Alberdi *et al*, 1985). Por ejemplo, ciertas coníferas no aclimatados sufren severos daños cuando son sometidas a temperaturas de aproximadamente $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que las aclimatadas pueden tolerar temperaturas de -40 a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las plantas cultivadas pueden alcanzar niveles intermedios de tolerancia, dependiendo de su grado de aclimatación. Así por ejemplo, plantas de trigo y centeno no aclimatadas mueren entre los -5 y $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero luego de la aclimatación , el trigo puede sobrevivir temperaturas de aproximadamente -15 a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el centeno de -25 a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Durante la aclimatación de las plantas ocurren una serie de cambios bioquímicos, tales como alteraciones en la composición lípidica de sus membranas, aparición de nuevas isoenzimas, aumento en el contenido de proteínas y azúcares solubles y aumento en los niveles de prolina y otros ácidos orgánicos (Sakai y Larcher, 1987; Steponkus, 1984). Algunos de estos cambios, como son las alteraciones en la composición lípidica tendrían un papel en el incremento de la tolerancia al frío de las plantas aclimatadas (Steponkus y Lynch, 1989). La composición lípidica de las membranas de plantas aclimatadas es más estable durante el ciclo de congelamiento-

descongelamiento que en membranas de células no aclimatas (Steponkus, 1984; Dowgert y Steponkus, 1984; Dowgert *et al.*, 1987).

También la aclimatación induce cambios en la expresión génica. Esto ha sido apoyado por experimentos en los cuales se ha demostrado que la cicloheximida, impide el aumento de la tolerancia en plantas de *Brassica napus* (Kacperska-Palacz *et al.*, 1977), *Triticum* (Trunova, 1982), y *Solanum commersonii* (Chen *et al.*, 1983). Se postula que para alcanzar la aclimatación, algunas plantas requieren la síntesis de nuevas proteínas (Guy, 1990; Thomashow, 1990). Estas nuevas proteínas estarían involucradas en la adquisición de tolerancia al congelamiento (Meza-Basso *et al.*, 1986; Guy *et al.*, 1988; Mohapatra *et al.*, 1987; Lang *et al.*, 1989).

1.3.2. Aclimatación al déficit hídrico. Las plantas sometidas a déficit hídrico también pueden experimentar el fenómeno de aclimatación (Larcher, 1995). Durante ella ocurren varios cambios metabólicos y fisiológicos que determinan un aumento de la tolerancia a la desecación (Levitt, 1980). Una de las manifestaciones más conocidas de esta aclimatación es el ajuste osmótico. El ajuste osmótico implica un aumento en la concentración intracelular de solutos compatibles (sacarosa, prolina libre, glicina betaína) y potasio, que conduce a una disminución del potencial osmótico celular (Morgan, 1984; Flowers y Yeo, 1986; Hanson y Hitz, 1982). Estas sustancias se acumulan en la vacuola y determinan también disminución del potencial

potencial hídrico (Flowers y Yeo, 1986). Como consecuencia de esta acumulación gatillada por el estrés, se mantiene el turgor celular.

En muchas plantas también se relaciona con la aclimatación a la sequía a la fitohormona ABA y a algunas proteínas específicas (Ibarra-Caballero *et al.*, 1988; Arakawa *et al.*, 1990; Creelman y Mullet, 1991; Close y Chandler, 1990).

1.5. Cambios bioquímicos asociados con la aclimatación al frío y a la sequía en cereales.

Las temperaturas bajas y el estrés hídrico afectan la integridad de las membranas celulares (Guy, 1990; Thomashow, 1990; Steponkus *et al.*, 1993). Una de las respuestas de las plantas a las bajas temperaturas es la producción de altos niveles de ácidos grasos insaturados (Graham y Patterson, 1982), destinados a mantener la fluidez y la funcionalidad de los fosfolípidos de las membranas biológicas. Se ha sugerido que el rápido incremento de los ácidos grasos insaturados es el resultado de la activación de enzimas desaturasas embebidas en la membrana. Estas enzimas son activadas en respuesta al incremento de la rigidez de los lípidos de membrana, lo cual provocaría cambios conformacionales en la enzima que inducirían una mayor actividad (Wolter *et al.*, 1992). Cambios similares han sido descritos en plantas sometidas a estrés hídrico (Hubac *et al.*, 1989)

La participación de los ácidos grasos insaturados en la tolerancia al enfriamiento ha sido demostrada utilizando mutantes de *Arabidopsis thaliana*, *fad*, que son incapaces de desaturar lípidos de membrana (Somerville y Browse, 1991). Estos mutantes tienen bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados y son sensibles al enfriamiento (Miquel *et al.*, 1993). Mediante el uso de plantas de *A. thaliana* modificadas mediante ingeniería genética, también se ha demostrado que altos niveles de ácidos grasos insaturados aumentan la tolerancia al enfriamiento, mientras que altos niveles de ácidos grasos saturados (16:0), aumentan la susceptibilidad al enfriamiento (Murata *et al.*, 1992). Esta observación, sin embargo, ha sido refutada por experimentos realizados en mutantes de *A. thaliana* tolerantes al congelamiento que presentan altos niveles de ácidos grasos saturados (Wu y Browse, 1995). En cebada y trigo, el papel del ácido linolénico se ha demostrado utilizando sustancias químicas que reducen su nivel (BASF 13-338) (St John *et al.*, 1979).

Un incremento en el contenido de azúcares solubles (sacarosa, sorbitol, rafinosa) en respuesta a ambos tipos de estrés es común en muchos cereales (Koster y Lynch, 1992). Luego de la exposición de plantas de trigo a 4 °C, se observa un incremento en la actividad de la enzima sacarosa sintetasa, con el consecuente aumento en los niveles de sacarosa (Calderón y Pontis, 1985). Se ha sugerido que esta acumulación es el resultado de una menor demanda

de asimilados, producto de un menor crecimiento a bajas temperaturas (Livingston *et al.*, 1989). La acumulación de fructanos se ha asociado con la respuesta de ciertas plantas a temperaturas bajas (Tognetti *et al.*, 1989). Sin embargo, en cereales la inducción de la síntesis de estos azúcares se iniciaría por la acumulación de sacarosa y no directamente por las temperaturas bajas (Wagner *et al.*, 1986).

La acumulación de prolina libre, también se asocia con la tolerancia de plantas a numerosos estreses, en particular las temperaturas bajas y sequía (Ibarra-Caballero *et al.*, 1988 ; Kushad y Yelenosky, 1987). En trigo, se ha demostrado que diferencias en la acumulación de prolina se correlacionan con la adquisición de tolerancia al congelamiento (Dörffling *et al.*, 1990). De igual modo la selección *in vitro* y la regeneración de líneas con altos contenidos de prolina, llevan a un incremento en la tolerancia al congelamiento (Dörffling, *et al.*, 1993). Por el contrario, en avena y en cebada no se ha encontrado una relación clara entre el contenido de prolina y la tolerancia al frío y la sequía (Alberdi *et al.*, 1993 ; Zúñiga *et al.*, 1990). La prolina puede jugar un papel importante en plantas estresadas, por ejemplo, puede ser usada como fuente de nitrógeno o carbono, durante la recuperación del estrés (Purvis y Yelenosky, 1982). La prolina también estaría involucrada en la osmoregulación celular y en la protección de proteínas (Rhodes y Hanson, 1993). Una observación frecuente es que sustancias

como la prolina o la glicina-betaína, protegen en contra de la deshidratación y que esta protección sería proporcional a la concentración de estas 2 sustancias (Paleg *et al.*, 1984). Dado que la prolina y la glicina-betaína son sustancias osmóticamente activas, ejercen una doble función, protegen contra la deshidratación y mantienen un gradiente osmótico favorable en la célula.

Se ha demostrado que moléculas orgánicas solubles, tales como azúcares y aminoácidos, ejercen protección de las membranas (Heber, *et al.*, 1971; Santarius, 1987) y de algunos sistemas enzimáticos *in vitro* contra el congelamiento y el consecuente desecamiento celular (Krall, *et al.*, 1989).

En la mayoría de los casos, aunque no en todos, el contenido de proteínas solubles aumenta durante la aclimatación (Levitt, 1980, Sakai y Larcher, 1987). En trigo se ha encontrado que el contenido de proteínas solubles aumenta entre un 50 y 300% durante la aclimatación (Trunova, 1982).

Existen numerosos trabajos en los que se ha comparado la composición polipeptídica de plantas aclimatadas y no aclimatadas, mediante PAGE- SDS y marcación *in vivo* (Mohapatra *et al.*, 1987 a y b; Guy *et al.*, 1985; Guy y Haskell, 1987; Perras y Sarhan, 1989). Los resultados obtenidos en estos trabajos muestran que la aclimatación está asociada con la aparición de nuevos polipéptidos y el aumento o disminución de otros. Si bien, durante la aclimatación al frío pueden ocurrir cambios en la síntesis de proteínas, estos

cambios son mucho menores que los cambios que se observan en otras condiciones de estrés como son las altas temperaturas y la sequía (Kimpel y Key, 1985; Sach y Ho, 1986). Luego de la exposición de plantas de cebada al frío (1 a 5 °C), se inducen nuevos mRNAs y un conjunto de proteínas reguladas por frío (genes *cor*) (Hughes y Pearce, 1988; Cattivelli y Bartels, 1990). Análisis electrofóreticos de los polipéptidos obtenidos mediante traducción *in vitro* de los mRNAs inducidos por frío mostraron alrededor de 10-12 polipéptidos de entre 10 a 30 kDa y 2 polipéptidos de 45 y 75 kDa. Los mRNAs inducidos por frío en cebada, muestran diferentes cinéticas de inducción: el mRNA que codifica para el polipéptido de 75 kDa se expresa unas pocas horas luego de aplicado el frío, mientras los otros mensajeros se expresan sólo luego de 1-3 días (Cattivelli y Bartels, 1989). Evidencias similares se han obtenido en los trabajos de Guy *et al.*, (1985) con espinaca. Mediante estudios de traducción *in vitro* ellos lograron demostrar que los RNA poly (A) de plantas con dos días de aclimatación sintetizaban dos polipéptidos de 82 y 120 Kd, ausentes en plantas no aclimatadas. Resultados similares a estos se han obtenidos en otras plantas (Meza-Basso *et al.*, 1986; Mohapatra *et al.*, 1987 a; Gilmour *et al.*, 1988; Robertson *et al.*, 1988; Guy *et al.*, 1988; Yoshida y Uemura, 1984; Uemura y Yoshida, 1984 y Perras y Sarhan, 1989).

Un incremento en la producción de especies activadas de oxígeno (superóxidos, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos) se asocia con el

desarrollo de síntomas de daño en plantas sometidas tanto a temperaturas bajas como al estrés hídrico (Wise y Naylor, 1987; Purvis y Shewfelt, 1993 ; Quartracci y Navari-Izzo, 1992). Las células vegetales están normalmente protegidas de la acción de estas sustancias por la acción de complejos sistemas antioxidantes (Smirnoff, 1993; Zhang y Kirkham, 1994). Estos sistemas se agrupan en tres grupos, a) antioxidantes asociados a membrana, liposolubles (α -tocoferol, β -caroteno); b) reductantes solubles en agua (ascorbato y glutatión); c) antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasas, peroxidasas) y enzima del ciclo ascorbato-glutatión. La tolerancia a condiciones adversas se correlaciona con un incremento en la capacidad para atrapar o detoxificar especies activadas de oxígeno (Kendall y Mckersie, 1989; Smirnoff, 1993; Foyer *et al.*, 1994). Bajo condiciones de sequía el estado hídrico de la planta sería uno de los factores que gatillan los mecanismos defensivos en contra del estrés oxidativo provocado por las especies radicalarias (Sgherri y Navari-Izzo, 1995).

1.6. Papel del ácido abscísico (ABA) en la aclimatación al frío y la sequía

El ABA juega un papel importante en la respuesta de las plantas a condiciones adversas y en algunos casos es capaz de acelerar la adaptación a condiciones desfavorables (Bartels *et al.*, 1988; La Rosa *et al.*, 1985).

Los niveles endógenos de ABA aumentan en forma significativa en plantas bajo sequía (Davis y Jones, 1991). Los niveles de ABA también

aumenta, aunque en forma transitoria, bajo condiciones de frío (Lang *et al.*, 1994) El papel del ABA y su grado de participación en la modulación de la tolerancia al frío y congelamiento todavía genera controversia. Se ha demostrado que la aplicación exógena de ABA puede sustituir a las temperaturas bajas en la aclimatación al frío en callos y suspensiones celulares de diferentes especies (Chen *et al.*, 1983; Orr *et al.*, 1986; Ishikawa *et al.*, 1990; Hauser *et al.*, 1992). En trigo se ha encontrado un correlación entre el nivel máximo de ABA y la tolerancia al congelamiento (Dörffling, *et al.*, 1990), aunque en algunos genotipos sensibles a las temperaturas bajas, se ha encontrado un aumento en los niveles endógenos de ABA por efecto del frío (Daie y Campbell, 1981). Estos resultados indican que la relación entre el contenido de ABA y la capacidad de las plantas para aumentar su tolerancia a las temperaturas bajas no es del todo clara. Esta última hipótesis, ha sido corroborada por Dallaire *et al.*, (1994), quienes demostraron que en callos de trigo, la inducción de tolerancia al congelamiento no se asocia con un aumento en el nivel de ABA. En cambio, en papa o en *Arabidopsis*, al igual que lo descrito en trigo, la exposición a temperaturas bajas provoca un incremento transitorio en el contenido de ABA (Lang *et al.*, 1994).

Una gran cantidad de otros trabajos han mostrado que ABA, aplicado exógenamente a plantas enteras o suspensiones celulares, incrementa la capacidad de tolerar el congelamiento en ausencia de temperaturas bajas

(Irving, 1969; Mohapatra *et al.*, 1988; Waldman *et al.*, 1975; Lang *et al.*, 1989; Chen *et al.*; 1979, Chen y Gusta, 1982,1983; Reaney y Gusta, 1987). Por ejemplo, Chen y Gusta (1983), han establecido que el ABA induce en suspensiones celulares de trigo y centeno niveles de tolerancia al congelamiento mayores que los inducidos por temperaturas bajas. Los cultivos controles perdieron viabilidad alrededor de $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$, en tanto que los aclimatados lo hicieron a $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los crecidos a temperatura ambiente en presencia de $100\text{ }\mu\text{M}$ ABA a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El ABA induce tolerancia al congelamiento sólo en aquellas especies que pueden ser aclimatadas. *Datura innoxia*, *Catharanthus roseus*, *Glycine max* y *Vicia hajastana* no responden a la aclimatación por temperaturas bajas y tampoco a la aplicación de ABA (Davis y Jones, 1991).

Mchos genes inducidos por frío o sequía son también inducidos por tratamiento con ABA exógeno. Estos genes contienen elementos que responden a ABA (ABRE) en su región promotora (Bray, 1993). Una interrogante que resulta de los experimentos realizados con ABA para aclimatar plantas, es si los genes *cor* son también regulados por esta hormona. Trabajos realizados en plantas de alfalfa (Mohapatra *et al.*, 1988a y b) han mostrado evidencia directa de que el ABA puede afectar la expresión de los genes *cor*. Mediante análisis del tipo Northern blot, utilizando 4 clones cDNA previamente aislados, se encontró que los transcriptos

correspondientes al clon pSM1409 aumentaron significativamente en respuesta a la aplicación de ABA en aquel cultivar que alcanzó un mayor nivel de tolerancia al congelamiento. En el cultivar sensible los niveles de expresión no fueron modificados en presencia de ABA.

Los resultados señalados anteriormente muestran que los genes *cor* responden a la presencia de ABA, sin embargo, la relación entre temperaturas bajas y expresión de genes regulados por ABA no ha sido establecida completamente. Chen *et al.*, (1983), han propuesto que las temperaturas bajas aumentan los niveles endógenos de ABA, lo cual gatilla la expresión de genes *cor*. Esta hipótesis es apoyada por el hecho que muchas plantas acumulan ABA en respuesta a las temperaturas bajas (Daie y Campbell, 1981; Lalk y Dörffling, 1985.), aunque en otras esto no ocurre (Waldman *et al.*, 1975).

El determinar si la expresión de los genes *cor* es afectada por déficit hídrico, resulta interesante por al menos dos razones: Primero, el ABA se acumula en plantas sometidas a estrés hídrico, entonces, aquellos genes *cor* que responden al ABA también deberían responder al déficit hídrico. Segundo, existen numerosos trabajos que muestran que el estrés hídrico severo puede inducir una mayor tolerancia al congelamiento en algunas plantas tales como trigo y centeno (Siminovitch y Cloutier, 1982 y 1983). La tolerancia a ambos tipos de estrés requiere de una tolerancia a la deshidratación. Ciertamente, el

grado de deshidratación provocado por las temperaturas bajas es mucho menor que el inducido por sequía. La expresión de genes *cor* en respuesta a la sequía, sólo ha sido estudiada en especies como alfalfa y *Arabidopsis*. Los resultados indican que al menos algunos de los genes *cor* responden al déficit hídrico (Mohapatra *et al.*, 1988b, 1989).

1.7 Uso del cultivo de tejidos en el estudio de las respuestas de células condiciones de estrés.

El conocer los mecanismos bioquímicos y moleculares que permiten a las plantas tolerar condiciones desfavorables como el frío o la sequía, resulta indispensable para lograr el mejoramiento de cultivos mediante el uso de la ingeniería genética. La mayor parte de los estudios, sin embargo, se realizan utilizando órganos de plantas enteras. Una de las limitaciones asociadas a estos estudios es que el resultado obtenido corresponde a la sumatoria de las respuestas de los distintos tipos celulares que componen el tejido. Además, en hojas por ejemplo, existen varios tejidos diferentes que responden de manera distinta a la condición de estrés. Esta situación afecta las determinaciones respecto del grado de tolerancia expresado frente a un determinado tipo de estrés. Existe una gran cantidad de trabajos en los cuales se evalúa el uso del cultivo de tejidos para estudiar las respuestas celulares a condiciones desfavorables. Si bien existe una abundante literatura en la cual se muestran las respuestas de cultivos celulares (callos y

suspensiones celulares) a condiciones adversas (Tabla 1.1.), a la fecha no se reportan estudios en cebada, probablemente debido a que el cultivo de tejidos de este cereal es difícil (Karp y Lazzeri , 1990).

El uso del cultivo de tejidos para estudios fisiológicos y bioquímicos tiene la ventaja que en este sistema simple los efectos de la diferenciación y especificidad de órganos presentes en plantas enteras son eliminados o reducidos. Además, las condiciones ambientales pueden ser controladas cuidadosamente y las células expuestas en forma uniforme al tratamiento deseado.

Por otra parte, se dispone de pocos estudios relacionados con los cambios que experimentan células de cereales como la cebada, cuando son sometidas a procesos de aclimatación. Las respuestas de las plantas al frío y la sequía originan varias interrogantes, como por ejemplo ¿Qué cambios experimentan las células frente a la pérdida de agua o la caída de la temperatura?, ¿Existen algunas vías de respuesta común a ambos tipos de estrés?. En relación a esta última interrogante, estudios recientes han mostrado que en *Avena sativa*, el estrés hídrico mejora la capacidad de plántulas para tolerar el congelamiento (Maldonado *et al.*, 1996). Por otra parte, plantas de cebada

Tabla 1. Uso del cultivo de tejidos en el estudio de la respuesta de células a condiciones adversas.

Planta	Tipo de Cultivo	Condición	Referencia
Alfalfa	Suspensión	Frío	Borochoy <i>et al.</i> , 1989
Bromus	Suspensión	Frío	Reany y Gusta, 1987
Centeno	Suspensión	Frío	Chen y Gusta, 1983
Maíz	Suspensión	Frío	Xin y Li, 1993
Maíz	Callos	Frío	Duncan y Widhom, 1987
Papa	Callos	Frío	Chen <i>et al.</i> , 1992
Trigo	Suspensión	Frío	Chen y Gusta, 1983

infestadas con áfidos, también alteran su capacidad para tolerar el congelamiento (Bravo *et al.*, 1996). Por lo tanto, dado que el frío como la sequía inducen deshidratación celular, es posible que ambos tipos de estrés gatillen algunos mecanismos comunes de tolerancia. La hipótesis a verificar en este trabajo es la siguiente:

1.7. Hipótesis

1. No se requiere de organización tisular para que suspensiones celulares de cebada se aclimaten al frío y al déficit hídrico. Esta aclimatación involucraría aumento de "solutos compatibles", cambios en la composición de las membranas biológicas y en los niveles endógenos de ABA, al igual que en plantas completas.
2. La aclimatación a estos tipos de estrés estaría dada por algunos mecanismos comunes. De ser así, se puede predecir que, por ejemplo, la aclimatación de células al frío permitiría una mejor tolerancia al déficit hídrico.

1.8. Objetivos

1.8.1. Objetivo General

Caracterizar las respuestas fisiológicas y metabólicas de suspensiones celulares de cebada al frío y al déficit hídrico.

1.8.2. Objetivos específicos

1. Obtener y caracterizar suspensiones celulares de cebada
2. Demostrar que las suspensiones celulares de cebada se aclimatan al frío y déficit hídrico.
3. Comparar el contenido de solutos compatibles (prolina, glicina-betaina, azúcares solubles), proteínas, lípidos y ABA en suspensiones aclimatadas al frío y a la deficiencia hídrica.
4. Inducir aclimatación al frío y sequía mediante la aplicación de ABA y compararla con la aclimatación inducida por temperaturas bajas y déficit hídrico.
5. Determinar si la aclimatación al frío también provoca una aclimatación al déficit hídrico y viceversa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de suspensiones celulares de cebada

Para la inducción de suspensiones celulares fue necesaria la obtención previa de callos. Se probaron explantes provenientes de ápices radiculares de semillas de cebada recién germinadas (aproximadamente 24 horas) y de hojas y raíces de plántulas de 4 días de edad (*Hordeum vulgare* cvs. Atlas 68 y Aramir). Los explantes fueron esterilizados superficialmente introduciéndolos por 30 segundos en una solución de hipoclorito de sodio al 10%. Al cabo de este tiempo, los explantes fueron lavados con abundante agua destilada estéril y colocados en frascos con medio de cultivo T (Tabla 1), suplementados con 2,4-D 1 mg/L. Los frascos fueron mantenidos en oscuridad a $28 \pm 2^\circ \text{C}$.

Para obtener las suspensiones celulares se tomó un trozo de callo y se introdujo en un medio de cultivo líquido (medio T sin agar). Los frascos fueron colocados en un agitador orbital y mantenidos a 120 rpm y $28 \pm 2^\circ \text{C}$.

2.2. Caracterización de las suspensiones celulares de cebada. La caracterización de las suspensiones celulares fue realizada determinando su dinámica de crecimiento, su viabilidad y su actividad metabólica (consumo de oxígeno) bajo las diferentes condiciones de estudio.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo utilizado en la inducción de callos.

Compuesto	Cantidad (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1.000
KNO ₃	1.000
KCl	65
Ca(NO ₃) ₂ x 2 H ₂ O	260
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	165
MgSO ₄ x 7H ₂ O	360
MnSO ₄ x H ₂ O	5
H ₃ BO ₄	3
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄	0,025
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,2
Acido nicotínico	5
Tiamina-HCl	10
Pantotenato de calcio	0,25
Acido ascórbico	10
Glicina	10
L-Glutamina	50
Mio-inositol	1.000
Sacarosa	20.000
Agar	8.000
2,4-D	1
pH	5,6

Este medio fue descrito por Dudits *et al* (1975) para cultivo *in vitro* de trigo.

Para la inducción de suspensiones celulares se elimino del medio de cultivo el agar.

2.2.1. Crecimiento: El crecimiento de las suspensiones celulares fue determinado evaluando las variaciones de peso fresco y seco.

La determinación de peso fresco y seco se realizó utilizando la metodología descrita por Dixon (1985). Se tomó un trozo de papel filtro al cual se le determinó su peso (P_0). A este papel se agregó una alícuota de 1 ml de medio de cultivo, y se determinó su peso (P_1). Se tomó un volumen igual de una suspensión celular y se agregó al papel, el cual fue sometido a vacío durante 10 s y luego se determinó su peso (P_2). Luego se dejó secar a 80 °C por 24 horas y se determinó su peso (P_3). Los pesos húmedos y secos de las células fueron determinados mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Peso húmedo (g/L)} = [(P_2 - P_1) / \text{volumen}] \times 1000$$

$$\text{Peso seco (g/L)} = [(P_3 - P_0) / \text{volumen}] \times 1000$$

2.2.2. Viabilidad celular. La viabilidad de las células fue determinada evaluando la reducción de cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio (TTC) (Towil y Manzur, 1975). Diversos estudios han mostrado que una menor capacidad para reducir el TTC se correlaciona con una menor sobrevivencia de las células (Xin and Li, 1992). Se tomaron 100 mg de células obtenidas de los diferentes tratamientos y se incubaron en una solución de TTC al 0,8%. La mezcla se dejó reposar durante 2 horas. Al cabo de este tiempo, las células fueron precipitadas y el sobrenadante eliminado. Las células fueron resuspendidas en 1 ml de etanol 95% durante 6 horas para extraer el

precipitado formado por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales. Al cabo de este tiempo se centrifugó a 13.000 x g y se determinó la absorbancia (A) del sobrenadante a 485 nm utilizando como blanco etanol 95%.

La viabilidad de las células fue expresada mediante la relación:

$$\text{Sobrevivencia (\%)} = (A_{\text{tratamiento}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

2.2.3. Consumo de oxígeno: El estado fisiológico de las células fue determinado, además, midiendo el consumo de oxígeno bajo los diferentes tratamientos. Las determinaciones de respiración celular se hicieron en un oxígrafo HANSATECH, provisto una cámara de reacción (2 ml de volumen), y un electrodo de oxígeno (tipo CLARK).

Las células (equivalente a 30 mg de proteínas) fueron resuspendidas en medios frescos y colocadas en la cámara de reacción. El electrodo registró el consumo de oxígeno de las células, el que fue expresado como $\mu\text{moles de O}_2$ consumidos x ml de mezcla de reacción⁻¹ x minuto⁻¹ x mg de proteína⁻¹ en la alícuota agregada a la cámara.

2.3. Aclimatación de las células. Se estudio la capacidad de las células crecidas a 28 °C, para aclimatarse al frío, déficit hídrico, ABA, y cloruro de colina.

2.3.1. Temperatura. Para aclimatar las células a bajas temperaturas, se tomó una suspensión celular (100 ml) en fase de crecimiento estacionario crecida a 28 ± 2 °C y luego se colocó en una cámara fría (4 °C) por diferentes

períodos de tiempo. Se determinaron los efectos del frío evaluando la viabilidad de las células mediante la reducción del TTC y la actividad metabólica (consumo de oxígeno).

2.3.2. Déficit hídrico. Para aclimatar las células a un potencial hídrico menor se tomó una suspensión de células (200 ml) crecidas a 28 ± 2 °C, las que fueron transferidas a medios frescos (50 ml) suplementados con 2% PEG-8000, durante diferentes períodos de tiempo. Se evaluó la tolerancia de estas células a concentraciones mayores de PEG-8000 y al congelamiento.

2.3.3. Efecto del ácido abscísico (ABA) sobre la aclimatación de las células. Se tomó una suspensión celular en fase de crecimiento estacionario y se transfirió a medios de cultivos frescos con diferentes contenidos de ABA (0-100 μ M). Al cabo de una semana se evaluó la tolerancia de estas células al congelamiento y al déficit hídrico.

2.3.4. Efecto del cloruro de colina (ChCl) sobre la aclimatación de células. Se tomó una suspensión de células en fase de crecimiento estacionario y se transfirió a medios con diferentes contenidos de ChCl (0-1 μ M). Las suspensiones fueron incubadas por diferentes períodos de tiempo al cabo del cual se determinó su tolerancia al frío y déficit hídrico.

2.4. Evaluación del grado de tolerancia

La tolerancia al congelamiento y al déficit hídrico, se determinó evaluando el grado de reducción del TTC como una medida de la viabilidad

de las células (Nachlas, 1960) y además, midiendo el consumo de oxígeno de las células luego del tratamiento.

2.4.1. Tolerancia al congelamiento. Se tomaron aproximadamente 300 mg de células, las que fueron resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo en un tubo Eppendorf. Cada tubo fue llevado a un baño termorregulado y sometido durante 2 horas a la temperatura tratamiento (entre -28 y 28 °C). Para el caso de las temperaturas congelantes los tubos fueron descongelados a una temperatura de 4° C (refrigerador). Luego las células fueron precipitadas mediante centrifugación y resuspendidas en medio con 0.8 % de TTC. Los tubos se dejaron reposar durante 12 horas. Al cabo de este tiempo, las células fueron precipitadas y resuspendidas en etanol 95% durante 6 horas. Luego de centrifugar a 500 x g, se determinó la absorbancia (A) del sobrenadante a 485 nm. Se determinó el porcentaje de sobrevivencia utilizando la ecuación mostrada en el punto 2.2.2. La tolerancia al congelamiento fue determinada además, midiendo el consumo de oxígeno de las células a las diferentes temperaturas.

2.4.2. Tolerancia al déficit hídrico. Se tomaron varias alícuotas de la suspensión celular, equivalente a 30 mg de proteínas y se colocaron en tubos Eppendorf con medios de cultivos suplementados con diferentes cantidades de PEG-8000 (0-10%). Se dejaron los tubos durante 24 horas y luego se

determinó la viabilidad de las células midiendo el consumo de oxígeno a 28 °C, según la metodología antes descrita.

2.5. Caracterización bioquímica de las suspensiones celulares.

2.5.1. Glucosa y sacarosa. Los azúcares solubles se extrajeron incubando las células en etanol 80 % durante al menos 12 horas, según la metodología descrita por Riazi (1986). Al cabo de este tiempo las muestras fueron filtradas en un filtro Millipore de 0,45 μm y analizadas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Las condiciones analíticas fueron las siguientes, se utilizó una columna Carbohydrate 10 (Whatman) de 25 cm de largo; la mezcla isocrática de elución fue acetonitrilo:agua (75 :25 v/v) a un flujo de 1,5 ml/min. La detección de la sacarosa, fructosa y glucosa se realizó mediante un refractómetro Knauer. Los tiempos de retención fueron 5,1 min. para fructosa; 5,6 min. para la glucosa y 7,6 para la sacarosa. La Figura 1 muestra un cromatograma tipo de los azúcares indicados. Estudios realizados para determinar la eficiencia de extracción del método de extracción mostraron que luego de la primera extracción se recuperaba el 80 % de la sacarosa. Los valores obtenidos fueron corregidos por este % de extracción.

2.5.2. Prolina y glicina-betaína. La extracción y cuantificación de prolina en las células se realizó utilizando la metodología descrita por Bates *et al.*, (1973). Las células (300 mg) fueron homogeneizadas en 1,5 ml de ácido sulfosalicílico 3% p/v.

