

DOC-B  
0475  
c.1

**ESTUDIO DE MECANISMOS DE TERMOTOLERANCIA EN  
PLANTAS DE *Prosopis chilensis***

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



Claudia Andrea Ortiz Calderón

Septiembre, 1997

Directora de Tesis: Liliana Cardemil Oliva

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

**Informe de Aprobación**

**Tesis de Doctorado**

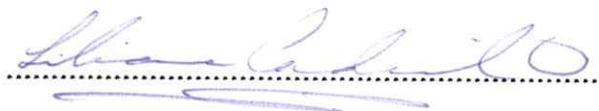
Se informa a la Escuela de Posgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

**CLAUDIA ANDREA ORTIZ CALDERON**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Ciencias con mención en Biología, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día \_\_\_\_\_, de Septiembre de 1997.

Directora de Tesis:

Dra. Liliana Cardemil O.



Comisión de Evaluación de la Tesis:

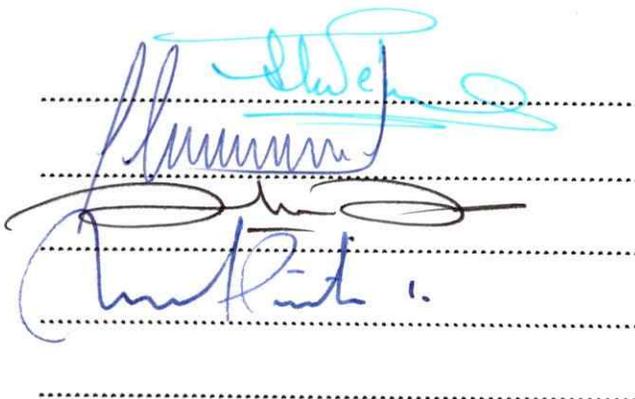
Dra. Luz María Pérez (Presidente)

Dr. Luis Corcuera

Dr. Carlos Jerez

Dr. Manuel Pinto

Dr. Francisco Squeo



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis agradecimientos a quienes aportaron a mi formación profesional y personal durante estos años. A mis compañeros de laboratorio por el apoyo y la convivencia. A mis compañeros de Facultad por las visiones compartidas. A mi tutora, por la formación y la crítica que permitieron darle forma a esta tesis. A mi familia, quienes silenciosamente me entregaron el mejor apoyo que se podría recibir. A mis amigos y amigas por el cariño y la aceptación que me han brindado.

Finalmente quisiera agradecer a la Red Latinoamericana de Botánica, a Fondecyt (Proyecto para Estudiantes de Doctorado 2950043) y al DTI de la Universidad de Chile, sin cuya ayuda material esta tesis no hubiese sido posible.

## INDICE DE MATERIAS

	página
TITULO	
AGRADECIMIENTOS	
INDICE	iii
LISTA DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	ix
LISTA DE REACTIVOS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiv
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
1.1 Fisiología del estrés térmico	1
1.2 Proteínas de estrés térmico	4
1.3 <i>Prosopis chilensis</i> como modelo experimental	11
1.4 Objetivos	14
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>16</b>
2.1 Material vegetal para análisis en terreno	16
2.2 Material vegetal para análisis de simulación	16
2.3 Condiciones luminosas en la cámara de crecimiento	17

2.4	Condiciones de humedad y temperatura	18
2.5	Experimentos de estrés térmico	18
2.6	Determinación de asimilación de CO <sub>2</sub>	19
2.7	Determinación de conductancia estomática	19
2.8	Determinación de prolina	20
2.9	Contenido de azúcares solubles y sacarosa	20
2.10	Evolución de oxígeno	21
2.11	Evolución de etileno en <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i>	22
2.12	Emisión de fluorescencia en <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i>	22
2.13	Germinación y crecimiento en <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i>	23
2.14	Temperatura letal en <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i>	24
2.15	Determinación del contenido de proteínas	24
2.16	Análisis electroforético	25
2.17	Análisis Western	26
2.18	Dot blot, inmunodetección y análisis densitométrico	27
2.19	Extracción de RNA	28
2.20	Análisis Northern	29
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>31</b>
3.1	Determinación de temperatura, tasa fotosintética, conductancia estomática y potencial hídrico en <i>Prosopis chilensis</i> bajo condiciones de terreno simuladas	31
3.1.1	Temperatura foliar	31
3.1.2	Asimilación de CO <sub>2</sub>	32
3.1.3	Conductancia estomática	35
3.1.4	Potencial hídrico	36
3.2	Acumulación de azúcares reductores solubles, sacarosa y prolina	36
3.2.1	Azúcares solubles y sacarosa	40

3.2.2 Contenido de prolina	41
3.2.3 Evolución de oxígeno en presencia de prolina	41
3.2.4 Efecto de prolina sobre la evolución de oxígeno en cloroplastos	43
3.3 Evolución de etileno en plántulas de <i>P. chilensis</i> sometidas a estrés térmico	45
3.3.1 Evolución de etileno a distintos tiempos de germinación	45
3.4 Ubiquitina libre, ubiquitina conjugada y HSP70 en plantas de <i>P. chilensis</i> bajo condiciones simuladas	46
3.4.1 Western blots para ubiquitina libre y ubiquitina conjugada	49
3.4.2 Inmuno dot blots para ubiquitina libre y ubiquitina conjugada	50
3.4.3 Inmuno dot blots para HSPs de 70 KDa	53
3.5 Análisis comparativo de la respuesta a estrés térmico en <i>P.</i> <i>chilensis</i> y <i>G. max</i>	55
3.5.1 Efecto de la temperatura sobre la germinación y el crecimiento de <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i>	55
3.5.2 Temperatura letal (TL <sub>50</sub> ) en hojas de <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i>	56
3.5.3 Emisión de fluorescencia en plantas de <i>P. chilensis</i> y <i>G.</i> <i>max</i>	60
3.5.4 Efecto de la temperatura sobre la evolución de etileno	61
3.6 Presencia de ubiquitina libre, ubiquitina conjugada y HSP70	63
3.6.1 Análisis inmuno dot blot y Western blot para ubiquitina libre	65
3.6.2 Análisis inmuno dot blot y Western blot para ubiquitina conjugada	65
3.6.3 Análisis inmuno dot blot para HSP70	68
3.6.4 Cambio temporal de ubiquitina libre y ubiquitina conjugada	69
3.6.5 Cambio temporal de HSP70	73
3.7 Expresión de ubiquitina a nivel de la transcripción en <i>P.</i> <i>chilensis</i>	73
3.7.1 RNA total de <i>P. chilensis</i>	74
3.7.2 Expresión de ubiquitina en cotiledón y radícula	74

<b>4.</b>	<b>DISCUSION</b>	<b>78</b>
4.1	Temperatura, tasa fotosintética, conductancia estomática y potencial hídrico en <i>Prosopis chilensis</i> bajo condiciones de terreno simuladas	78
4.2	Azúcares reductores solubles, sacarosa y prolina en <i>Prosopis chilensis</i> bajo condiciones de terreno simuladas	83
4.3	Evolución de etileno en plantas de <i>P. chilensis</i> sometidas a estrés térmico	87
4.4	Ubiquitina libre, ubiquitina conjugada y HSP 70 en plantas de <i>Prosopis chilensis</i> bajo condiciones de terreno simuladas	89
4.5	Análisis comparativo de la respuesta a estrés térmico en algarrobo y soya	92
4.6	Estabilidad del mRNA para ubiquitina en <i>P. chilensis</i>	104
4.7	Conclusiones	107
<b>5.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>110</b>

## LISTA DE FIGURAS

		página
FIGURA 1	Perfil de temperatura a diferentes horas del día bajo condiciones de terreno simuladas	33
FIGURA 2	Asimilación de CO <sub>2</sub> durante el día en plantas de <i>P. chilensis</i>	34
FIGURA 3	Conductancia estomática durante el día en hojas de <i>P. chilensis</i> bajo condiciones de terreno simuladas	37
FIGURA 4	Plegamiento de folíolos de <i>P. chilensis</i> en horas de alta temperatura y baja humedad relativa	38
FIGURA 5	Potencial hídrico en plantas de <i>P. chilensis</i> bajo condiciones de terreno simuladas	39
FIGURA 6	Fluctuación diaria en el nivel de azúcares reductores solubles y sacarosa en plantas de <i>P. chilensis</i> bajo condiciones de terreno simuladas	42
FIGURA 7	Contenido de prolina en plantas de <i>P. chilensis</i> bajo condiciones de terreno simuladas	44
FIGURA 8	Efecto de prolina sobre la evolución de oxígeno en cloroplastos de <i>P. chilensis</i>	47
FIGURA 9	Evolución de etileno en plántulas de <i>P. chilensis</i>	48
FIGURA 10	Análisis Western de proteínas solubles de <i>P. chilensis</i>	51
FIGURA 11	Fluctuaciones diarias de ubiquitina libre y ubiquitina conjugada en plantas de <i>P. chilensis</i> bajo condiciones de terreno simuladas	52
FIGURA 12	Niveles diarios de proteínas de la familia HSP 70 en plantas de <i>P. chilensis</i> bajo condiciones simuladas	54
FIGURA 13	Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de plántulas de <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i> de 72 horas de edad	57
FIGURA 14	Inducción de termotolerancia en <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i> germinadas a 25° y 35°C, y crecidas a diferentes temperaturas	58

FIGURA 15	Temperatura letal (TL <sub>50</sub> ) en hojas de <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i>	59
FIGURA 16	Emisión de fluorescencia en plantas de <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i> a temperaturas entre 25° y 45°C	62
FIGURA 17	Evolución de etileno en <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i> a temperaturas entre 25° y 50°C	64
FIGURA 18	Presencia de ubiquitina libre en plantas de <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i> a diferentes temperaturas	66
FIGURA 19	Presencia de ubiquitina conjugada en plantas de <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i> a diferentes temperaturas	67
FIGURA 20	Presencia de proteínas del tipo HSP 70 en plantas de <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i> a distintas temperaturas	70
FIGURA 21	Cinética para ubiquitina libre y conjugada en plantas de <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i> a 40°C	71
FIGURA 22	Cinética para proteínas del tipo HSP 70 en <i>P. chilensis</i> y <i>G. max</i>	72
FIGURA 23	RNA total en <i>P. chilensis</i>	76
FIGURA 24	Presencia de mensajeros para ubiquitina en <i>P. chilensis</i>	77

## ABREVIATURAS

BSA	Seroalbúmina de bovino
CAM	Metabolismo ácido de crasuláceas
F <sub>0</sub>	Fluorescencia inicial
F <sub>m</sub>	Fluorescencia máxima
F <sub>v</sub>	Fluorescencia variable
GHS	Glutación
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSF	Factor de transcripción de estrés térmico
HSPs	Proteínas de estrés térmico
LHCII	Complejo cosechador de luz
NO	Noroeste
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
PSII	Fotosistema II
tRNA	RNA de transferencia
SE	Sureste
TL <sub>50</sub>	Temperatura letal

## LISTA DE REACTIVOS

Acetato de Sodio  
Acido sulfosalicílico  
Acido acético  
Acido p-aminosalicílico  
Acrilamida  
Alcohol Isoamílico  
Antrona  
Azida de Sodio  
Azul de Bromofenol  
Azul de Coomassie  
 $\beta$ -mercaptoetanol  
Bisacrilamida  
Bromuro de Etidio  
BSA  
Citrato de Sodio  
Cloroformo  
EDTA  
EGTA  
Etanol  
Fenol  
Formaldehído  
Formamida  
Gelatina  
Glicerol  
Glicina  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
LiCl  
Metanol  
 $\text{MgCl}_2$   
NaCl  
 $\text{NaN}_3$   
Ninhidrina ácida  
Prolina  
SDS  
Sacarosa  
Tricina  
Trizma-HCl  
Tris-isopropilnaftalenosulfónico (ácido)  
Triton X-100  
Tween 20

La procedencia de los reactivos es Sigma, Merck y en algunos casos reactivo líquido Sudelab.

## RESUMEN

*Prosopis chilensis* (algarobo chileno), es un árbol leguminoso que crece en Chile en las zonas áridas y semi-áridas del Norte y Centro del país y se le ha descrito como resistente a altas temperaturas, a falta de agua y a altas concentraciones de sal.

En consecuencia, en esta tesis, se postula que:

- 1) Si *P. chilensis* presenta una alta tolerancia al calor, es debido a la presencia y acción simultánea de características anatómicas, fisiológicas y moleculares.
- 2) Si *P. chilensis* es excepcionalmente termotolerante, presentará mejores respuestas fisiológicas que le otorgan tolerancia a altas temperaturas y una más rápida y más intensa acumulación de proteínas de estrés térmico que una planta ya descrita como termotolerante.

Para probar la primera hipótesis, se midió la asimilación de CO<sub>2</sub>, la conductancia estomática, el potencial hídrico, la acumulación de solutos compatibles, la evolución de oxígeno y etileno, y la acumulación de ubiquitina y HSP70. Se usaron plantas en poblaciones naturales y plantas aclimatadas en cámara de crecimiento simulando un día de primavera en la Quebrada San Carlos, IV Región.

La temperatura foliar de *P. chilensis* en el campo y en la cámara de crecimiento fue menor que la temperatura ambiental a las horas de mayor

temperatura y menor humedad relativa. Esto se relacionó con la apertura estomática continua durante el día. La asimilación de CO<sub>2</sub> de las plantas en el campo presentó una curva bimodal, similar a lo que se observó en condiciones simuladas. La asimilación de CO<sub>2</sub> disminuyó a las horas de mayor temperatura y menor humedad ambiental y se recuperó parcialmente por la tarde. La asimilación de CO<sub>2</sub> no fue bimodal en plantas control crecidas a 25°C y 50% de humedad ambiental. Los azúcares reductores solubles fueron más bajos en plantas en condiciones de terreno que en los controles a las horas de mayor temperatura. Prolina aumentó 50 veces en plantas bajo fluctuaciones ambientales respecto al control lo que se asoció a una posible protección de la actividad de las membranas tilacoidales por prolina. Concentraciones del soluto similares a las presentes en plantas bajo condiciones de terreno protegen la evolución de oxígeno en cloroplastos tratados a 50°C. Etileno no aumenta significativamente en *P. chilensis* durante el estrés térmico y los niveles dependen de la edad de las plántulas. La menor tasa de evolución de etileno se observó a las 96 horas de germinación.

Durante el día, el nivel de ubiquitina varió en plantas aclimatadas a condiciones de terreno. El valor mínimo de la proteína se observó a las horas de mayor temperatura y menor humedad ambiental asociado a una mayor conjugación de ubiquitina a otras proteínas. Se detectó más ubiquitina conjugada en plantas sometidas a fluctuaciones diarias de temperatura y humedad.

La mayor acumulación de HSP70 en plantas en condiciones de terreno fue a las 15:00 horas, cuando la temperatura fue 33°C.

Para probar la segunda hipótesis, se comparó el crecimiento, la inducción de termotolerancia, la emisión de fluorescencia, la evolución de etileno, la acumulación de las proteínas de estrés térmico ubiquitina y HSP70 entre *P. chilensis* (algarrobo) y en *Glycine max* (soya), una leguminosa descrita como termotolerante.

La adquisición de termotolerancia se evaluó comparando el crecimiento de algarrobo y soya (vr. McCall), en semillas germinadas a 25° y a 35°C. Algarrobo creció más que soya en ambos casos. La temperatura letal para el crecimiento de algarrobo fue 5°C mayor que para soya. Las plántulas de *P. chilensis* fueron capaces de crecer a 50°C cuando las semillas se germinaron a 35°C. Soya no mostró termoinducción bajo condiciones similares. La TL<sub>50</sub> fue 6°C mayor para algarrobo que para soya.

La Fluorescencia inicial (Fo) fue mayor en soya que en algarrobo. La Fluorescencia máxima (Fm), disminuyó menos en soya que en algarrobo y no existieron diferencias en la relación Fv/Fm. La temperatura crítica fue más alta en algarrobo que en soya.

La evolución de etileno fue mayor en soya respecto a algarrobo a todas las temperaturas ensayadas.

La acumulación de ubiquitina libre y conjugada bajo estrés térmico, fue similar en algarrobo y en soya. En ambas plantas ubiquitina libre disminuyó y

ubiquitina conjugada aumentó con el incremento de temperatura. Independiente del tratamiento, soya presentó más ubiquitina libre y conjugada. A altas temperaturas, HSP70 fue mayor en algarrobo respecto a soya. Ubiquitina conjugada y HSP70 aumentaron a los mismos tiempos de tratamiento a 40°C en algarrobo y soya. Ubiquitina libre disminuyó a los 5 minutos y aumentó a los 90 de tratamiento en ambas plantas. Las cinéticas fueron similares aunque la conjugación de ubiquitina fue levemente mayor en algarrobo respecto a soya.

El nivel de mRNA de ubiquitina en algarrobo fue dependiente de la temperatura y hubo expresión basal a 25°C. La mayor acumulación de mensajeros fue en cotiledón. El mRNA de ubiquitina se acumuló a 40°C hasta los 30 minutos de tratamiento.

## ABSTRACT

*Prosopis chilensis* (chilean algarrobo) is a leguminose tree growing in Chile in arid and semi-arid regions of the Northern and Central part of the country. This tree has been described as resistant to extreme temperature, water stress and high salt concentrations.

Therefore, in this thesis, it has been proposed that:

- 1) if *P. chilensis* shows a high heat tolerance, is because its anatomical , physiological and molecular characteristics.
- 2) if *P. chilensis* is particularly thermotolerant, it will show better physiological responses which give it tolerance at high temperature. The accumulation of heat shock proteins will be faster and more intense than in a plant already described as thermotolerant.

To test the first hypothesis, CO<sub>2</sub> assimilation, stomatal conductance, water potential, accumulation of compatible solutes, O<sub>2</sub> and ethylene evolution and accumulation of ubiquitin and HSP70 were determined. We used natural populations of plants and plants acclimated in a growing chamber simulating a spring day in Quebrada San Carlos, IV Region.

Leaf temperature of *P. chilensis* in natural populations and in a growing chamber was lower than the environmental temperature at the time of the day with higher temperature and lower humidity. This result correlated to the

continuous opening of stomatas during the day. CO<sub>2</sub> assimilation in natural populations plants showed a bimodal behaviour. The same was observed in plants under field simulated conditions. CO<sub>2</sub> assimilation decreased at the time of the day with higher temperature and lowest humidity showing a partial recovery in the afternoon. CO<sub>2</sub> assimilation was not bimodal in plants acclimated at a constant temperature (25°C) and 50% of humidity (control conditions). Soluble reducing sugars were lower in plants acclimated to field conditions than in control plants at the time of the day with higher temperature and lowest humidity. Proline increased 50 times in plants under field simulated conditions related to control plants. This increase was associated to a possible protective role of proline on thylacoidal membranes. Proline concentrations similar to those found in plants under field simulated conditions protect the oxygen evolution in chloroplasts treated at 50°C. Ethylene did not increase significantly in *P. chilensis* plants under heat stress and levels depend on the age of the plants. The smallest amount of ethylene was detected in 96 hour old plants.

During the day, ubiquitin levels changed in plants acclimated to field conditions. The lowest amount of the protein was detected at the time of the day with the highest temperature and the lowest humidity. This behaviour was associated to an increase in the level of the binding of ubiquitin proteins. Conjugated ubiquitin was higher in plants under daily fluctuations of temperature and humidity.

The highest amount of HSP70 was detected at 15:00 h, when the temperature was 33°C.

To test the second hypothesis, the growing rate, thermotolerance induction, fluorescence emission, ethylene evolution and accumulation of ubiquitin and HSP70 were compared between *P. chilensis* and *Glycine max* (soybean), a leguminose already described as thermotolerant.

Thermotolerance was studied by comparing of *P. chilensis* and *G.max* (vr McCall) growth rate in seeds germinated at 25° and 35°C. *P. chilensis* grew more than *G.max* in both treatments. The lethal temperature for *P. chilensis* growing was 5°C higher than in soja. *P. chilensis* seedlings were able to grow at 50°C when the seeds were germinated at 35°C. Soja did not show thermoinduction under similar conditions. TL<sub>50</sub> was 6°C higher in algarrobo than in soja.

The initial fluorescence ( $F_0$ ) was higher in soja than in algarrobo. The maximal fluorescence ( $F_m$ ) decreased at a lesser extent in soja than in algarrobo and there were not differences in the  $F_v/F_m$  rate. The critical temperature was higher in algarrobo than in soja.

Ethylene evolution was higher in soja than in algarrobo at all the temperatures of treatment.

Free and conjugated ubiquitin accumulation under heat stress, was similar in algarrobo and soja. In both plants, free ubiquitin decreased and conjugated ubiquitin increased when the temperature increased. Soja showed more free and

conjugated ubiquitin at all the temperatures of treatment. At high temperatures HSP70 level was higher in algarrobo than in soja. Conjugated ubiquitin and HSP70 increased at the same time of treatment at 40°C in algarrobo and soja. Free ubiquitin decreased after 5 minutes of heat treatment and increased 90 minutes later. Time course variations showed similar tendencies although conjugated ubiquitin was slightly higher in algarrobo with respect to soja.

Ubiquitin mRNA level in *P. chilensis* was dependent on temperature and it showed a basal expression at 25°C. The highest mRNA accumulation was in cotyledon. Ubiquitin mRNA was accumulated at 40°C until 30 minutes of treatment.