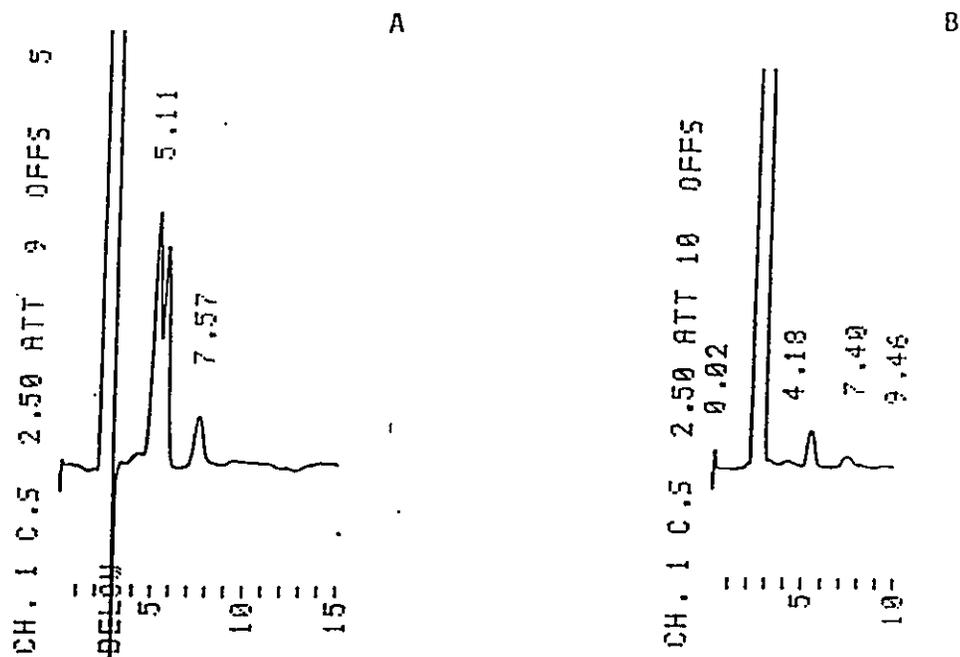


Figura 1. Cromatograma de los azúcares fructosa, glucosa y sacarosa, separados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), según lo descrito en la metodología. La señal de fructosa y glucosa corresponden a 100 μg y la señal de sacarosa corresponde a 50 μg (A). Cromatograma de una muestra problema (B)

Luego se filtró al vacío tomándose 300 µl del filtrado al que se agregaron 1,5 ml de ácido acético concentrado y 1 ml de ninhidrina ácida (0,63 g de ninhidrina en 15 ml de ácido acético concentrado y 10 ml de ácido fosfórico (6M). Las muestras fueron calentadas a 100° durante 30 minutos. Luego de este tiempo se enfriaron en hielo, se transfirieron a un embudo de agitación se agregaron a cada muestra 3 ml de toluol. Luego de agitar se dejó reposar para lograr la separación de fases, se extrajo la fase orgánica (coloreada), y se leyó su absorbancia a 520 nm. El contenido de prolina se calculó a partir de una curva estándar de prolina (SIGMA) entre un rango de 0 y 100 µg/ml ($r=0.995$)

La extracción de glicina-betaina se realizó según la metodología descrita por Grieve y Grattan (1983). La muestra fue homogeneizada en 1ml de agua desionizada, dejándose en reposo por 12 horas. Luego de este tiempo se filtró y se agregaron al filtrado 2 ml de ácido sulfúrico 2 N . De esta dilución se tomaron 500 µl, a los cuales se agregaron 200 µl de una solución refrigerada de KI-I₂ (17,5 g de I₂ y 20 de KI en 100 ml de agua destilada) y se almacenó a 0° durante 6 horas.

La mezcla se centrifugó a 13.000 rpm en una centrifuga Eppendorf, eliminándose el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en 1,5 ml de dicloroetano. Después de 2 horas se leyó la absorbancia a 365 nm. Las

concentraciones de glicina-betaína se calcularon a partir de una curva estándar (0-120 µg/ml).

2.5.3. Lípidos. Los lípidos de membrana se extrajeron en una mezcla cloroformo:metanol (2:1) utilizando la metodología descrita por Borochoy *et al.*, (1978). El contenido de fosfolípidos de la muestra fue determinado como fosfato inorgánico luego de la oxidación con perclorato utilizando el reactivo de Fiske-Subbarov (SIGMA) (Kendall *et al.*, 1985). No se determinaron galactolípidos, puesto que estos son propios de las membranas cloroplásticas y suspensiones celulares carecen de estos organelos.

2.5.4. Análisis de fosfolípidos. Los fosfolípidos individuales fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia utilizando la metodología descrita por Chen and Kou (1982). Los lípidos fueron extraídas de las muestras utilizando como sistema de extracción CHCl₃:MeOH (1:2 v/v). Los lípidos polares fueron separados de los lípidos neutros mediante la precipitación con acetona. A 1 ml de extracto lipídico se agregaron 10 ml de acetona fría y se mantuvo la mezcla a 0° durante 1 hr. Luego de centrifugar a 10.000 x g durante 10 min., los fosfolípidos fueron resuspendidos en 500 µl de la mezcla CHCl₃: MEOH (1:2 v/v) y separados mediante HPLC. Las muestras fueron inyectadas en una columna Supelcosil Lc-Si y separadas mediante una mezcla de elución acetonitrilo:metanol: ácido fosfórico 85% (130:5:1,5 v/v/v) y un flujo de 1 ml/min. La detección de los fosfolípidos se realizó a 203 nm,

utilizando como estándares fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanoamina (SIGMA). La separación se realizó a temperatura ambiente.

2.5.5. Análisis de ácidos grasos. Los ácidos grasos totales presentes en los extractos fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Las condiciones de análisis fueron una columna Supelcosil LC8 (Supelco), con una mezcla de elución acetonitrilo: tetrahidrofurano: 0,1% H_3PO_4 (83:7:10 v/v) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La detección se realizó a 215 nm. Se preparó una curva de calibración utilizando ácidos grasos puros (SIGMA) como estándares.

2.5.6. Análisis de ácido abscísico. El ABA fue extraído desde las células mediante la incubación en etanol 80% durante 12 horas. Las muestras fueron luego filtradas y analizadas mediante HPLC. La identificación y cuantificación fue realizada utilizando la metodología descrita por Lipp (1991) y modificada en esta tesis. Las muestras fueron inyectadas en una columna Lichrosorb RP18 (Merck) de 25 cm de largo. La mezcla de elución fue un gradiente de acetonitrilo: H_2O (pH 3) en diferentes proporciones. $T_0= 100\% H_2O$; $T_{12}= 45\% H_2O$; $T_{13}= 100\% acetonitrilo$; $T_{15}= 100\% acetonitrilo$; $T_{16}=100\% H_2O$. El ABA fue detectado a 236 nm. Se utilizó ABA (SIGMA) como estándar. La curva de calibración fue construida utilizando ABA en el rango La Figura 2 muestra un cromatograma tipo de esta hormona y un cromatograma de una muestra

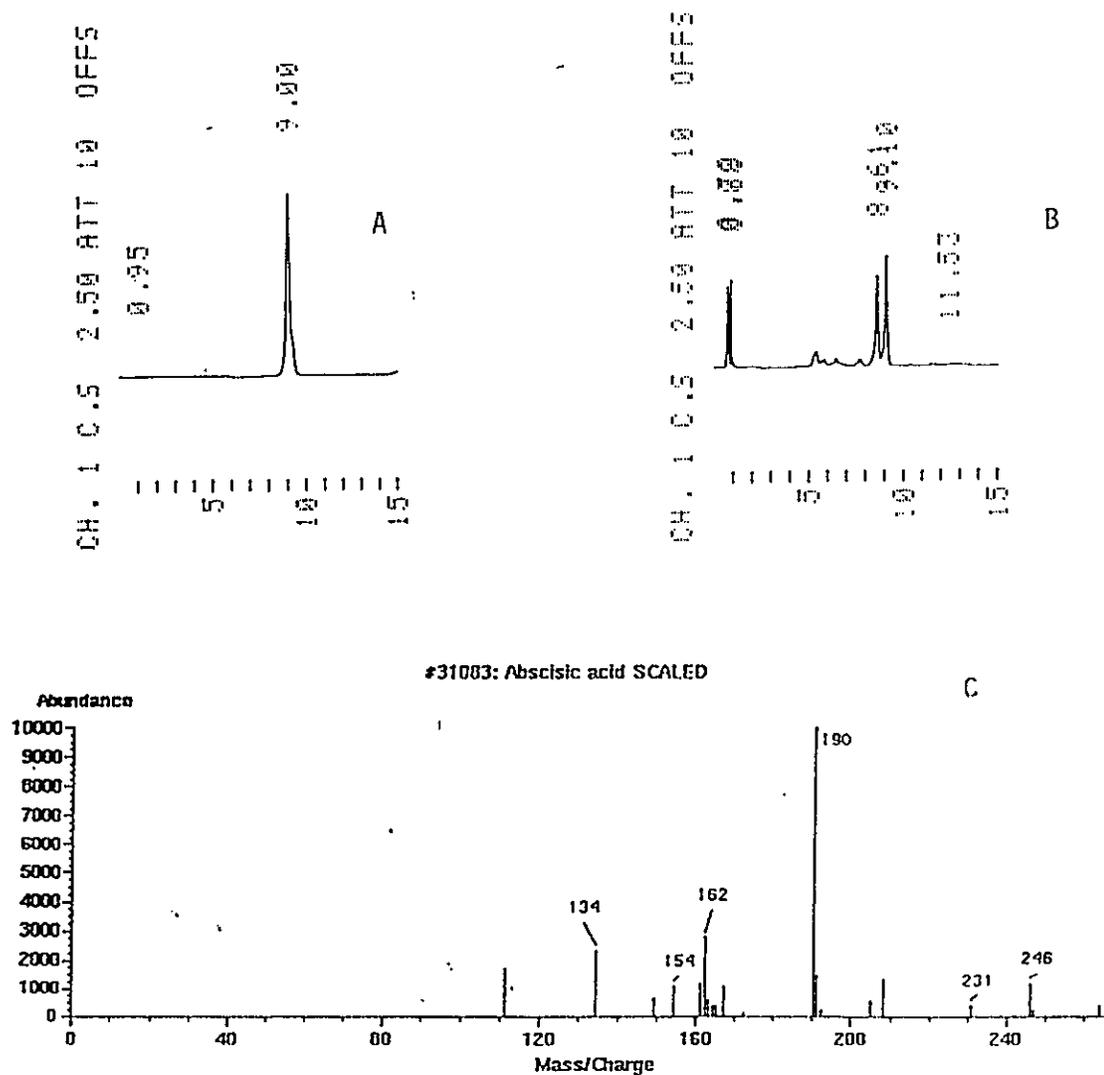


Figura 2. Análisis de ABA. La separación se realizó utilizando una columna Licrosorb RP18. La detección se realizó a 236 nm. A partir de una solución de ABA 0,1 mg/ml se preparó una curva de calibración inyectando en la columna alícuotas de diferentes volúmenes. Cromatogramas de una muestra estándar (A), una muestra problema (B); espectro de masa de ABA eluido desde una muestra (C).

obtenida de células aclimatadas al frío. La identidad de la señal correspondiente a ABA fue verificada coinyectando en el HPLC ABA puro más la muestra y luego colectando la señal correspondiente a ABA para un posterior análisis por espectrometría de masas en un equipo HP- 5989A. La señal correspondiente al ABA mostró un 95% de identidad con el ABA existente en la base de datos del equipo (Fig. 2).

2.5.7. Análisis de lipoperoxidación. El nivel de lipoperoxidación de lípidos en las células, fue medido en términos del contenido de malondialdehído (MDA), un producto de peroxidación, determinado mediante la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA) (Dhindsa *et al.*, 1981). Las células (200 mg) fueron homogeneizadas en 2 ml de 1 % ácido tricloroacético (TCA). El homogeneizado fue centrifugado a 10.000 x g durante 5 minutos. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 1 ml y se mezcló con 4 ml de 0,5% TBA disuelto 20% TCA. La mezcla fue calentada a 95 ° durante 30 minutos y luego enfriada en hielo. Luego de una centrifugación a 10.000 x g se determinó la absorbancia del sobrenadante a 532 nm. La concentración de MDA fue calculada utilizando como coeficiente de extinción el valor de 155 mM⁻¹cm⁻¹ (Heath y Parker, 1964).

2.5.8. Análisis enzimáticos. Las actividades de las enzimas catalasa (CAT, EC. 1.11.1.6) y peroxidasa (POD, EC. 1.11.1.7) de la fracción citosólica fueron medidas de acuerdo al método de Chance y Maehly (1955). Para la actividad

CAT, se determinó la descomposición de H_2O_2 medida a 240 nm ($\epsilon=39.4 M^{-1} cm^{-1}$), durante 2 minutos. Para la reacción a 2 ml de amortiguador fosfato (pH 7,0) se agregaron 15 mM de H_2O_2 , más 20 μl de extracto proteico.

La actividad POD, se evaluó midiendo la oxidación del guaiacol, seguida a 470 nm ($\epsilon= 26,6 mM^{-1}cm^{-1}$) durante 2 min. La mezcla de ensayo estuvo constituida por 2 ml de amortiguador fosfato, 20 ml de 20 mM guaiacol, 20 μl de H_2O_2 40 mM. La reacción se inició agregando al medio 20 μl de extracto enzimático.

Las actividades CAT y POD se expresaron en katal mg^{-1} de proteína. Para la CAT se definió un Katal como la descomposición de 1 mol de H_2O_2 por seg. Para la guaiacol-POD, se definió un Katal como la oxidación de 1 mol de guaiacol por seg.

2.5.8. Cuantificación de proteínas solubles

Las proteínas fueron cuantificadas según la metodología descrita por Bradford (1976). Se tomaron 40 μl de muestra y se mezclaron con 1,1 ml de reactivo de Bradford. Se esperó durante 10 minutos y luego se leyó la absorbancia a 595 nm. El contenido de proteínas en las muestras se determinó a partir de una curva de calibración de albúmina de bovino 1 mg/ml (SIGMA).

2.6 Análisis estadísticos. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el test de student y/o mediante análisis de varianza a un 95 % de confiabilidad

3. RESULTADOS

3.1 Obtención y caracterización de las suspensiones celulares y callos

En esta sección se describirán algunas características fisiológicas y bioquímicas de las células de cebada crecidas en suspensión. Se incluirán además, estudios realizados con una suspensión celular tolerante al frío (4° C), obtenida durante el desarrollo experimental de este trabajo y con callos obtenidos a partir de esta suspensión.

3.1.1 Caracterización fisiológica de las suspensiones celulares

Para la obtención de suspensiones celulares, se requiere inducir previamente callos. Luego de probar diferentes explantes, se logró obtener callos a partir de ápices radiculares de semillas con 24 horas de germinación en el medio T descrito por Dudits *et al.*, (1975), para el cultivo *in vitro* de trigo. A partir de estos callos se indujeron suspensiones celulares de las variedades Atlas 68 y Aramir. Las células mostraron las características típicas de la célula en suspensión, esto es forma alargada, con una gran vacuola central (Fig. 3). El 2,4 D no afectó a las células luego de varios subcultivos.

3.1.2. Crecimiento. El crecimiento de las suspensión presentó una fase de latencia, una fase de crecimiento exponencial y una fase estacionaria (Fig. 4).



Figura 3. Células de cebada (cv. Atlas 68) crecidas en suspensión. Células control (A), Estresadas con PEG-8000 (2%) (B) y Tolerantes al frío (4 °C) (C). Las suspensiones fueron inducidas de segmentos de callos y cultivadas en un agitador orbital a 120 r.p.m y 28 ± 3 °C. El tamaño promedio de 10 células fue 8 μm de largo en A; 4 μm de diámetro en B y 4 μm de diámetro en C. El aumento es 40 x.

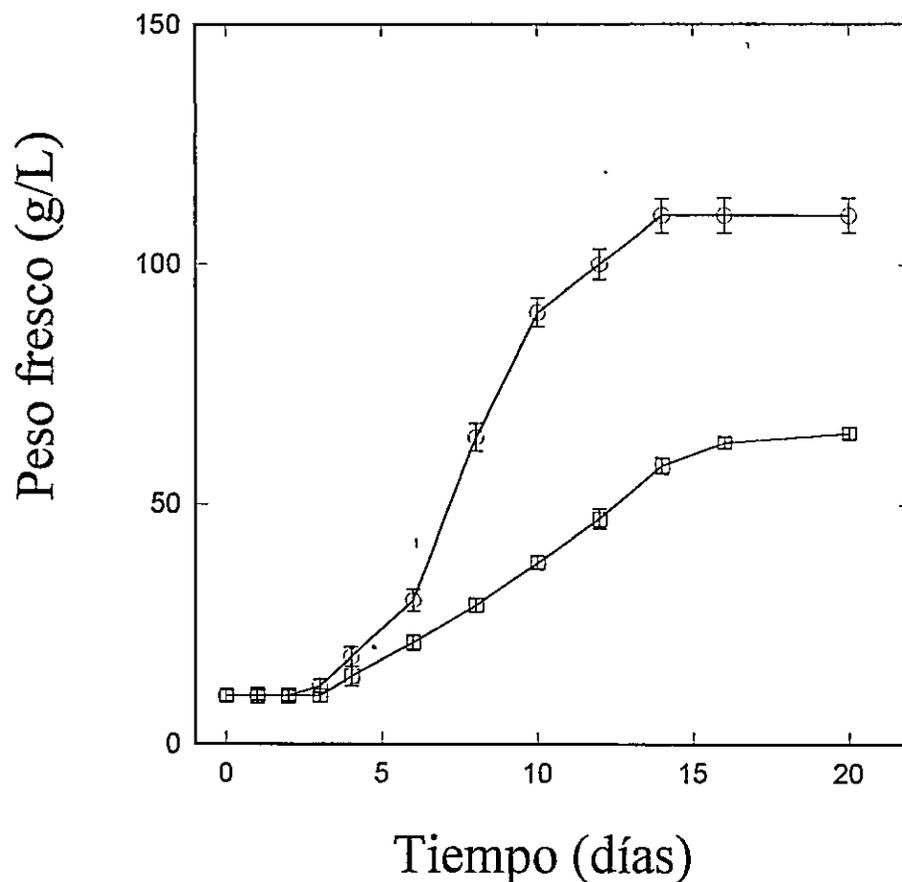


Figura 4. Crecimiento de las suspensiones celulares de cebada. Las suspensiones fueron cultivadas en oscuridad en un agitador orbital a 120 r.p.m. y 28 ± 3 °C. Cada valor corresponde al promedio de tres mediciones ± 1 error estándar. Atlas 68 (o) y Aramir (\square). El número de células al final del experimento fue 5×10^5 células/ml para Atlas 68 y 2×10^5 células/ml para Aramir.

La variedad Atlas 68 presentó a 28 °C, una tasa de crecimiento más rápida y alcanzó una mayor biomasa que la variedad Aramir en períodos de tiempo comparables y bajo las mismas condiciones de cultivo (Fig. 4). Por esta razón, los resultados que se mostrarán a continuación fueron realizados sólo con la variedad Atlas 68. Al comparar el crecimiento en base a incrementos en peso fresco y seco de suspensiones celulares crecidas a 4, 10 y 28 °C, se observó que la suspensión creció mejor a 28 °C, puesto que alcanzó una mayor biomasa y la fase estacionaria a los 13 días de iniciado el cultivo (Fig. 5). Por el contrario, a 10 °C la biomasa fue menor y la fase estacionaria se alcanzó a los 16 días de cultivo. A 4 °C prácticamente no se produjo crecimiento. Estos resultados sugieren que esta suspensión celular es susceptible al frío. El porcentaje en peso seco respecto del peso fresco, fue mayor a 10 °C (17 % de materia seca) que a 28 °C (8 % de materia seca). Esta última temperatura será considerada como control en el presente estudio

3.1.3. Consumo de oxígeno. La actividad metabólica estimada en base a la respiración, es un buen indicador del estado fisiológico de los organismos vivos. Por esta razón, se evaluó el consumo de oxígeno de las suspensiones celulares crecidas a 4 y 28 °C, directamente en el medio de cultivo en presencia de algunos sustratos descritos como sustancias capaces de mejorar la tolerancia al frío (Tabla 3). Se puede observar que para las células

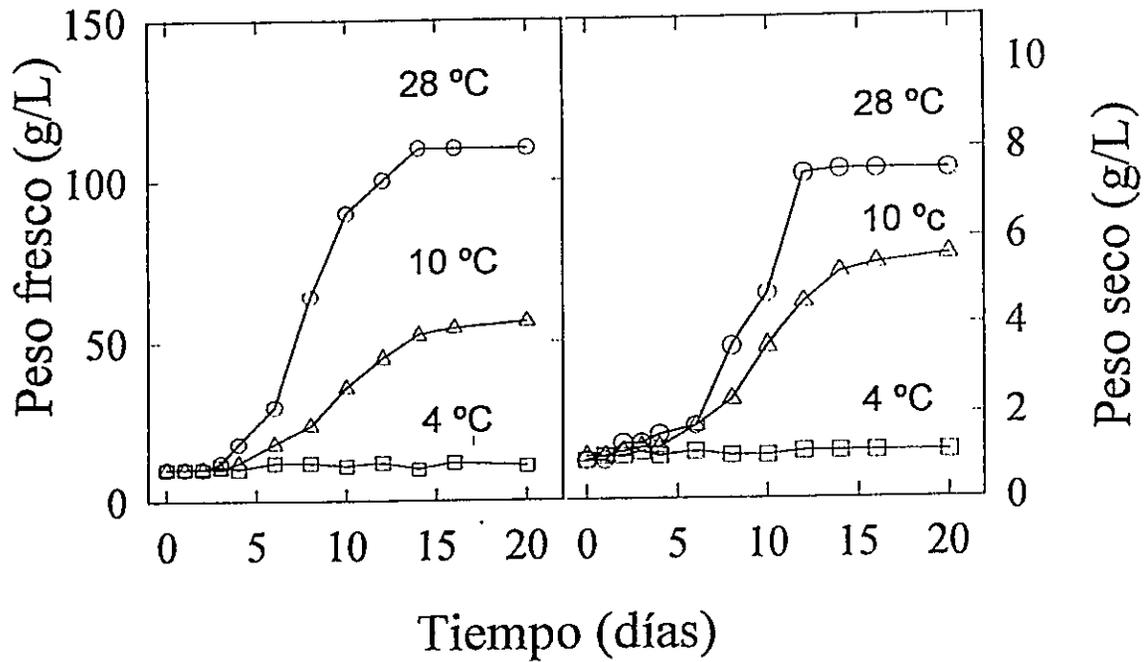


Figura 5. Crecimiento de la suspensión celular de cebada variedad Atlas 68 a diferentes temperaturas: 4° (□), 10° (Δ) y 28° °C (o). La suspensión fue iniciada utilizando un inóculo de células equivalente a 1×10^5 células/ml. El número final de células fue 1×10^5 células/ml a 4°, 2×10^5 células/ml a 10° y 5×10^5 células/ml a 28°.

Tabla 3. Efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno en suspensiones celulares de cebada cv Atlas 68.

Tratamiento	Consumo de oxígeno ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}$ de proteína)	
	4 °C	28°C.
Control	45 \pm 7	225 \pm 20
Glucosa	55 \pm 5	320 \pm 25
Prolina	45 \pm 7	225 \pm 25
ABA	50 \pm 5	230 \pm 20
Sacarosa	60 \pm 5	220 \pm 25

Las suspensiones celulares fueron crecidas a 4 o 28 °C hasta los 12 días. Al cabo de este tiempo se determinó el consumo de oxígeno a la temperatura de crecimiento, en muestras suplementadas con las sustancias indicadas. La concentración de los 4 compuestos utilizados en los tratamientos fue de 10 μM . Cada valor es el promedio de tres mediciones \pm 1 error estándar. Los valores de consumo de oxígeno a 4° y 28 °C fueron diferentes ($P < 0,05$, test de student)

crecidas a 28 °C, sólo se produjo un aumento en la respiración cuando el medio fue suplementado con glucosa. El consumo de oxígeno se redujo significativamente cuando las células fueron colocadas a 4°C, no observándose efecto significativo de ninguna de las sustancias agregadas ($P>0,05$, test de t). La baja actividad metabólica a 4 °C, podría ser una de las causas por las cuales no se produjo crecimiento (Fig. 5).

3.1.4. Consumo de sacarosa. El análisis del contenido de sacarosa en el medio de cultivo permite una mejor interpretación de la dinámica de crecimiento de la suspensión celular bajo distintas condiciones de estrés. Por esta razón, resulta indispensable conocer la dinámica de absorción de sacarosa en las células control (crecidas a 28 °C). Luego de una fase de latencia que duró alrededor de tres días, la sacarosa comenzó a disminuir continuamente en el medio de cultivo, hasta el final del experimento (Fig. 6). La fase estacionaria que se produjo en el crecimiento de la suspensión a los 16 días, podría estar determinada en parte, por la disminución de la fuente de carbono en el medio de cultivo, pues al colocar células en medios frescos reasumieron su crecimiento. El análisis cuantitativo de sacarosa realizado mediante HPLC permitió utilizar varias muestras, en períodos cortos de tiempo, con un error experimental bajo (Fig. 6).

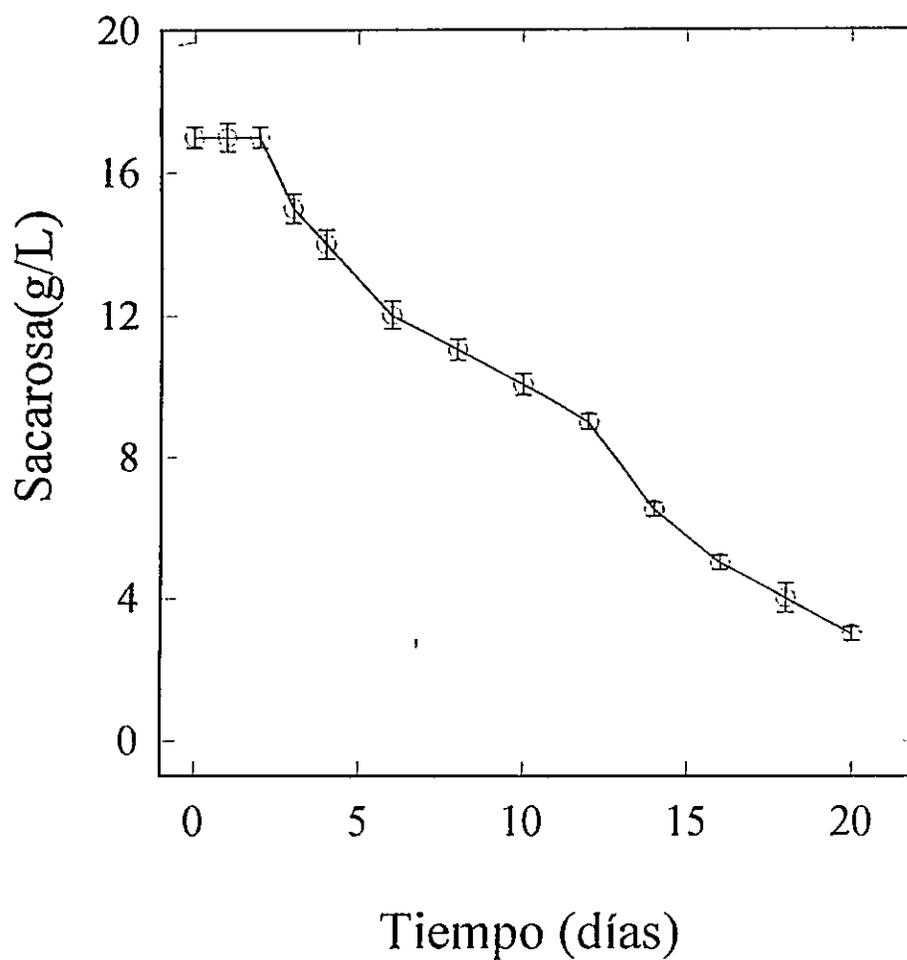


Figura 6. Absorción de sacarosa en suspensiones celulares de cebada (cv Atlas 68) crecidas a 28 °C. La determinación de sacarosa en el medio de cultivo fue realizada mediante HPLC. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar.

3.1.5. Sobrevivencia a temperaturas bajas y tolerancia al congelamiento.

La capacidad de la suspensión celular susceptible al frío (crecida a 28 °C), para tolerar el congelamiento, se determinó evaluando la reducción del TTC luego de congelar las células durante 2 horas (Fig. 7). La sobrevivencia de las células decreció significativamente con la disminución de la temperatura. Del análisis de la curva se pudo obtener la temperatura a la cual se produce una mortalidad igual al 50 % de las células (TL_{50}), y que correspondió a -6,2 °C. Adicionalmente, se determinó el efecto de las temperaturas bajas sobre la respiración de las células, utilizando un oxígrafo. La capacidad respiratoria de las células disminuyó con la caída de temperatura (Fig. 8a). El valor de temperatura a la cual la capacidad respiratoria se redujo en un 50% fue de aproximadamente -5,5 °C, valor muy similar al obtenido con la reducción del TTC. Por esta razón, como una forma de determinar si este último ensayo puede ser utilizado para determinar la tolerancia de las células al frío, se tomaron muestras y expusieron a diferentes temperaturas durante un lapso de 2 hrs y luego se determinó su capacidad respiratoria a $28^{\circ} \pm 2$ °C. En este caso, la capacidad respiratoria se correlaciona con la cantidad de células vivas presentes en la muestra. La sobrevivencia de las células disminuyó con la caída de la temperatura. El valor de temperatura al cual se tiene un 50% de muerte celular fue de -5,3 °C (Fig. 8b), que es algo mayor al valor determinado evaluando la reducción del TTC (-6,2 °C).

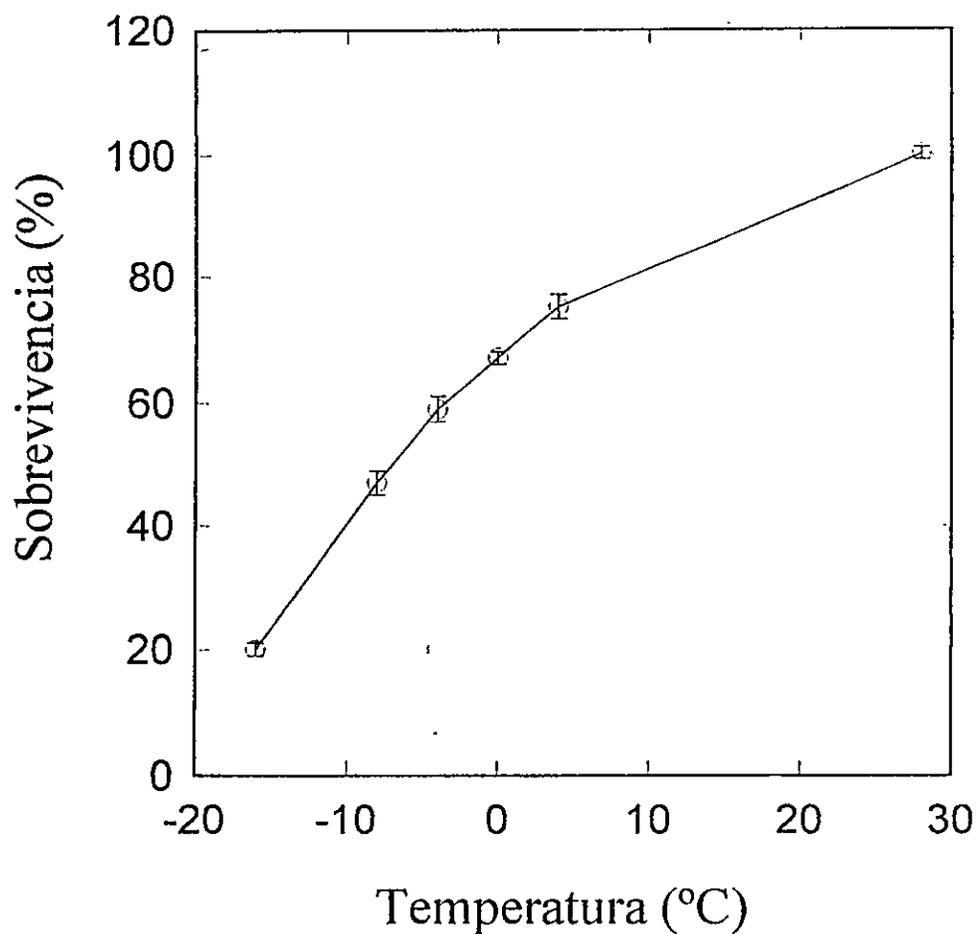


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la sobrevivencia de células de cebada (cv. Atlas 68) crecidas a 28 °C. La sobrevivencia fue determinada a los 16 días de iniciado el cultivo, luego de incubar las células 2 horas a la temperatura indicada. Se evaluó la reducción del TTC según se describe en Materiales y Métodos. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones ± 1 error estándar.

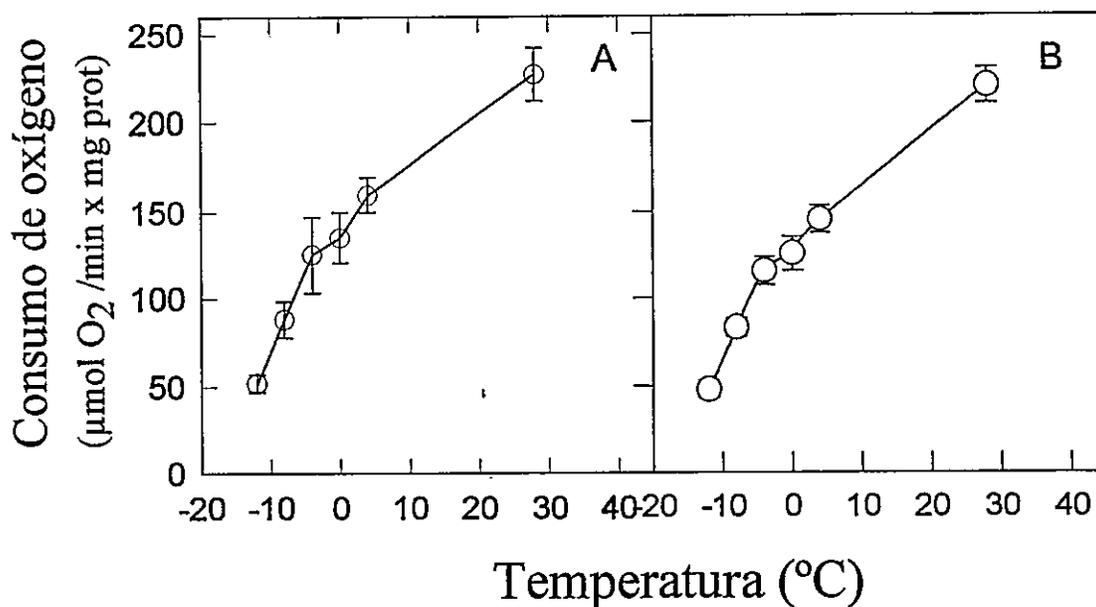


Figura 8. Efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno en una suspensión celular de cebada (cv. Atlas 68) crecida a 28 °C. El consumo de oxígeno se determinó después de colocar las células directamente en la cámara de reacción del oxígrafo por 1 hora a la temperatura indicada (A), o bien congelando las células durante 2 horas a la temperatura indicada y luego midiendo el consumo de oxígeno a 28 °C (B). Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar.

3.1.6. Tolerancia al déficit hídrico. La capacidad de la suspensión celular para tolerar el déficit hídrico se determinó evaluando los efectos del polietilenglicol-8000 (PEG-8000) sobre el consumo de oxígeno de las células. La capacidad respiratoria disminuyó a medida que aumentó la concentración de PEG-8000 en el medio de reacción (Fig. 9). La concentración a la cual se redujo el consumo de oxígeno en un 50% fue equivalente al 2,2% de PEG-8000.

3.1.7. Obtención de una suspensión celular tolerante al frío. Los resultados indicados en la sección 3.1.2 mostraron que en el período en el cual la suspensión celular crecida a 28 °C alcanzó la fase estacionaria, la suspensión colocada a 4 °C no experimentó crecimiento (Fig. 5). Sin embargo, cuando esta suspensión se mantuvo a 4 °C por un período de tiempo mayor (aproximadamente entre 45 y 50 días), se pudo inducir la formación de una suspensión celular tolerante al frío, cuya dinámica de crecimiento (Fig. 10) fue diferente a la observada durante el crecimiento a 28 °C (Fig. 5). La fase de latencia duró 6 días y la fase estacionaria se alcanzó a los 12 días. La ganancia en peso fresco en las células crecidas a 4 °C fue significativamente inferior (alrededor de 2/3) a la ganancia de las células crecidas a 28 °C. El contenido de agua de las células crecidas a 4 °C fue menor que a 28 °C (Fig. 11), mientras que el peso seco fue mayor. Esto

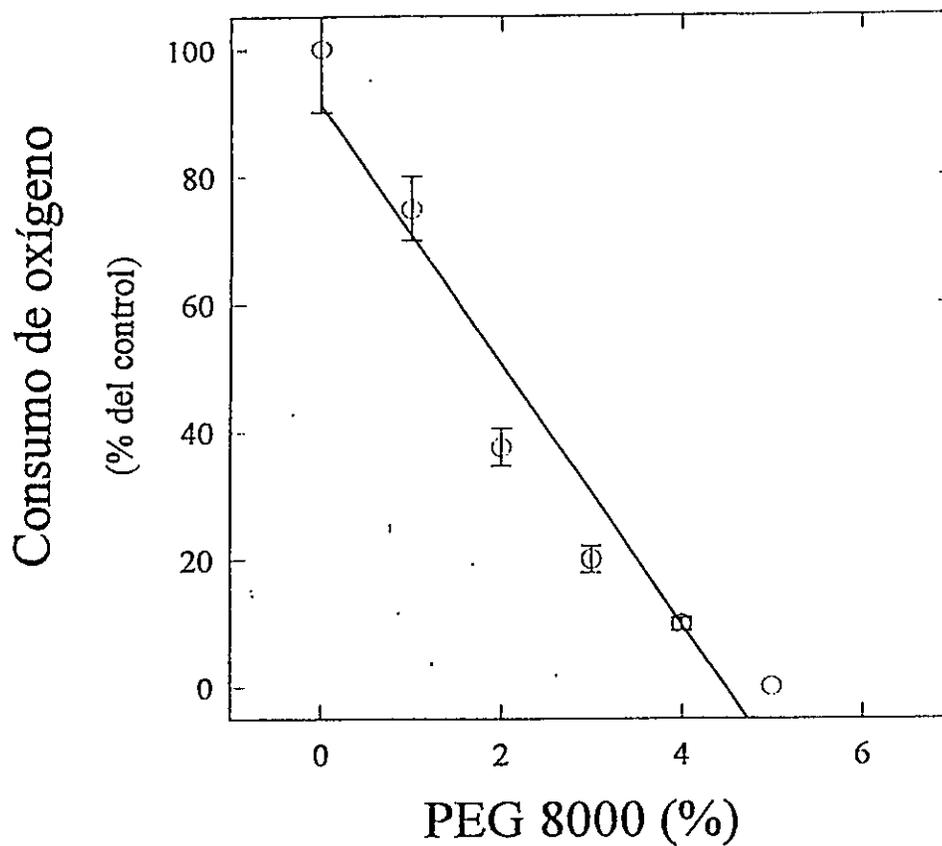


Figura 9. Tolerancia al déficit hídrico en células de cebada crecidas a 28 °C. La tolerancia fue determinada midiendo los efectos del PEG-8000 sobre el consumo de oxígeno de las células. Las determinaciones fueron realizadas a 28 °C. Cada valor corresponde al promedio de 3 repeticiones \pm 1 error estándar.

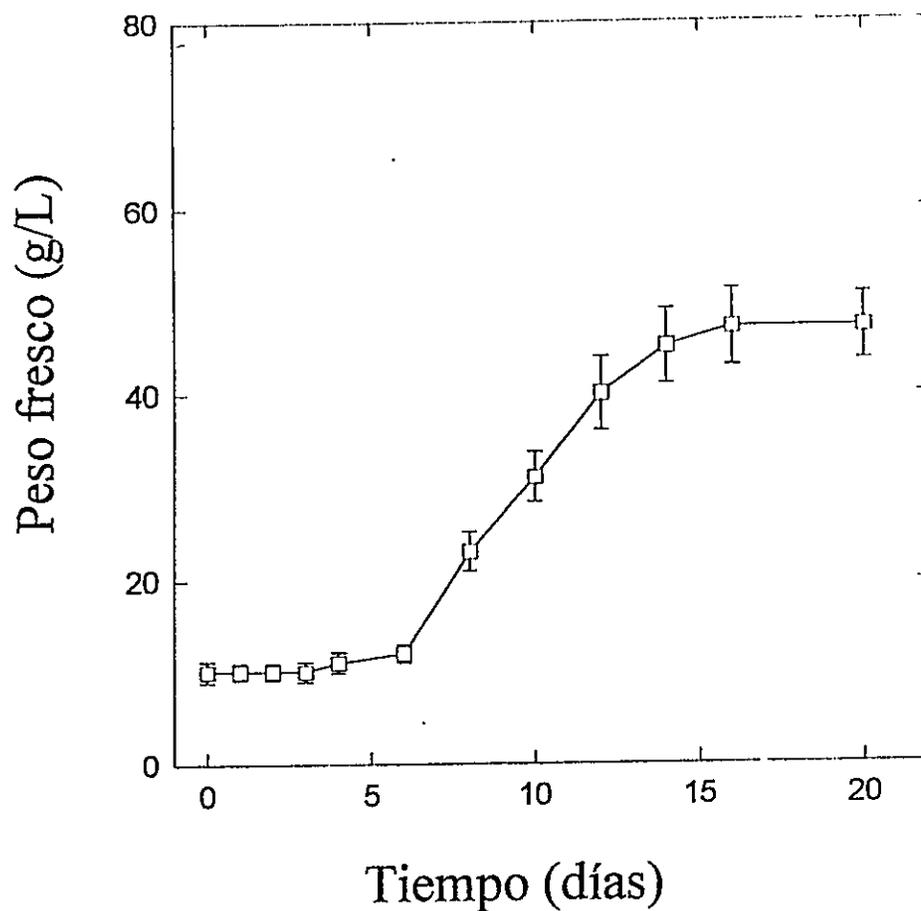


Figura 10. Crecimiento de una suspensión celular de cebada tolerante al frío (cv Atlas 68) a 4°C. La cinética de crecimiento fue determinada al cabo del tercer subcultivo. La suspensión inicial se formó entre 45 y 50 días a 4 °C. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar.

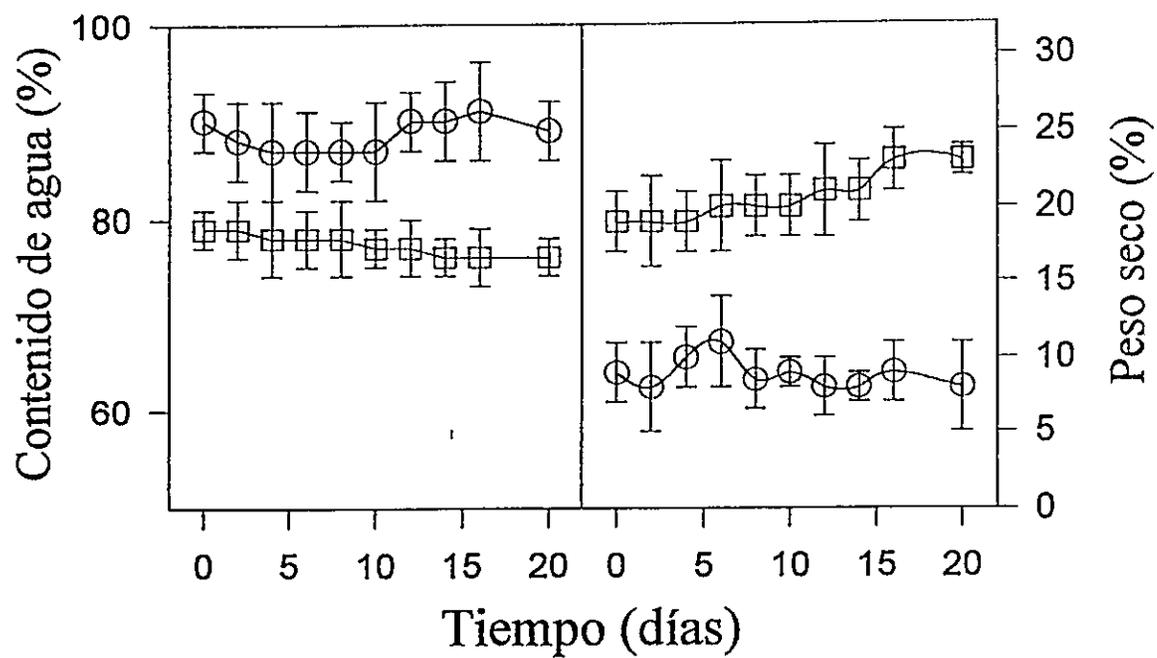


Figura 11. Contenido de agua y materia seca en células crecidas a 4 (□) (tolerante al frío) y 28 (○) °C (susceptible al frío). Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. .

último indica que las células que crecieron a una menor temperatura acumularon una mayor biomasa que las células que crecieron a 28 °C.

La capacidad de estas células para tolerar el congelamiento será mostrada en los experimentos siguientes.

3.1.8. Consumo de Sacarosa en las células tolerantes al frío. El menor crecimiento observado a 4 °C puede ser el reflejo de una menor actividad metabólica de las células, lo que debería traducirse en una menor absorción de nutrientes desde el medio. La cinética de absorción de sacarosa desde el medio de cultivo no difirió de la cinética de absorción observada a 28 °C (Fig. 12). Igualmente las determinaciones de los niveles de glucosa en el medio de cultivo, no mostraron diferencias a ambas temperaturas, lo que permitió descartar la posible hidrólisis de sacarosa (resultado no mostrado). Estos resultados sugieren que los mecanismos de absorción de sacarosa no se afectaron por las temperaturas bajas.

3.1.9. Eficiencia en el uso del carbono. Debido a que la temperatura no afectó la absorción de sacarosa desde el medio de cultivo, se determinó la eficiencia en el uso del carbono, definida como la cantidad de materia seca acumulada/g de sacarosa consumida. Esta relación permite evaluar los costos metabólicos asociados con el crecimiento y sobrevivencia a 4 °C, con respecto a los costos metabólicos asociados con el crecimiento en condiciones óptimas. Las células fueron cultivadas en medios suplementados

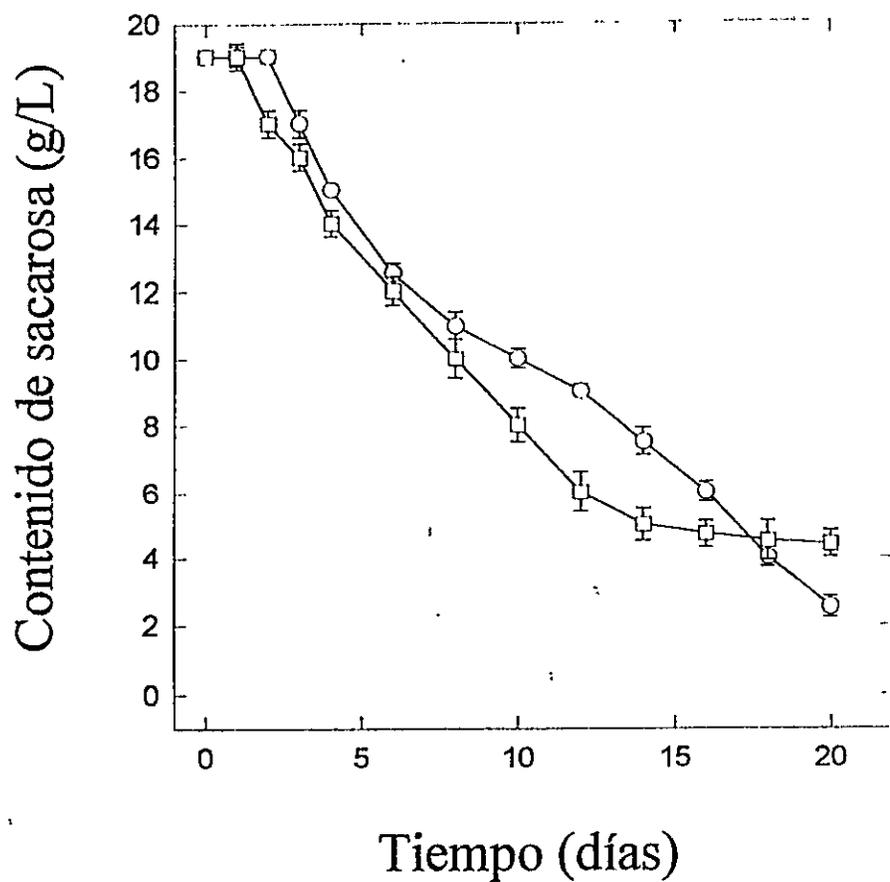


Figura 12. Absorción de sacarosa en células crecidas a 4 °C (□, tolerante al frío) y 28 °C (○, susceptible al frío). El contenido de sacarosa en el medio de cultivo fue determinado mediante HPLC. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar

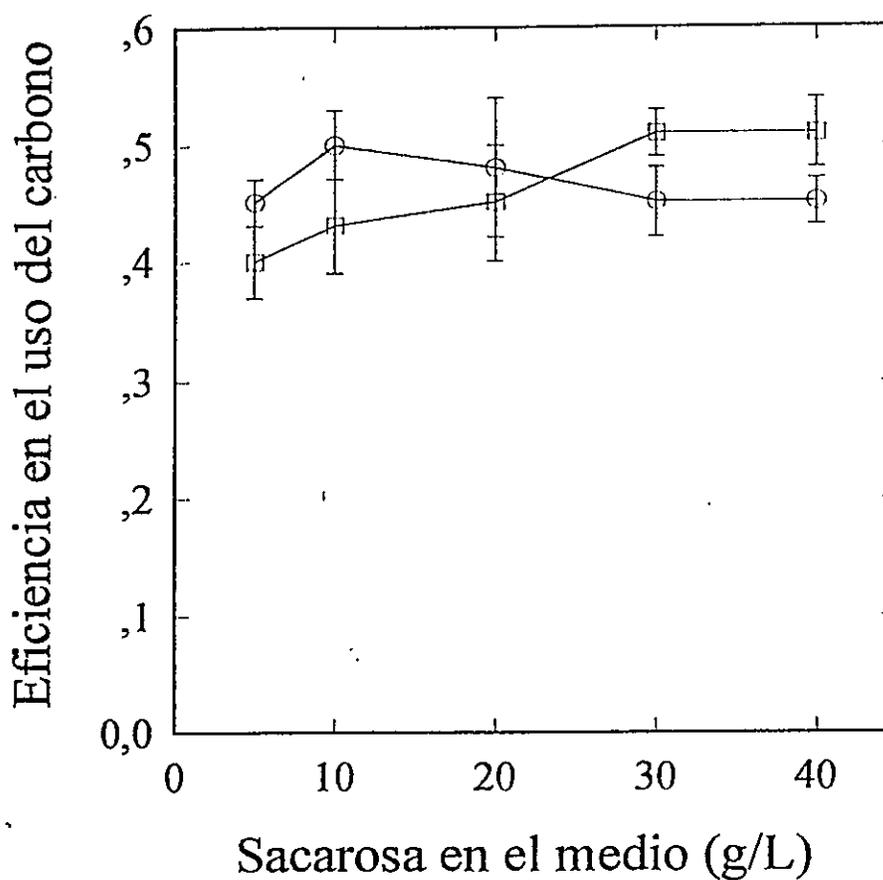


Figura 13. Eficiencia en el uso del carbono en células crecidas a 4 °C (□, tolerante al frío) y 28 °C (○, susceptible). Las células fueron crecidas durante 16 días en medios con diferentes concentraciones de sacarosa. La eficiencia en el uso del carbono fue determinada midiendo la cantidad de materia seca acumulada/g de sacarosa consumida. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones ± 1 error estándar.

con diferentes cantidades de sacarosa. Las diferencias en el uso del carbono, fueron mínimas en el rango de sacarosa utilizada (Fig. 13). Estos resultados sugieren que no existe un costo metabólico adicional asociado al crecimiento a 4 °C, sino más bien una redistribución de la sacarosa a otras vías necesarias para crecer a esta temperatura.

3.1.10. Tolerancia al congelamiento en células tolerantes al frío. Dado que la temperatura de crecimiento de las células tolerantes es de 4 °C, es esperable encontrar una mayor tolerancia al congelamiento que la encontrada en las células de la suspensión susceptible al frío, crecidas a 28 °C. En ambos grupos la sobrevivencia de las células disminuyó con la caída de temperatura (Fig. 14). Sin embargo, las células mantenidas a 4 °C, evidenciaron una TL_{50} inferior (-11 °C) a la de las células crecidas a 28 °C ($TL_{50} = -6,2$ °C). Por lo tanto, las células crecidas a 4 °C incrementaron en un 77% su capacidad para tolerar el congelamiento.

3.1.11. Comparación de la tolerancia al déficit hídrico en células crecidas a 4 °C y 28 °C. La tolerancia al déficit hídrico inducido por PEG-8000 en las células crecidas a 4 y 28 °C, fue evaluada en base al consumo de oxígeno de las células (Fig. 15). Las células crecidas a 4 °C fueron más tolerantes al déficit hídrico que las células control crecidas a 28 °C, encontrándose en este caso, que la concentración necesaria para reducir el consumo de oxígeno en

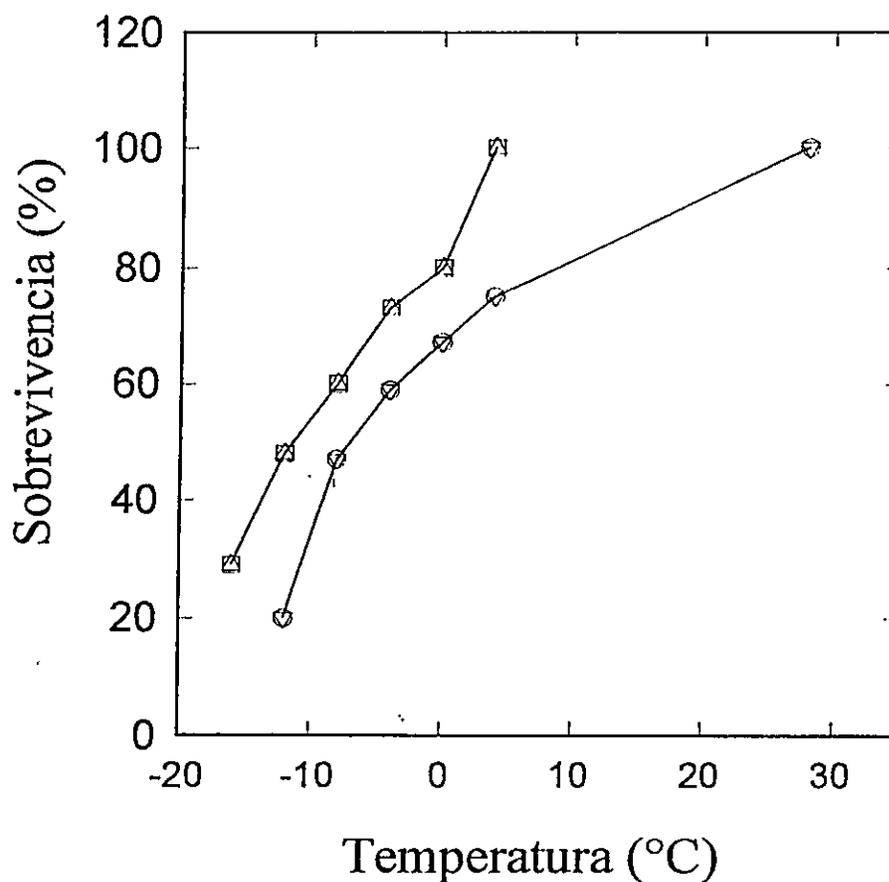


Figura 14. Efecto de la temperatura sobre la sobrevivencia de células crecidas a 4 °C (□) y a 28 °C (○). La sobrevivencia fue determinada evaluando la capacidad de las células para reducir TTC, luego de haber sido sometidas por 2 horas a la temperatura indicada. La temperatura a la cual la sobrevivencia se redujo en un 50% corresponde a la TL_{50} . Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones ± 1 error estándar.

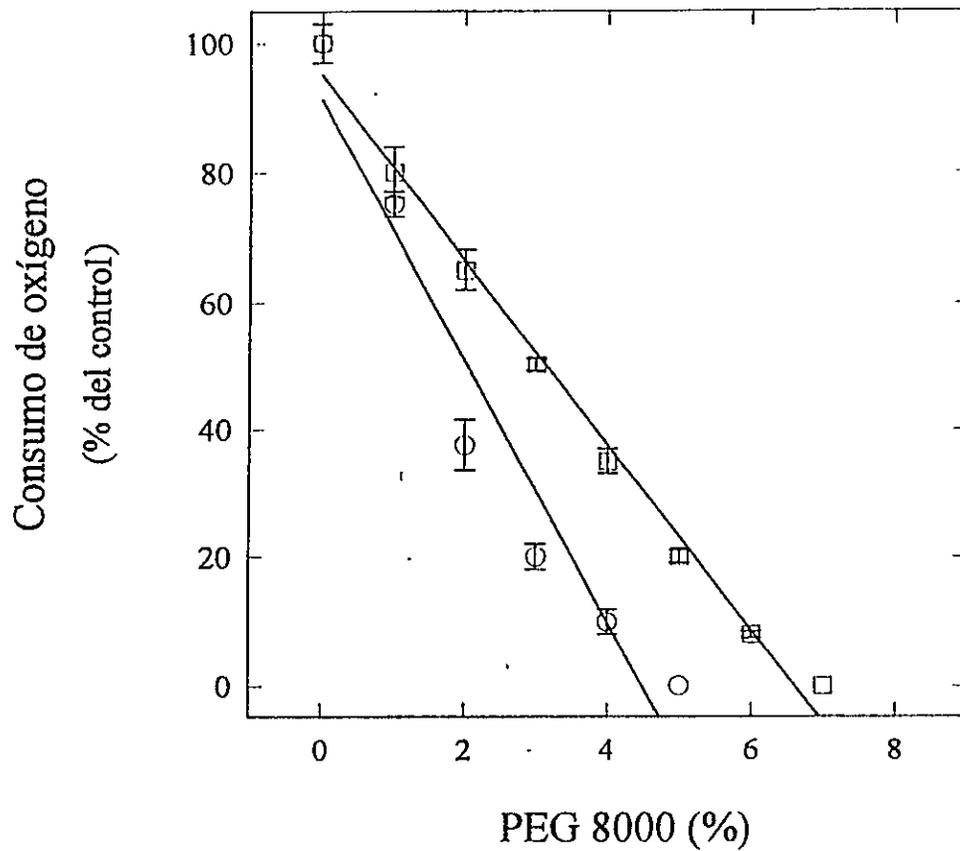


Figura 15. Tolerancia al déficit hídrico en células de cebada (cv Atlas 68) crecidas a 4 °C (□, tolerante); y a 28 °C (○, susceptible). La tolerancia fue determinada agregando PEG-8000 en las concentraciones indicadas. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar.

un 50 %, fue equivalente al 3,2 % de PEG-8000 en comparación al 2,2 % de las células crecidas a 28 °C.

Para demostrar que efectivamente las células están adaptadas a 4 °C, se tomó una alícuota de la suspensión y se colocó en un medio de cultivo sólido a 4 °C en un refrigerador, con el objeto de observar la formación de callos. Al cabo de un tiempo aproximado de 45 días, a partir de estas células se formaron callos (Fig. 16). Ciertos autores han expresado que callos y suspensiones celulares responden de manera diferente a condiciones de estrés. Por esta razón, se evaluó la respuesta al congelamiento y al estrés hídrico en los callos crecidos a 4 °C

3.1.12. Tolerancia al congelamiento y al estrés hídrico en callos crecidos a 4 °C. La tolerancia al congelamiento en callos fue levemente inferior ($TL_{50} = -10$) a la de las suspensiones celulares de la cual derivan (Fig. 17). Además, estos callos mostraron ser capaces de tolerar el déficit hídrico de manera similar a las células (Fig. 18).



Figura 16. Aspecto de un callo crecido a 4 °C. El callo fue inducido a partir de células crecidas a 4 °C, colocando el frasco de cultivo en un refrigerador a 4 °C. Los callos comenzaron a formarse a partir de los 45 días de cultivo.

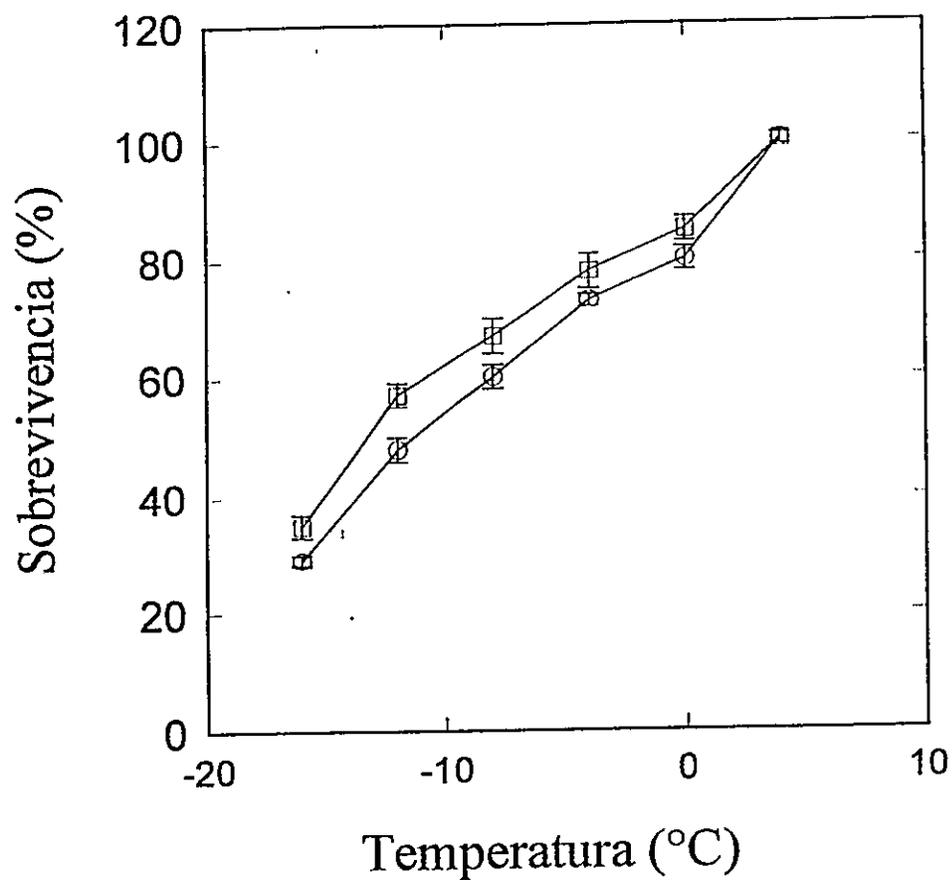


Figura 17. Tolerancia al congelamiento en callos (○) y células (□) crecidos a 4 °C (tolerantes al frío). Los análisis fueron realizados a los 30 días de haber iniciado un subcultivo. La sobrevivencia fue determinada evaluando la reducción del TTC. Cada valor corresponde al promedio de 3 muestras \pm 1 error estándar.