## 1 INTRODUCCION

### 1.1 Fisiología del estrés térmico en plantas.

Bajo condiciones naturales y de cultivo, las plantas están constantemente expuestas a diferentes tipos de estrés ambientales que ocurren simultáneamente, como son alta temperatura y déficit hídrico o altas temperaturas con altas radiaciones solares (Weiss & Berry, 1988), y que pueden llegar a límites letales para los individuos (Piper, 1987). Las variaciones o aumentos en la temperatura ambiental pueden afectar dentro de pocos minutos tanto la respiración como la fotosíntesis (Harding y col., 1990; Barker y col., 1988), las funciones más sensibles a cambios de temperatura en las células vegetales (Berry & Björkman, 1980). La exposición de plantas o algas a temperaturas en un rango de 35-45°C, dependiendo de las especies y condiciones de crecimiento durante el estrés, tiene un efecto inhibitorio sobre la evolución de oxígeno, fijación de CO<sub>2</sub> y capacidad de fosforilación (Berry & Björkman, 1980; Quinn & Williams, 1985). Se ha observado que el principal sitio de daño por altas temperaturas está asociado a algunos componentes del aparato fotosintético ubicados en las membranas tilacoidales, que forman parte del fotosistema II (PSII). La inactivación del PSII inducida por calor involucra la separación física del centro de reacción del complejo cosechador de luz (LHCII) (Sundby y col., 1986). Al mismo tiempo, el sistema de evolución de oxígeno acoplado a la fotólisis del agua se disocia liberando iones manganeso y

proteínas asociadas (Enami y col., 1994). Se cree que los eventos de desnaturalización que ocasionan la desorganización molecular del PSII son consecuencia de cambios en las interacciones lípidos-proteínas debidas a una mayor fluidez lipídica provocada por altas temperaturas (Berry & Björkman, 1980). Algunos autores han observado que el crecimiento de plantas a temperaturas elevadas provoca aumentos en el nivel de ácidos grasos saturados en los lípidos de membranas, lo que estabiliza la fotosíntesis (Gombos y col., 1994); sin embargo, en espinaca y en mutantes de *Arabidopsis* no se observó una asociación entre la estabilidad térmica de la fotosíntesis y cambios en el nivel de saturación de ácidos grasos (Santarius & Müller, 1979; Browse y col., 1989). Otros efectos del estrés térmico sobre procesos celulares que ocurren en sistemas de membranas es la pérdida de electrolitos y deficiencias en el transporte de glucosa y rubidio (Cress & Gerner, 1980). En estos casos, se ha propuesto que los cambios de temperatura causan transiciones de fase de los lípidos, impidiendo el funcionamiento adecuado de las proteínas asociados a éstos (Grindstaff y col., 1996).

El efecto de altas temperaturas sobre el proceso fotosintético es mayor en plantas C3 que en plantas C4 o CAM. Se ha observado que la reserva de carbohidratos disminuye como resultado de la inhibición del proceso fotosintético (Taiz & Zeiger, 1991). Por otra parte, los límites de termotolerancia varían según el genotipo de los individuos y el nivel de aclimatación de la planta (Barker y col., 1988). Es así como la mayoría de los vegetales superiores viven a

temperaturas que fluctúan entre 10°C y 30°C, pero las plantas adaptadas a climas más cálidos pueden presentar límites de tolerancia mayores. Las plantas son capaces de soportar el estrés causado por altas temperaturas mediante el desarrollo de estrategias morfológicas, fisiológicas y moleculares como por ejemplo, disminución de la absorción de radiación solar mediante el plegamiento de las hojas (Taiz & Zeiger, 1991), aumento en la concentración de solutos compatibles (Zúñiga y col., 1991) y/o aumento en la transcripción de proteínas específicas que protegerían a la planta durante el estrés (Vierling, 1991). Las variaciones en el nivel de algunas hormonas también han sido observadas como respuestas al estrés por altas temperaturas (Klee & Estelle, 1991). Los cultivos celulares de epidermis de pepino crecidos a bajas temperaturas responden aumentando los niveles de evolución de etileno cuando son transferidos a temperaturas mayores (Wang & Adams 1980). Existen evidencias de que los mecanismos que participan en la tolerancia y adaptación al estrés actúan en forma simultánea, por ejemplo, las plantas de soya bien irrigadas en el campo, mantienen la temperatura foliar hasta 5,5°C por debajo de la temperatura ambiental mediante transpiración, en horas del día en que ésta alcanza 50°C. Al mismo tiempo, se observó un aumento en la síntesis de proteínas de estrés térmico de bajo peso molecular (Kimpel & Key, 1985), lo que se considera una estrategia universal de los organismos frente al aumento de la temperatura por sobre niveles normales.

## 1.2 Proteínas de estrés térmico.

El aumento en los niveles de proteínas de estrés térmico (HSPs), es una respuesta a la exposición a altas temperaturas y se caracteriza porque estas proteínas no están presentes, o están presentes en muy baja cantidad en las células no estresadas. En eucariontes, las principales HSPs pertenecen a 5 clases: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y HSPs de bajo peso molecular, entre 15 y 30 kDa (Vierling, 1991). En levaduras, insectos, células animales en cultivo y plantas, se ha establecido una correlación entre la acumulación de proteínas de estrés térmico y la resistencia a temperaturas subletales (Cooper & Ho, 1983). En algunos organismos, la función de algunas HSPs ha sido determinada; en *Escherichia coli*, se han identificado una tRNA lisil sintetasa y una proteasa dependiente de ATP (Philips y col., 1984); en fibroblastos de embrión de pollo se ha identificado ubiquitina (Bond & Schlesinger, 1985); en levadura existe una HSP que es una isoforma de una enolasa (Iida & Yahara, 1985) y en células HeLa se conoce una proteína que se une a cadenas de poli(A) (Schönfelder y col., 1985). Sin embargo, la identidad de la mayoría de las HSPs aún es desconocida. En plantas superiores, las proteínas de estrés térmico son un grupo complejo de polipéptidos que son codificados por familias multigénicas (Vierling, 1990). Muchos genes para proteínas de estrés térmico en plantas han sido clonados y secuenciados, entre los que se observa una alta conservación a nivel de las estructuras de nucleótidos y aminoácidos. Se ha propuesto que las proteínas que pertenecen a las clases HSP90 y HSP70

funcionan como chaperonas moleculares (Ellis & Hemmingsen, 1989; Hartl y col., 1994; Gatenby y col., 1990), algunas de las cuales están codificadas en el genoma del cloroplasto (Viitanen y col., 1995). Las chaperonas moleculares son proteínas que alteran o mantienen la conformación de otras proteínas facilitándoles su plegamiento, ensamblaje, renaturación o transporte a través de membranas (Gething & Sambrook, 1992). Esta función es esencial para las actividades celulares normales y se cree que juega un papel importante en la supervivencia celular durante el estrés. La familia de las HSP70 es una clase importante de chaperonas moleculares. Los miembros de esta familia han sido identificados en una serie de compartimentos celulares como citoplasma, retículo endoplásmico, mitocondrias y cloroplastos y poseen secuencias de aminoácidos altamente conservadas entre los organismos en que se ha descrito su presencia (Marshall & Keegstra, 1992). Entre organismos tan distantes como *E. coli* y humano, miembros de la familia de HSP70 presentan una identidad de un 46% y una similitud de 65% a nivel de aminoácidos (Rensing & Maier, 1994). La estructura de las HSP70 puede dividirse en tres regiones: un péptido de reconocimiento con un dominio de unión en la región carboxilo terminal, una secuencia intermedia y un dominio con función de ATPasa en el extremo amino terminal (Wang y col., 1993). Aunque en la HSP70 citosólica de células humanas la función ATPasa parece no ser relevante, en tomate y maíz, la delección de esta región afecta fuertemente la función de la proteína, lo que ha llevado a sugerir que la unión a ATP por las HSP70 es esencial para la función

de chaperonas moleculares (Miernyk & Hayman, 1996). El dominio de unión carboxilo terminal interactuaría en forma transitoria con segmentos hidrofóbicos de péptidos en formación, permitiendo su plegamiento y transporte a través de membranas o manteniendo la conformación correcta de proteínas que han sufrido cambios en ésta por efecto de altas temperaturas ( Schmid y col., 1994).

Por otra parte, se sabe de la existencia de un mecanismo de degradación guiado por ubiquitina, un polipéptido de 76 aminoácidos, que juega un papel importante en la mantención de la estructura de la cromatina y en la degradación dependiente de ATP de proteínas celulares inestables (Vierstra, 1987; Agell y col., 1988; Hatfield y col., 1990). La ubiquitina fue descrita como una proteína de estrés térmico por primera vez en fibroblastos de embrión de pollo donde se observó que los niveles de RNA mensajero para la proteína aumentaban 5 veces en respuesta a la incubación a altas temperaturas (Bond & Schlesinger, 1985). En maíz, la secuencia aminoacídica del polipéptido monomérico de ubiquitina maduro es idéntica a la determinada en cebada, avena y *Arabidopsis* y se diferencia de la ubiquitina de levadura y animal en sólo 2 y 3 aminoácidos, respectivamente (Christensen & Quail, 1989). La proteína es sintetizada como una poliproteína con múltiples repeticiones de la secuencia de ubiquitina o como una proteína de fusión en la cual ubiquitina forma el dominio amino terminal de un péptido mayor (Agell y col., 1988). Cerca de la mitad de la ubiquitina presente en la célula se encuentra como monómero y el resto está presente como ubiquitina conjugada a otras proteínas a través de un enlace

isopeptídico entre el carboxilo terminal de ubiquitina y grupos  $\epsilon$ -amino de lisinas de las proteínas a las que se une (Haas & Bright, 1985). La conjugación de ubiquitina requiere de un complejo enzimático y ATP, el que activa a ubiquitina libre y la transfiere a las proteínas que de esta manera se convierten en blanco para ser degradadas por una proteasa dependiente de ATP (Rechsteiner, 1987). Este sistema se encarga del recambio de proteínas de corta vida en la célula y de proteínas que poseen conformación anormal debido al estrés térmico (Bond y col., 1988).

La síntesis de HSPs es regulada principalmente a nivel de la activación transcripcional de los genes correspondientes (Vierling, 1991). Este control regulatorio ocurre a través de la interacción entre el factor de transcripción de estrés térmico (HSF), una proteína trimérica que se une al DNA, y los elementos cis de estrés térmico presentes en copias múltiples y altamente conservados en todos los sistemas hasta ahora analizados (Sorger, 1991; Harrison y col., 1994). La inducción de la síntesis de HSPs es transitoria y se caracteriza por un aumento rápido entre 30 a 100 veces en la actividad del HSF durante menos de 1 hora (Sorger, 1990). Se ha especulado que algunas HSPs podrían actuar como reguladores negativos de los HSFs, lo que ha generado un modelo de autorregulación de la inducción de la transcripción de HSPs. Bajo condiciones normales de crecimiento, algunas HSPs se unirían a los HSFs, reprimiendo su actividad. Estas HSPs podrían ser HSP70, involucrada en la homeostasis de la respuesta a estrés térmico en *Drosophila* (DiDomenico y col., 1982) y/o HSP 90,

que interactúa con receptores de hormonas esteroidales regulando su actividad transcripcional (Picard y col., 1990). Durante el estrés térmico, las proteínas dañadas competirían con los factores de estrés térmico por la unión a HSP70 ó a HSP90. De esta manera, el complejo HSF-HSP se disocia y la afinidad del HSF por el DNA aumentaría con el correspondiente aumento en los niveles de transcripción de proteínas de estrés térmico (Sorger, 1991). No se ha descartado la posibilidad de que la conformación de los HSFs sea afectada por el estrés térmico, y que los cambios conformacionales asociados a la temperatura controlen la capacidad del factor para unirse al DNA (Sorger, 1991). Además de la inducción de la transcripción, la selección traduccional de los mensajeros juega un papel importante en la síntesis de HSPs. Se ha observado que el estrés térmico acelera la maquinaria traduccional de las células estresadas. Como consecuencia, la traducción de RNAs mensajeros para proteínas de estrés térmico está altamente favorecida en comparación con otros mensajeros lo que implicaría que la mayoría o la totalidad de los RNAs mensajeros para proteínas de estrés térmico que se sintetizan son utilizados (Apuya & Zimmerman, 1992). Se ha sugerido que la región 5' del péptido líder juega un papel regulatorio en la traducción selectiva de RNAs mensajeros eucarióticos que codifican para proteínas de estrés térmico, ya que estas regiones podrían funcionar como sitios de entrada al ribosoma para la iniciación de la traducción durante el estrés (Chandrashekhar & Nguyen, 1995). Por otro lado, en *Tetrahymena thermophila* se ha observado que bajo estrés térmico se

acumula rápidamente un RNA citoplasmático de aproximadamente 300 nucleótidos llamado G8 y que se asocia en forma cuantitativa a los ribosomas (Hallberg y col., 1992). Se ha propuesto que el RNA G8 podría ser parte de una maquinaria que regula la traducción selectiva de diferentes clases de RNA mensajero durante situaciones de estrés (Fung y col., 1995).

La vía de señal de transducción de la expresión de genes que codifican para HSPs es desconocida. La característica principal en la inducción de HSPs es el daño causado a la estructura de las proteínas o la síntesis de proteínas aberrantes, de manera que se ha planteado como posible hipótesis que la señal para la inducción de HSPs sería la acumulación de proteínas anormales en la célula (Ananthan y col., 1986; Edington y col., 1989). Por otra parte, en plántulas de soya se ha observado que el ácido azetidina-2-carboxílico (Aze), un análogo de prolina, induce la acumulación de proteínas de estrés térmico a 28°C (Lee y col., 1996). En maíz, análisis por HPLC revelaron que el nivel de glutatión (GHS) aumenta y el contenido de cisteína disminuye en las raíces cuando las plantas son sometidas a estrés térmico (Nieto-Sotelo & Ho, 1986). Mitchel y col. (1983), demostraron que cultivos de células VT9, derivadas de hamster y expuestas a inhibidores de la síntesis o a la acción de glutatión, presentaron bajos niveles de GHS intracelular y una mayor sensibilidad térmica cuando eran sometidas a estrés térmico. Por lo tanto, es posible que moléculas pequeñas producto de la degradación proteolítica durante el estrés, como el aminoácido prolina y/o el

tripéptido GHS, puedan tener un papel en la vía de transducción de la señal para la síntesis de HSPs.

La síntesis de HSPs se correlaciona estrechamente con la adquisición de termotolerancia en plantas. En plántulas de soya, se ha observado que un cambio de temperatura desde 25°C a 45° ó 50°C, es letal. Sin embargo, estas temperaturas pueden ser toleradas por plántulas aclimatadas a temperaturas subletales de 40°C lo que se correlaciona con un aumento en la síntesis de proteínas de estrés térmico (Lin & col., 1984). Plántulas de maíz expuestas a 40°C presentan una disminución en la actividad de la ATPasa de membrana plasmática dependiente de K<sup>+</sup>, sin embargo, la actividad se recupera luego de 20 minutos de estrés. Esta recuperación se correlaciona con un aumento en la síntesis de proteínas de estrés (Cooper y col., 1984). Plántulas de arroz sometidas a estrés térmico, acumulan HSP104 y HSP90 al mismo tiempo en que ocurre inducción de termotolerancia (Pareek y col., 1995).

En condiciones de campo, la expresión de proteínas de estrés térmico ha sido muy poco estudiada. Existen algunos trabajos realizados en plantas de cultivo que permiten asociar en condiciones naturales la respuesta a estrés térmico con la síntesis de HSPs. En plantas de soya crecidas en terreno, se ha observado acumulación de RNAs mensajeros que codifican para proteínas de estrés térmico de baja masa molecular (Kimpel & Key, 1985). Plantas de algodón expuestas a altas temperaturas en el campo, acumulan proteínas de estrés térmico de baja y alta masa molecular (Burke & col., 1985). En

experimentos realizados en hojas de arveja en cámaras de crecimiento simulando un día de alta temperatura en terreno, se demostró la acumulación de proteínas de estrés térmico al tiempo que aumentaba la temperatura (Chen & col., 1990, DeRocher y col., 1991). En condiciones naturales, la síntesis de proteínas de estrés térmico ha sido asociada al estado de desarrollo reproductivo en *Medicago sativa*. A temperaturas óptimas de crecimiento, plantas bien irrigadas que crecen en el campo, presentan producción de HSPs de baja masa molecular en flores y frutos (Hernández & Vierling, 1993). Los resultados de estos trabajos permiten asociar la respuesta a estrés térmico con la síntesis de algunas proteínas específicas, sin embargo, no se presentan evidencias que correlacionen la tolerancia a altas temperaturas que presentan algunos cultivos con la síntesis de HSPs y/o respuestas fisiológicas adaptativas.

### **1.3. *Prosopis chilensis* como modelo experimental.**

*Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz (algarrobo chileno), como otras especies de *Prosopis* son árboles leguminosos de la familia mimosácea que conforman bosques monoespecíficos en las regiones áridas y semi-áridas del norte y centro de Chile. *P. chilensis* presenta una distribución geográfica amplia, desde Copiapó a Talca. La precipitación anual en la región de Copiapó es de 29,4 mm mientras que en Santiago es de 356 mm . En estos lugares, las temperaturas fluctúan entre 1°C en invierno a 55°C en verano y entre 6°C en la noche a 55°C a mediodía en un día de verano. Las hojas y las legumbres del algarrobo, así

como de otras especies de *Prosopis*, se usan como forraje para ganado caprino y ovino; su biomasa leñosa se utiliza como combustible y en casos de dimensiones mayores, como fuente de materiales de construcción (postes para cierres, parquets); su corteza es también rica en taninos (Arce & Balboa, 1988). *P. chilensis* es un árbol resistente a déficit hídrico, estrés por alta temperatura y salinidad (Medina & Cardemil, 1993). Semillas de *P. chilensis* presentan una tasa de germinación entre 70 y 80% en presencia de NaCl 0,3M. Después de 5 días de germinación, la sobrevivencia de plántulas de *P. chilensis* regadas con NaCl 4% es de 61% y no se observa efecto en plántulas de 30 días de edad (Arce & Balboa, 1988). Durante la germinación, *P. chilensis* expresa 4 proteínas de pared celular que presentan inmunoreacción cruzada con un anticuerpo anti extensina de soya (Rodríguez & Cardemil, 1994). La expresión de estas 4 proteínas aumenta luego de herir las plantas, por lo que se ha sugerido que participarían en la reparación del daño a la pared celular. Al mismo tiempo, en plántulas de *P. chilensis* heridas mecánicamente, la rápida elongación de los ejes embrionarios ha llevado a plantear un control hormonal de la respuesta a daño por heridas (Rodríguez & Cardemil, 1994). Por otra parte, semillas de algarrobo son capaces de germinar a altas temperaturas. Se ha observado que 100% de las semillas de *P. chilensis* germinan a 35°C; a 40°C, el porcentaje disminuye a 90% (Medina & Cardemil, 1993). De estas observaciones se ha deducido que *P. chilensis* es un árbol resistente a condiciones ambientales adversas. Datos experimentales obtenidos en nuestro laboratorio demuestran

que *P. chilensis* es una planta altamente termotolerante capaz de responder al estrés por alta temperatura mediante inducción de termotolerancia, fenómeno que se correlaciona con la aparición de proteínas no detectadas a la temperatura de germinación (35°C) (Medina & Cardemil, 1993). Estudios del efecto de fluctuaciones ambientales en condiciones de campo sobre algunos parámetros fisiológicos y expresión de HSPs han mostrado que el árbol es capaz de modular la respuesta fotosintética y resistir temperaturas ambientales que son desfavorables para otras especies (Ortiz y col., 1995).

Ya que el conjunto de respuestas fisiológicas a diferentes tipos de estrés ambientales hacen de *P. chilensis* un modelo adecuado para el estudio de mecanismos responsables de la tolerancia de la planta a temperaturas elevadas en su medioambiente natural, en esta tesis se plantean las siguientes hipótesis:

1. Si *P. chilensis* presenta una alta tolerancia al calor, es debido a la presencia y acción simultánea de características anatómicas, fisiológicas y moleculares.
2. Si *P. chilensis* es excepcionalmente termotolerante, presentará mejores respuestas fisiológicas que le otorgan tolerancia a altas temperaturas y una más rápida y más intensa acumulación de proteínas de estrés térmico que una planta ya descrita como termotolerante.

## 1.4 Objetivos

Como objetivo general se desea caracterizar en *P. chilensis*, parámetros fisiológicos que son afectados por el estrés de calor, en plantas en condiciones de laboratorio similares a las determinadas en el campo y comparar las respuestas en la expresión de proteínas de estrés térmico de *P. chilensis* con otra planta leguminosa resistente al calor que es *Glycine max.* (soya, vr McCall).

Como objetivos específicos se ha propuesto:

1. Caracterizar la tasa de fotosíntesis, fluorescencia, evolución de oxígeno, potencial hídrico y resistencia estomática en plantas jóvenes de *P. chilensis* bajo condiciones de temperatura y humedad relativa similares a las determinadas en terreno.
2. Determinar el contenido de azúcares solubles, sacarosa y prolina en plantas jóvenes de *P. chilensis* sometidas a variaciones diarias de temperatura y humedad relativa.
3. Determinar diferencias en la termotolerancia, capacidad de crecimiento, evolución de etileno y fluorescencia entre *P. chilensis* y *Glycine max* bajo condiciones de estrés térmico.

4. Caracterizar y comparar mediante análisis Western y dot blots en experimentos de cinética, la presencia, variación y velocidad de expresión de proteínas asociadas al estrés por temperatura en *P. chilensis* y soya.

5. Caracterizar mediante análisis Northern, la presencia y variación del RNA mensajero de ubiquitina en *P. chilensis*.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Material vegetal para análisis en terreno.

*Prosopis chilensis* (algarrobo chileno), es un árbol nativo que se encuentra en Chile en regiones áridas y semi áridas de la zona Central y Norte Chico, además de Perú y Argentina.