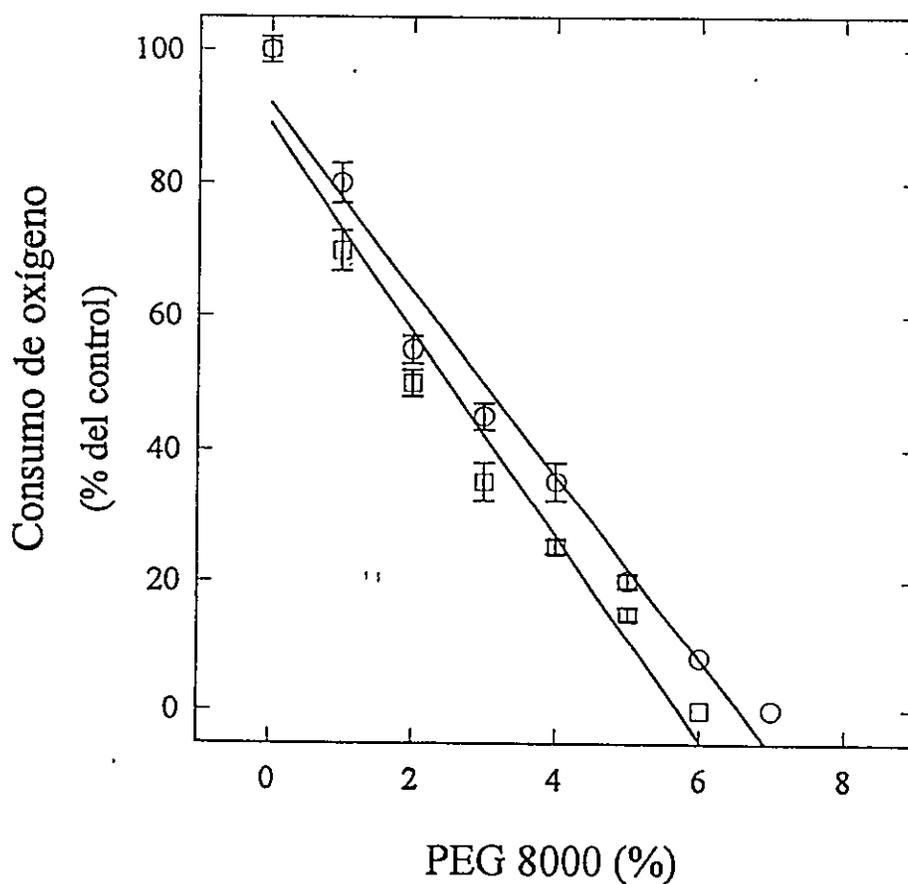


Figura 18. Tolerancia al déficit hídrico en callos (o) y células (□) crecidos a 4 °C (tolerantes al frío). La tolerancia fue determinada agregando al medio PEG-8000 en las concentraciones indicadas y midiendo el consumo de oxígeno. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar.

3.2. Caracterización bioquímica

En los párrafos siguientes se mostrarán los resultados obtenidos al caracterizar desde el punto de vista bioquímico las suspensiones celulares puestas a crecer a diferentes temperaturas, y la células (suspensiones o callos) tolerantes al frío (4°C).

3.2.1. Contenido de solutos en células crecidas a diferentes temperaturas. El contenido de solutos de las suspensiones celulares susceptibles al frío crecidas a las diferentes temperaturas fue determinado el día 15, luego de iniciado el cultivo (Tabla 4). El contenido de sacarosa, proteínas solubles, prolina y ABA fue mayor a 10 que a 4 y 28 °C ($P < 0,05$, test de varianza). No se observaron diferencias significativas entre los niveles de glicina-betaína a las distintas temperaturas ($P > 0,05$, test de varianza). El mayor contenido de solutos en la suspensión cultivada a 10 °C puede dar cuenta parcial del mayor porcentaje en peso seco de las células.

3.2.2. Acumulación de solutos en células y callos tolerantes al frío. Los niveles de solutos presentes en la fase estacionaria de una suspensión tolerante al frío (crecida a 4 °C), y el callos de 40 días crecidos a 4 °C se muestran en la Tabla 5. El contenido de ABA, sacarosa, prolina, y proteínas solubles de células y/o callos crecidos a 4 °C fue mayor que el contenido presente en las células crecidas a 28 °C. El hecho que el contenido de

Tabla 4. Contenido de solutos en suspensiones celulares susceptibles al frío crecidas a diferentes temperaturas .

	4°C	10 °C	28 °C
Sacarosa ($\mu\text{mol/g p.s}$)	36,5 \pm 1,8	54,6 \pm 1,5	42,3 \pm 4,5
Glucosa ($\mu\text{mol/g p.s}$)	102,7 \pm 1,7	166,0 \pm 5,5	132,0 \pm 5,0
Proteínas solubles (mg/g p.s).	22,4 \pm 2,0	33,5 \pm 3,0	27,7 \pm 1,5
Prolina (mmol/g p.s)	0,3 \pm 0,01	1,2 \pm 0,05	0,5 \pm 0.07
ABA (nmol/g p.s)	23 \pm 3	35 \pm 5	29 \pm 6
Glicina- betaína (mmol/g p.s)	0,4 \pm 0,01	0,7 \pm 0,04	0,6 \pm 0.09

El contenido de sacarosa, glucosa y ABA fue determinado mediante HPLC. El contenido de proteínas solubles y prolina fue determinado colorimétricamente de acuerdo a la metodología descrita en Materiales y Métodos. Las suspensiones fueron obtenidas de células crecidas a 28 °C. Las mediciones fueron realizadas a los 16 días de iniciado los cultivos. Cada valor corresponde al promedio de tres mediciones \pm 1 error estándar.

Tabla 5. Contenido de solutos en células crecidas a 4 °C (tolerante al frío) y 28 °C (susceptible al frío)

Solutos	Temperatura de crecimiento		
	4 °C		28 °C
	Suspensión	Callos	Suspensión
Sacarosa ($\mu\text{mol/g. ps}$)	126 \pm 9	76 \pm 10	43 \pm 9
Glucosa ($\mu\text{mol/g. ps}$)	444 \pm 61	366 \pm 61	143 \pm 44
Proteínas (mg/g. ps)	37 \pm 2	29 \pm 3,0	25 \pm 2
Prolina (mmol/g. ps)	2,0 \pm 0,08	1,3 \pm 0,05	1,3 \pm 0,06
ABA (nmol/g. ps)	45 \pm 3	39 \pm 4	29 \pm 3

El contenido de sacarosa, glucosa y ABA fue determinado mediante HPLC. El contenido de prolina y proteínas solubles fue determinado colorimétricamente. El análisis fue realizado a los 16 días. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar.

sacarosa en las células crecidas a 4 °C, sea 3 veces superior al contenido de sacarosa presente en las células crecidas a 28 °C, y que el nivel de sacarosa encontrado en el medio de cultivo a ambas temperaturas sea equivalente (Fig. 12), sugiere que esta sustancia podría estar desempeñando un papel osmótico bajo estas condiciones.

3.3. Aclimatación al frío

Uno de los objetivos de esta tesis, fue verificar si las células crecidas en suspensión son capaces de aclimatarse a condiciones desfavorables al igual que plantas intactas. Por esta razón, para determinar la capacidad de las células para aclimatarse al frío, se colocó una suspensión celular susceptible al frío en fase de crecimiento estacionario, en una cámara fría a 4 °C. Se evaluó la capacidad de sobrevivencia al enfriamiento y la tolerancia a la congelación en función del tiempo. La sobrevivencia de las células mantenidas a 4 °C disminuyó con el tiempo, alcanzando un valor mínimo a los 16 días (40 % de sobrevivencia respecto del control) (Fig. 19). La tolerancia a la congelación de las células varió durante el proceso de aclimatación (Fig. 20). Al inicio del cultivo se produjo un aumento de las TL_{50} , y posteriormente a partir del sexto día se produjo un descenso alcanzándose la máxima tolerancia a los 16 días ($TL_{50} = -9.0$ °C). El hecho que la TL_{50} disminuya significa que las células fueron capaces de aclimatarse al frío. El consumo de oxígeno de las células también varió durante la aclimatación (Fig.21),

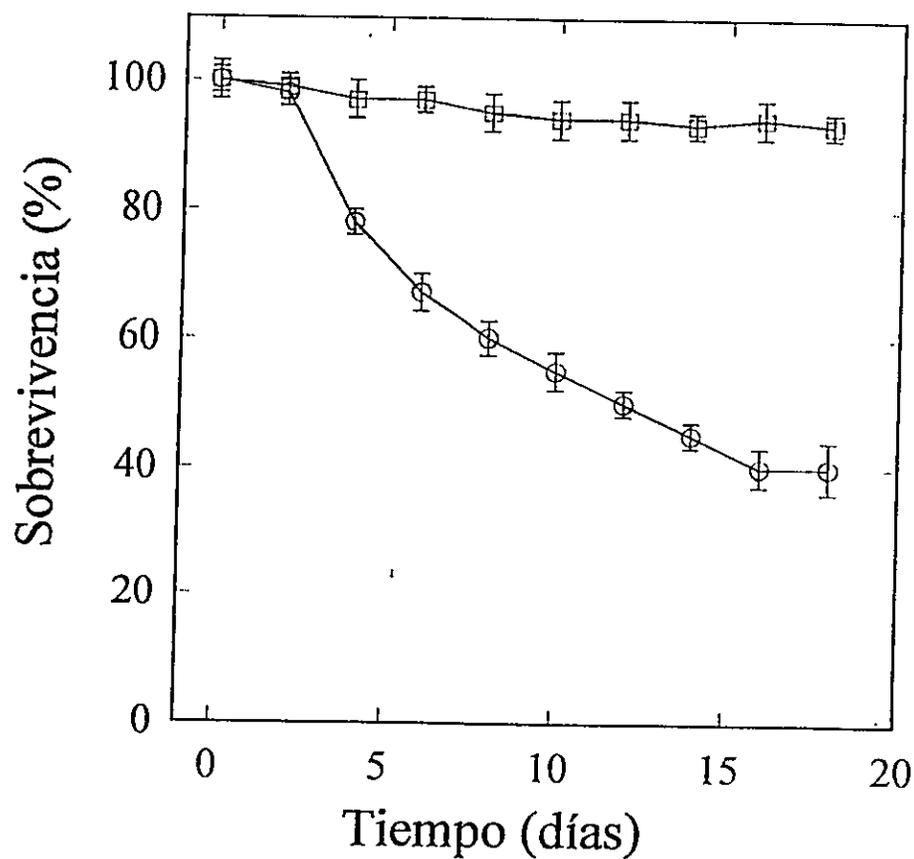


Figura 19. Sobrevivencia de células susceptibles al frío durante la aclimatación a dos temperaturas diferentes 4 °C (○) y 28 °C (□). La sobrevivencia fue determinada evaluando la reducción del TTC. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar.

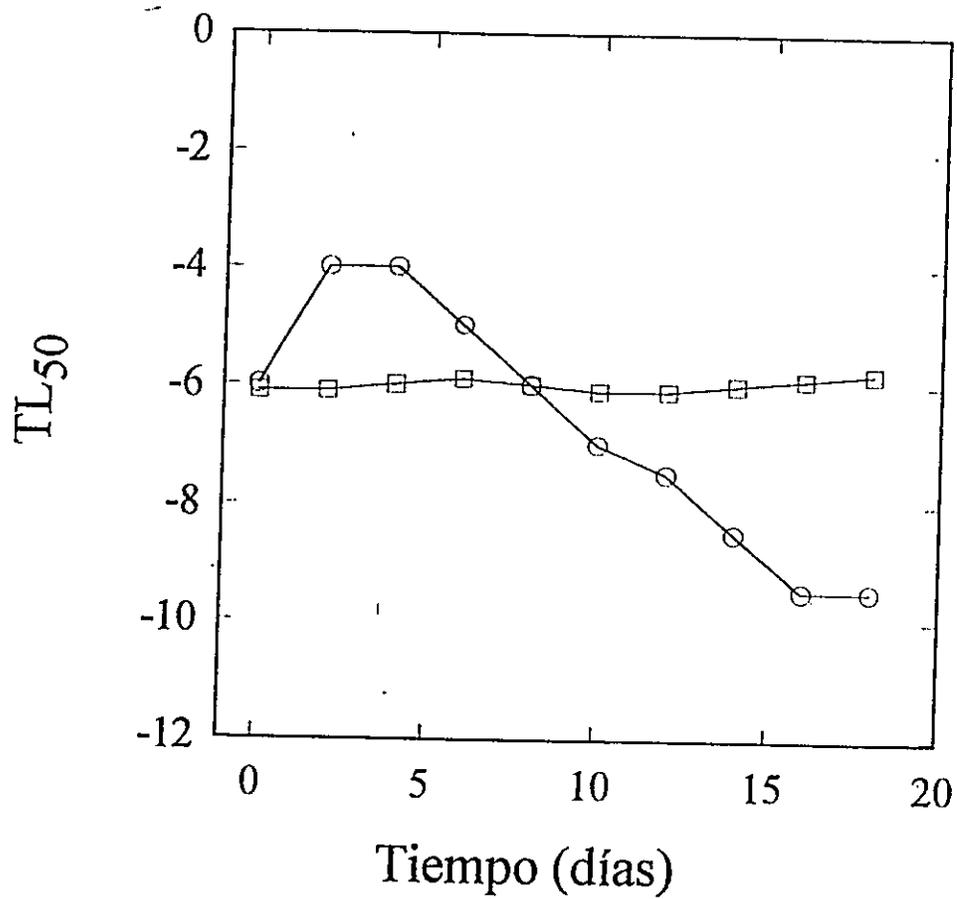


Figura 20. Tolerancia al congelamiento de suspensiones celulares de cebada susceptible al frío, durante el período de aclimatación a 4 °C. El valor de TL₅₀ se determinó midiendo la reducción del TTC. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. 4 °C (○); 28 °C (□).

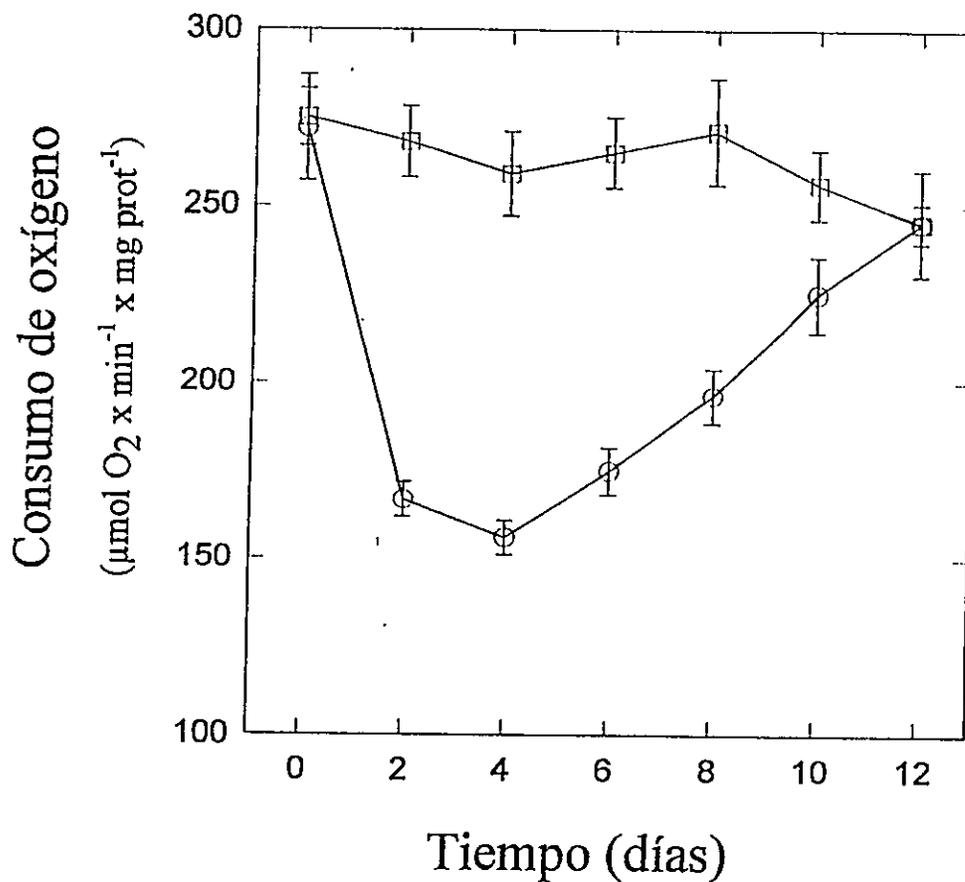


Figura 21. Consumo de oxígeno durante la aclimatación a 4 °C de las células susceptibles al frío. El consumo de oxígeno fue determinado en medios de cultivo fresco. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Células aclimatadas a 4 °C (○); Control a 28 °C (□)

observándose una disminución inicial en el consumo de oxígeno (menor capacidad metabólica) durante los primeros 4 días de tratamiento, el que se recuperó posteriormente. Este resultado es consistente con la variación en el valor de la TL_{50} mostrado en la Fig. 20, dado que la reducción del TTC requiere de la actividad de deshidrogenasas mitocondriales. Dado que ambos métodos utilizados para determinar la tolerancia al congelamiento, requieren de la integridad de las membranas celulares, el aumento de la sensibilidad observado al inicio de la aclimatación podría estar relacionado entre otros factores, con daños provocados por el estrés oxidativo que ocurre a bajas temperaturas.

Entre las manifestaciones del estrés oxidativo en plantas, se encuentra la lipoperoxidación de las membranas, lo que constituye una medida del daño producido (Elstner y Osswald, 1994). El aumento de ciertos sistemas antioxidantes enzimáticos contrarresta el efecto nocivo de la oxidación y representa una medida de la recuperación del estrés (Prasad, *et al.*, 1994). Por esta razón, se determinó durante la aclimatación de las células a 4 °C, el contenido de malodialdehído (MDA), un producto de la oxidación de lípidos de membrana y los niveles de actividad de las enzimas peroxidasas y catalasas citosólicas (Elstner y Osswald, 1994).

El contenido de MDA aumentó durante los primeros días de la aclimatación (los mismos en que aumentó la TL_{50}) y se mantuvo constante a partir del octavo día hasta el final del tratamiento (Fig. 22). Las peroxidasas citosólicas también experimentaron cambios durante la aclimatación. En el período inicial de la aclimatación la actividad disminuyó (al igual que la tolerancia al congelamiento), para posteriormente aumentar (Fig. 23). La actividad catalasa mostró un comportamiento similar. Durante el período inicial de la aclimatación la actividad disminuyó pero en menor magnitud, que la actividad peroxidasa. A partir del cuarto día la actividad catalasa aumentó, alcanzándose valores por sobre el control desde el sexto día a 4 °C (Fig. 23). Los resultados muestran que las células de cebada son capaces de recuperarse del estrés oxidativo inducido por el frío, durante el proceso de aclimatación.

3.3.1 Contenido de solutos durante la aclimatación. Se ha descrito que como respuesta a la aclimatación, numerosas especies acumulan compuestos asociados con la adquisición de un mayor grado de tolerancia como son la prolina, betaína, sacarosa y ABA. Por esta razón, se determinó la variación en el contenido de estos compuestos durante la aclimatación de las células a 4 °C. El contenido de prolina aumentó durante la aclimatación (Fig. 24). Este aumento se produjo a partir del sexto día de exposición de las células a 4 °C y alcanzó valores máximos alrededor de los 20 días 27 mmol/g. p.s). En

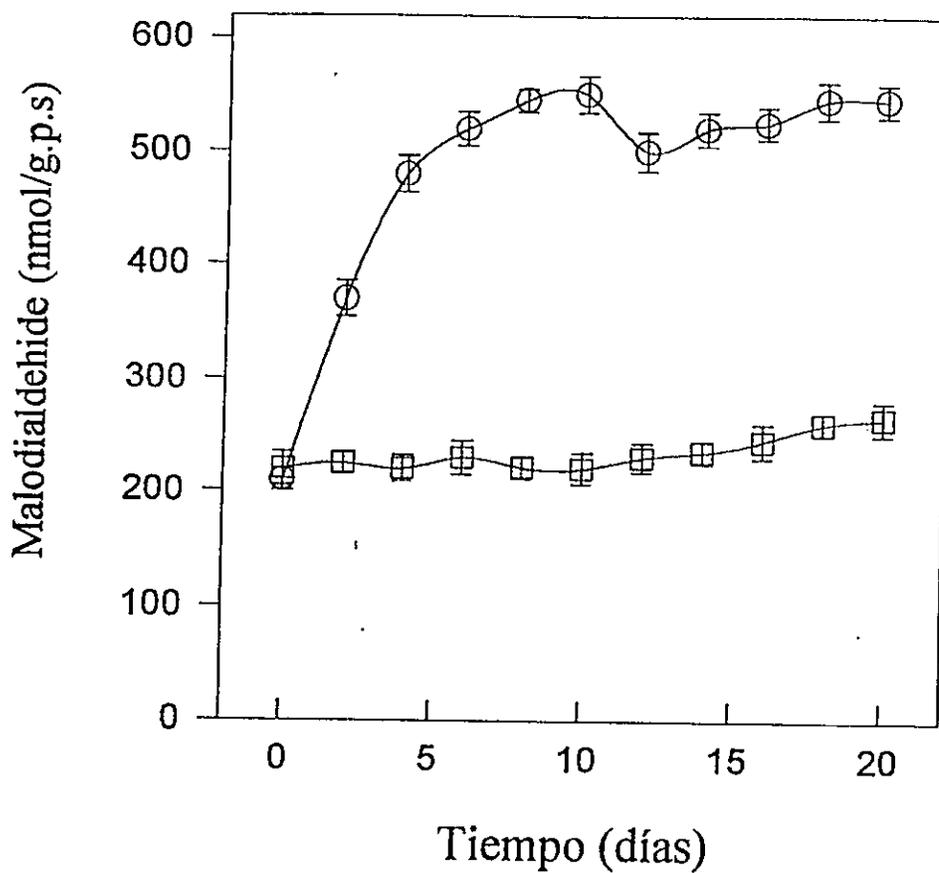


Figura 22. Variación en el contenido de MDA durante la aclimatación a 4 °C de suspensiones celulares de cebada susceptible al frío. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Células aclimatadas a 4 °C (o); Control a 28 °C (□)

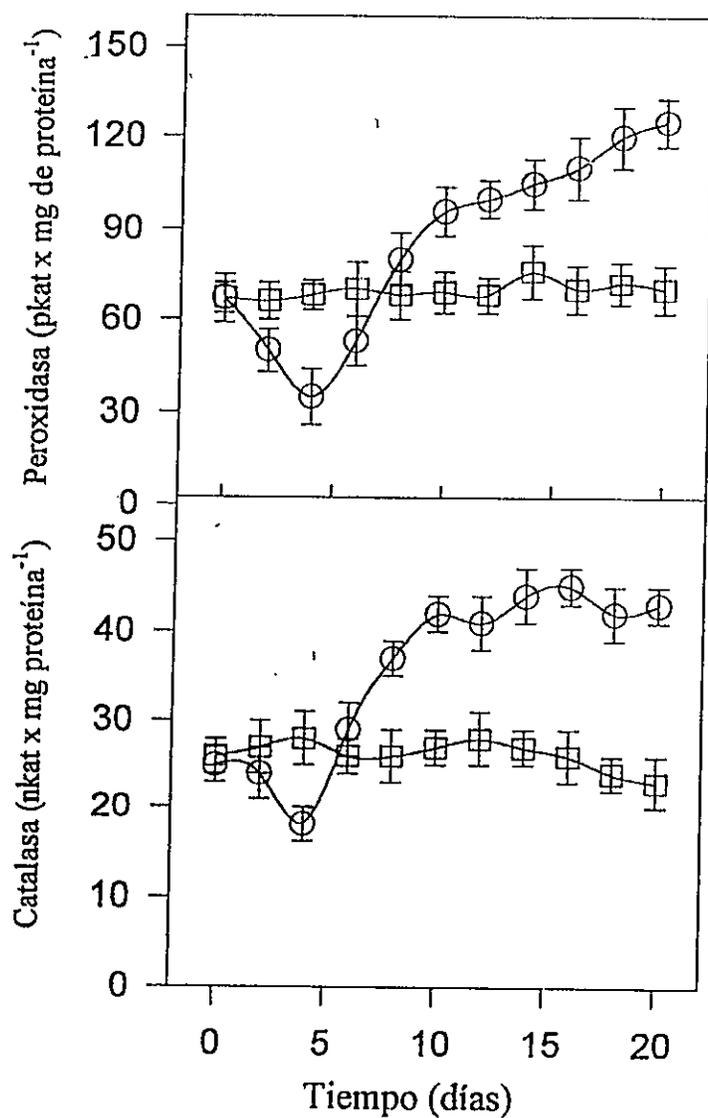


Figura 23. Actividad de las enzimas guaiacol-peroxidasa y catalasa durante la aclimatación a 4 °C de células susceptibles al frío. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Células aclimatadas a 4 °C (o); Control 28 °C (□)

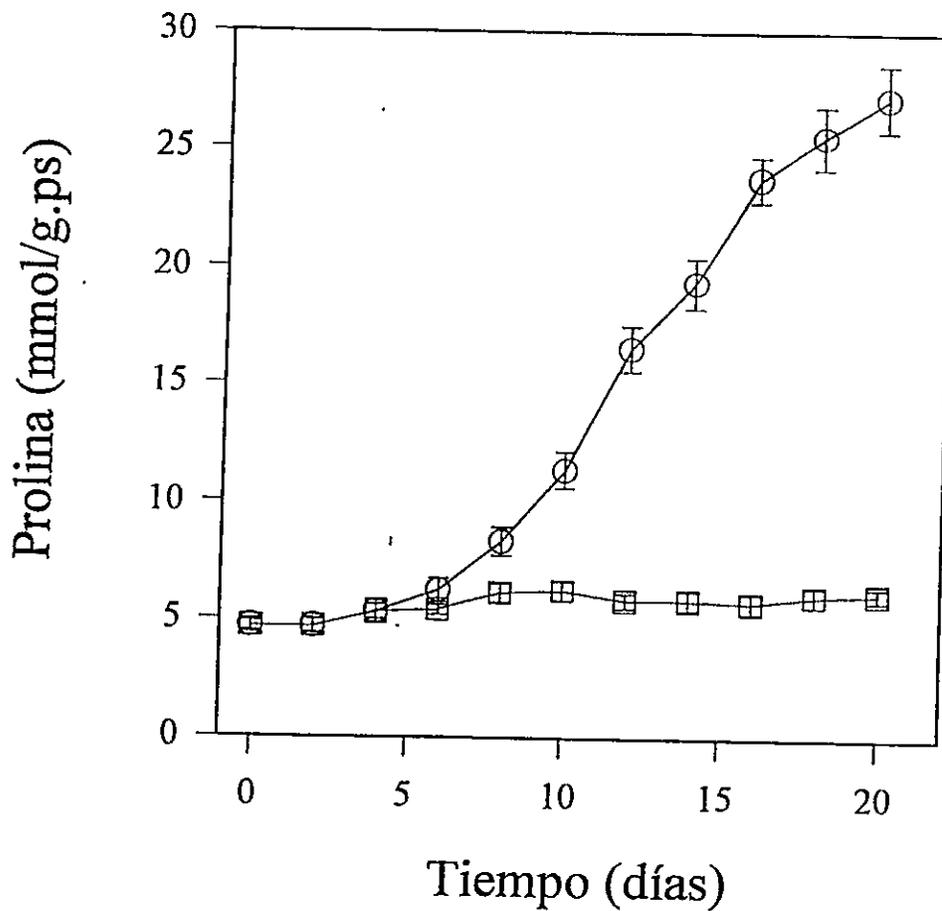


Figura 24. Acumulación de prolina durante la aclimatación a 4 °C de células susceptibles al frío. La determinación se realizó colorimétricamente, según lo descrito en Materiales y Métodos. Cada valor corresponde el promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Células aclimatadas a 4 °C (○); Control 28 °C (□)

cambio el contenido de betaína no experimento cambios significativos, manteniéndose los valores en el rango de las células control (0,06 mmol/kg p.s, $P > 0,05$ test de t).

La sacarosa, metabolito que ha sido asociado con la tolerancia al congelamiento también se acumuló durante la aclimatación (Fig. 25). Esta acumulación se produjo a partir del cuarto día de aclimatación, alcanzando valores máximos a los 10 días (aproximadamente 3 veces el nivel del control).

El metabolismo proteico también no se vio afectado cuando las plantas fueron sometidas a bajas temperaturas. Los niveles de proteínas solubles totales en las células control y las aclimatadas no experimentaron variación durante el período de aclimatación a 4 °C (Fig. 26, $P > 0,05$ test de varianza) .

En otras especies se ha descrito que durante la aclimatación de las células se acumula ABA. El contenido de ABA comenzó a aumentar a partir del sexto día de aclimatación a 4 °C, alcanzando un máximo transitorio a los 8 días (Fig. 27). Luego de este período se produjo un descenso estabilizándose los niveles entre los 12 y 16 días. El contenido de agua y el peso seco de las células, medidos como porcentaje del control, mostraron variaciones durante la aclimatación (Fig. 28). El porcentaje de agua se redujo desde un 90% en las células control a un 78% en las células aclimatadas mientras que el porcentaje de peso seco aumentó desde un 8 a un 26 % por efecto de la

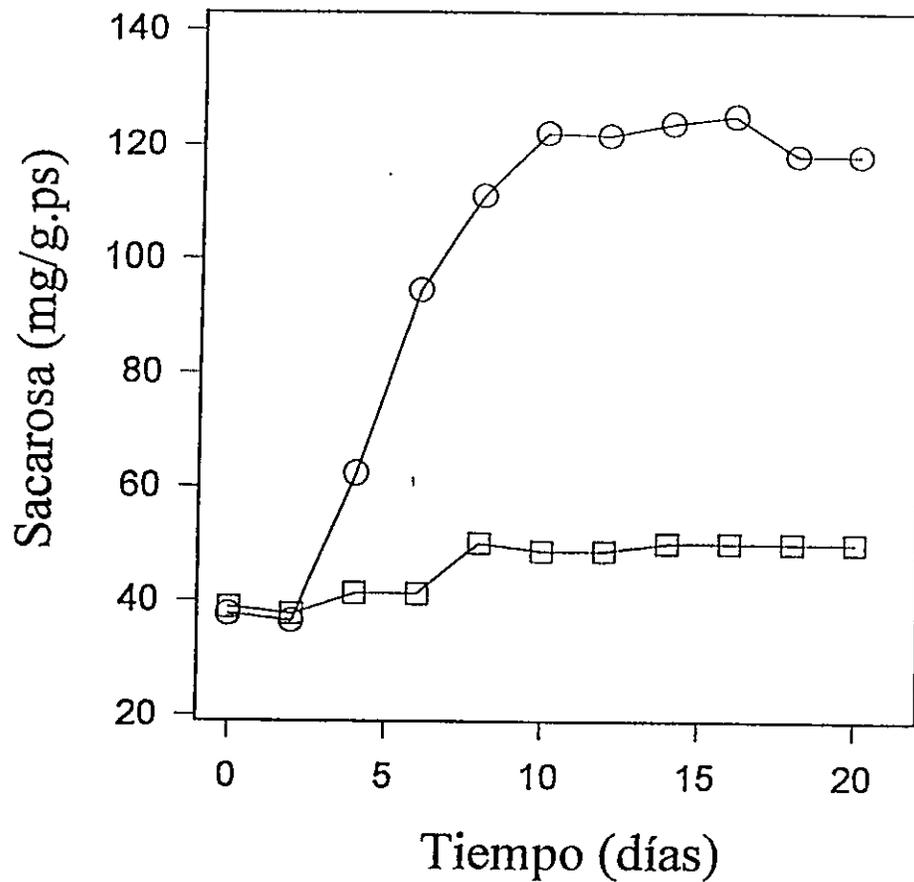


Figura 25. Acumulación de sacarosa durante la aclimatación a 4 °C de las células susceptibles al frío. Los valores de sacarosa en las células fueron determinados por HPLC. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Células aclimatadas a 4 °C (o); Control a 28 °C (□).

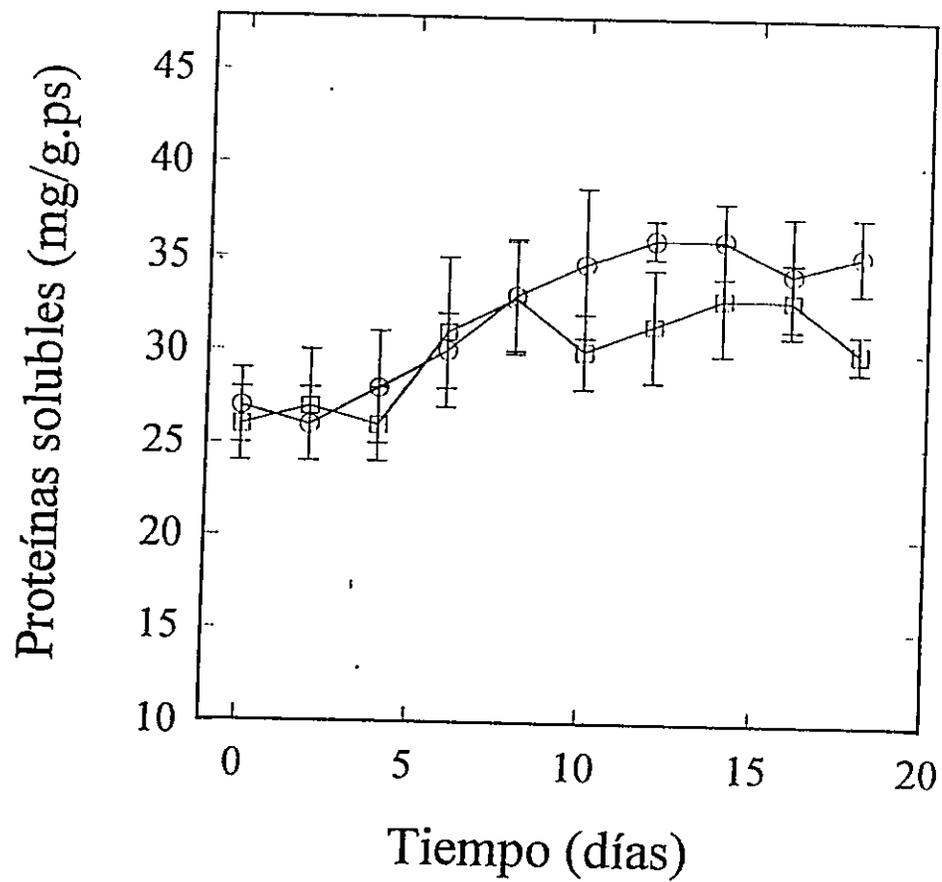


Figura 26. Contenido de proteínas solubles durante la aclimatación a 4 °C de células susceptibles al frío. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Células aclimatadas a 4 °C (○), Control a 28 °C (□).

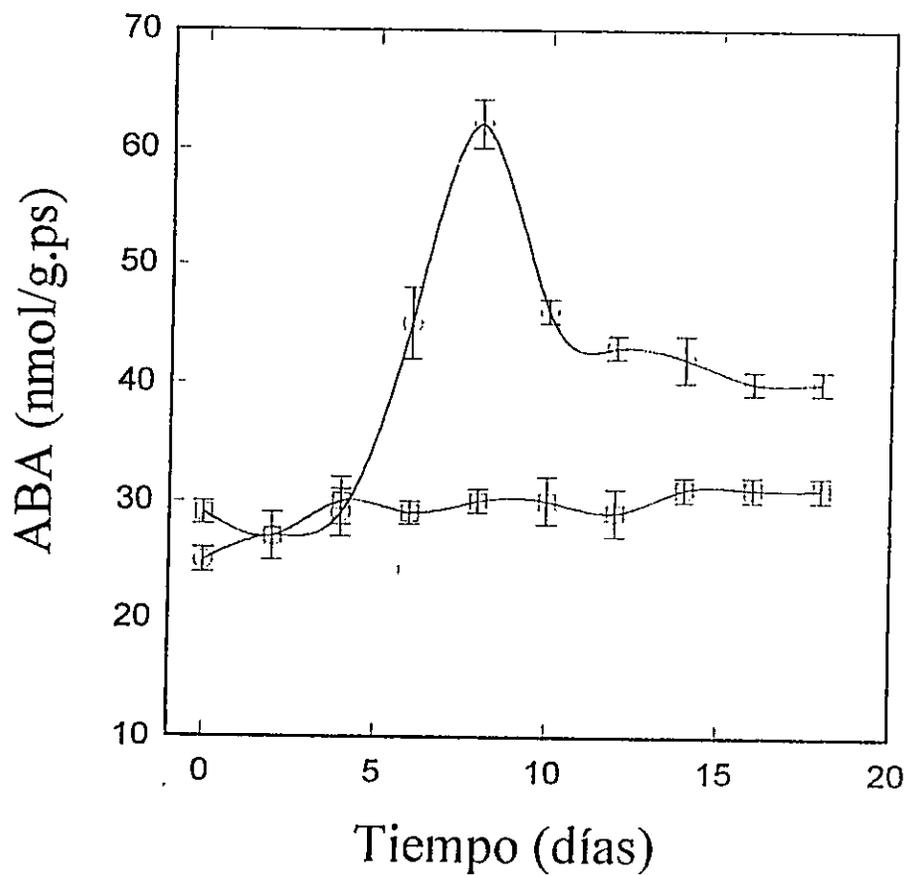


Figura 27. Variación en el contenido de ABA durante la aclimatación a 4 °C de células susceptibles al frío. El contenido de ABA fue determinado mediante HPLC. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Células aclimatadas a 4 °C (○), Control a 28 °C (□).

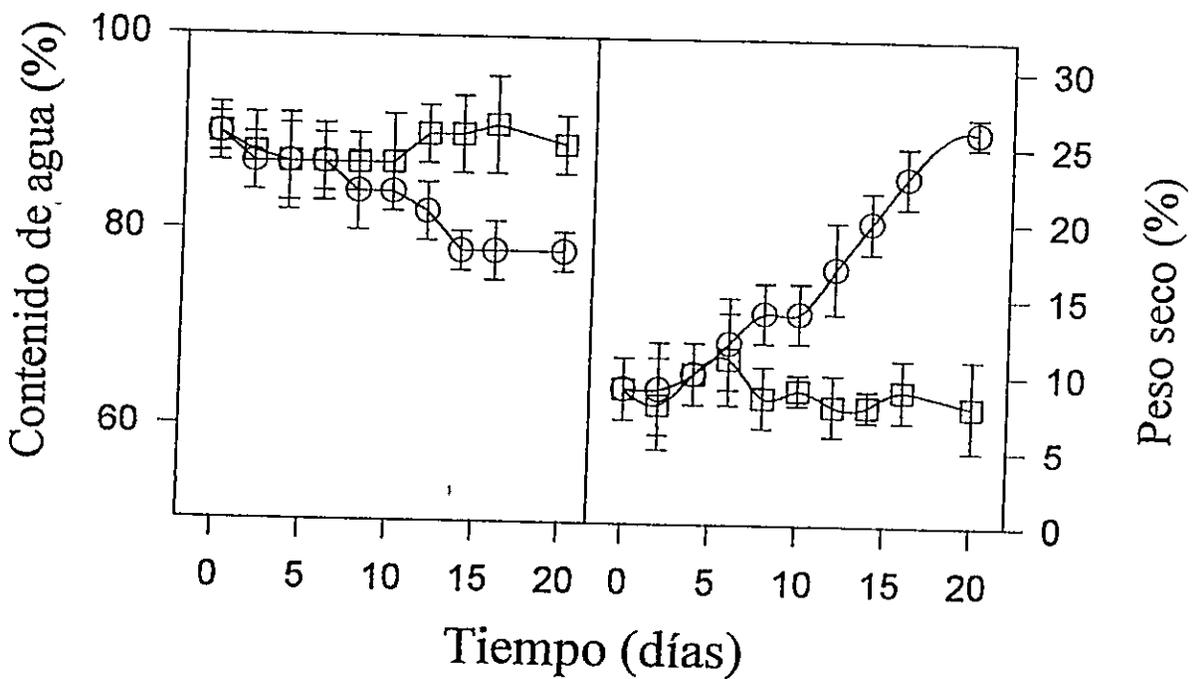


Figura 28. Variación en el contenido de agua y materia seca durante la aclimatación a 4 °C de células susceptibles al frío. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Células aclimatadas a 4 °C (o); Control a 28 °C (□)

aclimatación. La reducción del contenido de agua y el aumento de los solutos pueden contribuir a aumentar la tolerancia al frío de las células susceptibles.

3.3.2. Tolerancia al déficit hídrico en células susceptibles al frío aclimatadas a 4° C. Como se mostró en los puntos anteriores, el frío indujo en las células una serie de cambios, algunos de los cuales también han sido reportados por efectos del estrés hídrico. Se debería esperar entonces, que las células aclimatadas a 4°C, respondan mejor al déficit hídrico que las células no aclimatadas. La tolerancia de las células al PEG-8000 aumentó en forma considerable respecto del control a 28 °C (Fig. 29). La concentración de PEG-8000 necesaria para inhibir en un 50 % el consumo de oxígeno aumentó desde 2,2 % a 3%. Esto sugiere que durante la aclimatación al frío se gatillan también mecanismos que permiten a las células tolerar mejor el estrés hídrico. Los resultados mostrados en esta sección, indican que las células susceptibles son capaces de aclimatarse al frío, con lo cual mejoran también su tolerancia al déficit hídrico.

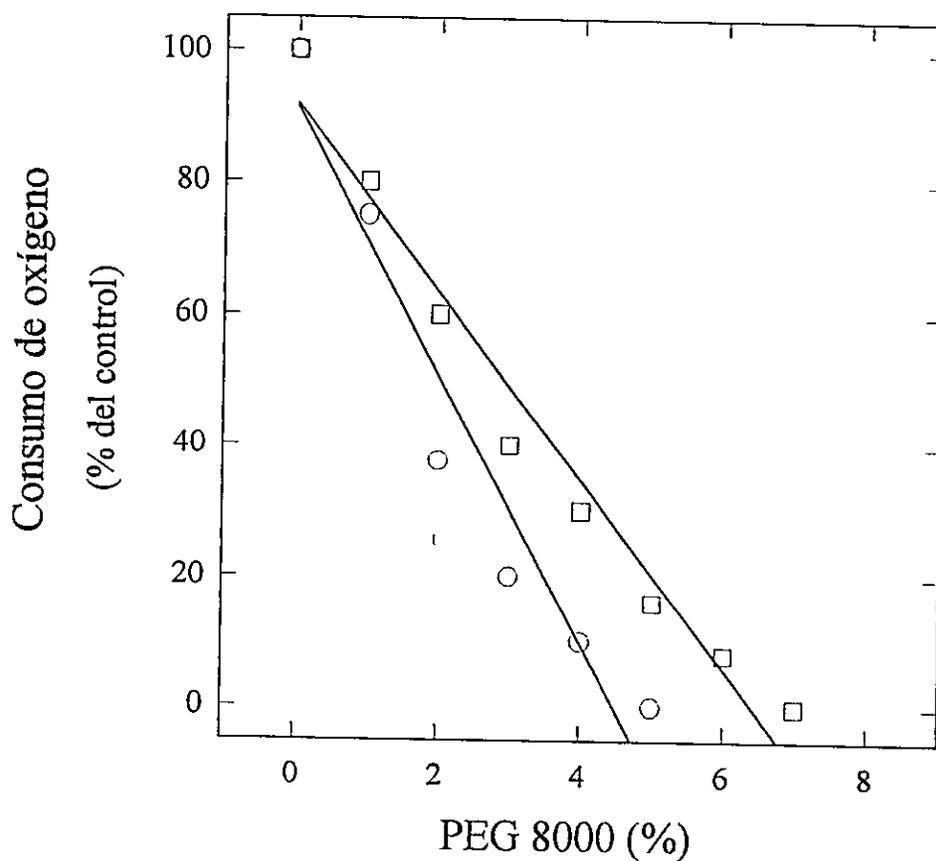


Figura 29. Efecto de la aclimatación a 4 °C en células de cebada susceptibles al frío sobre la tolerancia al déficit hídrico. El déficit hídrico se indujo aplicando al medio PEG-8000 en las concentraciones indicadas. Cada valor corresponde al promedio de tres mediciones ± 1 error estándar. Células acimatadas a 4°C (○); Control a 28 °C (□)

3.4. Efecto del ABA sobre la aclimatación.

Debido a que el ABA exógeno puede incrementar la capacidad de las células para tolerar el estrés inducido por frío y déficit hídrico, en diferentes especies (Chen and Gusta, 1983; Reeney and Gusta, 1987), se pretendió evaluar los efectos de este compuesto en la tolerancia al frío de las células susceptibles (crecidas a 28 °C). Se incubaron suspensiones celulares con diferentes concentraciones de ABA (0-100 μ M) durante 7 días. La TL₅₀ de las células disminuyó significativamente a medida que aumentó el contenido de ABA del medio de cultivo (Fig. 30), alcanzando valores inferiores a -30 °C con ABA 100 μ M. La acumulación de ABA en las células mostró una proporcionalidad con el contenido externo hasta los 75 μ M ABA. Los niveles endógenos fueron similares a 75 y 100 μ M. Si se comparan estos resultados con los obtenidos al aclimatar las células a 4 °C, se puede concluir que la aclimatación con ABA hace a las células más tolerantes que cuando se aclimatan a 4 °C en un período de tiempo menor (Figs 20 y 30).

Dado que durante la exposición de las células a 4° C la máxima tolerancia al congelamiento se obtuvo alrededor del sexto día (Fig. 15), se quiso determinar los efectos de un período de incubación mayor que 7 días con 100 μ M ABA. Por esta razón, se evaluó la capacidad de tolerar el congelamiento a los 14 y 21 días de incubación. La incubación con ABA 100 μ M redujo el

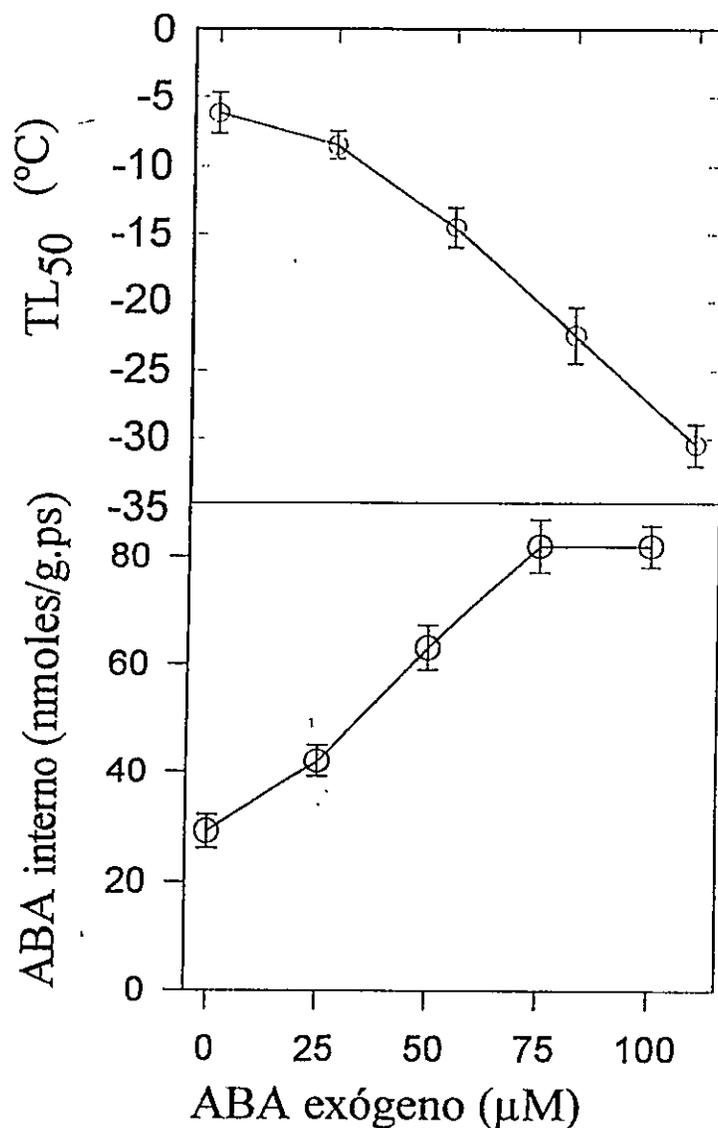


Figura 30. Efecto de la incubación con ABA exógeno sobre la tolerancia al congelamiento y la acumulación de ABA en una suspensión celular susceptible al frío crecida a 28 °C. La TL₅₀ se determinó a partir de los valores de sobrevivencia medidos evaluando la reducción del TTC. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar.

crecimiento de las células, medido como incremento en peso fresco del inoculo inicial (Tabla 5). La viabilidad de las células se redujo sólo levemente. El contenido de ABA a los 7, 14 y 21 días no difirió significativamente ($P > 0,05$, test de varianza). Sin embargo, hubo un aumento significativo en la capacidad de las células para tolerar el congelamiento. Al transferir las células a un medio sin ABA, se recuperó el crecimiento y el contenido de ABA de las células disminuyó, esto probablemente por un efecto de dilución debido a la división. No obstante, esta baja en el contenido endógeno de ABA, las células mostraron una mejor tolerancia al congelamiento que el control (Tabla 5). celular. El contenido de prolina aumentó en relación al contenido de ABA en el medio de cultivo. Sin embargo, los niveles fueron menores que los alcanzados durante la aclimatación a 4 °C (27,2 mmol/g.p.s y 12,3 mmol/g.p.s, respectivamente) (Fig. 31). La presencia de ABA en el medio de cultivo también indujo la acumulación de sacarosa, alcanzándose valores máximos de 170 mg/ g. p.s alrededor del decimotercer día (Fig. 32). El contenido de fosfolípidos en las células tratadas con ABA se muestra en la Fig. 33. Los niveles de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol aumentaron con el ABA exógeno, existiendo a 100 μ M ABA claras diferencias con respecto al control sin ABA 28 °C ($P < 0,05$, test de varianza).

Tabla 6. Efecto del tiempo de incubación con ABA sobre la tolerancia al congelamiento en suspensiones celulares de cebada Atlas 68.

ABA exógeno (μM)	Tiempo (días)	ABA interno (nmol/g.p.s)	Peso fresco (g/L)	TL ₅₀ ($^{\circ}\text{C}$)
0	7	29 \pm 3	50,0 \pm 1	-6.2
100	7	43 \pm 4	42,5 \pm 2	-30.5
100	14	56 \pm 7	35,5 \pm 1	-30.5 (-38,5) ^a
100	21	61 \pm 8	19,5 \pm 3	-30,5 (-42,0) ^a
100	7 *	43 \pm 5	43,0 \pm 2	-30,5
0	7	35 \pm 3	52,5 \pm 2	-14.5
100	14	56 \pm 4	35,0 \pm 2	-30,5
0	7	43 \pm 3	51,0 \pm 2	-18,5

La TL₅₀ fue determinada evaluando la capacidad de las células para reducir TTC. El contenido de ABA fue determinado mediante HPLC, según lo descrito en métodos. El inoculo inicial de células fue de 10 g/L. Los valores corresponden al promedio de tres mediciones \pm 1 error estándar. *Al cabo de este tiempo las células se transfirieron a medios sin ABA y se incubaron durante el tiempo indicado en la línea inmediatamente inferior. ^aValores determinados mediante extrapolación de la recta de regresión lineal.

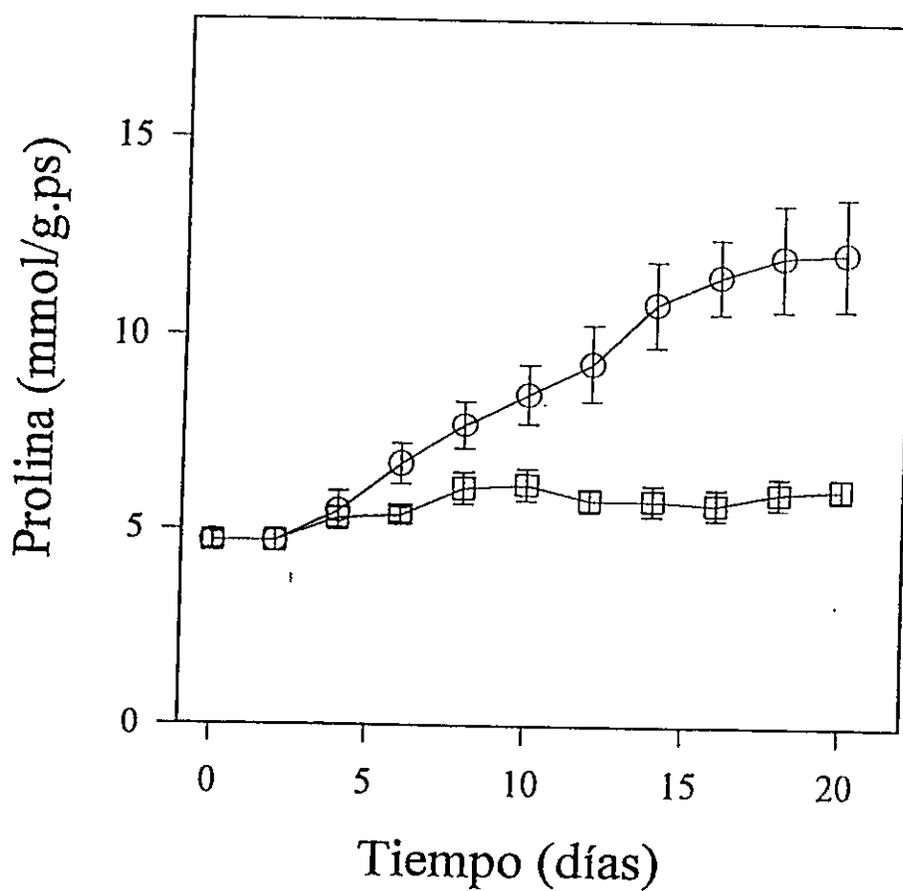


Figura 31. Efecto de la aclimatación con ABA exógeno sobre la acumulación de prolina en suspensiones celulares de cebada susceptibles al frío crecidas a 28 °C. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Control sin ABA (□), ABA 100 μ M (o).

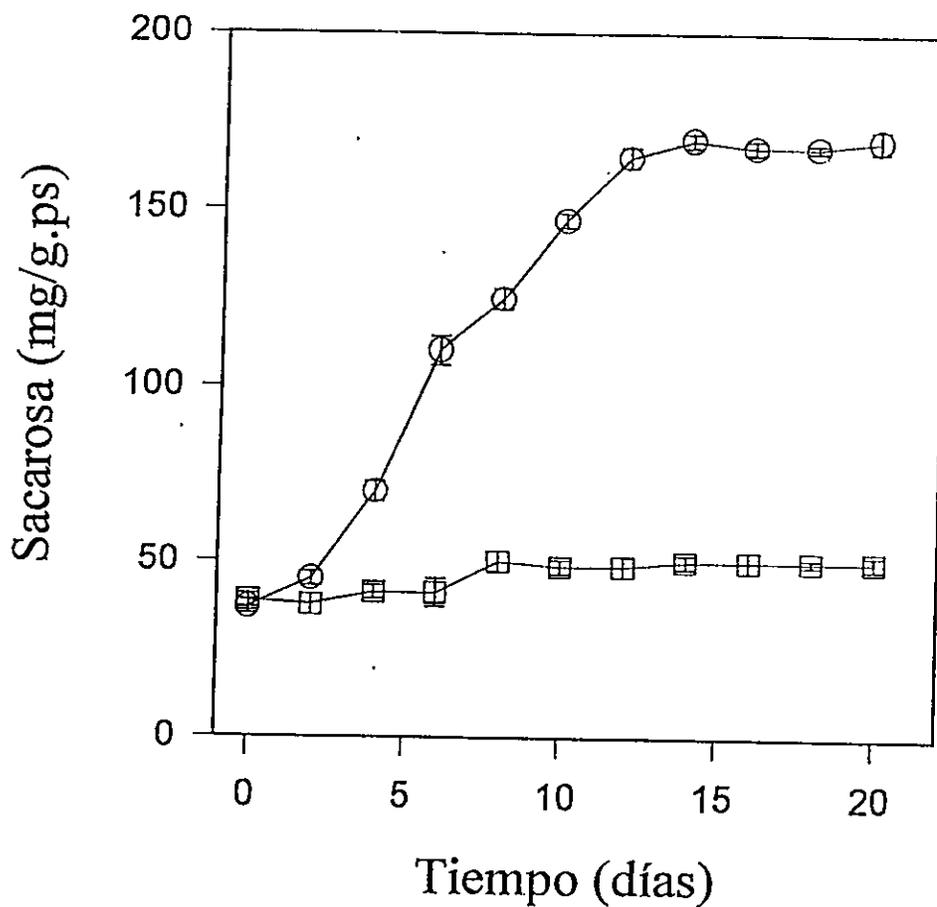


Figura 32. Efecto de la aclimatación con ABA sobre la acumulación de sacarosa en células susceptibles al frío crecidas a 28 °C. La sacarosa se determinó mediante HPLC. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Control sin ABA (□); ABA 100 μ M (○).

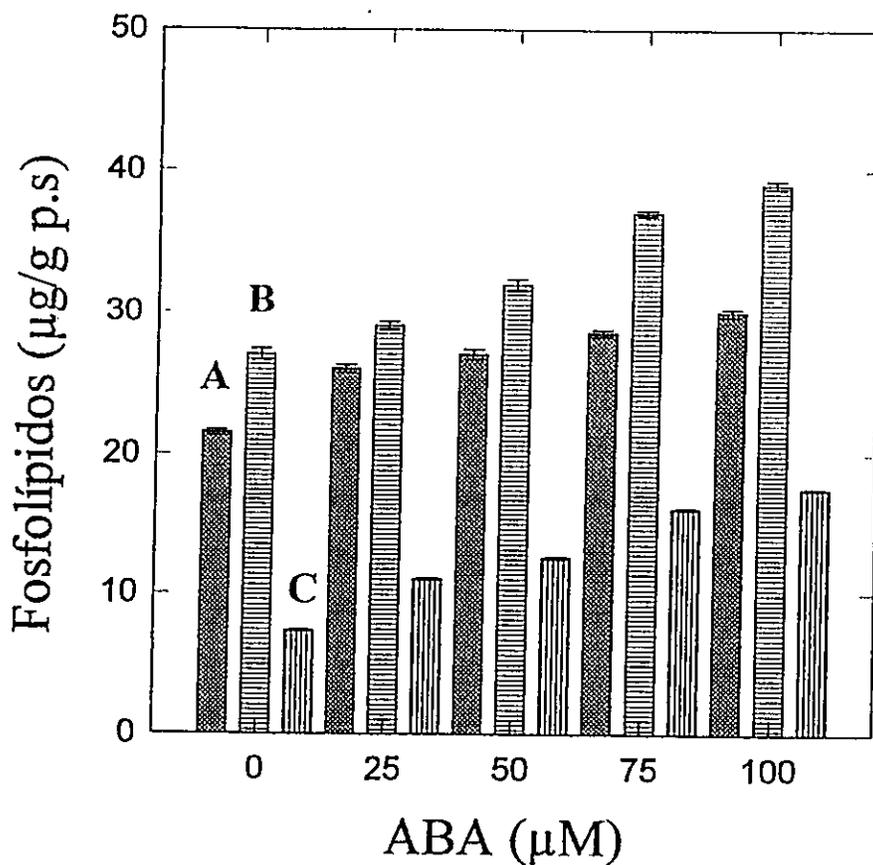


Figura 33. Efecto de la aclimatación con ABA ($100 \mu\text{M}$) sobre el contenido de fosfolípidos en células de cebada susceptibles al frío. Los fosfolípidos fueron determinados mediante HPLC, según se describe en Materiales y Métodos. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones ± 1 error estándar. Fosfatidilinositol (A); Fosfatidilcolina (B); Fosfatidiletanolamina (C).

3.4.1. Tolerancia al déficit hídrico en células aclimatadas al ABA

En la hipótesis se planteó la posibilidad de la existencia de mecanismos comunes de tolerancia a las diferentes condiciones adversas. Por esta razón, se determinó la capacidad para tolerar el déficit hídrico de las células aclimatadas con ABA 100 μM . Estas células toleran muy bien el congelamiento (Fig. 31). Las células fueron incubadas durante 12 horas con diferentes concentraciones de PEG-8000 (0-10%). Al cabo de este tiempo, se determinó el consumo de oxígeno de las células en cada una de las concentraciones de PEG-8000 utilizadas. La capacidad respiratoria de las células se redujo en forma proporcional al contenido de PEG-8000 en el medio de cultivo (Fig. 34). La concentración necesaria para reducir el consumo de oxígeno en un 50% fue equivalente al 5%, que es sobre el 100% superior a la de las células control (2,2%). Entonces, las células de cebada aclimatadas con ABA duplican su capacidad para tolerar el déficit hídrico inducido por PEG-8000.