Para los estudios en terreno, se emplearon seis árboles de *P. chilensis* de tamaño similar (de aproximadamente 50 años de edad), pertenecientes a una población ubicada en la Quebrada San Carlos, Vicuña, Cuarta Región (30°0.2'S, 70°49'W, 520 m de elevación). Tres de ellos se encontraban en exposición Noroeste y tres en exposición Sureste. En primavera, la Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR) varía, dependiendo de las horas del día, entre 100 y 2100  $\mu\text{molesm}^{-2}\text{s}^{-1}$  desde las 8 :00 a las 15 :00 horas en los árboles con orientación NO, y desde 100 a 1800  $\mu\text{molesm}^{-2}\text{s}^{-1}$  a las mismas horas del día para los árboles con orientación SE. La humedad relativa (RH) varía entre 60 y 25% desde las 6 :00 a las 18 :00 horas. Las muestras para los análisis y las lecturas fueron realizadas a las 8 :00, 10 :00, 12 :00, 14 :00, 16 :00, 18 :00 y 20 :00 horas.

### 2.2 Material vegetal para análisis de simulación.

Para los experimentos de simulación, se colectaron semillas de *P. chilensis* en la Quebrada San Carlos, en 1991 y 1992, las que fueron germinadas de acuerdo a la metodología descrita por Medina y Cardemil (1993). Las semillas

separadas de los frutos, fueron escarificadas con ácido sulfúrico durante 10 minutos con la finalidad de romper la testa de la semilla. Después de varios lavados con agua, las semillas se colocaron sobre un papel absorbente humedecido en una bandeja de germinación y germinadas a 25°C en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad.

Plantas de tres meses de edad fueron aclimatadas por 10 días en una cámara de crecimiento (Heraeus vötsch HPS 2000) bajo condiciones que simulaban las determinadas en un día de Primavera en la Quebrada San Carlos para los árboles con exposición NO. La intensidad luminosa máxima en la cámara de crecimiento fue  $550 \mu\text{molesm}^{-2}\text{s}^{-1}$  dentro de la cámara (25% de la encontrada en condiciones naturales), la que es suficiente para alcanzar saturación de la fotosíntesis en la planta tal como lo demuestra Pinto (1989).

### **2.3 Condiciones luminosas en la cámara de crecimiento.**

La luminosidad en la cámara fue programada para un fotoperíodo de 11 horas de luz y 13 horas de oscuridad y las temperaturas y ciclos de humedad relativa fueron similares a las determinadas en terreno para los árboles en exposición NO. El período de luz comenzó a las 8 :00 horas y el período de oscuridad a las 20 :00 horas. La intensidad luminosa fue regulada variando la altura del panel móvil de tubos de luz fluorescente. La intensidad mínima fue  $100 \mu\text{molesm}^{-2}\text{s}^{-1}$  a las 8 :00 horas, aumentando a  $300 \mu\text{molesm}^{-2}\text{s}^{-1}$  a las 11 :00 horas y llegando a un máximo de  $550 \mu\text{molesm}^{-2}\text{s}^{-1}$  a las 14 :00 horas, para posteriormente disminuir y volver a la intensidad inicial a las 19 :00 horas. El

medio día solar en las plantas en el campo se registró a las 14:00 horas y en la cámara de cultivo a las 15:00 horas.

#### **2.4 Condiciones de humedad y temperatura.**

Simulando las condiciones naturales, la temperatura en la cámara fue aumentada a una tasa de aproximadamente  $4^{\circ}\text{h}^{-1}$ , desde  $6^{\circ}\text{C}$  a las 6 :00 horas con una humedad relativa de 60% para alcanzar un máximo de  $35^{\circ}$  en la tarde (14 :00-15 :00 horas) con una humedad relativa de 25%. Luego, la temperatura fue disminuída a una tasa de  $4^{\circ}\text{h}^{-1}$  alcanzando un mínimo de  $6^{\circ}$  en la noche (22 :00 horas) con una humedad relativa de 50%. Después de las 22 :00 horas las condiciones se mantuvieron uniformes a  $6^{\circ}$  y 60% de humedad relativa. Los experimentos control se realizaron bajo condiciones de luminosidad similares a las descritas y la temperatura y humedad relativa se mantuvieron constantes a  $25^{\circ}\text{C}$  y 60% respectivamente. Las muestras para los análisis se tomaron a las 8 :30, 11 :00, 15 :00, 17 :00, 20 :00 y 23 :00 horas. La temperatura foliar fue determinada en la superficie superior de los folíolos mediante termocuplas de constantan-cobre.

#### **2.5 Experimentos de estrés térmico.**

Estos se realizaron con plántulas crecidas a  $25^{\circ}\text{C}$  por 72 horas luego de la germinación. Grupos de 20 plántulas fueron expuestas por 2 horas a  $30^{\circ}$ ,  $35^{\circ}$ ,  $40^{\circ}$ ,  $45^{\circ}$  y  $50^{\circ}\text{C}$ . Luego de los tratamientos, las plántulas fueron congeladas en

hielo seco y procesadas para la extracción de proteína según lo descrito en Medina y Cardemil (1993).

## **2.6 Determinación de asimilación de CO<sub>2</sub>.**

La asimilación neta de CO<sub>2</sub> fue determinada en terreno en hojas de árboles adultos y en el laboratorio bajo condiciones simuladas en plantas de 6 meses de edad utilizando un analizador de gases infrarojo con un sistema abierto para el flujo de aire (IRGA, Analytical Development Co. Ltd, modelo 225/2/SS/B), durante 4 días consecutivos. Bajo condiciones simuladas, la humedad en la cámara de crecimiento fue controlada mediante un flujo de aire de 150 ml/min a través de un sistema de humidificación. La humedad relativa fluctuó entre 60 a 25%. La concentración de CO<sub>2</sub> se mantuvo entre 340 y 370 ppm. Para los cálculos de asimilación de CO<sub>2</sub> se consideró la masa molecular de CO<sub>2</sub> (44 g/mol), el volúmen específico (22,4 l/mol) y la densidad (2 g/l). El área de exposición fue alrededor de 30 cm<sup>2</sup> en las hojas medias de las plantas.

## **2.7 Determinación de conductancia estomática.**

Las mediciones de conductancia estomática se realizaron con un porómetro automático transiente (MK3 Delta-T). En los experimentos bajo condiciones simuladas, el porómetro fue calibrado a las condiciones en la cámara al momento de tomar las muestras para ser analizadas. El potencial hídrico fue determinado en brotes terminales de longitud entre 6 a 8

centímetros con una bomba de presión tipo Scholander. El potencial hídrico se mantuvo entre -0,8 y -2,8 MPa desde las 6:00 a las 15:00 horas.

## **2.8 Determinación de prolina.**

Prolina fue cuantificada en plantas crecidas en cámara de crecimiento bajo condiciones de terreno simuladas. Se determinó según el método descrito por Bates y col. (1973) con el reactivo Ninhidrina ácida al 3% (p/v) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (p.a.), que forma el complejo coloreado con prolina, aminoácido que se extrae a partir de tejido fresco en ácido sulfosalicílico al 3% (p/v). La absorbancia del complejo ninhidrina-prolina extraído en tolueno (p.a.), fue medida a 520 nm en un espectrofotómetro Shimadzu. Mediante una curva de calibración se obtuvo un coeficiente de absorbilidad molar  $\epsilon=11551$ .

## **2.9 Contenido de azúcares solubles y sacarosa.**

Los azúcares solubles se cuantificaron en plantas crecidas en cámara de cultivo bajo condiciones de terreno simuladas mediante el método colorimétrico con el reactivo de Antrona, tal como lo describen Riazi y col. (1985). Tejido fresco de plantas de *Prosopis chilensis* (0,5 g) se trató con etanol al 85% (v/v) a 25°C por 24 horas. El extracto fue posteriormente filtrado en papel Whatman N°1 y una alícuota de 0,1 ml de extracto etanólico se hizo reaccionar a 100°C por 10 minutos con 3 ml de Antrona (0,15% p/v en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% v/v) recién preparada. La reacción fue detenida en hielo y la absorbancia medida a 625 nm

en un espectrofotómetro Shimadzu. La concentración fue expresada en equivalentes de glucosa a partir de una curva de calibración.

La concentración de sacarosa en hojas de *Prosopis chilensis* fue determinada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según la metodología de Nachtmann y Budna (1977). Los azúcares fueron obtenidos del tejido mediante un extracto etanólico como se describe en la obtención de azúcares solubles. Los extractos fueron filtrados en Millipore (0,2  $\mu\text{m}$ ) antes de analizar las muestras en una columna Merck (RP18) y ser caracterizadas por medio de un detector de índice de refracción en condiciones isocráticas de acetona:agua (55:45).

## 2.10 Evolución de oxígeno

La tasa de evolución de oxígeno fue determinada en un oxígrafo Hansatech en cloroplastos y membranas tilacoidales extraídos según se describe a continuación. Tejido foliar fresco de *Prosopis chilensis* fue macerado en amortiguador de ruptura (sacarosa 250 mM; tricina 25 mM; NaCl 10 mM;  $\text{MgCl}_2$  5 mM;  $\text{NaN}_3$  1 mM; pH 8,0) en una proporción 1:4 peso:volumen. El macerado se filtró por gasa, fue transferido a tubos frescos preenfriados y se centrifugó a 3000 x g durante 2 minutos a 0°C en rotor SS-34, modelo Sorvall. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pella en 1 a 2 ml de medio de reacción (sacarosa 250 mM; NaCl 10 mM;  $\text{MgCl}_2$  5 mM; tricina 25 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 mM;  $\text{NaN}_3$  1 mM; pH 7,5). La determinación de la evolución de oxígeno se realizó en extractos tratados a 25°, 35°, 40° y 45°C por 2 horas en ausencia y

presencia de prolina 0,15 mM o en extractos tratados a 50°C durante 2 horas con diferentes concentraciones de prolina. La evolución de oxígeno fue determinada en  $\mu\text{moles de O}_2 (\text{ml min mg proteína})^{-1}$  previa calibración del oxígrafo con ditionito de sodio que remueve todo el oxígeno disuelto en el agua . Se consideró que la concentración de oxígeno disuelto en el agua destilada a 25° es 0,253  $\mu\text{moles/ml}$ . En el registro, el eje vertical se asocia con concentración de oxígeno y el eje horizontal representa el tiempo transcurrido.

### **2.11 Evolución de etileno en *P. chilensis* y soya.**

La evolución etileno fue determinada en plántulas de *Prosopis chilensis* de 48, 72 y 96 horas de edad y en plántulas de soya de 96 horas de edad en un cromatógrafo de gases. Las plántulas fueron germinadas en cámara de crecimiento a 25°C y transferidas a frascos herméticos en las que se trataron a 30°, 35°, 40°, 45° y 50°C durante 2 horas. Posteriormente, se tomaron muestras de gases desde los frascos en jeringas de 1 ml a través de un septo de goma. El contenido de etileno se determinó en base al peso seco del tejido mediante el uso de un estándar que contenía 77,2 ppb del gas.

### **2.12 Emisión de fluorescencia en *P. chilensis* y soya.**

Para la determinación de la fluorescencia de las moléculas de clorofila del fotosistema II, se utilizó un fluorómetro Plant Efficiency Analyser (PEA) fabricado por Hansatech (U.K.). Las mediciones se realizaron en hojas de plantas de *Prosopis chilensis* de 3 meses de edad y de soya de 1 mes de edad,

mantenidas a 25°, 35°, 40° y 45°C durante 2 horas en una cámara de aclimatación. Una porción de las hojas se mantuvo en oscuridad por 30 minutos, utilizando una pinza oscura. Posteriormente, se iluminó con el dispositivo de iluminación del aparato que consiste en 6 fotodiodos con un máximo de emisión de alrededor de 650 nm. La intensidad utilizada fue de  $2250 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los registros se tomaron durante 40 segundos. Se obtuvieron los principales parámetros de la fluorescencia:  $F_0$ ,  $F_m$ ,  $F_v$ , y la relación entre  $F_v/F_m$ . Los datos fueron transferidos mediante una interfase a un computador en donde fueron analizados posteriormente.

### **2.13 Germinación y crecimiento en *P. chilensis* y *Glycine max*.**

Las semillas de *P. chilensis* fueron germinadas en bandejas plásticas en oscuridad en estufas termorreguladas a 25°, 30°, 35°, 40°, 45° y 50°C durante 72 horas. Las semillas de *Glycine max* (soya, vr. McCall), fueron imbibidas en agua destilada durante 10 minutos y luego fueron germinadas en condiciones similares a las de *P. chilensis*.

El crecimiento en *Prosopis chilensis* y soya fue determinado en plántulas germinadas a 25° y 35°C durante 24 horas y luego transferidas a bandejas que fueron sometidas a 25°, 30°, 35°, 40° y 45°C. Luego de completar 72 horas de germinación, se midió la longitud del eje embrionario de las plántulas.

## **2.14 Temperatura letal en *P. chilensis* y *Glycine max*.**

La temperatura letal (TL<sub>50</sub>) fue determinada en tejido foliar de algarrobo y soya según modificación del método descrito por Raymond (1986). Trozos de folíolos de plantas de *P. chilensis* de 3 meses de edad y de *G.max* de 1 mes de edad con un peso aproximado de 0,12 g fueron incubadas a temperaturas entre 25° y 70°C durante 2 horas en frascos oscuros con 2 ml de agua desionizada. Luego de la incubación, los frascos fueron enfriados a temperatura ambiente e incubados a 25°C por 1 hora con agitación suave previa adición de 25 ml de agua desionizada a cada uno. La conductividad del medio se determinó mediante el uso de un conductímetro WTW. Posteriormente, para obtener la conductividad máxima del tejido, los frascos fueron incubados en una estufa a 80°C durante toda la noche.

## **2.15 Determinación del contenido de proteínas**

El tejido congelado se maceró en amortiguador Tris-HCl 1,5 mM, pH 7,5; Triton X-100 al 2% y 2-mercaptoetanol al 0,1% en una relación peso volumen 1:2. El macerado fue tratado a 100°C por 90 segundos y centrifugado a 15.000 rpm por 5 minutos en microfuga. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se precipitó la proteína con acetona fría en una proporción acetona:sobrenadante (5:1). La proteína precipitada fue resuspendida en amortiguador Tris 100mM pH 6,8. Las muestras fueron congeladas y se determinó el contenido de proteínas solubles mediante el método de Bradford

(1976) usando una curva de calibración a partir de un estándar de BSA marca Sigma.

## **2.16 Análisis electroforético.**

Las proteínas solubles fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 10% y 12% en condiciones desnaturalantes como describe Laemli (1970). El gel separador (pH 8,8) contenía poliacrilamida en la concentración adecuada y 0,1% de SDS y el gel concentrador (pH 6,8) contenía 3,5% de poliacrilamida. Ambos geles fueron preparados a partir de una solución de acrilamida:bis-acrilamida 30:0,8. En cada pocillo del gel se colocaron 30  $\mu$ g de proteína y éste fue desarrollado a una intensidad de corriente constante de 30 mA durante 5 a 7 horas. El amortiguador de corrida contenía Tris-HCl 0,25M, glicina 0,192 M pH 8,8 y SDS al 0,1%. El amortiguador de muestra (1X) consistió en Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8; SDS al 2%; glicerol al 10% (v/v); mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,001%. Las muestras fueron hervidas a baño María por 3 minutos antes de ser colocadas en el gel.

Las proteínas usadas como estándares de masa molecular preparadas a partir de un kit comercial (Sigma), fueron las siguientes:  $\alpha$ -macroglobulina (180 KD),  $\beta$ -galactosidasa (116 KD), fructosa-6-fosfato quinasa (84 KD), piruvato quinasa (58 KD), fumarasa (48,5 KD), lactato deshidrogenasa (36,5 KD) y triosa-P-isomerasa (26,6 KD). Las masas moleculares de las proteínas de las muestras fueron determinadas por interpolación de la curva de movilidad relativa

en los geles en función del logaritmo de la masa molecular estándar de cada marcador.

Las bandas de proteínas fueron visualizadas mediante la tinción con azul de Coomassie 0,25%, metanol 50% y ácido acético 10%. La solución de desteñido consistió en ácido acético 7,5% y metanol 5%. Los geles mantenidos en esta solución fueron fotografiados y posteriormente secados entre papel de celofán en un secador de geles (Drygel modelo SE 540, Hoefer Scientific Instrument).

### **2.17 Análisis Western.**

Para los análisis Western, las proteínas extraídas de plantas de *P. chilensis* y soya fueron electrotransferidas durante toda la noche desde los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa a 180 V de acuerdo al método de Towbin y col. (1979). Las membranas fueron bloqueadas en amortiguador Tris-HCl pH 8,0; azida de Na 0,05%, BSA 0,25%, gelatina 0,25% y Tween-20 0,30% durante 3 horas o toda la noche. Posteriormente, las membranas fueron lavadas varias veces con amortiguador Tris-HCl pH 8,0; azida de Na 0,05%, Tween-20 0,30%. Luego de los lavados, las membranas fueron incubadas con anticuerpos policlonales contra ubiquitina libre, ubiquitina conjugada, ambas de embrión de pollo (Ciechanover y col. 1984) o con un anticuerpo monoclonal contra la proteína de estrés térmico de 72 KD de células HeLa. La dilución para el anticuerpo anti ubiquitina libre fue 1:200, para el anticuerpo anti ubiquitina conjugada 1:300 y para el anticuerpo anti HSP 70 1:1000. Luego de la

incubación con el primer anticuerpo, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti IgG desarrollado en cabra y ratón y conjugado a fosfatasa alcalina en una dilución 1:20 000. Para comprobar la especificidad de los anticuerpos, se realizaron controles incubando membranas con suero preinmune o sin el primer o segundo anticuerpo.

### **2.18 Dot blot, inmunodetección y análisis densitométrico.**

Análisis de inmuno dot blots fueron realizados con proteínas extraídas de plantas de *P. chilensis* mantenidas bajo condiciones simuladas. Experimentos de cinéticas se realizaron con extractos de plántulas de *P. chilensis* y de soya germinadas y crecidas a 25°C por 72 horas y tratadas a 40°C. Se utilizó una cámara BioRad (modelo Bio Dot) en la que se colocó por pocillo, 12,5 o 20 µg de proteína. Luego, las membranas fueron incubadas con el primer y segundo anticuerpo tal como se describe para los ensayos Western. Se realizaron inmuno dot blots con diluciones seriadas de ubiquitina comercial (Sigma) para obtener una curva de calibración.

La densitometría de los dot blots se realizó con un scanner Gelscan CS-4500 y el análisis de la imagen se hizo con el programa Gel-Perfect 5-2, software desarrollado por el Dr. Salvador Bozzo, Depto. de Medicina Experimental, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las absorbancias de los "dot blots" se registraron como picos y el área integrada de estos fue comparada con las absorbancias obtenidas con la curva de calibración. Los resultados fueron expresados en µg de ubiquitina µg de

proteína<sup>-1</sup> o  $\mu\text{g}$  de ubiquitina conjugada  $\mu\text{g}$  de proteína<sup>-1</sup>. En el caso de HSP 70 KD, los resultados fueron expresados en unidades de Absorbancia ( $\text{mm}^2 \mu\text{g}$  de proteína)<sup>-1</sup> debido a la ausencia de un estándar de HSP 70 KD para realizar una curva de calibración.

### **2.19 Extracción de RNA.**

El RNA total de plantas de *P. chilensis* fue extraído según la metodología descrita por Nieto-Sotelo y col. (1990). Se trituró el tejido con nitrógeno líquido en mortero y se transfirió el polvo a un tubo que contenía 2 volúmenes de amortiguador de extracción RGB (1% de Tris-isopropylnaphtalene sulfonic acid; 6% de ácido p-aminosalicílico; 100mM Tris pH 7,6; 50mM EGTA; 100mM NaCl; 1% SDS; 50 mM mercaptoetanol) y 2 volúmenes de suspensión de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla se homogenizó en polytron a velocidad máxima y se mezcló por inversión durante 15 minutos. Se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 4000 x g. A la fase acuosa se le agregó 1 vol de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por 15 minutos. Se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 4000 x g y se añadió a la fase acuosa 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 2 vol de etanol frío. Se precipitó durante toda la noche a -70°C. Se centrifugó a 0°C durante 15 minutos a 12 000 x g y la pastilla se disolvió en agua destilada estéril. Se añadió un volumen de LiCl 4M y se precipitó durante 8 horas como mínimo. Luego se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 12 000 x g y se repitió la precipitación con LiCl por lo menos dos veces más. La pastilla se disolvió en agua destilada estéril y se

precipitó a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche en presencia de 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2 vol de etanol frío. Se centrifugó a  $12\ 000 \times g$  durante 15 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$  y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Se centrifugó a  $12\ 000 \times g$  durante 10 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$  y la pastilla se secó al vacío y fue resuspendida en agua destilada estéril. Se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm.

## **2.20 Análisis Northern.**

El RNA obtenido fue colocado en un gel de agarosa al 1% en MAE (MOPS 0,2M; Acetato de sodio 50mM; EDTA 10 mM pH 7,0) en presencia de formaldehído. El gel se desarrolló a 150 V por 3 horas en amortiguador MAE 1X y formaldehído 3%. Se utilizó una cantidad de RNA entre 5 a 20 ng los que previamente se mezclaron con el amortiguador de muestra (formamida 5%; formaldehído 2%; MAE 1X; glicerol 1%; azul de bromofenol 2% y bromuro de etidio 0,01%) y se calentaron a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.