3.5. Aclimatación de las células al déficit hídrico inducido por PEG-8000.

Si las células de cebada son capaces de aclimatarse al frío, se debería esperar que también fueran capaces de aclimatarse al estrés hídrico. Al determinar los efectos del PEG-8000 sobre las células control, se pudo constatar que el consumo de oxígeno de las células disminuyó por debajo del 50% a concentraciones iguales o mayores al 2%. Por esta razón, se escogió

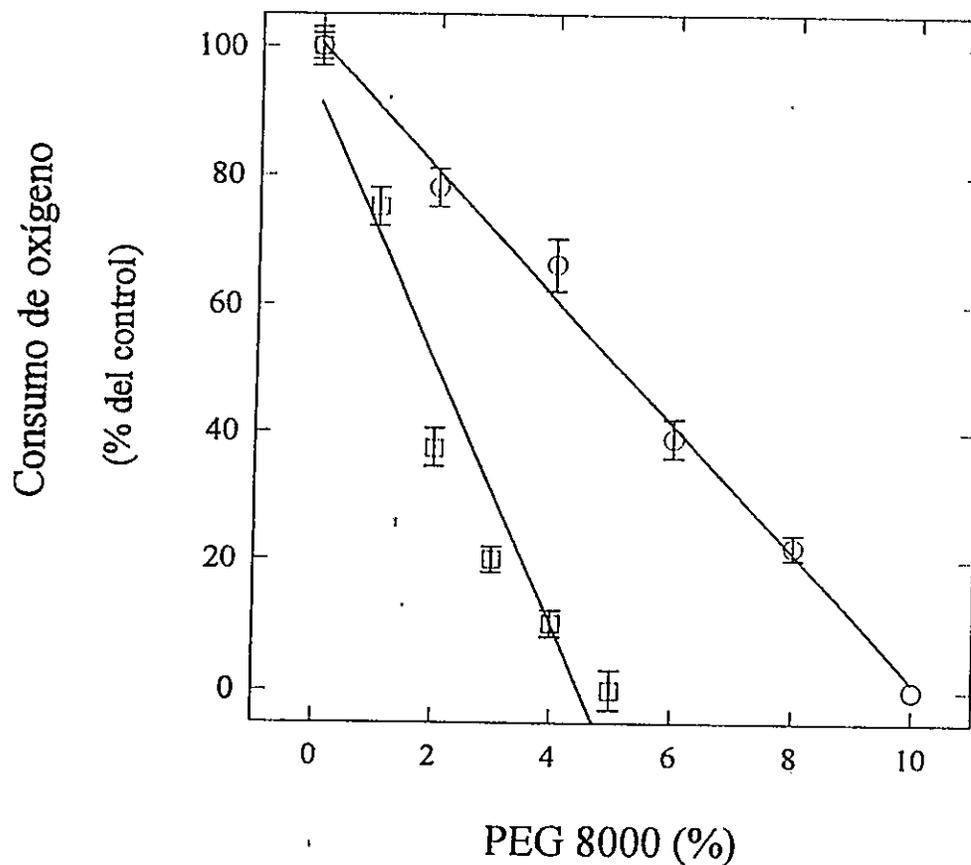


Figura 34. Efecto del ABA en la tolerancia al estrés hídrico inducido por PEG-8000 en células susceptibles al frío crecidas a 28 °C . La tolerancia al déficit hídrico fue determinada midiendo el efecto del PEG sobre el consumo de oxígeno de las células. El consumo de oxígeno de las células en ausencia de PEG fue de $240 \pm 10 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones ± 1 error estándar. Control sin ABA (□); ABA 100 μM (○).

una concentración igual al 2% para aclimatar las células a condiciones de déficit hídrico durante un período de 7 días.

3.5.1. Efecto del déficit hídrico sobre la sobrevivencia de células de cebada. La sobrevivencia de las células no se afectó al utilizar esta concentración de PEG-8000, pues no existen diferencias significativas respecto del control sin PEG-8000 ($P > 0,05$, test de t; Fig. 35). La capacidad de estas células para tolerar niveles de estrés hídrico mayores aumentó levemente con respecto a las células control (desde 2,2 % a 2,8%; Fig. 36). Sin embargo, la magnitud de este incremento fue inferior al observado al aclimatar con ABA (desde 2,2% a 5 %).

3.5.2. Tolerancia al congelamiento y acumulación de solutos en células aclimatadas al déficit hídrico. La aclimatación de células con PEG-8000 aumentó su capacidad para tolerar congelamiento celular en aproximadamente 1,5 °C (Fig. 37). La aclimatación de células con 2% PEG-8000 indujo la acumulación de solutos relacionados con la respuesta a estrés hídrico. La acumulación de prolina fue más rápida que la observada a 4 °C (Fig. 38), mientras que la cinética de acumulación de ABA fue similar a la observada a 4 °C, aunque con un máximo inferior (Fig. 39). La acumulación de sacarosa fue semejante a la observada durante la aclimatación a 4 °C, alcanzándose, no obstante, niveles inferiores (Fig. 40).

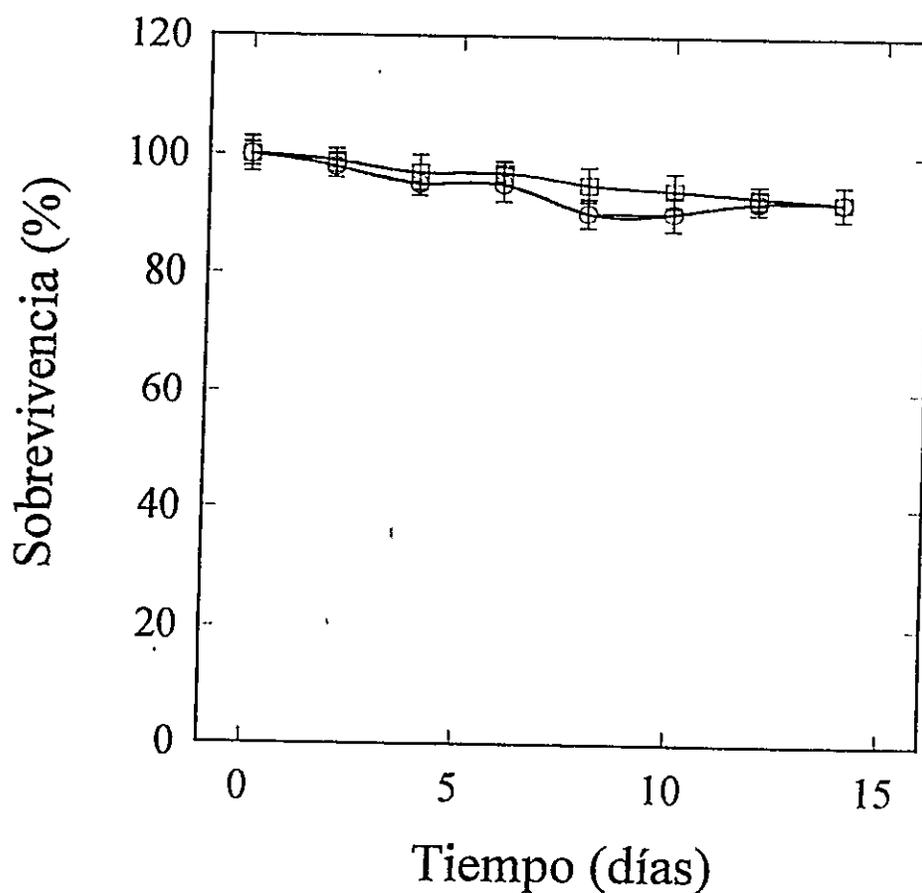


Figura 35. Efecto del PEG-8000 sobre la sobrevivencia de suspensiones celulares de cebada susceptibles al frío mantenidas a 28 °C. La sobrevivencia fue determinada evaluando la capacidad para reducir TTC. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Control sin PEG (\square); Células aclimatadas con 2% PEG-8000 (\circ)

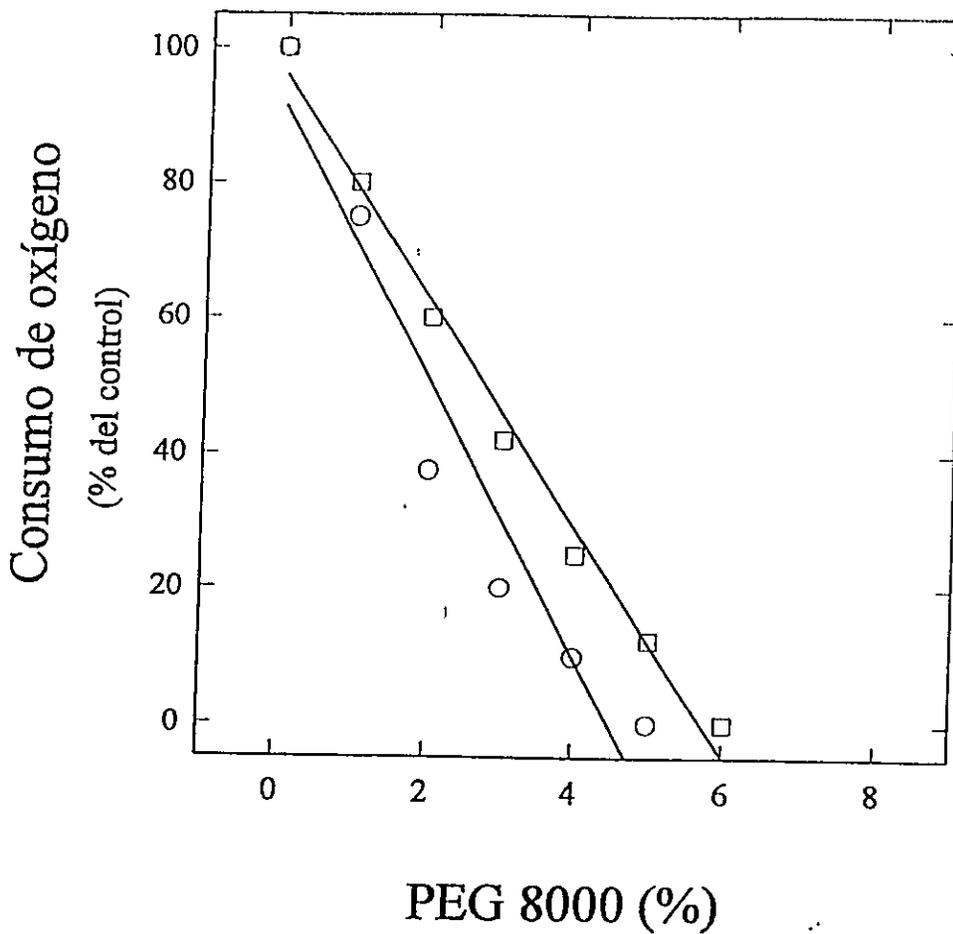


Figura 36. Efecto de la aclimatación con PEG sobre la tolerancia al déficit hídrico en células susceptibles al frío mantenidas a 28 °C. La tolerancia al déficit hídrico fue determinada midiendo los efectos de la concentración de PEG-8000 sobre el consumo de oxígeno. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Control sin PEG (□); Células aclimatadas con 2 % PEG-8000 (○).

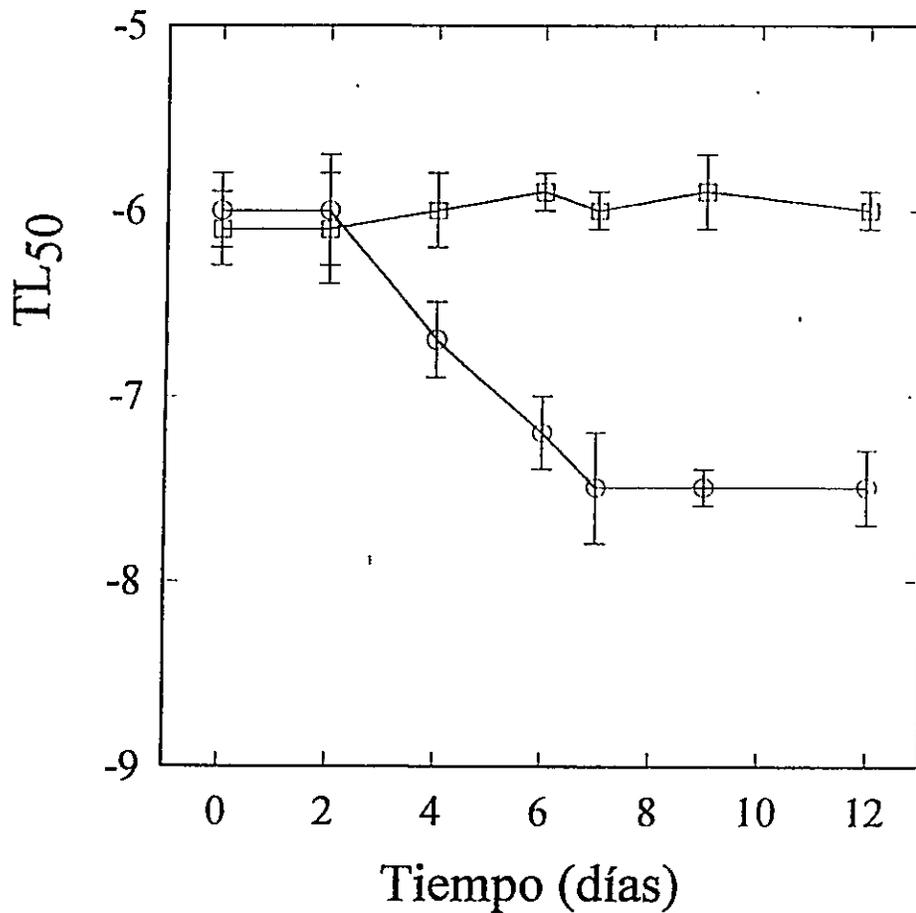


Figura 37. Tolerancia al congelamiento en células de cebadas susceptibles al frío aclimatadas con PEG. La tolerancia al congelamiento fue evaluada luego congelar las células durante 2 horas y determinando la reducción del TTC. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Control sin PEG (□); Células aclimatadas con 2% PEG-8000 (○).

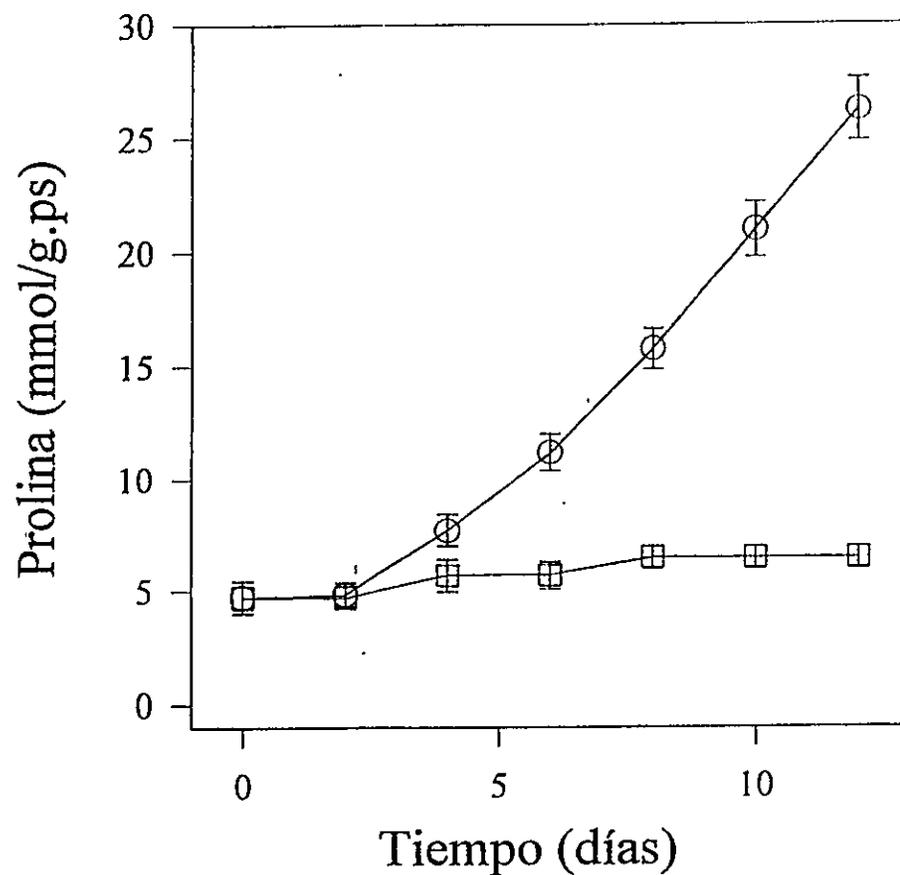


Figura 38. Efecto de la aclimatación con PEG sobre la acumulación de prolina en células susceptibles al frío crecidas a 28 °C. La prolina fue determinada colorimétricamente. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Control sin PEG (□); Células acimatadas con 2% PEG-8000 (○)

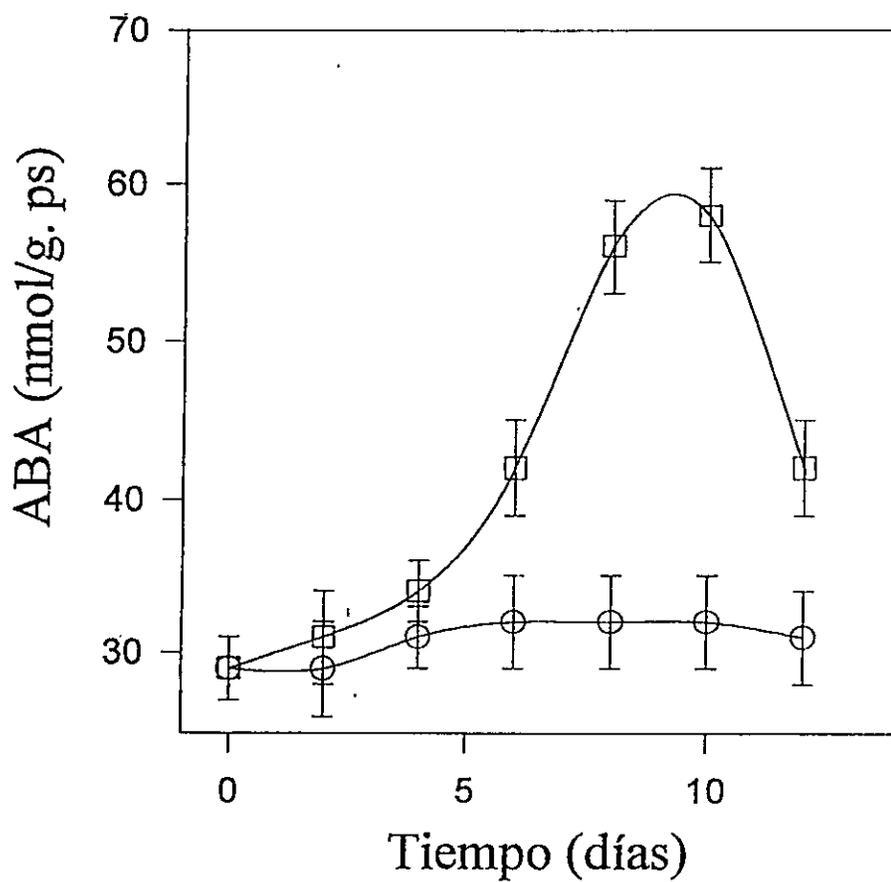


Figura 39. Efecto de la aclimatación con PEG sobre la acumulación de ABA en células susceptibles al frío crecidas a 28 °C. El contenido de ABA de las células fue determinado mediante HPLC. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Control sin PEG (□), Células aclimatadas con 2% PEG-8000 (○)

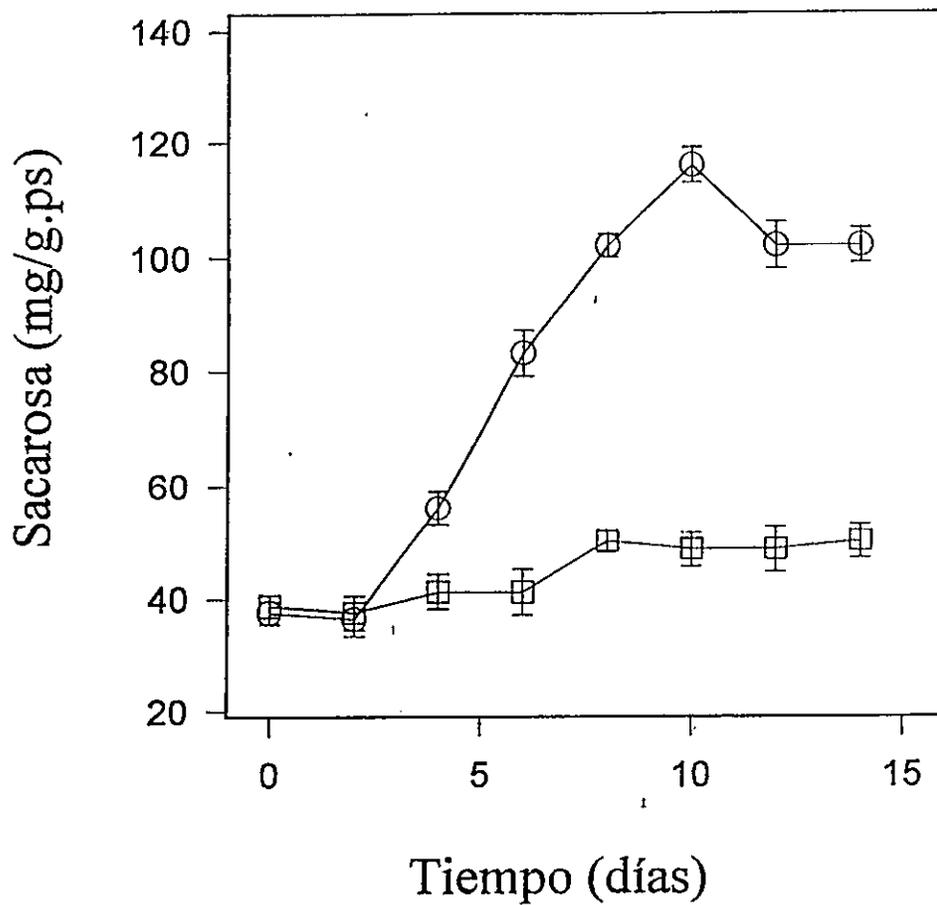


Figura 40. Efecto de la aclimatación con PEG, sobre la acumulación de sacarosa en células susceptibles al frío crecidas a 28 °C. La sacarosa fue determinada mediante HPLC. Cada valor corresponde al promedio de tres repeticiones \pm 1 error estándar. Control Sin PEG (□); Células aclimatadas con 2% PEG-8000 (○).

3.5.3. Efecto de la aclimatación al déficit hídrico sobre el contenido de fosfolípidos. El estrés hídrico puede inducir también alteraciones en los componentes de la membrana plasmática. Por esta razón, se determinaron los efectos de la incubación con PEG-8000 sobre los niveles de lípidos. El contenido de fosfolípidos aumentó al incubar las células en 2% PEG-8000. Los niveles de fosfoinositol, fosfatidilcolina y fosfoetanolamina aumentaron en un 24%, 34% y sólo 7% respecto del control sin PEG (Fig. 41). Los cambios provocados por el PEG fueron menores que los cambios inducidos por el ABA (Fig. 33)

3.6. Efecto del cloruro de colina sobre la tolerancia al congelamiento y déficit hídrico.

En esta última sección de los resultados se mostrarán los efectos de la incubación de las células con cloruro de colina, un precursor de la glicina-betaína y la fosfatidilcolina, sobre la tolerancia al frío y al déficit hídrico.

Como se mostró en la Fig. 23, durante la etapa inicial de la aclimatación de las células a 4 °C, se produjeron alteraciones en las membranas, pues los niveles de MDA aumentaron por efecto del frío. Hacia el final de la aclimatación, cuando las células mostraron una mayor tolerancia al frío,

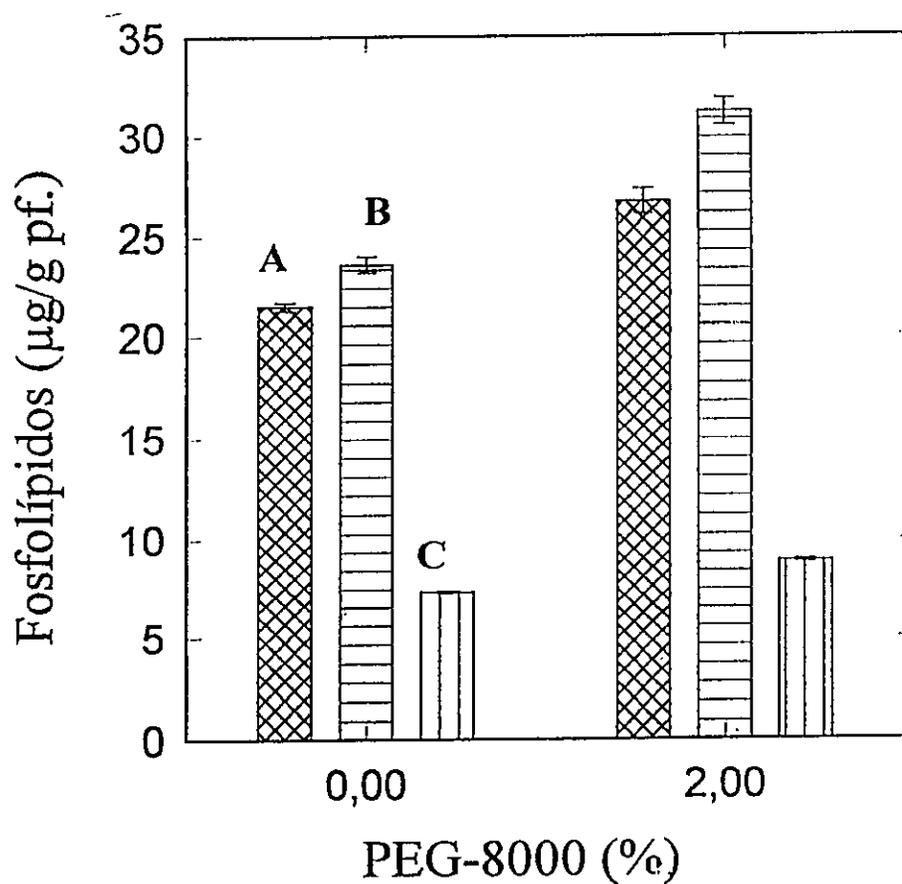


Figura 41 Efecto de la aclimatación con PEG (2 %) sobre el contenido de fosfolípidos en células susceptibles al frío crecidas a 28 °C. Los fosfolípidos fueron separados mediante HPLC. Los valores corresponden al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Fosfatidilinositol (A); Fosfatidilcolina (B); Fosfatidiletanolamina (C).

los niveles de MDA permanecieron constantes. Debido a que diversos trabajos han mostrado que la membrana plasmática puede modular la tolerancia a condiciones de estrés manteniendo su funcionalidad (fluidez), si se modifica en forma artificial la composición de las membranas plasmáticas, se debería modificar la tolerancia de las células al estrés. Con el propósito de verificar esta hipótesis, se incubaron suspensiones celulares en medios suplementados con cloruro de colina (ChCl) durante 7 días. Al cabo de este tiempo se determinó el efecto de la temperatura sobre la sobrevivencia de las células (Fig. 42). Se observa que la tolerancia de las células a las temperaturas bajas aumentó con la concentración de cloruro de colina en el medio de cultivo (Fig. 43), lo cual significa que las células se hicieron más tolerantes. La TL_{50} alcanzada a una concentración 1 mM de ChCl fue de -19°C . Al comparar estos resultados con los obtenidos al aclimatar con ABA se concluye que el grado de tolerancia alcanzado en presencia de ChCl fue menor, pero de todas maneras fue mayor que el alcanzado al aclimatar a 4°C .

3.6.1 Tolerancia al déficit hídrico. Las células aclimatadas con ChCl también fueron capaces de tolerar el déficit hídrico. La concentración de PEG a la cual se produjo la inhibición del 50 % en la capacidad respiratoria de las

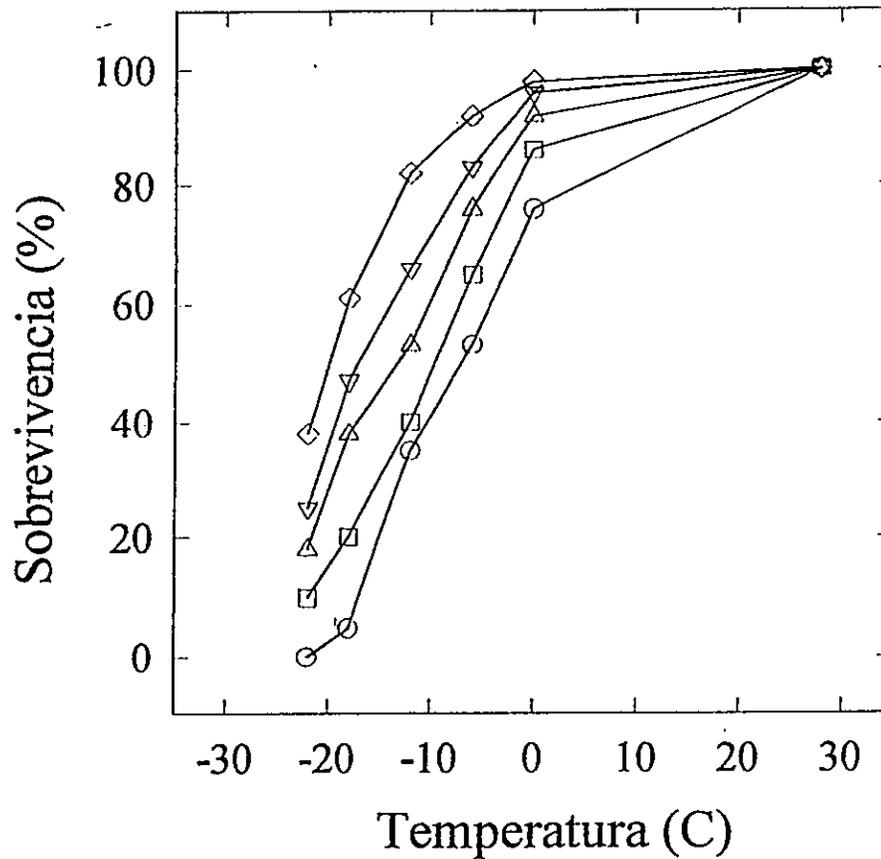


Figura 42. Efecto de la aclimatación con ChCl sobre la tolerancia a temperaturas bajas en células susceptibles al frío. Las células fueron incubadas en presencia de ChCl durante 7 días. La sobrevivencia se determinó midiendo la reducción del TTC. Cada valor corresponde al promedio de 3 muestras \pm 1 error estándar. Control (o); 0,25 (□); 0,5 (Δ); 0,75 (∇) y 1 μ M ChCl (◇).