Se transfirió el RNA y se realizaron las hibridaciones de acuerdo al método descrito por Sambrook y col (1989). Se lavó el gel 2 veces por 20 minutos en SSC 10X (NaCl 1,5M; citrato de sodio 0,5M pH 7,0). La transferencia del RNA a un filtro Hybond húmedo se realizó por capilaridad durante toda la noche en SSC 10X con papel Whatman 3MM. Se lavó el filtro con SSC 1X, se secó a temperatura ambiente y fue fijado en luz ultravioleta de baja intensidad. La marcación de las sondas se realizó según el protocolo descrito en el catálogo de Random Primed Multiprime DNA Labelling System de Amersham RPN 1600. Se hirvió la banda de la sonda correspondiente (50 ng) durante 2 minutos y se

enfrió en hielo. Se mezclaron 10  $\mu$ l del DNA con 4  $\mu$ l de cada uno de los nucleótidos fríos, 5  $\mu$ l de buffer, 5  $\mu$ l de partidores, 18  $\mu$ l de agua estéril, 5  $\mu$ l de  $^{32}$ dCTP (5 uCi) y 2  $\mu$ l de Klenow (2U). Se mezcló bien y se incubó durante 3 horas a 37°C y se determinó la eficiencia de incorporación. Se utilizó una sonda de DNA genómico para el gen de ubiquitina de embrión de pollo (Bond y Schlesinger, 1985) y una sonda de cDNA para el gen de HSP 70 KD de maíz (Rochester y col. 1986). Se prehibridó el filtro con 7 ml de solución de prehibridación (formamida 50%; SDS 7%; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3M; EDTA 1mM; 0,1 mg/ml DNA de esperma de salmón) por al menos 10 minutos a 42°C. La hibridación se realizó con 10 ml de solución de prehibridación más 1x10<sup>6</sup> cpm de sonda hervida y enfriada/ ml de solución durante toda la noche a 42°C. Los filtros fueron lavados en amortiguador fosfato 0,4 M en presencia de SDS 1% 2 veces a 42 °C durante 30 minutos. La membrana húmeda se fijó entre papel plástico en un "cassette" de exposición con pantalla intensificadora y película X-OMAT de Kodak y se incubó a -70°C por 48 horas o más. La película se reveló usando fijador y revelador instantáneo Kodak.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Determinación de temperatura, tasa fotosintética, conductancia estomática y potencial hídrico en *Prosopis chilensis* bajo condiciones simuladas.

Debido a que las hojas son uno de los tejidos más expuestos a variaciones ambientales y a que en ellas se lleva a cabo el proceso fotosintético, la fisiología asociada a estas podría presentar variaciones importantes como respuesta a condiciones de estrés. En plantas de *P. chilensis* aclimatadas a condiciones simuladas de terreno, se evaluó el efecto de altas temperaturas sobre algunos parámetros fisiológicos asociados a las hojas como temperatura foliar, tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>, conductancia estomática, y potencial hídrico.

##### 3.1.1. Temperatura foliar.

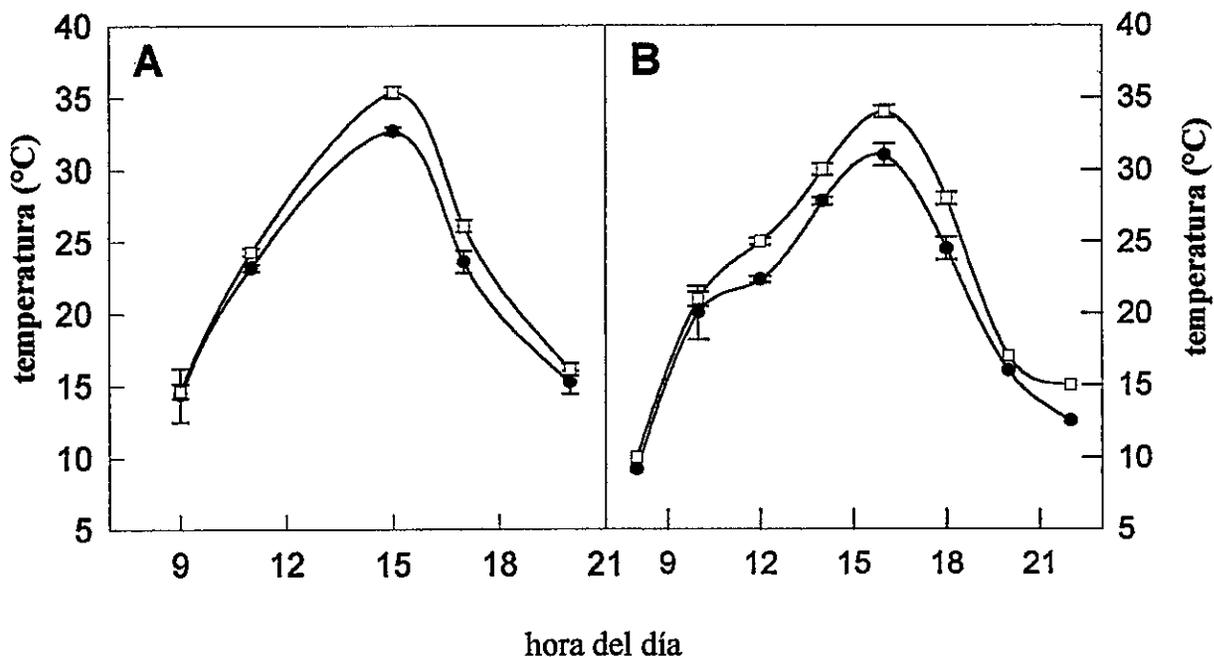
La determinación de la temperatura en la cámara de crecimiento y en las hojas de *Prosopis chilensis* bajo condiciones simuladas se realizó mediante termocuplas de contacto. Los resultados mostraron que las hojas presentan temperaturas menores que las temperaturas ambientales entre las 12:00 y las 18:00 horas, cuando la temperatura de la cámara alcanza el valor máximo (Figura 1A). La correlación entre temperatura ambiental y temperatura foliar en la cámara arrojó una pendiente de 1.12, con un coeficiente de correlación de 0.986, lo que confirma que la temperatura en las hojas de *P. chilensis* siempre

permanecen 1 ó 2 °C por debajo de la temperatura del aire. Resultados similares se observaron para las temperaturas foliares en árboles en la Quebrada San Carlos (Figura 1B). La relación entre temperatura ambiental y temperatura foliar arrojó una pendiente de 1.11 con un coeficiente de correlación de 0.993.

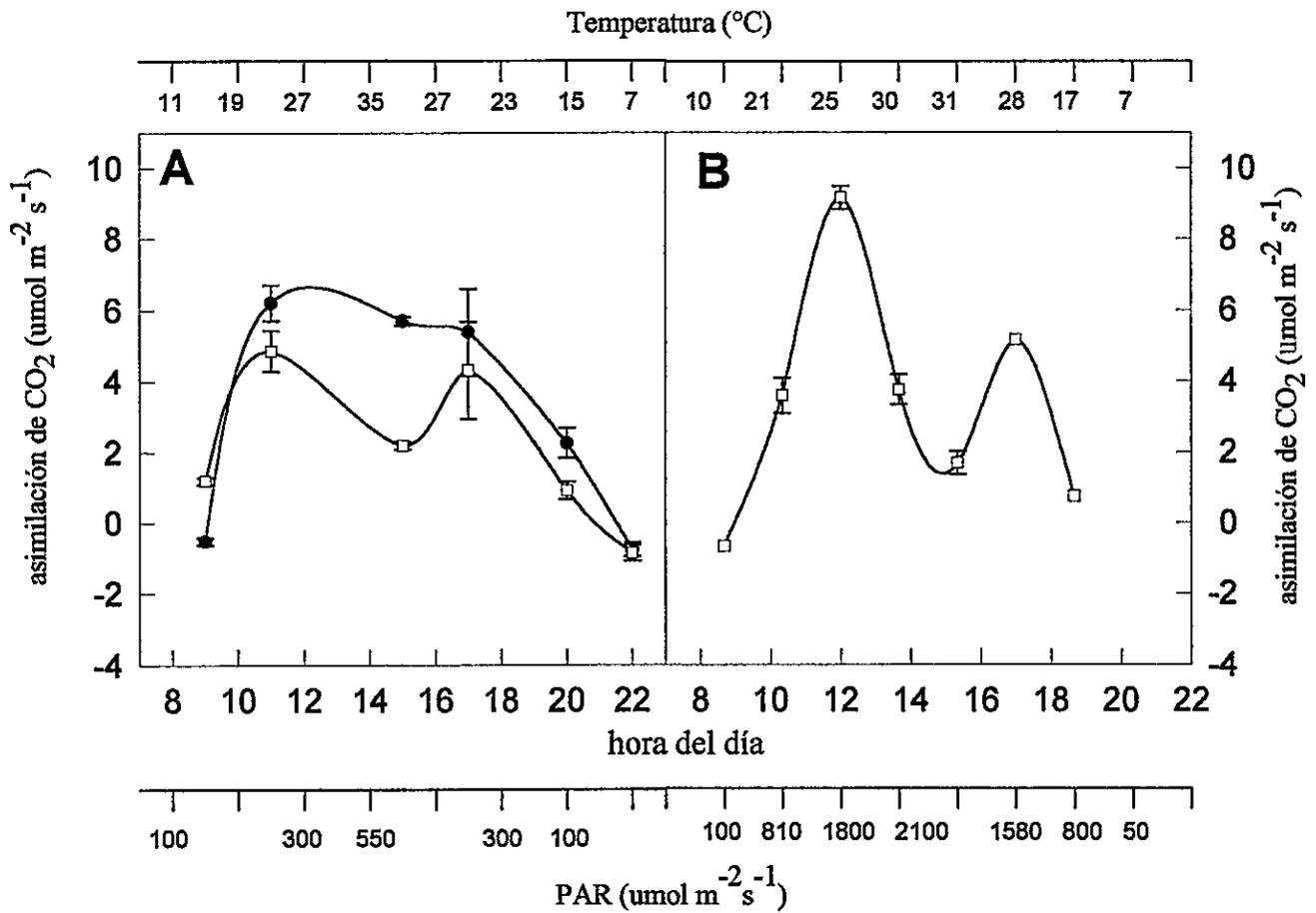
### **3.1.2. Asimilación de CO<sub>2</sub>.**

Para evaluar el efecto de las variaciones de temperatura y humedad sobre la fotosíntesis en *P. chilensis*, se determinó la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> en plantas mantenidas en condiciones simuladas a las determinadas en la Quebrada de San Carlos para árboles en exposición Noroeste. Los resultados muestran que bajo condiciones simuladas, la asimilación de CO<sub>2</sub> presentó una respuesta bimodal (Figura 2 A), la que aumentó a las 11:00 horas disminuyendo a las horas de mayor temperatura y menor humedad relativa (entre 13:00 y 17:00 horas); para aumentar nuevamente a las 19:00 horas. En plantas control mantenidas a temperatura constante de 25°C y 60% de humedad relativa, la asimilación de CO<sub>2</sub> presentó una leve tendencia bimodal aunque mucho menos marcada que la que se observó en plantas experimentales. Esta aumentó a las 11:00 horas y se mantuvo al mismo nivel durante el día, disminuyendo luego de las 19:00 horas alcanzando niveles negativos a las 21:00 horas (Figura 2 A).

La asimilación de CO<sub>2</sub> en árboles en exposición Noroeste también presentó una respuesta bimodal, con valores negativos a las 8:00 horas y un



**Figura 1.** Perfil de temperatura a diferentes horas del día bajo condiciones de terreno simuladas: (A) temperatura de la hoja en plantas de *P. chilensis* en la cámara de crecimiento ● ; temperatura de la cámara de crecimiento □. (B) Temperatura de las hojas en la Quebrada San Carlos ● ; temperatura del aire □. Cada punto corresponde al promedio de 4 mediciones  $\pm$  error estándar. La termocupla fue ubicada en la cara superior de los folíolos y a 10 cm de la hoja en el caso de la temperatura del aire.



**Figura 2. Asimilación de CO<sub>2</sub> durante el día en plantas de *P. chilensis*** (A) Plantas en condiciones de terreno simuladas □ ; plantas crecidas a temperatura y humedad relativa constantes ● (B) Arboles en exposición NO en la Quebrada San Carlos □ . Cada punto corresponde al promedio de 4 mediciones independientes ± error estándar. La flecha indica el medio día solar en cada caso. Los ejes en la parte superior de la figura muestran el curso diario de temperatura (°C) y la radiación fotosintéticamente activa (PAR).

máximo a las 12:00 horas, los valores bajaron entre las 13:00 y 17:00 horas (Figura 2 B). Se observó un segundo aumento en la asimilación de CO<sub>2</sub> a las 19:00 horas. La tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> en las plantas bajo condiciones simuladas fue menor que la observada en árboles en la Quebrada San Carlos (alrededor de 60% de los valores determinados en terreno para árboles en exposición Noroeste).

### **3.1.3. Conductancia estomática.**

Debido a que la respuesta bimodal presentada para la asimilación de CO<sub>2</sub> en *P. chilensis* podría ser resultado de cierre estomático a las horas de mayor temperatura, se determinó la conductancia estomática en plantas bajo condiciones simuladas y control. Los resultados mostraron que tanto en las plantas bajo condiciones simuladas como en plantas control, los estomas permanecen abiertos durante el período luminoso, incluso a las horas de mayor temperatura y menor humedad relativa (Figura 3). Este resultado se correlacionó con la menor temperatura foliar respecto a la temperatura ambiental que se observó en plantas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas. Los estomas se cerraron al comienzo del ciclo de oscuridad, alrededor de las 20:00 horas en las plantas experimentales y cerca de las 23:00 horas en las plantas control. Los estomas permanecieron cerrados durante el período de oscuridad. Al mismo tiempo, se observó que las hojas de las plantas aclimatadas en cámara de

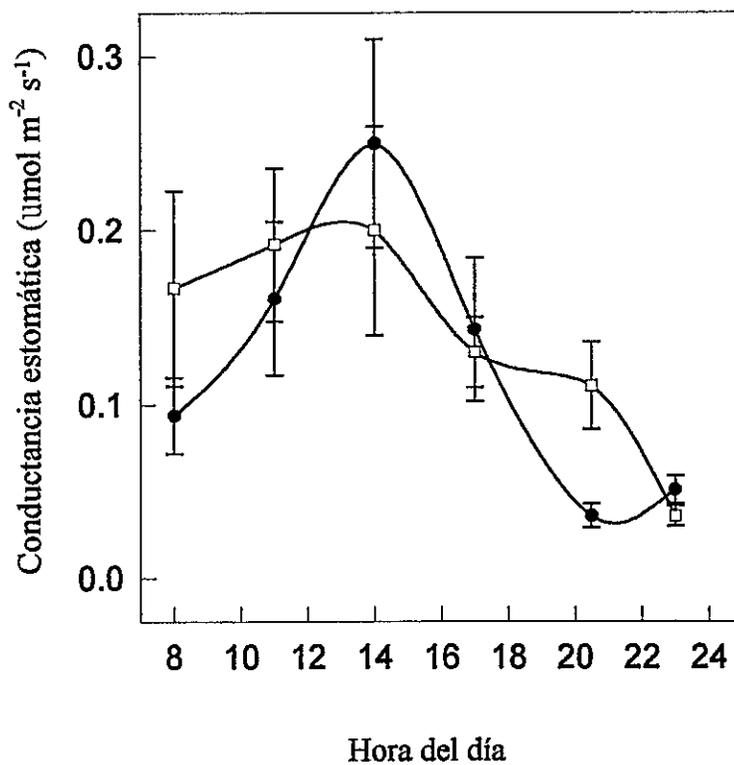
cultivo a condiciones simuladas de terreno permanecían plegadas a las horas de mayor temperatura y menor humedad relativa (Figura 4)

#### **3.1.4. Potencial hídrico.**

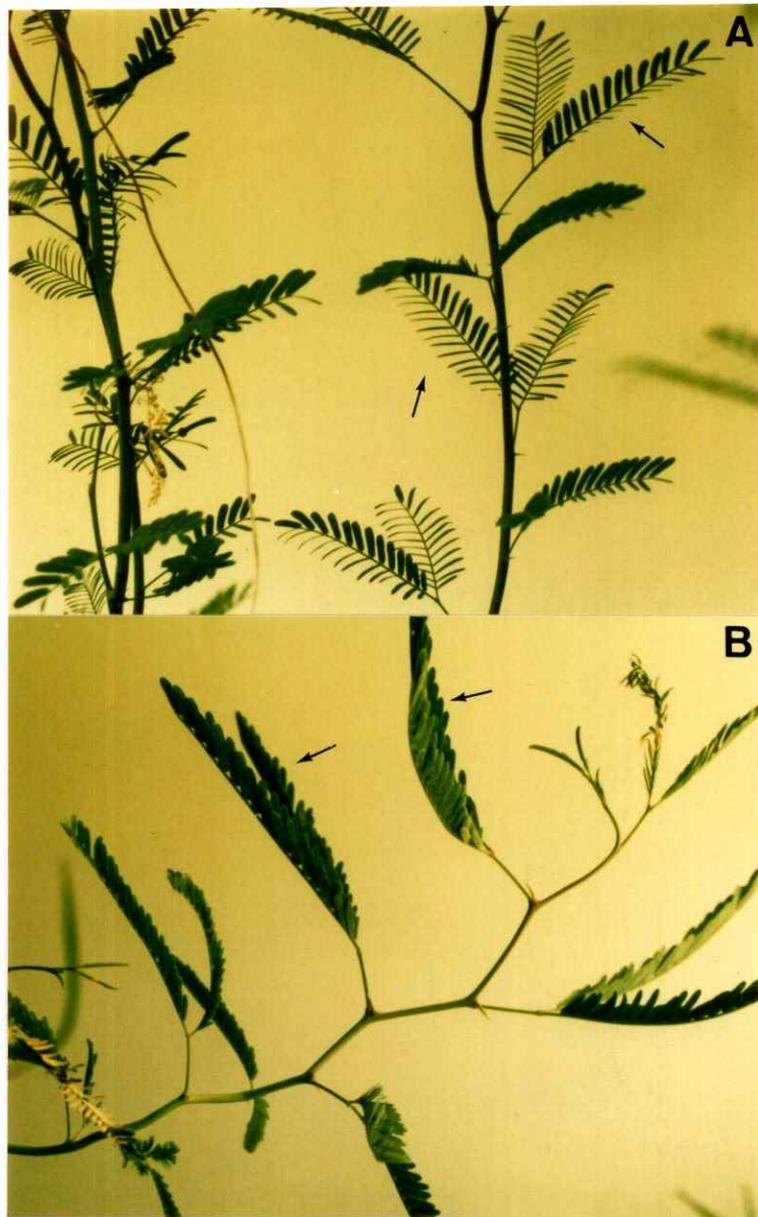
Ya que los estomas permanecen abiertos aún a horas de alta temperatura y baja humedad ambiental, es posible que las plantas de *P. chilensis* en condiciones simuladas presenten estrés hídrico por pérdida de agua. Para evaluar el nivel de estrés al que la planta está sometida bajo condiciones simuladas, se determinó el potencial hídrico en ramas de plantas de *P. chilensis*. Se observó que existe una variación en el potencial hídrico a lo largo del día, el que presenta un valor de -0,8 MPa a las 8:00 horas, haciéndose más negativo a las horas de mayor temperatura y menor humedad relativa, llegando a un valor de -2,5MPa a las 16:00 horas (Figura 5). El potencial hídrico se recupera luego de la disminución, para volver a valores iniciales (-0,5 MPa) a las 23:00 horas.

#### **3.2. Acumulación de azúcares reductores solubles, sacarosa y prolina.**

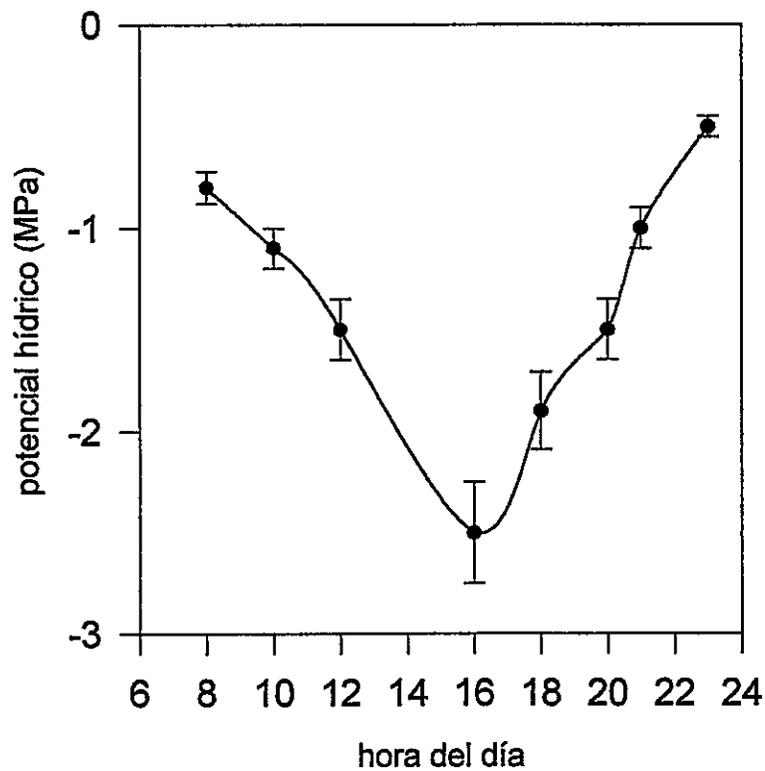
La acumulación de solutos es un aspecto importante de aclimatación y respuesta en plantas a diversos tipos de estrés. *P. chilensis* se encuentra creciendo en condiciones ambientales que son consideradas de estrés para la mayoría de la especies vegetales. Debido a esto, variaciones en los niveles de azúcares solubles, entre ellas sacarosa, así como la acumulación de prolina,



**Figura 3.** Conductancia estomática durante el día en hojas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas. Plantas control  $\square$  ; plantas en condiciones de terreno simuladas  $\bullet$  . Cada punto corresponde al promedio de 4 mediciones independientes  $\pm$  desviación estándar.