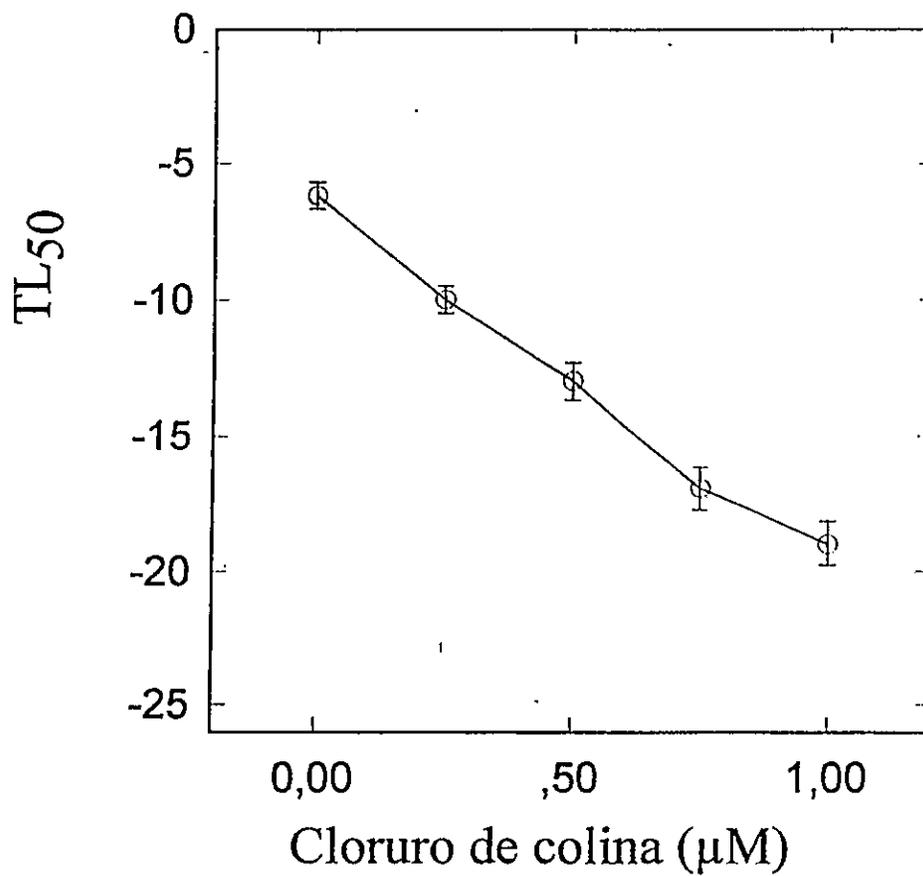


Figura 43. Efecto de la aclimatación con ChCl sobre la TL₅₀ de las células susceptibles al frío. Las células fueron incubadas en ChCl durante 7 días. La tolerancia al congelamiento se determinó midiendo la reducción del TTC luego de congelar las células durante 2 horas. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar.

células fue de aproximadamente un 3,8% (Fig. 44). Esto significa que la capacidad de tolerancia aumentó en aproximadamente un 79%.

3.6.2. Efecto del cloruro de colina sobre la acumulación de solutos. La incubación de células en medios de cultivo con un menor potencial osmótico, puede inducir en estas la acumulación de solutos. Los niveles de prolina aumentaron por efecto del ChCl (Tabla 6), pero en una proporción menor si se compara con la acumulación observada durante la aclimatación a 4 °C (9,6 y 27 mmol/g. p.s., respectivamente) Glicina-betaína no experimentó cambios significativos ($P > 0,05$, test de t). De igual modo la aplicación exógena de cloruro de colina no modificó los niveles endógenos de ABA ($P > 0,05$ test de t) (Tabla 6).

3.6.3. Efecto del cloruro de colina sobre el contenido de fosfolípidos. Para verificar cambios en la composición lípidica de las membranas de las células incubadas con ChCl, se determinaron los niveles de fosfolípidos. El contenido de fosfolípidos aumentó con la presencia de ChCl en el medio de cultivo (Fig. 45). El contenido de fosfatidilcolina aumentó en forma lineal con la concentración de ChCl incorporada en el medio de cultivo ($r = 0,99$).

Los niveles de fosfatidiletanolamina, aumentaron en un 12%, mientras que los niveles de fosfatidilinositol disminuyeron en un 13%. En los ácidos grasos de la fracción de fosfatidilcolina se produjo un aumento significativo en la proporción del ácido linolénico (4,3 veces) (18:3). (Tabla 7). El aumento de

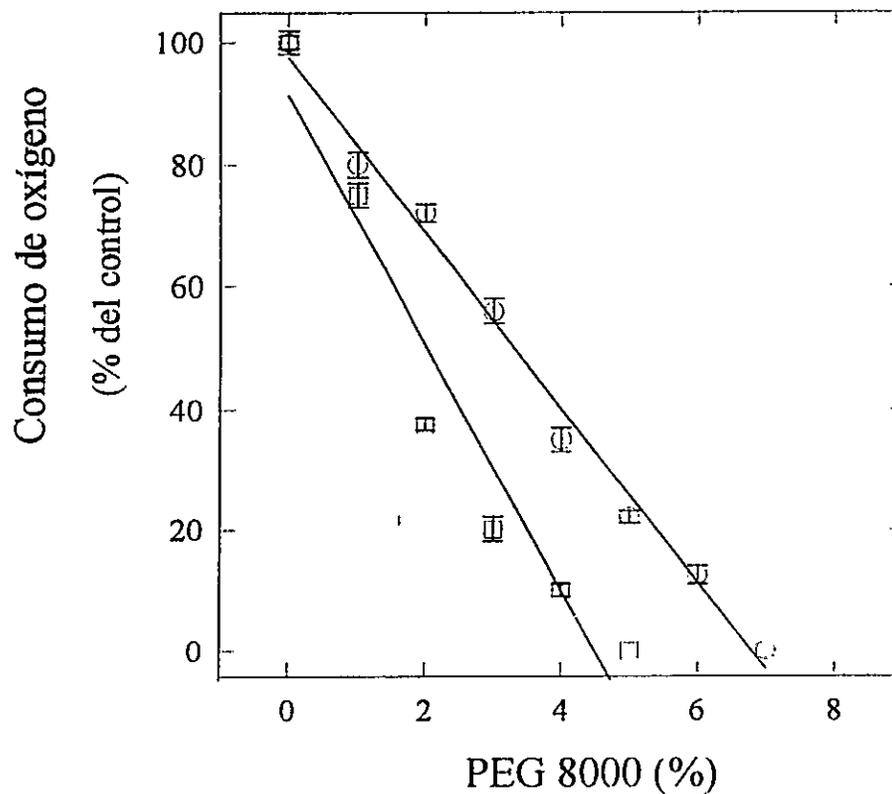


Figura 44. Efecto de la aclimatación con cloruro de colina sobre la tolerancia al déficit hídrico en células susceptibles al frío crecidas a 28 °C. La tolerancia al déficit hídrico se determinó evaluando los efectos del PEG-8000 sobre la actividad respiratoria de las células. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones \pm 1 error estándar. Control sin ChCl (□); Células aclimatadas con ChCl 1 μ M (○)

Tabla 7. Efecto del cloruro de colina sobre el contenido de prolina, glicina-betaína y ABA en suspensiones celulares de cebada cv Atlas 68.

ChCl (μM)	Prolina	Glicina-betaína	ABA
	(mmol/g. ps)		
0	$5,5 \pm 0,3$	$0,10 \pm 0,05$	$35 \times 10^{-6} \pm 3 \times 10^{-6}$
0,25	$6,3 \pm 0,7$	$0,15 \pm 0,05$	$39 \times 10^{-6} \pm 4 \times 10^{-6}$
0,50	$6,8 \pm 0,5$	$0,15 \pm 0,06$	$42 \times 10^{-6} \pm 2 \times 10^{-6}$
0,75	$7,3 \pm 0,7$	$0,20 \pm 0,08$	$39 \times 10^{-6} \pm 3 \times 10^{-6}$
1,0	$9,6 \pm 0,8$	$0,18 \pm 0,06$	$38 \times 10^{-6} \pm 3 \times 10^{-6}$

Prolina y Glicina-betaína fueron cuantificados colorimétricamente, mientras que ABA fue cuantificado mediante HPLC, según se describe en Materiales y Métodos. Cada valor corresponde al promedio de tres mediciones ± 1 error estándar. Las mediciones fueron hechas luego de incubar las células en ChCl $1 \mu\text{M}$ durante 7 días.

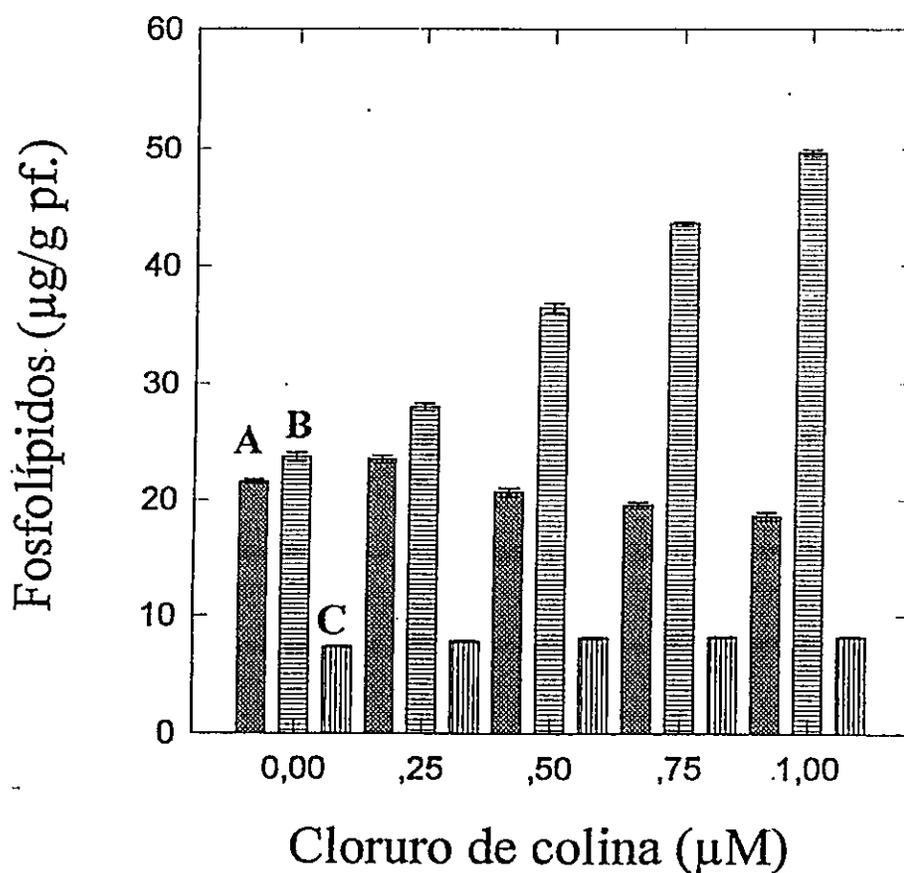


Figura 45. Efecto de la aclimatación con ChCl ($1 \mu\text{M}$) sobre el contenido de fosfolípidos en células de cebada susceptibles al frío. Los fosfolípidos fueron separados y cuantificados mediante HPLC. Cada valor corresponde al promedio de 3 mediciones ± 1 error estándar. Fosfatidilinositol (A); Fosfatidilcolina (B); Fosfatidiletanolamina (C). El tiempo de aclimatación fue de 7 días.

Tabla 8. Proporción de ácidos grasos en la fracción de fosfatidilcolina de células aclimatadas con ChCl.

	Control	Células aclimatadas (mol %)
16:0	20,9 ± 0,6	20,7 ± 0,7
18:0	1,5 ± 0,02	0,7 ± 0,03
18:1	15,1 ± 0,4	14,1 ± 0,3
18:2	59,3 ± 2,8	53,7 ± 1,7
18:3	2,2 ± 0,05	9,5 ± 0,4
Otros	1,0 ± 0,03	1,3 ± 0,05
Índice de insaturacion	3,41	3,61

La fosfatidilcolina fue colectada luego de separar los fosfolípidos mediante HPLC. El contenido de ácidos grasos en la fracción de fosfatidilcolina, fue determinado mediante HPLC, según se describe en Materiales y Métodos. Cada valor corresponde al promedio de tres repeticiones ± 1 error estándar. El índice de insaturación fue determinado mediante la siguiente relación $18:1 + 18:2 + 18:3 / 16:0 + 18:0$.

este ácido, provoca un aumento en el índice de insaturación, lo que podría asociarse con una mayor fluidez de las membranas a bajas temperaturas.

Los resultados mostrados en esta sección, sugieren que al modificar las características de la membrana plasmática, se puede modular la respuesta de las células a condiciones desfavorables.

4. DISCUSIÓN

El propósito principal de esta Tesis, fue estudiar la capacidad de células crecidas en suspensión para aclimatarse al frío y estrés hídrico.

En condiciones naturales las plantas son sometidas a diversos tipos de estrés en forma simultánea. Por ejemplo, un estrés de frío o calor es a menudo acompañado por un estrés hídrico. Para comprender las respuestas de las plantas al ambiente, se deben conocer los mecanismos mediante los cuales una planta se aclimata a los diferentes tipos de estrés ambientales. Una aproximación para comprender dichas interacciones es estudiar las perturbaciones inducidas a nivel celular. Una característica común entre el estrés inducido por frío y sequía es la deshidratación. El fluido extracelular en plantas terrestres contiene una menor cantidad de solutos que el vacuolar (Larcher, 1995). Esta diferencia de concentración combinada con la naturaleza semipermeable de las membranas y la rigidez de la pared celular es responsable de la presión de turgor. El proceso de deshidratación es similar bajo congelamiento y estrés hídrico (Palva, 1990). A medida que el aire se enfría, el hielo crece en el espacio apoplástico, provocando la salida de agua citosólica y el colapso de la célula. El movimiento del agua, ocurre debido a que la presión de vapor del hielo apoplástico es menor que la del agua

citoplasmática y vacuolar a la misma temperatura (Larcher, 1995). En estas condiciones la membrana plasmática no se separa de la pared celular.

La capacidad de la suspensión celular (variedad Atlas 68) para tolerar el congelamiento estuvo en el rango determinado para las hojas (TL_{50} $-5,8$ °C, Bravo, 1996), aunque los métodos empleados en la determinación de su TL_{50} fueron diferentes. En hojas normalmente se determina la capacidad de la membrana para controlar el flujo de iones luego del congelamiento (determinada por cambios en la conductividad que experimenta el agua pura, debido a la salida de iones desde las células). El grado de tolerancia de hojas de plántulas de cebada determinado mediante esta técnica varía entre -5.4 °C (cv Robur) y -10.8 (cv Libra) (Bravo, 1996). En cambio en la determinación del grado de tolerancia al frío en las suspensiones celulares, se emplearon dos metodologías. El primer método se basa en la capacidad de las células para reducir TTC, para lo cual se requiere de la presencia de deshidrogenasas mitocondriales activas, y es indicativo de la viabilidad celular. Este método ha sido utilizado y validado por numerosos autores en estudios sobre tolerancia al frío, pues se ha demostrado que la capacidad de las células para reducir el TTC está en directa relación con la cantidad de células vivas presentes en la muestra (Towill y Manzur, 1975; Chen, *et al.*, 1983). El segundo método, muy relacionado con el anterior, se basó en la determinación de la actividad respiratoria de las células a temperaturas bajas y déficit hídrico. La actividad

respiratoria de las células requiere de mitocondrias funcionales, de manera que cualquier daño que sufra la membrana mitocondrial interna o las enzimas que participan en la cadena transportadora de electrones, afectará el consumo de oxígeno. Por el hecho de estar ambos métodos muy relacionados, se obtuvieron valores similares de temperatura a los cuales se redujo la sobrevivencia o la capacidad respiratoria de las células, aunque levemente inferior en el caso de la reducción del TTC. Recientemente, Ishikawa, *et al.*, (1995), han mostrado que la reducción del TTC, puede sobreestimar la capacidad de las células de plantas leñosas, para tolerar el congelamiento en comparación con otros métodos. Los resultados encontrados en esta tesis, utilizando ambos métodos mostraron muy pocas diferencias, lo que permite sugerir que cualquiera de ellos resulta adecuado para determinar tolerancia, al frío en células de cebada.

La determinación de la capacidad respiratoria de las células también resulta adecuada para evaluar los efectos de otras condiciones adversas sobre las células. Utilizando esta metodología, se determinaron los efectos del PEG-8000 como inductor de déficit hídrico sobre las células. Esta sustancia por su tamaño no puede penetrar la membrana plasmática, de modo que en condiciones de estrés severo las células sufren un colapso. La concentración requerida para reducir el consumo de oxígeno en las células control (crecidas a 28 °C), fue de aproximadamente 2,2% PEG-8000.

Nuestros resultados también demuestran que la exposición prolongada de las células a una condición ambiental desfavorable, puede ser beneficiosa, para la obtención de suspensiones celulares en cantidades apropiadas, pues basta que una célula responda y comience a dividirse para formar una suspensión celular. Además, la obtención de una suspensión celular capaz de crecer a 4 °C, resulta importante, pues el disponer de este material, permitiría caracterizar los mecanismos responsables de la capacidad para crecer a bajas temperaturas. Estas células mostraron una capacidad para tolerar el frío y la sequía mucho mayor que las células crecidas a 28 °C. La capacidad para tolerar el congelamiento aumentó alrededor de 4 °C. Esto tiene importancia, pues como se mencionó con anterioridad, el seleccionar plantas capaces de tolerar 1 °C menos, permitiría aumentar los rendimientos de algunos cultivos (Fowler et al., 1981). De igual modo, estas células mostraron una mayor capacidad para tolerar el estrés hídrico. Entre los mecanismos responsables de esta diferencia se podría sugerir, la acumulación de ABA y sacarosa. Resulta interesante destacar que la acumulación de prolina en estas células (crecidas a 4 °C) no fue muy diferente a la prolina presente en células crecidas a 28 °C. Este resultado apoya la hipótesis planteada por algunos autores en el sentido que este metabolito es un indicador del grado de estrés que sufren las células, más que un indicador del grado de tolerancia (Ibarra-Caballero et al., 1988).

Como era de esperar, las células crecidas en suspensión mostraron al igual que plantas intactas, capacidad de aclimatarse cuando fueron expuestas a 4 °C, durante 20 días. La máxima aclimatación alcanzada por las células fue de alrededor de -9,5 °C. Plantas de esta variedad presentan menor una capacidad para aclimatarse, que la manifestada por las células en suspensión, pues la TL₅₀ varía entre -5,6 y -7.0 °C. Estas diferencias entre las células en cultivo y las plantas intactas en su respuesta a estímulos ambientales y en la capacidad de aclimatación sugiere que no es esencial la organización de las células en tejidos para la expresión de la aclimatación. Además, apoya la premisa que dice que en la determinación de TL₅₀ en tejidos, el valor obtenido corresponde al promedio de los diferentes tipos celulares.

Durante el período inicial de la aclimatación de las células (0-4 día), el valor de TL₅₀ aumentó, para posteriormente disminuir. Este aumento de la TL₅₀ se correlacionó con una disminución en la capacidad respiratoria de las células. Esta menor capacidad respiratoria puede ser el reflejo de daños sobre la membrana mitocondrial o sobre enzimas respiratorias. Las temperaturas bajas generan especies radicalarias que pueden afectar tanto membranas como enzimas. Como se mostró en la Fig. 3.20, durante el período inicial de la aclimatación se produjo un rápido aumento en los niveles de MDA. La producción de MDA es un claro reflejo de lipoperoxidación, producto de la acción de radicales libres, que sufren las membranas celulares (Zhan y

Kirkham, 1994). Concomitantemente, las actividades de las enzimas peroxidasa y catalasa que participan en la respuesta antioxidante de las células, sufrieron cambios. Ambas enzimas disminuyeron su actividad al inicio de la aclimatación, lo que permitiría un aumento de las especies radicalarias. A partir del 6 día, la actividad de ambas enzimas aumentó por sobre el control. Con esto se recupera la capacidad celular para degradar sustancias oxidativas como el H_2O_2 u otras. Un resultado similar obtuvieron en plantas de maíz Prasad *et al.*, (1995). Durante la aclimatación de estas plantas, la actividad de las enzimas guaiacol-peroxidasa y catalasa aumentaron. Prasad *et al.*, (1995) postularon que durante la aclimatación de plántulas de maíz, el H_2O_2 constituye la señal para ciertas enzimas antioxidantes, mientras que en plantas no aclimatadas, el H_2O_2 alcanza niveles tóxicos debido a la baja actividad de estas enzimas.

La aclimatación de las células al frío, involucró al igual que en otros sistemas, una serie de otros cambios, como son la acumulación de prolina, sacarosa, y ABA. La prolina ha sido asociada con la tolerancia al frío en especies tales como cebada, maíz y trigo (Alberdi y Corcuera, 1991, Duncan and Widholm, 1987). El mecanismo mediante el cual la prolina participa en la adquisición de tolerancia al frío, no está claro. Se ha sugerido que esta sustancia puede proteger componentes celulares. Se ha reportado por ejemplo, que la prolina puede proteger la piruvato fosfato dikinasa de maíz contra la

desnaturación por frío (Krall *et al.*, 1989). Herber *et al.*, (1973) mostraron que la prolina 100 mM es capaz de prevenir la inactivación de membranas inducida por el congelamiento. Otra alternativa es que la prolina pueda evitar la lipoperoxidación de las membranas, debido a la acción de especies radicalarias al actuar como un agente antioxidante. Se sabe que esta sustancia es capaz de proteger de la oxidación a aceites insaturados (Ahmad *et al.*, 1983). Sin embargo, las concentraciones utilizadas en estos trabajos fueron muy superiores a los niveles endógenos presentes en las células de cebada (de 27 mmol/kg. ps durante la aclimatación). La acumulación de prolina resultó más tardía que el aumento en la actividad de las enzimas involucradas en los procesos oxidativos probablemente inducidos por radicales libres, dado que se acumuló MDA. Por otra parte, al agregar prolina 10 mM al medio en el cual se midió el consumo de oxígeno a 4 °C, no se observó un efecto protector sobre el metabolismo respiratorio. Lo anterior, no descarta que la prolina esté efectivamente involucrada en algún mecanismo de protección.

El contenido de glicina-betaina no experimentó cambios durante la aclimatación. Esta sustancia ha sido asociada principalmente a estrés salino e hídrico (Levitt, 1980). Una posible explicación al hecho que las células crecidas en suspensión no acumularon glicina-betaina, bajo condiciones adversas, es que este metabolito no se acumula en todas las variedades de cebada (Hanson y Hitz, 1982).

La acumulación de sacarosa a 4 °C se produjo a partir del cuarto día alcanzando su máximo antes que las células alcanzaran su máxima tolerancia al congelamiento. Resulta fácil postular un papel para la acumulación de este azúcar en hojas, pues como hidrato de carbono de reserva puede ser translocado fácilmente desde un sitio a otro dentro de la planta. En cambio, en las células crecidas en suspensión con un carácter heterotrófico, la única fuente para la absorción de sacarosa es medio de cultivo. En estas condiciones, la acumulación de azúcares se relacionaría con una función crioprotectora. En numerosos estudios se ha demostrado una correlación directa entre la acumulación de sacarosa y la adquisición de tolerancia al congelamiento (Levitt, 1980). El papel crioprotector de la sacarosa ha sido documentado por diversos autores (Anchordoguy *et al.*, 1987; Santarius, 1973). Este azúcar protegería las membranas del desecamiento e incremento de la concentración de iones (Herber y Santarius, 1973).

La acumulación de ABA ha sido descrita en diferentes tipos de suspensiones celulares (Grossmann *et al.*, 1986; Hauser *et al.*, 1992). En cebada la acumulación de ABA alcanzó su máximo antes que las células lograran su máxima tolerancia al congelamiento. El papel de esta hormona en la tolerancia al frío ha sido mostrado utilizando mutantes de *Arabidopsis* insensibles o deficientes en ABA (Heino *et al.*, 1990).

Un aspecto importante de esta tesis fue la demostración que células aclimatadas al frío son capaces de tolerar el estrés hídrico. Como se mostró en la Fig. 29 las células aclimatadas al frío toleraron mejor el estrés hídrico inducido por PEG-8000 que las células control. Este resultado avala la hipótesis de la existencia de mecanismos comunes de tolerancia a diferentes tipos de estrés. Entre los factores participantes en estos mecanismos, el ABA parece ser importante, pues como se mencionó anteriormente mutantes de *Arabidopsis* insensibles o deficientes en ABA son incapaces de tolerar ambos tipos de estrés; frío e hídrico (Lang *et al.*, 1994).

Como una forma de verificar la importancia del ABA en la tolerancia de células a condiciones de estrés, se aclimataron células en medios suplementados con esta hormona (0-100 μM). Se ha sugerido que el ABA puede mediar la respuesta de las plantas a estímulos ambientales (Chen *et al.*, 1983), lo que ha sido apoyado por numerosas evidencias: a) Los niveles endógenos de ABA aumentan por efecto de las temperaturas bajas (Daie and Campbell, 1981; Chen *et al.*, 1983; Lalk and Dörffling, 1985; Lang *et al.*, 1994) y sequía (1988; Lang *et al.*, 1994); b) Las plantas son capaces de desarrollar tolerancia al congelamiento en presencia de ABA exógeno, sin que hayan sido aclimatadas (Chen and Gusta, 1983; Lang *et al.*, 1989); c) En las mutantes deficientes en ABA, *aba-1*, se puede inducir tolerancia al congelamiento aplicando ABA exógeno (Heino *et al.*, 1990) y d) Varias de las proteínas

inducidas por bajas temperaturas y sequía son también inducidas por la aplicación de ABA exógeno (Cattivelli y Bartels, 1990, Davis y Jones, 1991)

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la aclimatación con ABA exógeno permitió que las células alcanzaran un mayor grado de tolerancia al frío y al déficit hídrico. A una concentración 100 mM ABA la LT_{50} fue de -30°C y la concentración de PEG-8000 necesaria para reducir el consumo de oxígeno en un 50% fue de alrededor de un 6%. El tiempo requerido para lograr estos valores fue menor que el tiempo requerido durante la aclimatación a 4°C . Por otra, parte los cambios en los niveles de la prolina fueron menores, mientras que la acumulación de sacarosa alcanzó un valor mayor, que la observada durante la aclimatación a 4°C . Esta mayor acumulación de sacarosa, junto con los niveles de ABA interno podrían ser en parte los factores responsables de la tolerancia alcanzada.

Un aspecto interesante de destacar, es que si bien en presencia de ABA exógeno no se observó en las células una acumulación proporcional a la presente en el medio de cultivo, el nivel de ABA acumulado por las células fue mayor que el presente en las células aclimatadas a 4°C , en donde se obtuvo un máximo transitorio. Este mayor nivel "endógeno" de ABA, podría gatillar el mayor grado de tolerancia, probablemente mediante la inducción de ciertas proteínas involucradas en ambos tipos de estrés, como se ha postulado en *A. thaliana*. En esta especie, la tolerancia al congelamiento es dependiente de

factores controlados por ABA, como son las proteínas *RAB* (responsive to ABA) (Mäntylä *et al.*; 1995).

También, en presencia de ABA se produjeron cambios en la composición fosfolípida de las membranas plasmáticas, aumentando los niveles de PC y PE. Este cambio también podría dar cuenta en forma parcial del aumento en la tolerancia al estrés. Por ejemplo, en plantas de arroz resistentes al enfriamiento los niveles de PC y PE se duplican con respecto al de plantas sensibles (Kinney *et al.*, 1987).

Las suspensiones celulares pueden ser también aclimatadas a temperaturas bajas mediante el uso de otros factores adversos. En los estudios realizados para evaluar la aclimatación de las células al déficit hídrico, se pudo constatar que la tolerancia a potenciales hídrico menores aumentó levemente (cerca del 3% de PEG-8000). En estas mismas células la tolerancia al congelamiento aumentó, pero también en una magnitud menor que la alcanzada por efecto de la aclimatación a 4°C o 100 mM ABA. Una probable explicación para esta diferencia es que la concentración utilizada para aclimatar no corresponde a una concentración óptima, pues en ambos casos no fue suficiente para inducir el grado de aclimatación alcanzado durante la aclimatación a 4 °C. Por otra parte, en relación a la acumulación de sustancias involucradas en la tolerancia se pudo constatar que para prolina por ejemplo, se requirió de un menor tiempo para alcanzar los niveles máximos, los que

fueron equivalentes a los encontrados a 4°C. En el caso del ABA, el máximo, semejante al alcanzado a 4°C, se logró en un período de tiempo mayor que el observado a 4 °C. Es posible entonces, que los efectos del ABA no se hayan manifestado por completo y sea necesario también evaluar los efectos del PEG-8000 en un periodo de tiempo mayor a los 12 días.

Como se discutió con anterioridad, la membrana plasmática puede también ser importante, en la tolerancia a condiciones de estrés. En el caso particular del frío, se ha sugerido que la membrana es el sitio primario de daño (Steponkus, 1990). El daño sufrido por las membranas de células de cebada quedó de manifiesto durante la aclimatación a 4 °C, pues se produjo una acumulación de MDA, lo que es indicativo de lipoperoxidación. Al incubar las células en presencia de cloruro de colina, se pudo constatar que las células mejoraron su capacidad para tolerar el congelamiento y el déficit hídrico, en una fracción mayor que la observada durante la aclimatación a 4 °C o con PEG-800. Esta sustancia se incorpora en la fracción de fosfatidilcolina de las membranas. La fosfatidilcolina, es muy importante en el funcionamiento de la membrana. Esta fracción, mostró un enriquecimiento en ácido linolenico (18:3). Diversos trabajos han sugerido que el aumento de este ácido en las membranas, está relacionado con el aumento en la fluidez y por ende en la funcionalidad de las células sometidas a bajas temperaturas (Kodama *et al.*, 1995).

La incubación con cloruro de colina también indujo otros cambios aunque leves en las células. La presencia de ChCl en el medio de cultivo provocó un pequeño ascenso en los niveles de glicina-betaína y uno mayor en los niveles de prolina. Por el contrario, los niveles de ABA no experimentaron cambios. Estos resultados muestran que la composición de la membrana plasmática juega un papel importante en la tolerancia a condiciones de estrés. Sin embargo, a pesar de estas modificaciones con la adición de este fosfolípido, no se alcanzó el grado de tolerancia alcanzado con ABA.

Como se mencionó antes, el proceso de deshidratación inducido por estrés hídrico, es muy similar al inducido por congelamiento, excepto que el espacio extracelular en el tejido estresado contiene aire en lugar de hielo (Palva, 1990). En la medida que la célula pierde agua, se elimina primero el agua de los poros y capilares de la pared celular. A cada nivel de estrés, el potencial hídrico del citoplasma y la vacuola permanecen en equilibrio con el potencial hídrico del apoplasto. Al igual que en el congelamiento, la membrana plasmática no se separa de la pared celular (Palva, 1990).

Si bien una característica común entre el frío y el estrés hídrico es la deshidratación de los tejidos, existen otros aspectos que los diferencian, por ejemplo, la temperatura a la cual ocurre la deshidratación (Larcher, 1995). En el caso de frío, la temperatura puede provocar la inactivación o desnaturalización de enzimas, mientras que bajo déficit hídrico el efecto de la temperatura es

inexistente. Otro aspecto interesante de mencionar, es que la magnitud de la deshidratación inducida por frío o sequía es diferente (Palva, 1990). Esta puede ser una de las causas por las cuales, las células aclimatadas a 4 °C toleran mejor el congelamiento y la sequía que las células aclimatadas con 2% PEG-8000. La deshidratación puede provocar también cambios en las propiedades físicas de los lípidos de las membranas, tendiendo a rigidizarlos. Hay evidencia en la literatura que muestra cambios en la fluidez de la membrana en la medida que la temperatura baja o la deshidratación ocurre (Kodama, *et al.*, 1995; Hubac *et al.*, 1989). Estos cambios en las propiedades de los lípidos pueden provocar desnaturaciones o alteraciones en las propiedades de enzimas asociadas a membranas. Una de estas enzimas es la ATPsintetasa. Se ha reportado que la actividad de esta enzima aumenta durante la aclimatación al frío, en conjunto con un aumento en los niveles del ácido linoleico (18:2) y una disminución del ácido palmítico (16:0) (Browse *et al.*, 1993). La baja en la actividad respiratoria de las células de cebada durante el periodo inicial de la aclimatación al frío podría estar determinada por una menor actividad de estas enzimas en la mitocondrias, lo cual reduciría el transporte de electrones y el consumo de oxígeno.

Para que la funcionalidad de las membranas no se altere en forma significativa durante un período de estrés, deben producirse cambios en sus componentes. Estos cambios pueden ocurrir en forma natural o por la

presencia de precursores agregados en forma exógena al medio de cultivo. Por ejemplo, se ha reportado que en medios suplementados con colina se producen cambios en los niveles de fosfatidilcolina (Chervin *et al.*, 1995). Los resultados mostrados al incubar las células con ChCl, indican que si bien las células aumentan su capacidad para tolerar el frío o la sequía, la magnitud en la cual se verifica este aumento es menor que la observada durante la aclimatación en presencia de ABA. Si se considera que por efecto del ChCl no se observaron cambios en los niveles de ABA, se puede sugerir que no basta con la modificación de las membranas plasmáticas, sino que también deben ocurrir otros cambios que potencien el aumento en la tolerancia.

Un aspecto que no fue abordado en esta tesis y que sería interesante de estudiar es el efecto del ABA sobre la expresión génica, durante la adquisición de tolerancia al frío y la sequía. Existen numerosos trabajos en los cuales se muestran cambios a nivel génico inducidos por ABA (Bray, 1988; Robertson *et al.*, 1987 y 1988). Por ejemplo, la incubación de hojas de tomate en medios suplementados con ABA, induce la acumulación de un conjunto de polipéptidos que también se acumulan en condiciones de estrés hídrico (Bray, 1988). Una situación similar se ha descrito para el ABA y el frío. Sería interesante, estudiar en las suspensiones celulares de cebada, que polipéptidos son inducidos en común por las diferentes condiciones de estrés y verificar su participación en la adquisición de una mayor tolerancia. De esta manera se podría intentar

caracterizar los genes involucrados a fin de utilizar esta información en programas de fitomejoramiento de cultivos.

En resumen, los resultados mostrados permiten validar la hipótesis planteada en el sentido que las suspensiones celulares de cebada son capaces de aclimatarse experimentando cambios fisiológicos y bioquímicos similares a los observados en plantas enteras. Sería interesante poder identificar los cambios moleculares asociados a los cambios fisiológicos y bioquímicos. El disponer de células que se aclimatan al frío debería utilizarse en la caracterización de aquellos genes responsables de la aclimatación e identificar aquellos responsables de la tolerancia al frío y/o la sequía. Esta información podría ser utilizada en la obtención de cultivos tolerantes al frío y la sequía en un periodo de tiempo mucho más cortos que el requerido por los métodos tradicionales de selección. Por otra parte, el disponer de una suspensión o callos capaces de crecer a 4 °C resulta de gran relevancia pues a partir de estas células se podría intentar regenerar plantas o bien caracterizar aquellos genes involucrados en dicha capacidad con el propósito de introducirlos en otras especies susceptibles al frío.

Finalmente los resultados mostrados en esta tesis han demostrado que una célula aclimatada a una determinada condición responde mejor a otra condición desfavorable. Esto significa que en la vía de transducción de señales deben existir etapas comunes y etapas específicas para un determinado estrés. En la

literatura la información existente esta basada en el uso de sistema experimentales modelo como la *Arabidopsis thaliana* y no en plantas de importancia agrícola como son los cereales.

5. CONCLUSIONES

1. Las suspensiones celulares de cebada (cv. Atlas 68), son capaces de aclimatarse al frío y al déficit hídrico. Por lo tanto no es necesaria la organización tisular para que ello ocurra.
2. Al igual que en plantas enteras, durante la aclimatación de células al frío y al estrés hídrico, se producen cambios en los niveles de prolina, sacarosa y ABA. Los niveles de ABA fueron mayores en las células aclimatadas al frío que en las células aclimatadas al estrés hídrico.
3. La tolerancia de las células al congelamiento o el estrés hídrico puede ser modificada incubando las células en presencia de ABA, PEG-8000 o cloruro de colina.

Las células de cebada presentan algunos mecanismos comunes de tolerancia al frío y el estrés hídrico. Al igual que en plantas enteras niveles de ABA y sacarosa y la composición lípídica de las membranas plasmáticas jugarían un papel importante.

6. REFERENCIAS

Acevedo, E., Hsiao, T.C. and Henderson, D.W. (1971) Immediate and subsequent growth responses of maize leaves to changes in water status. *Plant Physiol* **48**, 631-636.

Ahamad, M.M., Al-Hakim, S., Adely, A. and Shehata, Y. (1983) The antioxidant activity of amino-acids in two vegetable oils. *J. Am Oil Chem. Soc.* **60**, 837-840.

Alberdi, M. and Corcuera, L.J. (1991) Cold acclimation in plants. *Phytochemistry* **30**, 3177-3184.

Alberdi, M., Romero, M., Rios, D. and Winzel, G (1985) Altitudinal gradients of seasonal frost resistance of *Nothofagus* communities of Southern Chile. *Acta Oecologica* **6**, 21-30

Alberdi, M., Corcuera, L.J., Maldonado, C., Barrientos, M., Fernández, J. and Henríquez, O. (1993). Cold acclimation in cultivars of *Avena Sativa* L. *Phytochemistry* **33**, 57-60

Anchordoguy, T.J., Rudolph, A.S., Carpenter, J.F and Crowe, J.H. (1987) Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* **24**, 324-331.

Arakawa, K., Katayama, M and Tabake, T (1990) Levels of betaine and betaine-aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves, and etiolated leaves and roots of barley. *Plant Cell Physiol* **31**, 797-803.

Bates, L., Waldren, R and Teare, I (1973) Rapide determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* **39**, 205-207.

Bartels, D., Singh, M. and Salami, F. (1990) Onset of dessication tolerance during development of the barley embryo. *Planta* **175**, 485-492.

Borochoy, A., Halevy, A.H., Borochoy, H. y Schinitzi, M (1978) Microviscosity of plasmalemmas in rose petals as affected by age and environmental factors. *Plant Physiol* **61**, 812-815.

Boyer, J.S. and Bowen, B.L. (1979) Inhibition of oxygen evolution in chloroplasts isolated from leaves with low water potentials. *Plant Physiol.* **45**, 612-615.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 284-254.

Bray, E.A. (1988) Drought- and ABA-induced changes in polypeptide and mRNA accumulation in tomato leaves. *Plant Physiol* **88**, 1210-1214.

Bray, E.A. (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* **103**, 1035-1040.

Bravo, L. (1996) Tolerancia al frío en cebada. Tesis para optar al grado de Doctor. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Bravo, L., Zúñiga, G.E., Corcuera, L.J. and Argandoña, V.H. (1996) Freezing tolerance in barley seedlings infested by aphids. *J. Plant. Physiol* (en prensa).

Browse, J., McConn, M., James, D. and Miquel, D (1993) Mutants of *Arabidopsis* deficient in the synthesis of α -linolenato. Biochemical and genetic characterization of the endoplasmic reticulum linoleoyl desaturase. *J. Biol. Chem.* **268**, 16345-16351.

Cabané, M., Calvet, P., Vincens, P and 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.

Calderón, P. and Pontis, H. H. (1985) Increase of sucrose synthase activity in wheat plants after chilling shock. *Plant Science* **42**, 173-176.

Cattivelli, L. and Bartels, D. (1989) Cold-induced mRNAs accumulate with different kinetics in barley coleoptiles. *Planta* **178**, 184-188.

Cattivelli, L. and Bartels, D. (1990) Molecular cloning and characterization of cold regulated genes in barley. *Plant Physiol.* **93**, 1504-1510.

Chance, B. and Maehly, A.C. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Method. Enzymol.*, **2**, 764-775.

Chen, P.M. and Gusta, L.V. (1982) Cold acclimation of wheat and smooth brome-grass-cell suspensions. *Can J. Bot.* **60**, 1207-1211.

Chen, T.H.H. and Gusta, L.V. (1983) Abscisic acid-induced freezing resistance in cultured cells. *Plant Physiol* **73**, 71-75.

Chen, H.H., Gavinlertvatana, P. and Li, P.H. (1979) Cold acclimation of stem-cultured plants and leaf callus of *Solanum* species. *Bot Gaz.* **140**, 142-147.

Chen, H.H., Li, P.H. and Brenner, M.L. (1983) Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant Physiol* **71**, 362-365.

Chen, S.S. U, and Kou, A.Y. (1982) Improved procedure for the separation of phospholipids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **227**, 25-31.

Chervin, D., Gawer, M., Guern, N. and Mazliak, P. (1995) Modulations of the effect of choline on tobacco cells by a solid medium and sucrose or phosphate supplementation. *Plant Physiol. Biochem.* **33**, 471-478.

Cleland, R. (1971) Cell wall extension. *Ann. Rev. Plant. Physiol* **22**, 179-222.

Cloutier, Y. and Siminovitch, D. (1982) Correlation between cold- and drought-induced frost hardiness in winter wheat and rye varieties. *Plant Physiol* **69**, 256-258.

Close, T.J. and Chandler, P.M. (1990) Cereal dehydrins: serology, gene mapping and potential functional roles. *Aust. J. Plant Physiol* **17**, 333-344.

Creelman, R.A. and Mullet, J.A. (1991) Abscisic acid accumulation at positive turgor potential in excised soybean seedlings growing zones. *Plant Physiol* **95**, 1209-1213.

Daie, J. and Campbell, W.F. (1981) Responses of tomato plants to stressful temperature. Increase in abscisic acid concentration. *Plant Physiol* **67**, 26-29.

Dallaire, S., Houde, M., Gagné, Y., Saini, H.S., Boileau, S., Chevrier, N and Sarhan, F. (1994) ABA and low temperature induce freezing tolerance via distinct regulatory pathways in wheat. *Plant Cell Physiol* **35**, 1-9.

Davies, W.J. and Jones, H.G. (1991) *Abscisic acid: Physiology and Biochemistry*. BIOS Scientific Publishers Limited.

Dixon, R. A. (1985) *Plant Cell Culture. A practical approach*. IRL Press Limited England.

Dhindsa, R.R., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe, T.A. (1981) Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.*, **32**, 93-101.

Dörffling, K., Schulenburg, S., Lesselich, G. and Dörffling, H. (1990) Abscisic acid and proline levels in cold-hardened winter wheat leaves in relation to

variety-specific differences in freezing resistance. J. Agron. Crop Sci. **165**, 230-239.

Dörffling, H. and Lesselich, G. (1993) In vitro-selection and regeneration of hydroxyproline-resistant lines of winter wheat with increased proline content and increased frost tolerance. J Plant Physiol **142**, 222-225.

Dowgert, M.F and Steponkus, P.L. (1984) Behaviour of the plasma membrane of isolated protoplasts during a freeze-thaw cycle. Plant Physiol **75**, 1139-1151.

Dowgert, M.F. Wolfe, J. and Steponkus, P.L. (1987) The mechanics of injury of isolated protoplasts following osmotic contraction and expansion. Plant Physiol **83**, 1001-1007.

Dudits, D., Nemet, G. and Haydu, Z. (1975) Study of callus growth and organ formation in wheat (*Triticum aestivum*) tissue cultures. Can. J. Bot., **53**, 957-963.

Duncan, D.R. and Widholm, J.M. (1987) proline accumulation and its implications in cold tolerance of regenerable maize callus. Plant Physiol. **83**, 703-708.

Eastman, J., Oosterhuis, D. and Walker, S. (1984) Leaf water and turgor potential threshold values for leaf growth of wheat. Agron. J. **76**, 841-847.

Elstner, E.F. and Osswald, W. (1994) Mechanism of oxygen activation during plants stress. Proc. Roy. Soc. Of Edinburgh **102 B**, 131-154.

Flower, T.J. and Yeo, A.R. (1986) ion relations of plants under drought and salinity. Australian J. Plant Physiol. **13**, 75-91.

Fowler, D.B., Gusta, L.V and Tyler, N.J. (1981) Selection for winterhardiness in wheat III. Screening methods. Crop Sci. **21**, 896-901.

Foyer, C. H., Descourvières, P. and Kunert, K.J. (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. Plant Cell Environ. **17**, 507-523.

Gilmour, S.J., Hajela, R.K., and Thomashov, M. F (1988) Cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol **87**, 745-750.

Gordon-Kamm, W.J. y Steponkus, P.L. (1984a) The behaviour of the plasma membrane following osmotic contraction of isolated protoplasts: Implications of freezing injury. Protoplasma **123**, 83-94.

Graham, D and Patterson, B.D. (1982) Responses of plants to low non-freezing temperatures: protein metabolism, and acclimation. Annu. Rev. Plant Physiol. **33**, 347-372.

Grieve, C and Grattan , S. (1983) Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. Plant and Soil **70**, 303-307.

Grossmann, K., Rademacher, W and Jung, J. (1986) Changes in membrane permeability and mineral, phytohormone and polypeptide composition in rice suspension cells during growth and under the influence of the growth retardant tetcyclacis. *Plant Cell Rep.* **5**: 315-318.

Grumet and Hanson, A.D. 1986

Guy, C.L. (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**, 187-223.

Guy, C.L. and Haskell, D. (1987) Induction of freezing tolerance in spinach is associated with the synthesis of cold acclimation induced proteins. *Plant Physiol* **84**, 872-878.

Guy, C.L., Niemi, K.J. and Brambl, R. (1985) Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 3673-3677.

Guy, C.L., Haskell, D. and Yelenosky, G. (1988) Changes in the freezing tolerance and polipeptide content of spinach and citrus at 5 °C. *Cryobiology* **25**, 264-271.

Hajela, R.K., Horvath, D.P., Gilmour, S.J and Thomashov, M.F. (1990) Molecular cloning and expresion of cor (cold-regulated) genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **93**, 1246-1252.

Hanson, A.D. and Hitz, W.D. (1982) Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**, 930-938.

Hauser, C., Kwiatrowski J., Jung, J, and Grossmann, K. (1992) Accumulation of abscisic acid in cell suspension cultures of oilseed rape treated with the growth retardant BAS 111..W: Effects of osmotic potential and potassium, water and sugar content. *J. Plant Physiol* **140**, 747-753.

Heber, U., Tyankova, L. and Santarius, H. A. (1971) Stabilization and inactivation of biological membranes during freezing in the presence of amino acids. *Acta Biochim. Biophys.* **241**, 578-592.

Heino, P., Sandman, G.m, Lang, V., Nordin, K. and Palva, E.T. (1990) Abscisic acid deficiency prevents development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Theor. Appl Genet* **79**, 801-806.

Hsiao, T.C. (1973) Plant responses to water deficit. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**, 519-570.

Hughes, M.A. and Pearce, R.S. (1988) Low temperature treatment of barley plants causes altered gene expression in shoot meristems. *J. Exp. Bot.*, **39**, 1461-1467.

Hubac, C., Guerrier, D., Ferran, J. and Trémolières, A. (1989) Changes in lipid composition during water stress in two genotypes of *Lupus albus* resistant or susceptible to drought. *Plant. Physiol. Biochem.*, **27**, 737-744.

Ibarra-Caballero, J., Villanueva-Vedugo, C., Molina-Galán J. and Sánchez- de Jiménez, E. (1988) Proline accumulation as a symptom of drought stress in maize: A tissue differentiation requirement. *J. Exp. Bot.* **39**, 889-897.

Irving, R.M. (1969) Characterization and role of an endogenous inhibitor in the induction of cold hardiness of *Acer negundo*. *Plant Physiol* **44**, 801-805.

Ishikawa, M., Robertson, A. and Gusta, L.V. (1995) Comparison of viability tests for assessing cross-adaptation to freezing, heat and salt stress induced by abscisic acid in bromegrass (*Bromus inervis* Leyss) suspension cultured cells. *Plant Science* **108**, 83-93.

Johnson-Flanagan, A.M. and Singh J. (1987) Alteration of gene expression during the induction of freezing tolerance in *Brassica napus* suspension cultures. *Plant Physiol* **85**, 699-705.

Kacperska-Palacz, A., Dlugokecka, E., Breitenwald, B.W, and B. (1977) Physiological mechanisms of frost tolerance: Possible role of protein in plant adaptation to cold. *Biol. Plant.* **19**, 10-17.

Karp. A. and Lazzeri, P.A. (1992) Regeneration, Stability and Transformation of Barley. En "Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology. Shewy, P.R. C.A.B. Internationat, Wallinford, UK.

Keith, C.N. and McKersie, B.D (1986) The effect of abscisic acid on the freezing tolerance callus cultures of *Lotus corniculatus* L. Plant Physiol **80**, 766-770.

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

Kendall, E.J. and McKersie, D. B. (1986) The effect of abscisic acid on the freezing tolerance of callus of *Lotus corniculatus* L. Plant Physiol **80**, 766-770.

Kendall, E.J. and McKersie, D. B. (1989) Free radicals and freezing injury to cell membranes in winter wheat. Physiol. Plant **76**, 86-94.

Kinney, A.J., Clarkson, D.T. and Loughman, B.C. (1987) The regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in rye (*Secale cereale*) roots. Stimulation of the nucleotide pathway by low temperature. Biochem. J., **242**, 755-759.

Kodama, H., Horiguchi, G., Nishiuchi, T., Mishimura, M. and Iba, K. (1995) Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one factor involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves. Plant Physiol **107**, 1177-1185.

Koster, K.L. and Lynch, D.V. (1992) Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. Plant Physiol. **98**, 108-113.

- Krall, J.P., Edwards, G.E. and Andreo, C.S. (1989) Protection of pyruvate, Pi dikinase from maize against cold lability by compatible solutes. *Plant Physiol.* **89**, 649-651.
- Kushad, N.M. and Yelenosky, G. (1987) Evaluation of polyamine and proline levels during low temperature acclimation of citrus. *Plant Physiol* **84**, 692-695.
- Lalk, I. and Dörffling, K. (1985) Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter varieties. *Physiol. Plant* **63**, 287-292.
- Láng, V., Heino, P and Palva, E.T. (1989) Low temperature acclimation and treatment with exogenous, abscisic acid induce common polypeptides in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* **77**, 729-734.
- Láng, V., Mantyla, E., Welin, B., Sundberg, B. and Palva, E.T. (1994) Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of Rab18 gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **104**, 1341-1349.
- La Rosa, P.C., Handa, A.K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A (1985) Abscisic acid accelerates adaptation of cultured tobacco cells to salt. *Plant Physiol* **79**, 138-142.
- Larcher, W (1995) *Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups.* Third Edition. Springer- Verlag. Berlin, Heidelberg.

Larcher, W. and Bauer, H. (1981) Ecological significance of resistance to low temperature: In Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B. and Ziegler, H. (eds): "Encyclopedia of Plant Physiology, Vol 12A. Berlin Springer- Verlag, pp. 403-437.

Levitt, J. (1980) Responses of Plants to Environmental Stress: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. 2nd ed. Academic Press, New York.

Livingston, D.P. III., Ollien C.R. and Freed R. D. (1989) Sugar composition and freezing tolerance in barley crowns at varying carbohydrate levels. *Crop Sci.* **29**, 1266-1279.

Lipp, J. (1991) detection of ABA and proline in pollen. *Biochem. Physiol.Pflazen.* **187**, 211-216.

Maldonado, C., Zúñiga, G.E., Corcuera, L.J. and Alberdi, M (1996) Effect of water stress on frost resistance of oat leaves. *Environmental and Experimental Botany* (en prensa).

Martin, B., Otr, D.R. and Boyer, J.S. (1981) Impairment od photosynthesis in thermophilic higher plants. *Plant Cell Environ.* **9**, 323-331.

Mäntyla E., Láng, V. and Palva E.P. (1995) Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LTI78 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **107**, 141-148.

Meza-Basso, L., Alberdi, M., Raynal, M., Ferero-Cadinanos, M. L and Delseny, M. (1986) Changes in proteins synthesis in rapessed (*Brassica napus*) seedlings during a low temperature treatment. *Plant Physiol* **82**, 733-738.

Miquel, M., James, D., Dooner, H. and Browse (1993) *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6208-6212.

Mohapatra, S.S., Poole, R.J. and Dhindsa, R.S. (1987a) Changes in protein patterns and translatable messenger RNA populations during cold acclimation of alfalfa. *Plant Physiol* **84**, 1172-1176.

Mohapatra, S.S., Poole, R.J. and Dhindsa, R.S. (1987b) Cold acclimation, freezing resistance, and protein synthesis in alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Saranac), *J. Exp. Bot.* **38**, 1697-1903.

Mohapatra, S.S., Poole, R.J. and Dhindsa, R.S. (1988a) Alterations in membrane protein-profile during cold treatment in alfalfa. *Plant Physiol* **86**, 1005-1007.

Mohapatra, S.S., Poole, R. J. and Dhindsa, R.S. (1988b) Absciscic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. *Plant Physiol* **87**, 486-473.

- Mohapatra, S. S., Wolfrain, L., Poole, R.J. and Dhindsa, R.S. (1998) Molecular cloning and relation to freezing tolerance of cold-acclimation-specific genes of alfalfa. *Plant Physiol.* **89**, 375-380.
- Morgan, J.M. (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **51**, 914-916.
- Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y and Nishida, I. (1992) Genically engineered alterations in the chilling sensitive in plants. *Nature* **356**, 710-713.
- Murelli, C., Rizza, F., Albin, F.M., Dulio, A., Terzi, V. and Carivelli, L. (1995). Metabolic changes associated with cold-acclimation in contrasting cultivars of barley. *Physiologia Plantarum* **94**, 87-93.
- Nachlas, M.M., Marguhes, S.I. and Seligman, A.M. (1960) Sites of electron transfer to tetrazolium salts in the succinoxidase system. *J. Biol. Chem.* **235**, 2739-2743.
- Orr, W., Keller, W. and Singh, J. (1986) Induction of freezing tolerance in an embryogenic cell suspension culture of *Brassica napus* by abscisic acid at room temperature. *J. Plant Physiol.* **126**, 23-32.
- Paleg, J.P., Steward, G.R. and Bradbeer, J.W. (1984) Proline and Glycinebetaine influence protein solvation. *Plant Physiol.* **75**, 974-978.

Palva, J.P. (1990) Stress interactions at the cellular and membrane levels. *HortScience* **25**, 1377-1381.

Palta, J.P. and Li, P-H. (1982) Alterations in membrane transport properties by freezing injury in herbaceous plants. evidence against rupture theory. *Plant Physiol*, **50**, 169-175.

Perras, M. and Sarhan, F. (1989) Synthesis of freezing tolerance proteins in leaves, crown and roots during cold acclimation of wheat. *Plant Physiol*. **89**, 577-585.

Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A. and Steward, C.R. (1994) Evidence for chilling oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* **6**, 65-74.

Purvis, A.C. and Yelenosky, G. (1982) Sugar and proline accumulation in grapefruit flavedo and leaves during cold hardening of young trees. *Physiol. Plant* **80**, 159-168.

Purvis, A.C. and Shewfelt, R.L. (1993) Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues?. *Physiol Plant* **88**, 712-718.

Quartacci, M.F. and Navari-Izzo, F. (1992) Water stress and free radical mediated changes in sunflower seedlings. *J. Plant Physiol*. **139**, 621-625.

Riazi, A., Matsuda, K. and Areland A. (1985) Water- stress induced changes in concentrations of proline and other solutes in growing regions of young barley leaves. *J. Exp. Bot.*, **36**, 1716-1725.

Reaney, M.J.T. and Gusta, L.V. (1987) Factors influencing the induction of freezing tolerance by abscisic acid in cell suspension cultures of *Bromus inervis* Leyss and *Medicago sativa* L. *Plant Physiol* **83**, 423-427.

Robertson, A.J., Gusta, L.V., Reaney, M.J.T. and Ishikawa, M. (1987) Protein synthesis in bromegrass (*Bromus inervis* Leyss) cultured cells during the induction of frost tolerance by abscisic acid or low temperature. *Plant Physiol.* **84**, 1331-1336.

Robertson, A.J., Gusta, L.V., Reaney, M.J.T. and Ishikawa, M. (1988) Identification of proteins correlated with increased freezing tolerance in bromegrass (*Bromus inervis* Leyss. cv Manchar) cell cultures. *Plant Physiol* **86**, 344-347.

Rhodes, D. and Hanson, A.D. (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Ann, Rev. Plant. Physiol. Plant Mol.Biol.* **44**, 357-384.

Running, G.W. and Read, C.P. (1980) Soil temperature influences on root resistance of *Pinus cortorta* seedlings. *Plant Physiol* **65**, 635-640.

Sachs, M.M. and Ho, T-H.D. (1986) Alterations of gene expression during environmental stress in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol* **37**, 363-376.

Sakai, A. and Larcher, W. (1987) *Frost Survival of Plants: Responses and Adaptations to Freezing Stress*. Springer-Verlag, Berlin and New York.

Santarius, K.A. (1973) The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance. *Planta* **113**, 105-114.

Siminovitch, D. and Cloutier, Y. (1982) Twenty-four hours induction of freezing and drought tolerance in plumules of winter rye seedlings by desiccation stress at room temperature in the dark. *Plant Physiol* **69**, 250-255.

Siminovitch, D. and Cloutier, Y. (1983) Drought and freezing tolerance and adaptation in plants. Some evidence for near equivalences. *Cryobiology* **5**, 202-225.

Singh, J., Lu, B. and Johnson-Flanagan, A.M. (1987) Membrane alterations in winter rye and *Brassica napus* cells during lethal freezing and plasmolysis. *Plant Cell Environ* **10**, 163-168.

Somerville, C. and Browse, J. (1991) Plant lipids: metabolism, mutants and membranes. *Science* **252**, 80-87.

Sgherri, C.M. and Navari-Izzo, F. (1995) Sunflower seedlings subjected to increasing water stress: oxidative stress and defense mechanisms. *Physiolgia Plant.* **93**, 25-30.

Smirnoff, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* **125**, 27-58.

St John, J.B., Christiansen, M.N., Ashworth, E.N. and Gentner, W.A. (1979) Effect of BASF 13-338, a substituted pyridazidone, on linolenic acid levels and winterhardiness of cereals. *Crop Science* **19**; 65-69.

Steponkus, P.L. (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol* **35**, 543-581.

Steponkus, P.L. and Lynch, D.V. (1989) Freeze/thaw-induced destabilization of the plasma membrane and the effects of cold acclimation. *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**, 24-21.

Steponkus, P.L. and Weist, S.G. (1979) Freeze-thaw induced lesions in the plasma membrane. In *Low Temperature Stress in Crops Plants: The Role of the Membranes*. Lyons, J.M., Graham, D. and Raison, J.K. eds. Academic Press, New York.

Steponkus, P.L., Uemura, M. and Webb, M.S. (1993) A contrast of the cryostability of the plasma membrane in winter rye and spring oat- two species

that widely differ in their tolerance and plasma membrane composition. En *Advances in Low-Temperature Biology*. JAI Press. London.

Tognetti, J.A., Calderón, P.L. and Pontis, H.H. (1989) Fructan metabolism. Reversal of cold acclimation. *J. Plant Physiol* **134**, 232-236.

Towill, L.E. And Manzur, P. (1974) Studies on the reduction of 2,3,5 trypheniltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue culture. *Can. J. Bot.* **53**, 1097-1102.

Thomashow, M.F. (1990) Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Adv. Gen.* **28**, 99- 131.

Turner, N. (1975) Concurrent comparison of stomatal behaviour water status, and evaporation of maize in soil at high or low water potential. *Plant Physiol* **55**, 932-936.

Turner, N. (1986) Crop water deficits: a decade of progress. *Adv. Agron.* **39**, 1-51.

Trunova, T.I. (1982) Mechanism of winter wheat hardening at low temperature. En "Plant Cold Hardiness and Freezing Stress: Mechanism and Crop Implications" Li, P.H. and Sakai, A. eds. Academic Press, New York.

Uemura, M. and Yoshida, S. (1984) Involvement of plasma membrane alterations in cold acclimation of winter rye seedlings (*Secale cereale* L. cv Puma) *Plant Physiol* **75**, 818-826.

Wagner, W., Wiemken, A. and Matile, Ph. (1986) Regulation of fructan metabolism in leaves of barley (*Hordeum vulgare* cv Gerberl). *Plant Physiol* **81**, 444-447.

Williams, J.P., Khan, M.U., Mitchell, K. and Johnson, G. (1988) The effect of temperature on the level and biosynthesis of unsaturated fatty acids in diacylglycerols of *Brassica napus* leaves. *Plant Physiol.* **83**, 904-910.

Wise, R.R. and Naylor, A.E. (1987) Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol* **83**, 278-282.

Wolter, F.P., Schmidt, R. and Heinz, E. (1992) Chilling sensitivity of *Arabidopsis thaliana* with genetically engineered membrane lipids. *EMBO J.* **11**, 4685-4692.

Wu, J. and Browse, J. (1995) Elevated levels of high-melting point phosphatidylglycerols do not induce chilling sensitivity in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* **7**, 17-27.

Xin, Z. and Li, P.H. (1992) Abscisic acid-induced tolerance in maize suspension-cultured cells. *Plant Physiol.* **99**, 707-711.

Yoshida, S. and Uemura, M. (1984) Proteins and lipid compositions of isolated plasma membranes from orchard grass (*Dactylis glomerata* L) and changes during cold acclimation. *Plant Physiol* **75**, 31-37.

Zhang, J. and Kirham, M.B. (1994) Drought-stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol* **35**, 785-791.

Zúñiga, G.E., Fernández, J., Cristi, R., Alberdi, M. and Corcuera, L.J. (1990) Lipid changes in barley seedlings subjected to water and cold stress. *Phytochemistry* **29**, 3087-3090.