**Figura 4.** Plegamiento de folíolos de *P. chilensis* en horas de alta temperatura y baja humedad relativa. Plantas de *P. chilensis* de 6 meses de edad fueron aclimatadas en cámara de crecimiento y sometidas a fluctuaciones diarias de temperatura y humedad relativa simulando un día de primavera en la Quebrada San Carlos, La Serena. **(A)** folíolos de plantas control, **(B)** folíolos de plantas tratadas.



**Figura 5.** *Potencial hídrico en plantas de P. chilensis bajo condiciones simuladas.* La figura muestra los valores de potencial hídrico en plantas de *P. chilensis* de 6 meses de edad sometidas a fluctuaciones diarias de humedad y temperatura. Las condiciones de crecimiento se detallan en Materiales y Métodos, secciones 2.3 y 2.4. Las determinaciones se realizaron en ramas ubicadas en la parte media de las plantas. Cada punto corresponde al promedio de 4 mediciones  $\pm$  error estándar.

podrían ser parte de una respuesta metabólica asociada a estrés por altas temperaturas en *P. chilensis*.

### **3.2.1. Azúcares solubles y sacarosa.**

El contenido de azúcares reductores solubles en plantas de *P. chilensis* sometidas a variaciones de temperatura y humedad relativa presentó un máximo de acumulación a las 11:00 horas (210 mg/Kg p.f), para disminuir a lo largo del día presentando el valor mínimo a las 23:00 horas (Figura 6 A). Se observó un aumento leve a las 17:00 horas el que no alcanzó el valor máximo. El contenido de azúcares reductores solubles en las plantas control presentó también un máximo a las 17:00 horas y disminuyó progresivamente hacia las 23:00 horas. El contenido de azúcares reductores solubles en las plantas control siempre fue mayor al determinado en las plantas bajo condiciones simuladas.

El contenido de sacarosa, en plantas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas presentó un patrón similar al observado para el contenido de azúcares reductores solubles (Figura 6 B). El valor máximo para sacarosa se observó a las 11:00 horas (910 mg/Kg p.f.), el que disminuyó a lo largo del día. Se observó un pequeño hombro en el contenido de sacarosa a las 17:00 horas el que, sin embargo, no alcanzó el valor máximo. El contenido de sacarosa en las plantas control no presentó variaciones importantes a lo largo del día.

Tanto el patrón de variación de azúcares reductores solubles como el de sacarosa se correlacionaron con el patrón presentado por la curva de asimilación de CO<sub>2</sub>.

### **3.2.2. Contenido de prolina.**

Bajo condiciones simuladas, la concentración de prolina en las hojas de *P. chilensis* aumentó alrededor de 50 veces por sobre el nivel determinado a las 8:00 y 23:00 horas, alcanzando un máximo de 51 nmoles mg de proteína<sup>-1</sup> a las 14:00 horas (Figura 7). Posteriormente, el contenido de prolina disminuyó alcanzando valores similares al inicial a las 23:00 horas. En las plantas que se mantuvieron en condiciones control de temperatura y humedad relativa, el contenido de prolina se mantuvo constante a lo largo del día y los valores determinados a las 8:00 y a las 23:00 horas fueron similares a los observados en plantas sometidas a variaciones de temperatura y humedad diarias. El nivel de prolina en plantas en condiciones de terreno simuladas fue 50 veces mayor que el determinado en plantas control a las horas de mayor temperatura.

### **3.2.3. Evolución de oxígeno en presencia de prolina.**

Uno de los papeles fisiológicos que se han descrito para prolina es el de proteger la actividad de los cloroplastos cuando estos son sometidos a condiciones de estrés. Debido al gran aumento (50 veces) en el nivel de prolina en plantas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas, se determinó la tasa de

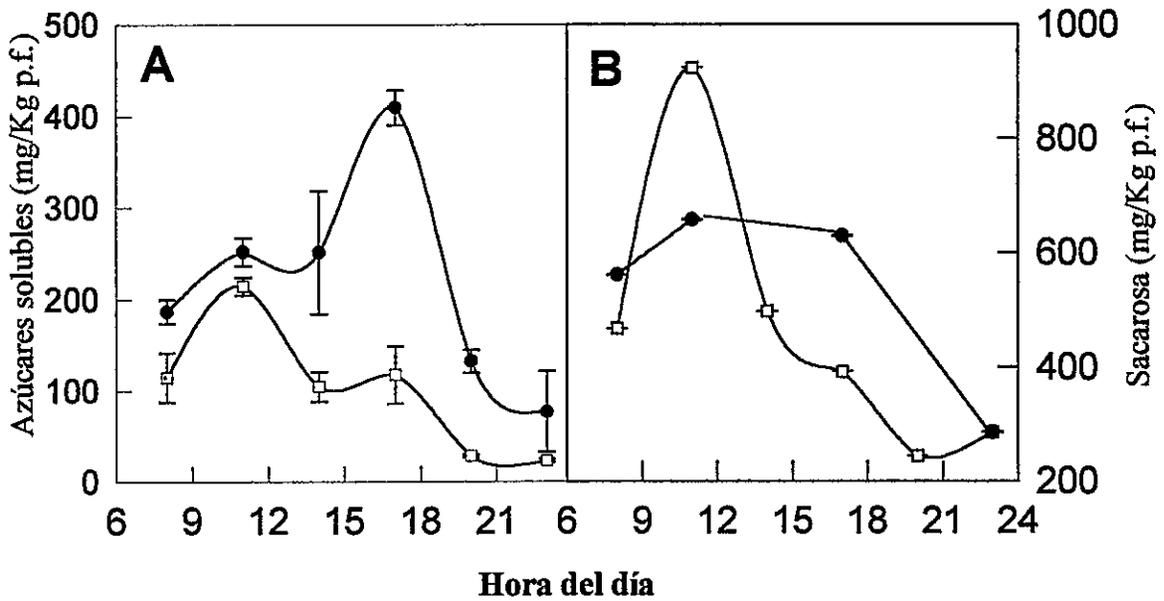


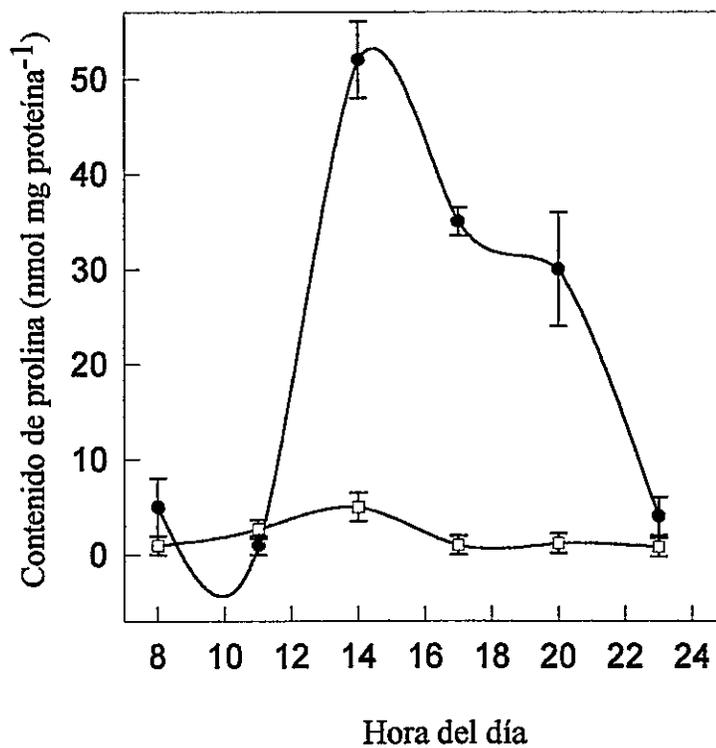
Figura 6. Fluctuación diaria en el nivel de (A) azúcares reductores solubles y (B) sacarosa en plantas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas. ● plantas control; □ plantas en condiciones de terreno simuladas. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar.

respiración en cloroplastos de plantas de *P. chilensis* crecidas a 25°C en ausencia y presencia de 0,15 mM de prolina a diferentes temperaturas.

Los resultados mostraron que la evolución de oxígeno determinada a 25°C es mayor a la determinada a 0°C y que ésta no presenta mayores variaciones hasta 40°C tanto en ausencia como en presencia de prolina 0,15 mM (Figura 8A). Cuando los cloroplastos fueron incubados a 45°C, la actividad respiratoria fue mayor en presencia de prolina 0,15 mM. Al aumentar la temperatura de incubación a 50°C, la actividad de los cloroplastos disminuyó notablemente en ausencia o presencia de prolina, sin embargo, el valor que se observó con prolina 0,15 mM en el medio de incubación es similar al valor basal determinado a 0°C.

#### **3.2.4. Efecto de prolina sobre la actividad de cloroplastos.**

Debido a que prolina podría estar actuando como un activador en lugar de proteger la actividad de los cloroplastos, se realizaron determinaciones de la evolución de oxígeno en preparaciones de cloroplastos de *P. chilensis* que fueron tratados a 50°C durante 2 horas en presencia de distintas concentraciones de prolina. Se observó que la actividad de los cloroplastos es mayor cuando estos son incubados con prolina 0,075 mM respecto a la actividad determinada en ausencia de prolina (Figura 8 B). Se observó que la actividad de los cloroplastos incubados a 50°C durante 2 horas aumentó cuando se incrementaron las concentraciones de prolina en el medio de



**Figura 7.** Contenido de prolina durante el día en plantas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas. Plantas control □ ; plantas en condiciones de terreno simuladas ● . Cada punto corresponde al promedio de 4 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar.

incubación. El valor máximo de evolución de oxígeno determinado para cloroplastos incubados a 50°C durante 2 horas correspondió a 1,8 ppm a una concentración de prolina de 0,6 mM. Esta tasa de evolución de oxígeno fue similar a la tasa de actividad basal determinada en preparaciones de cloroplastos a 0°C.

### **3.3. Evolución de etileno en plántulas de *P. chilensis* sometidas a estrés térmico.**

En plantas, los procesos fisiológicos bajo control hormonal son muchos y muy variados. Existen algunas hormonas vegetales que han sido descritas como hormonas del estrés ya que su síntesis aumenta bajo condiciones poco favorables para la planta, entre ellas, etileno. En plántulas de *P. chilensis*, la evolución de etileno se podría considerar como un marcador del nivel de estrés térmico al que está sometida la planta.

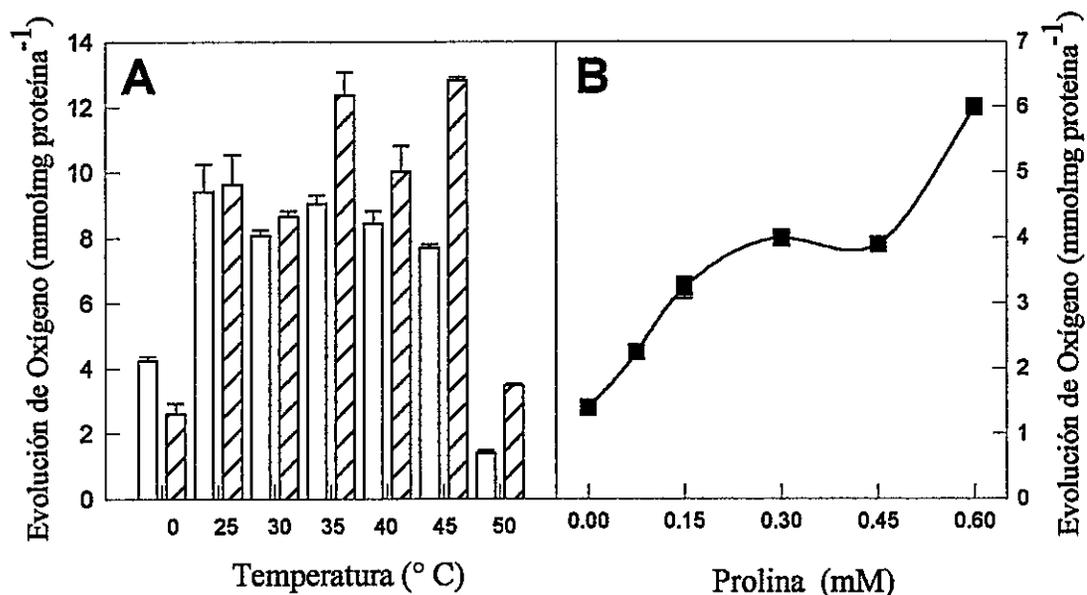
#### **3.3.1. Evolución de etileno a distintos tiempos de germinación.**

Se determinó la evolución de etileno en plántulas de *P. chilensis* de 48, 72 y 96 horas de edad mantenidas durante 2 horas a distintas temperaturas (25°, 30°, 35°, 40°, 45° y 50°C). En plántulas de 48 horas de edad se observó que la evolución de etileno no presentó variaciones cuando las temperaturas de tratamiento se mantuvieron entre 25° y 35°C (Figura 9). A temperaturas más altas, entre 40 y 50°C, el nivel de etileno de las plántulas disminuyó

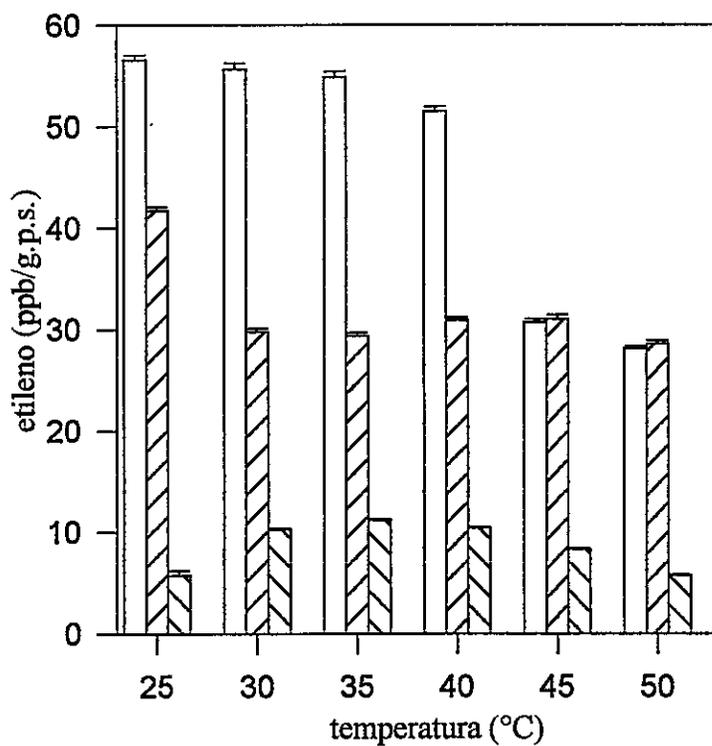
progresivamente hasta un valor mínimo de 28,1 ppb/g.p.s. a 50°C. Cuando las plántulas fueron crecidas durante 72 horas, el patrón de evolución de etileno fue diferente; se observó una producción máxima de 41,68 ppb/g.p.s. al mantener las plántulas a 25°C durante 2 horas. Este valor disminuyó cuando la temperatura de exposición fue 30°C para mantenerse sin mayores variaciones entre 30° y 50°C de tratamiento. Para plántulas de 72 horas de edad, el nivel de etileno en todos los tratamientos, fue menor al registrado en plántulas de 48 horas de edad. Cuando las plantas fueron crecidas durante 96 horas, el nivel de etileno disminuyó aproximadamente 3 veces respecto al determinado en plántulas de 72 horas de edad. Se observaron valores mínimos de 5,74 y 5,68 ppb/g.p.s. cuando las plantas fueron expuestas a 25° y 50°C respectivamente. La evolución de etileno aumentó al doble cuando las plantas se trataron a 30°C y ésta no presentó variaciones en los tratamientos a 35° y 40°C. El nivel de etileno disminuyó cuando los tratamientos se realizaron a 45° y 50°. Se observó que los niveles de etileno producidos por las plantas de *P. chilensis* varía dependiendo del estado de desarrollo de las plántulas, disminuyendo a medida que aumenta el tiempo de desarrollo posterior a la germinación.

#### **3.4. Ubiquitina libre, ubiquitina conjugada y HSP 70 en plantas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas.**

La expresión de proteínas de estrés es una estrategia que poseen todos los organismos vivos para tolerar o resistir condiciones ambientales



**Figura 8.** Efecto de prolina sobre la evolución de oxígeno en cloroplastos de *P. chilensis* (A) Evolución de oxígeno en ausencia □ y en presencia de prolina 0,15 mM ▨ . (B) Evolución de oxígeno en cloroplastos tratados a 50°C durante 2 horas en presencia de distintas concentraciones de prolina. Cada punto corresponde al promedio de 4 mediciones independientes ± error estándar.



**Figura 9.** Evolución de etileno en plántulas de *P. chilensis*. Plántulas de *P. chilensis* de distintas edades fueron sometidas a estrés térmico durante 2 horas. □ 48 horas de edad; ▨ 72 horas de edad; ▩ 96 horas de edad. Cada punto corresponde al promedio de 4 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar.

desfavorables. En plantas, se conocen una serie de proteínas llamadas proteínas de estrés térmico (HSPs), cuyos niveles de expresión aumentan en condiciones de estrés y que poseen un papel fisiológico conocido. La expresión de las HSPs ubiquitina y HSP 70 en *P. chilensis*, podría ser parte de las estrategias que posee la planta para tolerar las altas temperaturas a las que se ve expuesta en condiciones naturales.

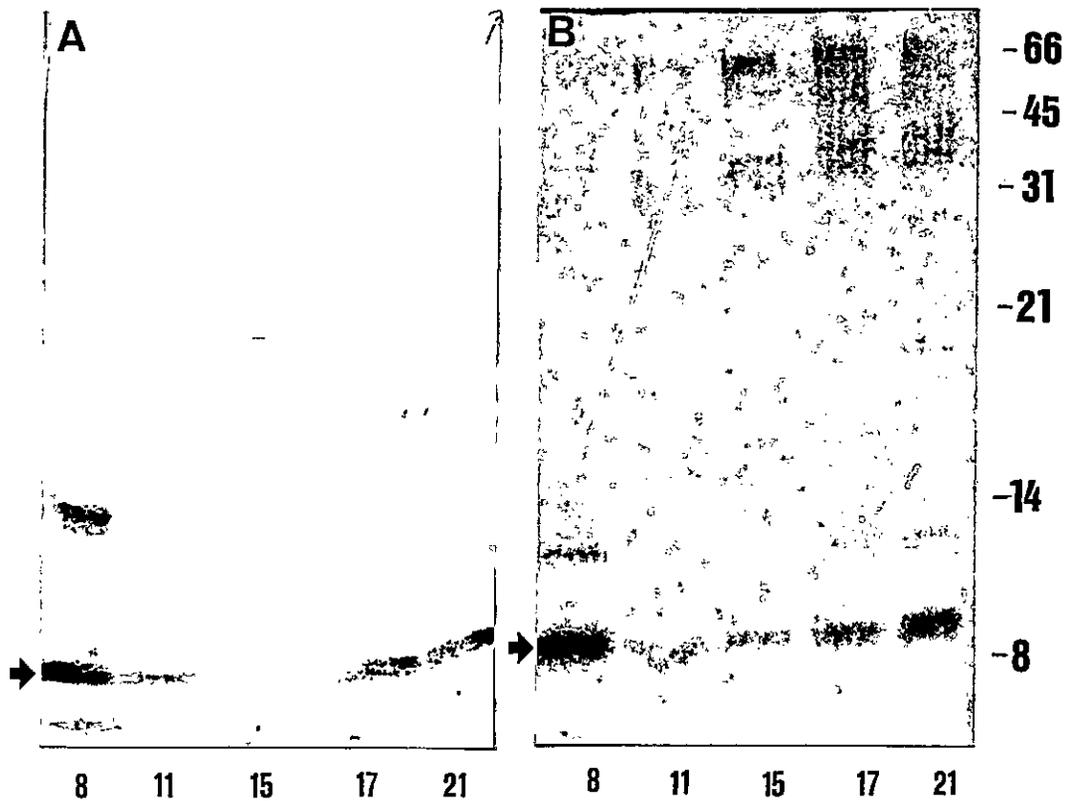
#### **3.4.1. Western blots para ubiquitina libre y ubiquitina conjugada.**

Se realizaron geles SDS-PAGE con extractos de proteína soluble de plantas de *P. chilensis* mantenidas en condiciones simuladas a lo largo del día para identificar las bandas de proteínas que corresponden a ubiquitina libre y a ubiquitina conjugada mediante análisis Western. Los resultados obtenidos mediante inmuno dot blots para plantas experimentales fueron confirmados por los análisis Western. Se observó reacción cruzada del anticuerpo anti ubiquitina libre con dos bandas de proteína (Figura 10 A). Estas bandas correspondían al monómero de 8 KDa y al dímero de 16 KDa. Ambas bandas presentan una expresión clara a las 8:00, 17:00 y 21:00 horas y se expresan más difusamente a las 11:00 y 15:00 horas. El anticuerpo anti ubiquitina conjugada presentó reacción con varias bandas de proteína (Figura 10 B), que se visualizaron en la zona de alto peso molecular ya que la masa de estas proteínas aumentaría producto de la unión de varias moléculas de ubiquitina unidas a ellas. Las bandas para estas proteínas presentan un patrón difuso, probablemente debido

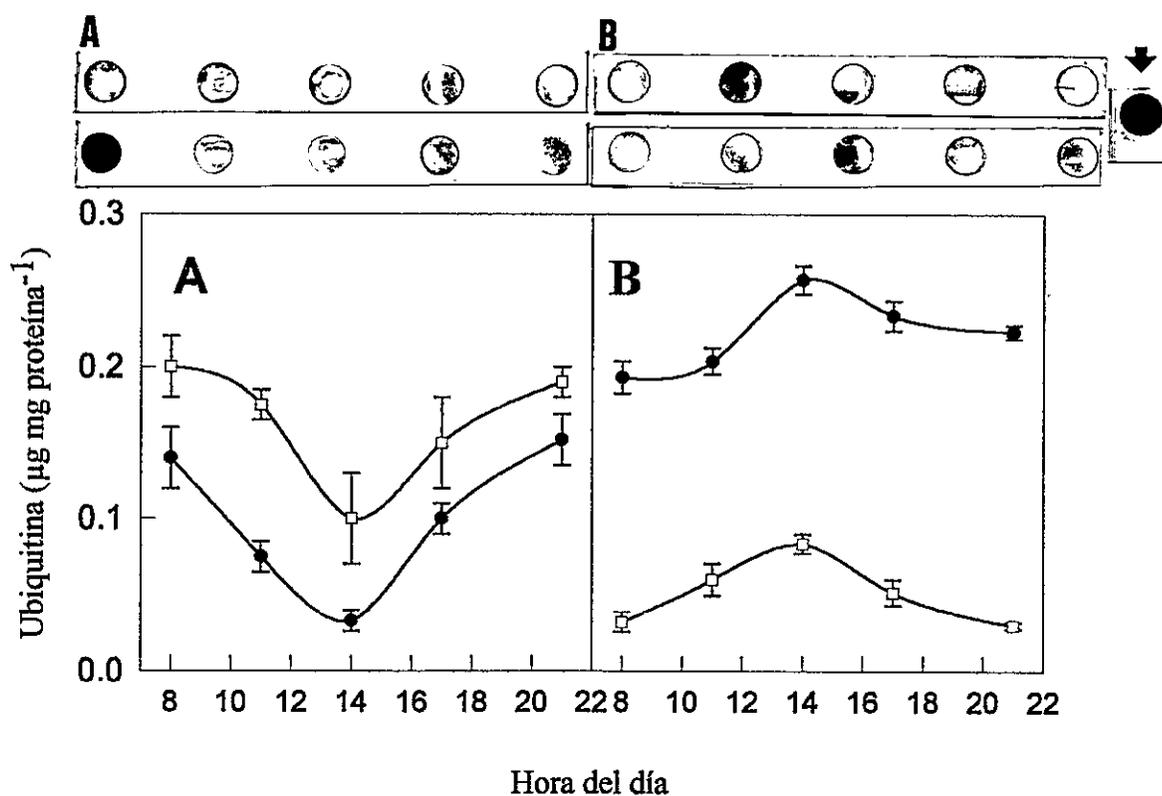
a diferentes estados de degradación de las proteínas que han sido marcadas con ubiquitina. Estas bandas de conjugados proteína-ubiquitina se observaron más claramente a partir de las 11:00 horas hasta las 21:00 horas presentando una mayor intensidad entre las 15:00 y 17:00 horas. En todos los casos se colocaron 30  $\mu\text{g}$  de proteína soluble en el gel y se utilizó un estándar de ubiquitina libre comercial.

### **3.4.2. Inmuno dot blots para ubiquitina libre y ubiquitina conjugada.**

Mediante inmuno dot blots se cuantificaron los niveles de ubiquitina libre y de ubiquitina conjugada a proteínas en extractos de plantas de *P. chilensis* mantenidas en condiciones simuladas durante el día y de plantas en condiciones constantes de humedad y temperatura. Tanto en plantas experimentales como controles, ubiquitina libre presentó un patrón opuesto al observado para ubiquitina conjugada (Figura 11 A y B). En plantas en condiciones simuladas, el nivel de ubiquitina libre fue alto durante la mañana y disminuyó a un 50% del valor inicial a las 14:00 horas para luego aumentar y alcanzar su valor máximo a las 21:00 horas. En las plantas control, el nivel de ubiquitina libre fue mínimo también a las 14:00, para aumentar posteriormente y llegar a un máximo a las 21:00 horas. La ubiquitina conjugada presentó niveles bajos a las 8:00 horas en plantas tratadas y plantas control (Figura 11 B). Se observó un incremento en el nivel de ubiquitina conjugada cuando la temperatura foliar aumentó, el que luego disminuyó durante la tarde y alcanzó un valor mínimo después de las 20:00



**Figura 10.** Análisis Western de proteínas solubles de *P. chilensis*. (A) incubación con el anticuerpo policlonal contra ubiquitina libre diluído 1:200; (B) incubación con el anticuerpo policlonal contra ubiquitina conjugada diluído 1:300. El segundo anticuerpo se utilizó diluído 1:20.000. Las horas del día se indican en la parte inferior de la fotografía. Las masas moleculares a se indican a la derecha. Las flechas indican las bandas de proteínas identificadas como ubiquitina libre.

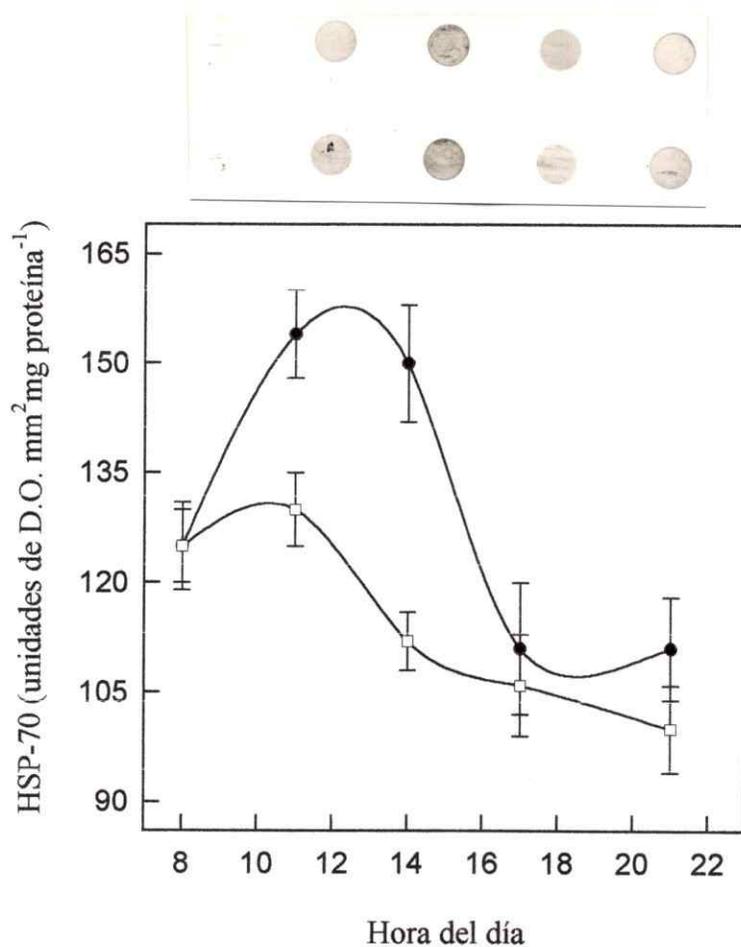


**Figura 11.** Fluctuaciones diarias de ubiquitina libre (A) y ubiquitina conjugada (B) en plantas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas. Plantas control □ ; plantas en condiciones de terreno simuladas ● . Cada punto corresponde al promedio de 3 determinaciones independiente  $\pm$  error estándar. Las fotografías muestran el resultado obtenido del análisis inmunológico de "dot blots" (A) ubiquitina libre; (B) ubiquitina conjugada. La flecha indica la reacción con el estándar de 1,5  $\mu\text{g}$  de ubiquitina comercial. Cada "dot" corresponde a 12,5  $\mu\text{g}$  de extracto de proteína.

horas. El nivel de ubiquitina conjugada fue siempre menor en plantas control respecto a plantas bajo condiciones simuladas. A las 14:00 horas, el nivel de ubiquitina conjugada en plantas control fue 4 veces más que el nivel detectado en plantas en condiciones de terreno simuladas.

### **3.4.3. Inmuno dot blots para HSPs de 70 KDa.**

Mediante inmuno dot blots de extractos de proteínas solubles de plantas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas durante el día y de plantas control, se cuantificó el nivel de las proteínas de estrés térmico pertenecientes a la familia de 70 KDa (HSP 70) similares a la HSP de 72 KDa de células HeLa. El patrón de expresión diaria de las proteínas de estrés térmico de *P. chilensis* mostró que estas HSPs aumentaban en las plantas en condiciones de terreno simuladas al aumentar la temperatura foliar y presentaban una disminución hacia la 17:00 horas cuando la temperatura foliar era 26°C, permaneciendo en un nivel bajo durante la tarde y la noche (Figura 12). En las plantas control, la expresión de estas HSPs aumentó levemente a las 11:00 horas, disminuyendo rápidamente en horas posteriores, aunque la temperatura foliar permaneció constante a alrededor de 26°C durante todo el experimento.



**Figura 12.** Niveles diarios de proteínas de la familia HSP 70 en plantas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas. Plantas control □ ; plantas en condiciones de terreno simuladas ● . Cada punto corresponde al promedio de 3 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar. La fotografía muestra el resultado obtenido en el análisis inmunológico en "dot blots" para el anticuerpo anti HSP70. Cada "blot" corresponde a 12,5  $\mu$ g de extracto de proteína.

### **3.5 Análisis comparativo de la respuesta a estrés térmico en *Prosopis chilensis* y *Glycine max*.**

Una vez caracterizada la respuesta a estrés por calor de algunos parámetros fisiológicos y moleculares en plantas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas, se realizó la comparación de ciertas respuestas a altas temperaturas entre *P. chilensis* y *G. max* con el objeto de establecer el grado de termotolerancia entre las plantas.

#### **3.5.1. Efecto de la temperatura sobre la germinación y el crecimiento de *P. chilensis* y *G. max*.**

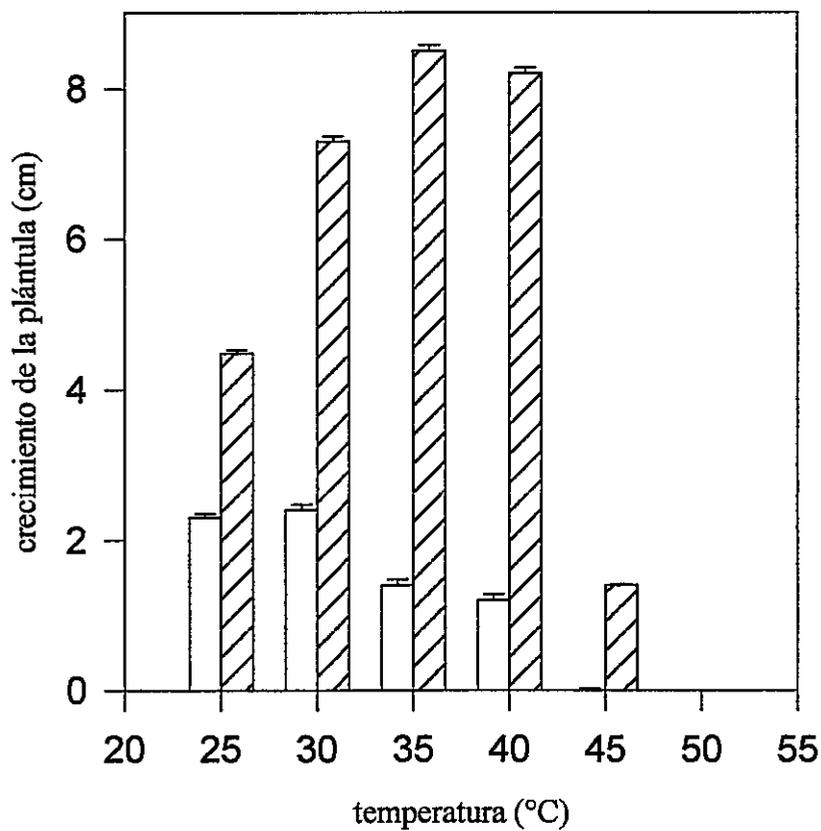
Se germinaron semillas de *P. chilensis* y *G. max* a distintas temperaturas entre 25 y 50°C. Luego de un período de imbibición de 24 horas. A 35°C, la germinación de *P. chilensis* y *G. max* fue 100% y 70% respectivamente. El porcentaje de germinación a 25° y 30°C fluctuó entre 90 y 80% para ambas plantas. A 40°C, la germinación de *P. chilensis* fue de 50% y a 45°C, sólo 10% de las semillas de *P. chilensis* germinaron y no se observó germinación en las semillas de *G.max*. A 50°C no se observó germinación ni en *P. chilensis* ni en *G.max*. Una vez determinado el efecto de la temperatura sobre la germinación de las semillas, se evaluó la tasa de crecimiento de las plántulas a estas mismas temperaturas, midiendo las longitudes del eje embrionario 72 horas después de la germinación. Se observó que las plántulas de *P. chilensis* crecieron mejor que las plántulas de *G.max* en todas las temperaturas de

tratamiento (Figura 13). El óptimo de crecimiento para *P. chilensis* fue 35°C y para *G.max* fue 30°C. Se determinó la temperatura letal de crecimiento para ambas plantas y se observó que las plántulas de *P. chilensis* son incapaces de germinar y crecer a 50°C. La temperatura letal para *G.max* fue menor, ya que las semillas dejan de germinar y crecer a 45°C. La menor tasa de crecimiento de *P. chilensis* se detectó a 45 °C y en *G.max* a 40°C.

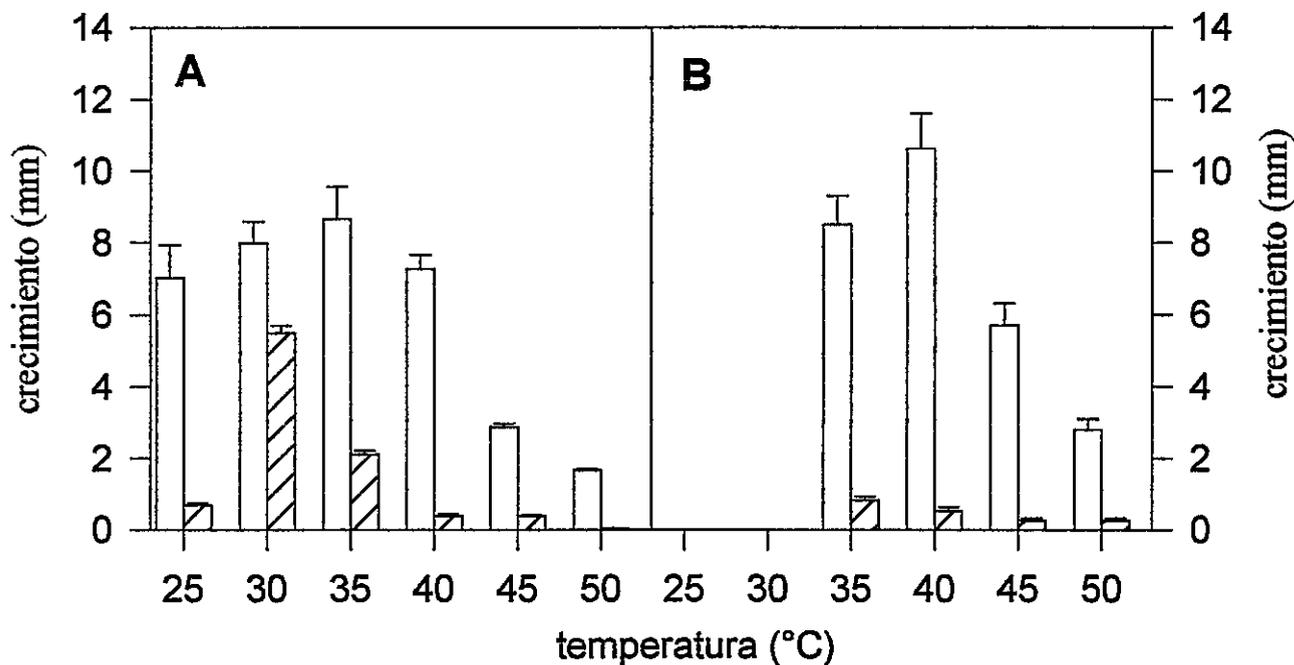
Se evaluó la termotolerancia en ambas plantas germinando las semillas a 25° y 35°C y se midieron las longitudes de los ejes embrionarios de las plántulas crecidas a diferentes temperaturas entre 25° y 50°C luego de 72 horas desde la germinación. Cuando las semillas de ambas plantas fueron germinadas a 25°C, la temperatura óptima de crecimiento fue 30°C para *G.max* y 35°C para *P. chilensis* (Figura 14 A). Si las semillas son germinadas a una temperatura mayor de 35°C, la temperatura óptima de crecimiento en *G.max* permanece en 30°C pero la temperatura óptima de crecimiento en *P. chilensis* aumenta a 40°C (Figura 14 B). Cuando las semillas de ambas plantas son germinadas a 35°C, estas son capaces de sobrevivir a las temperaturas letales aunque *G. max* siempre presentó menor crecimiento que *P. chilensis*.

### **3.5.2. Temperatura letal (TL<sub>50</sub>) en hojas de *P. chilensis* y *G.max*.**

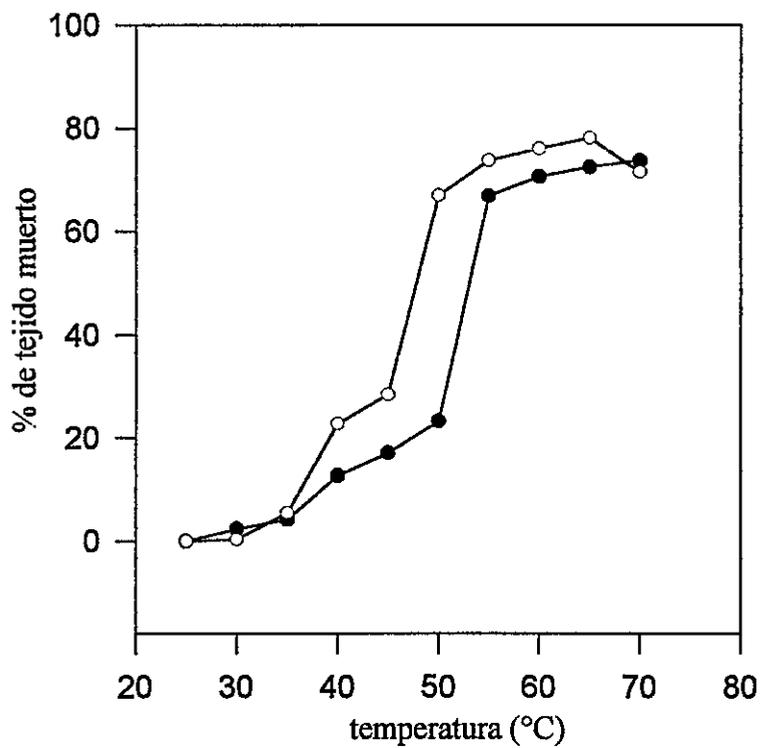
Se evaluó el efecto de altas temperaturas sobre la sobrevivencia del tejido foliar en *P. chilensis* y *G.max* mediante la determinación de la TL<sub>50</sub>. Se observó que las curvas de sobrevivencia del tejido son similares para ambas



**Figura 13.** Efecto de la temperatura sobre el crecimiento de plántulas de *P. chilensis* y *G. max* de 72 horas de edad. *P. chilensis* ▨ ; *G. max* □. Cada barra corresponde al promedio de 4 determinaciones ± error estándar. El crecimiento se determinó en plántulas cuyas semillas fueron germinadas a diferentes temperaturas. Los valores representan la longitud del eje embrionario. El efecto de la temperatura sobre la germinación se describe en el texto.



**Figura 14.** Inducción de termotolerancia en *P. chilensis* y *G. max* germinadas a 25° (A) y 35°C (B), y crecidas a diferentes temperaturas. *P. chilensis* □ ; *G. max* ▨ .Cada barra corresponde al promedio de 4 determinaciones ± error estándar. Se midió el crecimiento en plántulas de 72 horas de edad cuyas semillas fueron previamente germinadas durante 24 horas a 25°C (A) y a 35°C (B). Los valores representan la longitud del eje embrionario.



**Figura 15.** Temperatura letal ( $TL_{50}$ ) en hojas de *P. chilensis* y *G. max*. Se determinó la  $TL_{50}$  en en tejido foliar de *P. chilensis* ● y *G. max* ○ mediante determinaciones de la conductividad del medio de incubación a diferentes temperaturas. Cada punto corresponde al promedio de 4 determinaciones  $\pm$  error estándar.

plantas (Figura 15). Sin embargo, *P. chilensis* presenta una  $TL_{50}$  6°C mayor que *G. max*, ya que la mitad del tejido foliar de *P. chilensis* muere a 53°C y en *G. max* esta temperatura fue 47°C. Se observó que alrededor de 60°C, las curvas de sobrevivencia tienden a igualarse y mantenerse constantes, aunque ni en *P. chilensis* ni en *G. max* se alcanzó 100% de muerte en el tejido.

### 3.5.3. Emisión de fluorescencia en plantas de *P. chilensis* y *G. max*.

Se evaluó la estabilidad del PSII al estrés por temperatura en *P. chilensis* y *G. max* a través de la emisión de fluorescencia. Las determinaciones se realizaron a 25°, 35°, 40° y 45°C en tratamientos de 2 horas. Se observó que la fluorescencia inicial ( $F_o$ ) fue siempre mayor en *G. max* respecto a *P. chilensis* en todas las temperaturas de tratamiento excepto 25°C (Figura 16 A). En ambos grupos de plantas, se observó un aumento en  $F_o$  a partir de 35°C que alcanzó un máximo a 45°C. La diferencia en la  $F_o$  entre *G. max* y *P. chilensis* se hace evidente a partir de 35°C. Las curvas para  $F_o$  en ambos grupos presentan tendencias similares con diferencias de magnitud.

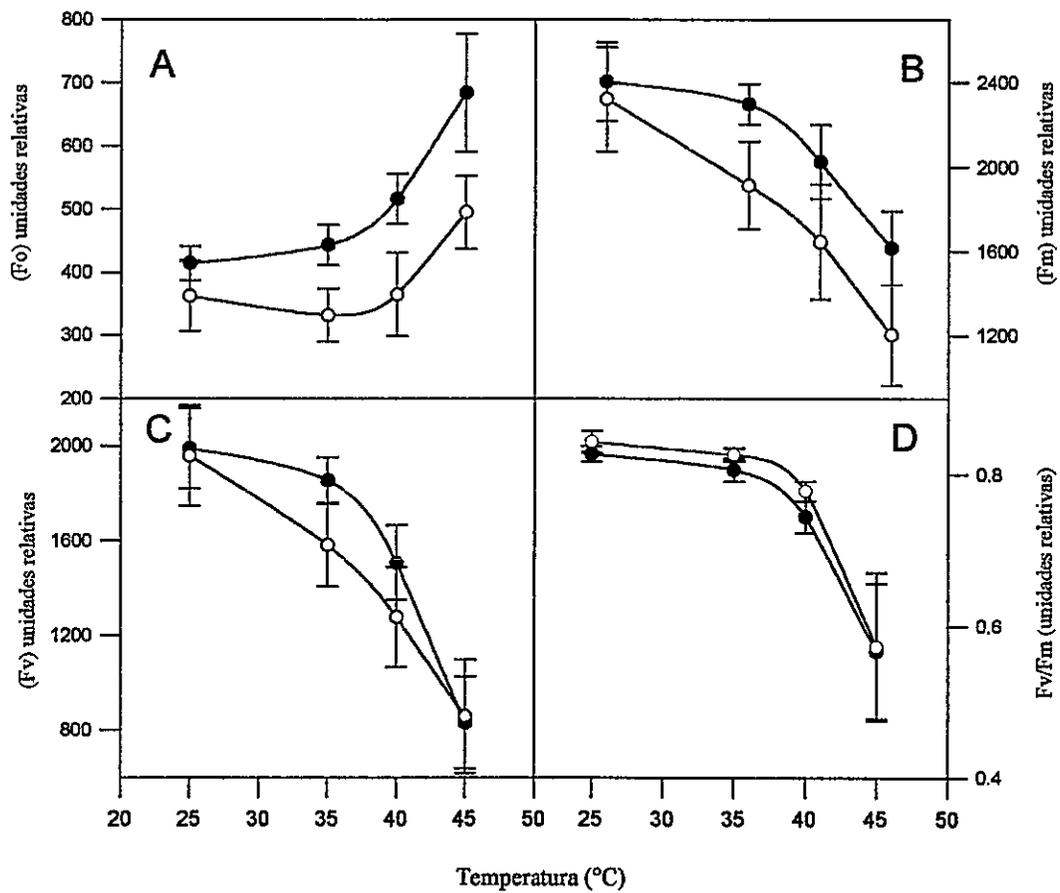
En ambos grupos de plantas, la fluorescencia máxima  $F_m$  a 25°C presentó un valor similar y comenzó a disminuir progresivamente alcanzando un mínimo a 45°C (Figura 16 B). Aunque los valores de  $F_m$  son similares a 25° para *P. chilensis* y *G. max*, la disminución de ésta es más pronunciada en *P. chilensis*. Sin embargo, los valores de  $F_m$  a 45°C son nuevamente similares.

La fluorescencia variable  $F_v$  presentó valores similares tanto para *P. chilensis* como para *G.max* (Figura 16 C). La forma de ambas curvas es similar y se observó que  $F_v$  es máxima a 25°C en ambos grupos de plantas, luego disminuyó progresivamente y alcanzó un valor mínimo a 45°C. *P. chilensis* presenta una pendiente de disminución de  $F_v$  más pronunciada que *G.max*.

Cuando se evaluó el parámetro  $F_v/F_m$ , se observó que no existían diferencias entre *P. chilensis* y *G.max* para esta proporción a ninguna de las temperaturas de tratamiento (Figura 16 D). El valor máximo para  $F_v/F_m$  se observó a 25°C en ambos grupos de plantas y éste disminuyó levemente con los tratamientos de temperatura a 35° y 40°C. El valor mínimo de  $F_v/F_m$  para *P. chilensis* y *G.max* se observó a 45°C con una caída bastante pronunciada desde el valor determinado a 40°C. Como la proporción  $F_v/F_m$  corresponde a la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, ésta es proporcional al rendimiento cuántico (Berry & Björkman, 1980; Havaux % Lannoye, 1983). De esta manera, se puede especular que el rendimiento cuántico decae drásticamente en ambas plantas cuando la temperatura de tratamiento aumenta desde 40° a 45°C.

#### **3.5.4. Efecto de la temperatura sobre la evolución de etileno.**

La evolución de etileno en plántulas de *P. chilensis* y *G. max* de 96 horas de edad fue determinada en tratamientos de 2 horas a diferentes temperaturas entre 25° y 50°C. Se observó que la evolución de etileno a 25°C fue mayor en *G.max* respecto a *P. chilensis* (Figura 17). Esta tendencia se mantuvo durante

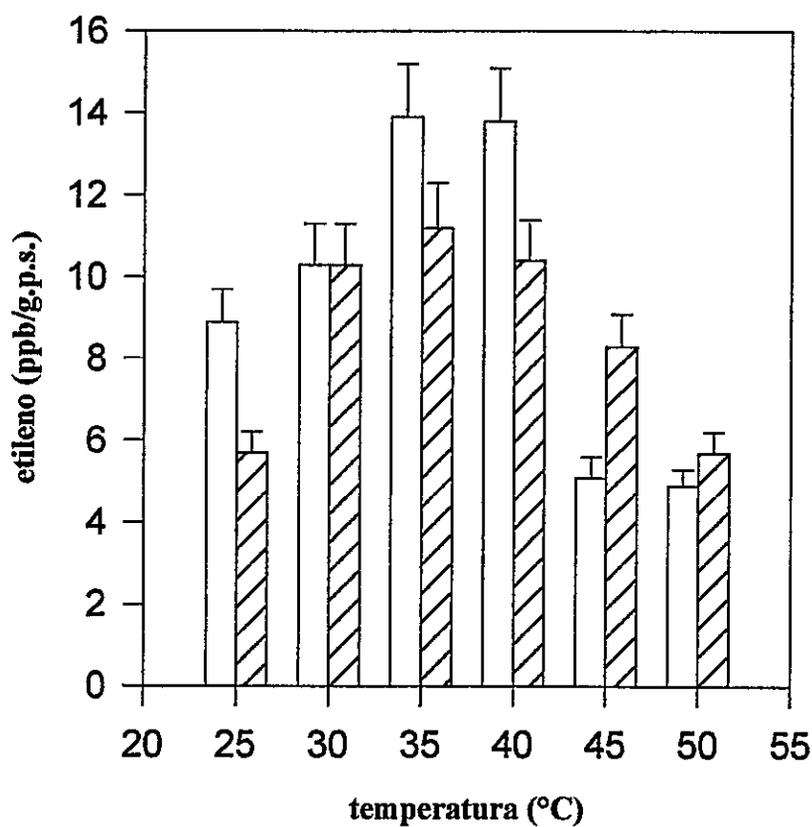


**Figura 16.** Emisión de fluorescencia en plantas de *P. chilensis* y *G. max* a temperaturas entre 25° y 45°C. (A) fluorescencia inicial, Fo; (B) fluorescencia máxima, Fm; (C) fluorescencia variable, Fv; (D) Fv/Fm. *P. chilensis* ○ ; *G. max* ● . Cada punto corresponde al promedio de 4 determinaciones independientes ± error estándar.

el aumento en la evolución de etileno hasta 40°C, la que luego disminuyó en ambos grupos de plantas cuando las temperaturas de tratamiento fueron 45° y 50°C. A estas temperaturas, la evolución de etileno en *P. chilensis* fue mayor que la determinada en *G. max*. El valor mínimo en *P. chilensis* se observó a 25° y 50°C, obteniéndose una curva en forma de campana en la que los valores máximos de evolución de etileno se presentaron a los 30° y 40°C. La disminución en la evolución de etileno cuando la temperatura aumenta desde 40° a 45°C fue más pronunciada en *G.max* que en *P. chilensis* y los valores máximos para soya también se observaron entre 30 y 40°C.

### **3.6 Presencia de ubiquitina libre, ubiquitina conjugada y HSP 70.**

*Glycine max*, soya, es una leguminosa que ha sido descrita como termotolerante en condiciones de laboratorio y de terreno. Esta planta responde al estrés por altas temperaturas incrementando los niveles de proteínas de estrés térmico, algunas de ellas de baja masa molecular. De esta manera, soya representa un modelo adecuado para evaluar la intensidad y la velocidad de la respuesta de *P. chilensis* al estrés térmico, comparando niveles de ubiquitina en sus formas libre y conjugada y de HSP70, en experimentos de "heat shock" y de cinéticas.



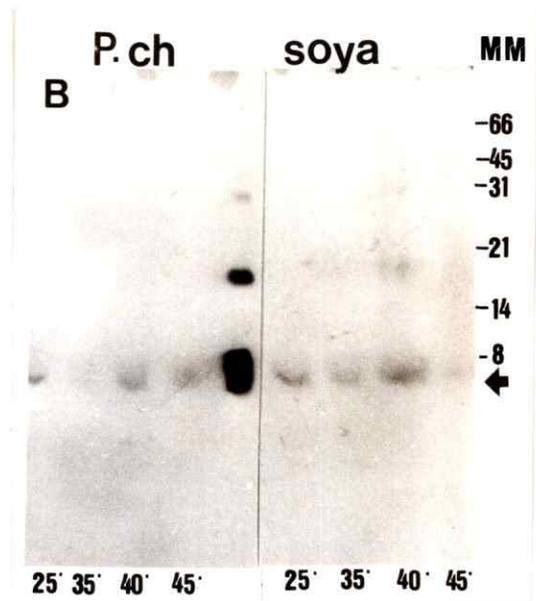
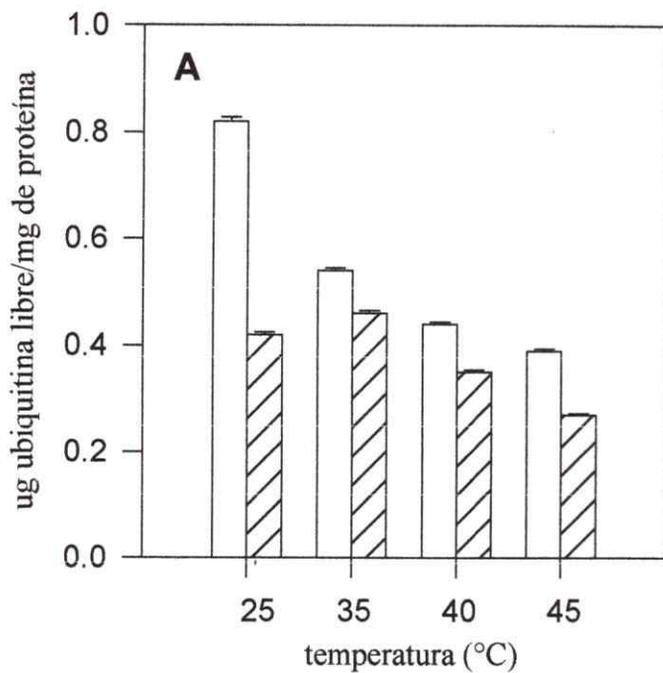
**Figura 17.** Evolución de etileno en *P. chilensis* y *G. max* a temperaturas entre 25° y 50°C. Plántulas de *P. chilensis* y *G. max* de 96 horas de edad fueron incubadas a diferentes temperaturas durante 2 horas luego de lo cual se determinó la evolución de etileno en un cromatógrafo de gases. *P. chilensis*  ; *G. max*  . Cada barra representa el promedio de 4 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar.

### **3.6.1. Análisis inmuno dot blot y Western blot para ubiquitina libre.**

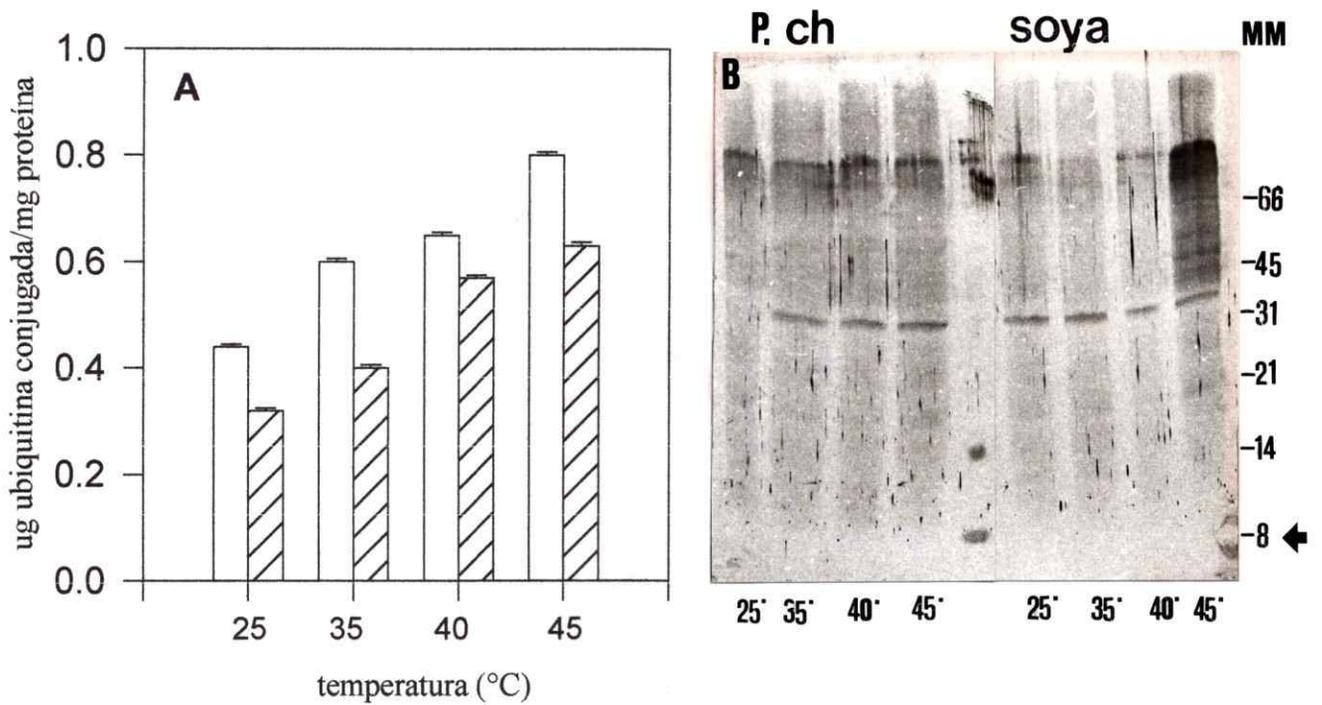
Cuando plántulas de *P. chilensis* y de *G.max* de 72 horas de edad y germinadas a 25° C fueron sometidas a estrés por 2 horas a 35°, 40° y 45°C, se observó, mediante análisis "dot blots", que los niveles de ubiquitina libre disminuyeron progresivamente en ambos grupos de plantas a medida que la temperatura de tratamiento aumentaba (Figura 18 A ). A 25°C, *G.max* presentó casi dos veces más ubiquitina libre que *P. chilensis*. Sin embargo, esta diferencia fue mínima a las temperaturas de tratamiento restantes. En *G.max*, la disminución en el nivel de ubiquitina libre entre 25°C y 35°C es de aproximadamente un tercio. En cambio, en *P. chilensis* prácticamente no se observaron diferencias en el nivel de ubiquitina libre entre 25°C y 35°C. En ambos grupos de plantas, los valores mínimos de ubiquitina libre se obtuvieron a 45°C. El análisis Western confirmó los resultados obtenidos mediante inmuno dot blot (Figura 18 B).

### **3.6.2. Análisis inmuno dot blot y Western blot para ubiquitina conjugada.**

El resultado obtenido mediante análisis "dot blot" mostró que ubiquitina conjugada presentó un patrón opuesto al observado para ubiquitina libre (Figura 19 A). En ambos grupos de plantas, el nivel de ubiquitina conjugada aumentó progresivamente a medida que la temperatura de tratamiento se hizo mayor. El nivel de ubiquitina conjugada fue más bajo en *P. chilensis* respecto a *G.max* en



**Figura 18.** Presencia de ubiquitina libre en plantas de *P. chilensis* y *G. max* a diferentes temperaturas. **(A)** ubiquitina libre determinada mediante experimentos "dot blot" en *P. chilensis* ▨ y *G. max* □ sometidas a temperaturas entre 25° y 45°C durante 2 horas. Cada barra corresponde al promedio de 3 determinaciones independientes ± error estándar. **(B)** análisis Western blot de proteínas solubles de *P. chilensis* y *G. max*. Mediante el uso de anticuerpos policlonales, se determinó la presencia de bandas que corresponden a ubiquitina libre. Las masas moleculares se indican a la derecha de la fotografía. La flecha indica la posición de ubiquitina libre que corresponde al carril central. Las temperaturas de tratamiento (°C) se indican en la parte inferior de la fotografía.



**Figura 19.** Presencia de ubiquitina conjugada en plantas de *P. chilensis* y *G. max* a diferentes temperaturas. **(A)** ubiquitina conjugada determinada mediante análisis "dot blot" en *P. chilensis* ▨ y *G. max* □ sometidas a temperaturas entre 25° y 45°C durante 2 horas. Cada barra corresponde al promedio de 3 determinaciones independientes ± error estándar. **(B)** análisis Western blot de proteínas solubles de *P. chilensis* y *G. max*. Mediante el uso de anticuerpos policlonales, se determinó la presencia de bandas que corresponden a ubiquitina libre. Las masas moleculares se indican a la derecha de la fotografía. La flecha indica la posición de ubiquitina estándar. Las temperaturas de tratamiento (°C) se indican en la parte inferior de la fotografía.

todos los tratamientos, inclusive a la temperatura control (25°C). Tanto *P. chilensis* como *G.max* presentaron un máximo en el nivel de ubiquitina conjugada a 45°C y un valor mínimo a 25°C. Sin embargo, la diferencia entre los niveles a 25°C y 35°C es más acentuada en *G.max* respecto a *P. chilensis*. Resultados similares fueron obtenidos mediante Western blot (Figura 19 B). El anticuerpo anti ubiquitina conjugada presentó una reacción más intensa con bandas de proteínas de alta masa molecular en ambos grupos de plantas.

### **3.6.3. Análisis inmuno dot blot para HSP 70.**

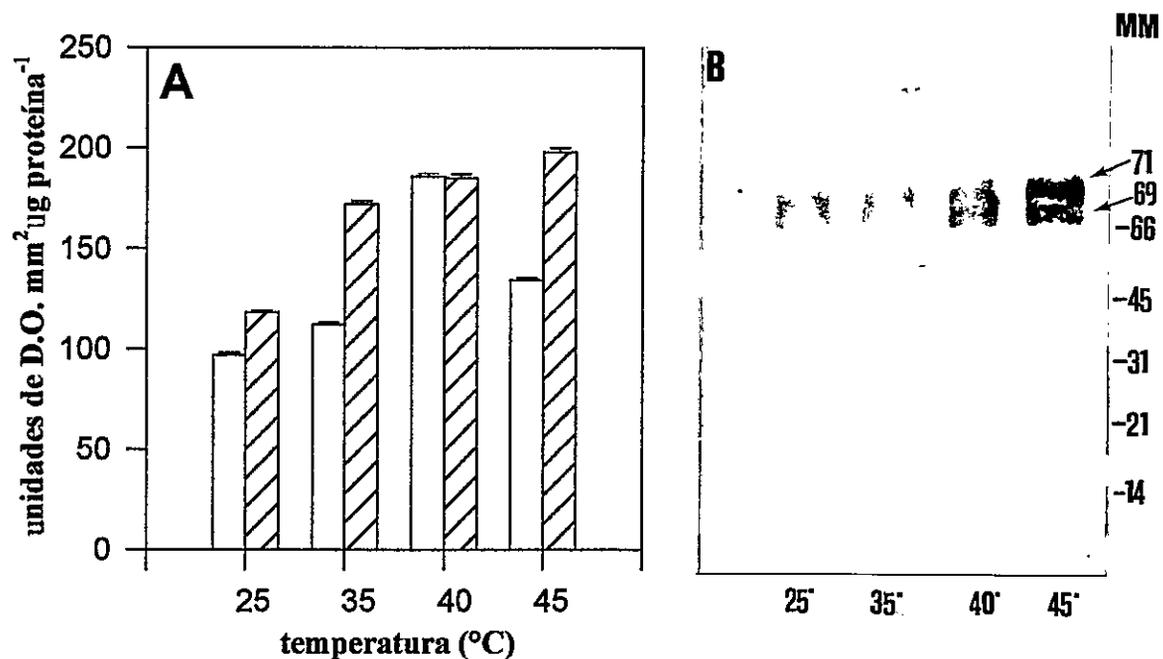
Cuando se realizó la determinación de HSP 70 en grupos de plántulas sometidas a estrés térmico, se observó que a 25°C, *P. chilensis* presentaba un nivel levemente más alto de HSP70 que *G.max* (Figura 20). Cuando las plantas fueron tratadas a 35°C durante 2 horas, HSP70 aumentó aproximadamente un 30% en *P. chilensis* respecto a *G.max*. A 40°C, el nivel de HSP70 en *P. chilensis* se mantuvo y en *G.max* experimentó un aumento de un tercio observándose que a esta temperatura de tratamiento, el nivel de HSP en ambos grupos de plantas es similar. Cuando las plántulas fueron tratadas a 45°C, se observó un pequeño incremento en el nivel de HSP70 en *P. chilensis* respecto a *G.max* y una disminución de la cantidad detectada de HSP70 en ésta última. En *P. chilensis*, el aumento en el nivel de HSP70 es progresivo a medida que la temperatura de tratamiento aumenta y en *G.max* se observó un aumento en HSP70 hasta 40°C, que luego disminuyó en aproximadamente 25%. Resultados

similares fueron obtenidos en *P. chilensis* mediante Western blot (Figura 20 B). El anticuerpo anti HSP70 presentó reacción cruzada con dos bandas de proteína de 69 y 71 KDa de masa molecular.

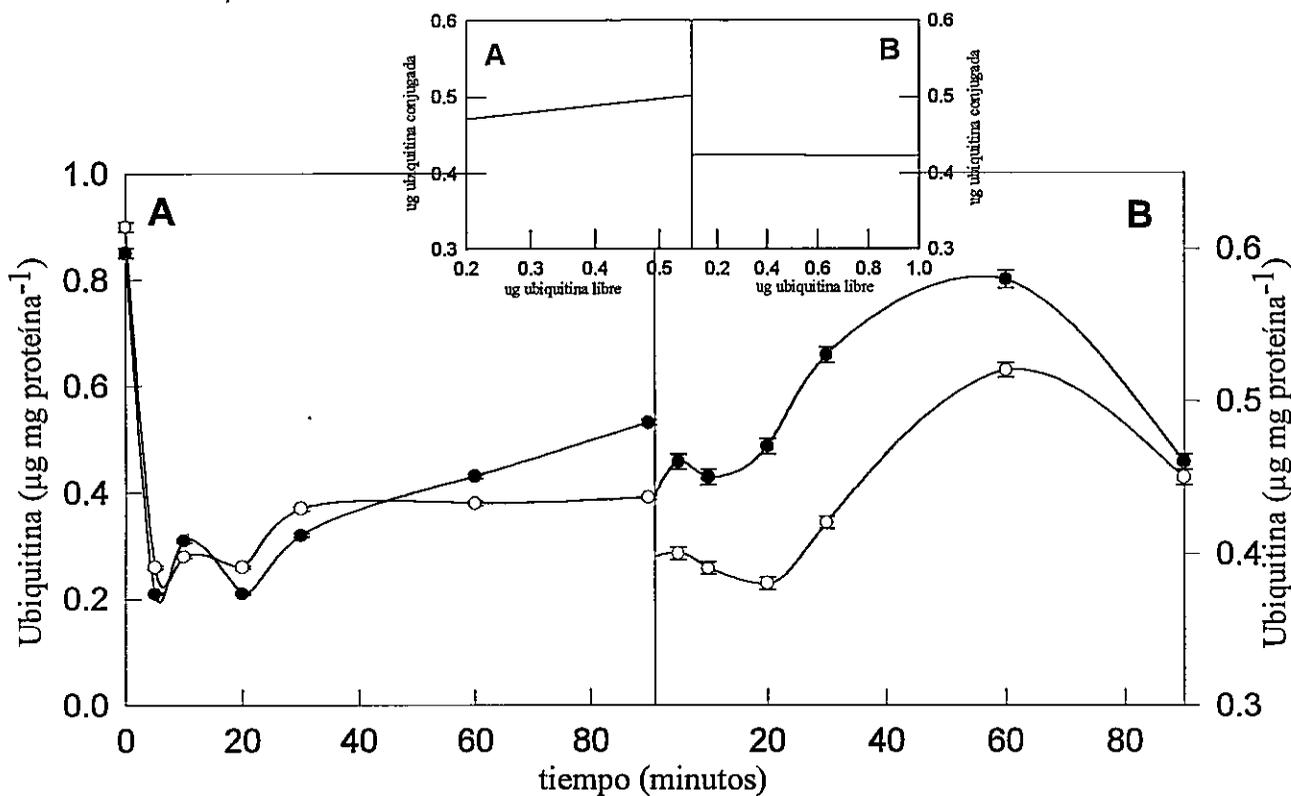
#### **3.6.4. Cambio temporal para ubiquitina libre y ubiquitina conjugada.**

Las curvas de cinética para ubiquitina libre realizada con extractos de plántulas de *P. chilensis* y *G.max* sometidas a estrés térmico de 40°C durante 90 minutos, presentaron tendencias similares en ambos grupos de plantas (Figura 21 A). Dentro de los primeros 5 minutos, se observó una disminución en el nivel de ubiquitina libre en aproximadamente 76 % que luego aumentó levemente para mantenerse constante hasta los 60 minutos de tratamiento. A partir de 1 hora y hasta 90 minutos de exposición a 40°C, el nivel de ubiquitina en *P. chilensis* aumentó respecto al nivel determinado en *G.max*.

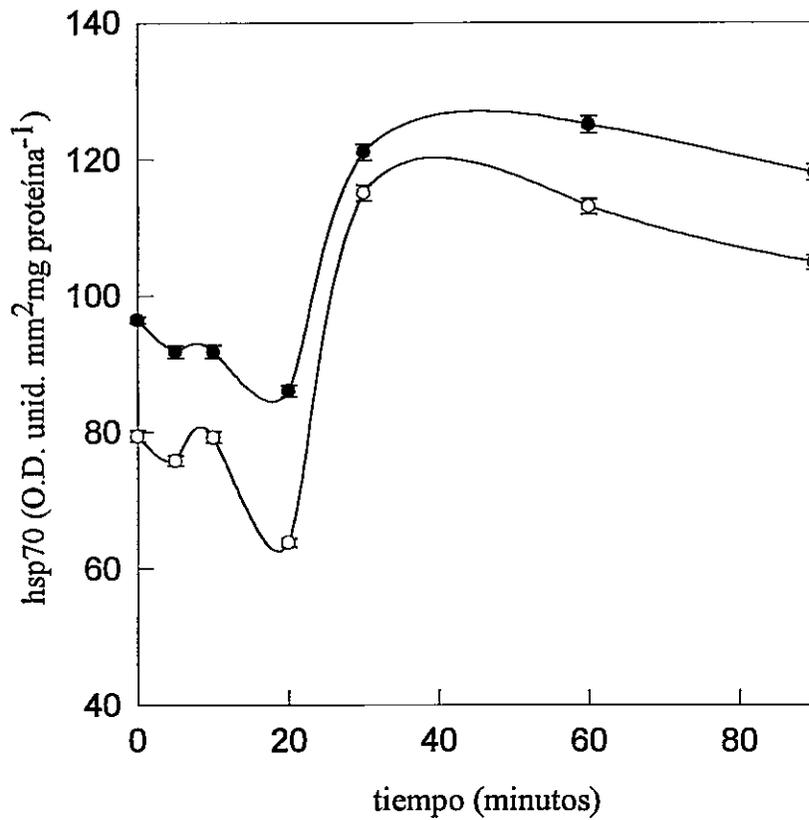
La cinética para ubiquitina conjugada se realizó con extractos de *P. chilensis* y *G. max* durante 90 minutos a 40°C y presentó un patrón opuesto al observado para la cinética de ubiquitina libre (Figura 21 B). Durante los 60 primeros minutos de tratamiento, el nivel de ubiquitina conjugada aumentó progresivamente y presentó valores mayores en *P. chilensis* respecto a *G.max*. El valor máximo determinado para ubiquitina conjugada se registró a los 60 minutos. Hacia los 90 minutos del tratamiento, el nivel de ubiquitina conjugada disminuyó para llegar a valores similares a los determinados inicialmente en ambas plantas.



**Figura 20.** Presencia de proteínas del tipo HSP 70 en plantas de *P. chilensis* y *G. max* a distintas temperaturas. (A) Mediante el uso de un anticuerpo monoclonal contra HSP71-72 de células HeLa y análisis densitométrico de inmuno dot blots, se determinó la presencia de HSP 70 en plantas de *P. chilensis* y *G. max* mantenidas durante 2 horas a temperaturas entre 25° y 45 °C. *P. chilensis* ▨ ; *G. max* □ . Cada barra representa el promedio de 3 determinaciones independientes ± error estándar. (B) Análisis Western blot de proteínas solubles de *P. chilensis*.



**Figura 21.** Cambio temporal de ubiquitina libre y conjugada en plantas de *P. chilensis* y soya a 40°C. Plantas de *P. chilensis* y soya fueron germinadas a 25°C y mantenidas a 40°C durante 90 minutos. Se determinaron los niveles de (A) ubiquitina libre y (B) ubiquitina conjugada mediante análisis densitométrico en inmuno dot blots. Los anticuerpos se utilizaron en diluciones 1:200 y 1:300 para ubiquitina libre y conjugada respectivamente. *P. chilensis* ● ; soya ○ . Inserto: relación entre ubiquitina conjugada y ubiquitina libre en (A) *P. chilensis* y (B) soya. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones independientes ± error estándar.



**Figura 22.** Cambio temporal de proteínas del tipo HSP 70 en *P. chilensis* y soya. Plantas de *P. chilensis* y soya fueron germinadas a 25°C y mantenidas a 40°C durante 90 minutos. La presencia de HSP 70 fue determinada mediante análisis densitométrico de inmuno dot blots. La dilución del anticuerpo fue 1:1000. ● *P. chilensis*; ○ soya. Cada punto corresponde al promedio de 4 determinaciones independientes  $\pm$  error estándar.

La relación entre ubiquitina conjugada y ubiquitina libre para *P. chilensis* fue positiva y la pendiente fue 0,18 (Figura 21, inserto A). Una gráfica similar para *G.max*, presentó una pendiente levemente negativa cercana a cero (-0,0078) (Figura 21, inserto B).

### **3.6.5. Cambio temporal para HSP 70.**

Las curvas para la cinética de HSP 70 en plántulas de *P. chilensis* y *G.max* mantenidas a 40°C durante 90 minutos presentaron tendencias similares (Figura 22), aunque los valores fueron mayores en *P. chilensis* respecto a *G.max* para todos los tiempos a lo largo del tratamiento. Dentro de los primeros 10 minutos, el nivel de HSP70 se mantuvo constante en ambos grupos de plantas para luego disminuir rápidamente hacia los 20 minutos de estrés alcanzando valores mínimos. Hacia los 30 minutos se observó una recuperación en los niveles de HSP70 que alcanzó un valor máximo para comenzar a disminuir lentamente hacia los 90 minutos de tratamiento.

### **3.7. Expresión de ubiquitina a nivel de la transcripción en *P. chilensis*.**

Se sabe que el aumento en la expresión de proteínas de estrés térmico está asociado a una activación de la síntesis de mensajeros para estas proteínas. Esta expresión puede ser tejido específica y dependiente del estado de desarrollo del organismo. En plantas, el tejido de las hojas está

particularmente expuesto a estrés por altas temperaturas y podría presentar una respuesta rápida y más intensa al estrés térmico.

### **3.7.1. RNA total de *P. chilensis*.**

En los geles realizados con las preparaciones de RNA total de cotiledón (carriles impares, Figura 23 A) y radícula (carriles pares Figura 23 A) de *P. chilensis*, se observó la presencia de las bandas correspondientes a RNA ribosomal de tamaño 18 S y 25-28 S. En las muestras de RNA de cotiledón también se observaron bandas por debajo del RNA ribosomal 18 S que podrían corresponder a RNA del cloroplasto.

Para verificar que la cantidad de RNA cargado en los geles que fueron posteriormente transferidos fuese similar en todos los carriles, se realizó un control interno mediante un experimento Northern usando una sonda para RNA ribosomal de plantas (Figura 23 B). Se observó que la hibridización fue de similar intensidad en todos los carriles.

### **3.7.2. Expresión de ubiquitina en cotiledón y radícula.**

Se determinó la presencia de mensajeros de ubiquitina mediante Northern blots en RNA de cotiledón y radícula extraído de plántulas de *P. chilensis* tratadas a 25°, 40° y 45°C durante 2 horas, usando una sonda para ubiquitina de embrión de pollo. Se observó presencia de RNA mensajero para ubiquitina en todos los tratamientos y en ambos tejidos (Figura 24 A). La

expresión mayoritaria se observó en cotiledones a 45°C . A esta temperatura, también las radículas de *P. chilensis* presentaron una expresión máxima. El tamaño aproximado del mensajero para ubiquitina en *P. chilensis* detectado por la sonda para ubiquitina de embrión de pollo fue de 0,7 Kb.

En la cinética de expresión para ubiquitina en plántulas mantenidas a 40°C durante 30 minutos se observó que las plantas tratadas (carriles 6-9) presentaron mayores niveles de mensajeros que las plantas control mantenidas a 25°C durante un tiempo similar (carriles 1-5) (Figura 24 B). En las plantas control, se observó presencia de mensajeros para ubiquitina a 25°C entre 10 y 20 minutos, a los 30 minutos no se observó bandas correspondientes a mensajeros de ubiquitina. La acumulación de mensajeros en plántulas tratadas aumentó progresivamente a medida que aumentó el tiempo de exposición de la plántula a 40°C. El nivel máximo de mensajeros para ubiquitina se observó a los 30 minutos (Figura 24 B).

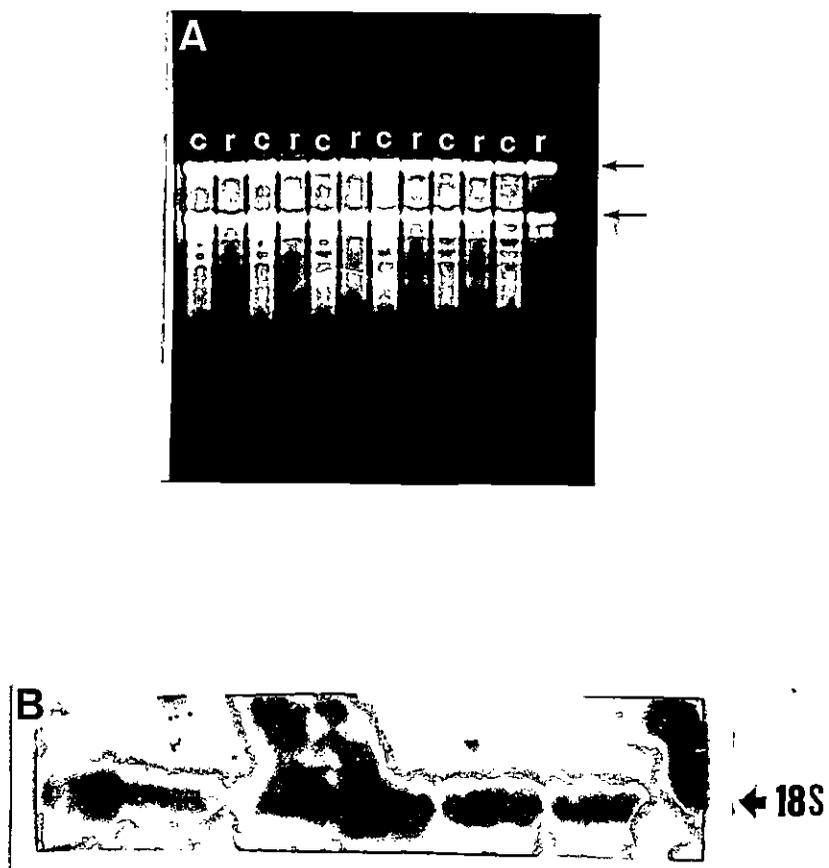
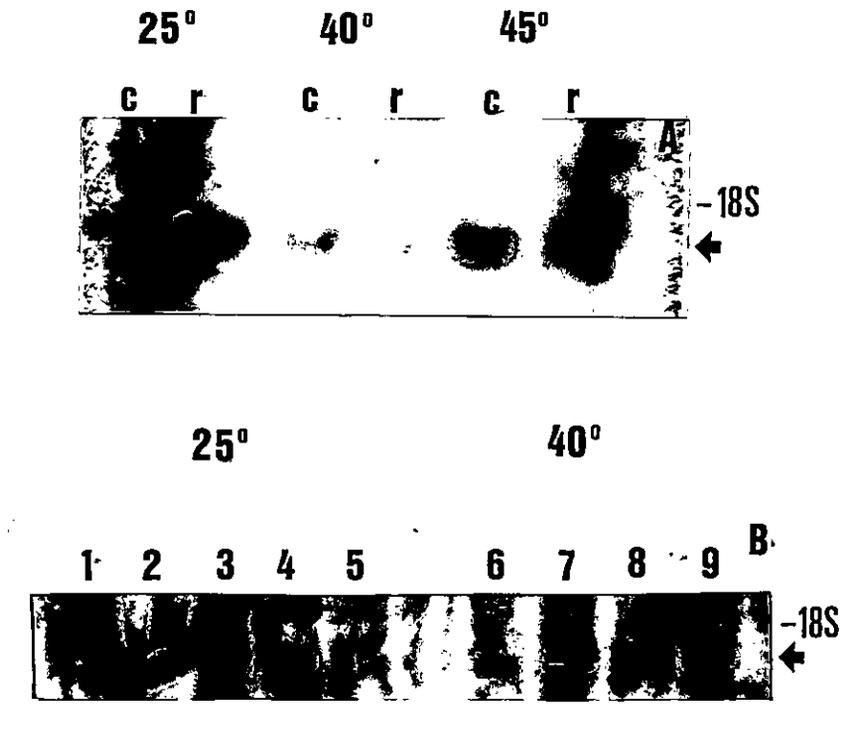


Figura 23. RNA total en *P. chilensis*. (A) 5 ug de RNA total de cotiledones (c) y radículas (r) de plántulas de *P. chilensis* fueron corridas en un gel de agarosa al 1% en presencia de formaldehído. Las flechas corresponden al RNA ribosomal 25-26 s y 18 s de plantas. (B) Northern blot realizado con una sonda para RNA ribosomal 25-26 s de poroto. La hibridización se realizó a 65°C en amortiguador fosfato.



**Figura 24.** Presencia de mensajeros para ubiquitina en *P. chilensis*. (A) presencia de mensajeros para ubiquitina en cotiledones (c) y radícula (r) de plántulas de *P. chilensis* mantenidas a 25°, 40 y 45°C durante 2 horas. (B) presencia de mensajeros para ubiquitina en RNA total de plántulas de *P. chilensis* mantenidas a 25° y 40°C durante 30 minutos. Carril 1, tiempo inicial; carriles 2 y 6, 5 minutos de tratamiento; carriles 3 y 7, 10 minutos de tratamiento; carriles 4 y 8, 20 minutos de tratamiento y carriles 5 y 9, 30 minutos de tratamiento. Las hibridaciones se realizaron a 65°C en amortiguador fosfato con una sonda para ubiquitina de embrión de pollo. La flecha indica la presencia del mensajero para ubiquitina en *P. chilensis*. El tamaño del RNA ribosomal 18 s es indicado a la derecha de la figura.

## 4 DISCUSION

### 4.1 Temperatura, tasa fotosintética, conductancia estomática y potencial hídrico en *Prosopis chilensis* bajo condiciones de terreno simuladas.

Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> es un buen indicador de estrés en *P. chilensis*. Se sabe que la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> depende de la intensidad luminosa, la temperatura, humedad relativa y resistencia estomática (Nobel, 1988; Weis & Berry, 1988). En condiciones naturales, la relación entre tasa fotosintética y temperatura es a través de interacciones complejas entre el medioambiente y las características genéticas de cada especie (Berry & Björkman, 1980). En *P. chilensis*, la fotosíntesis neta se vió claramente limitada a las horas de mayor temperatura y menor humedad relativa y exhibió una respuesta bimodal durante el día en el caso de árboles en exposición Noroeste y en plantas incubadas bajo las condiciones simuladas. En plantas control, la asimilación de CO<sub>2</sub> se mantuvo sin variaciones durante el período luminoso ya que las plantas fueron mantenidas en condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa. Bajo condiciones naturales y experimentales, los valores negativos observados para la asimilación de CO<sub>2</sub> fueron producto de respiración celular.

*Prosopis chilensis* es una leguminosa que pertenece a la familia Mimosaceae. Por lo tanto, una de las estrategias de estas plantas para evitar la alta intensidad luminosa y temperaturas elevadas es activar el sistema de

pulvino del pecíolo, lo que provoca un movimiento nictinástico de las hojas y folíolos (Fromm & Eschrich, 1988; Satter, 1988). Los estudios de este proceso fisiológico han determinado que luego que las células motoras del pulvino se han activado, los folíolos se reorientan reduciendo la superficie de las hojas expuestas a altas radiaciones solares. Todas estas respuestas anatómicas y fisiológicas en *P. chilensis*, ocurren con un costo energético muy pequeño para la planta (Nobel, 1988). Movimientos nictinásticos de los folíolos y respuestas estomáticas similares se han observado en *P. chilensis* en la Quebrada San Carlos a las mismas horas del día. El movimiento de los folíolos en *P. chilensis* provoca una menor incidencia de radiación fotosintéticamente activa (PAR) sobre la superficie de la hoja. Al mismo tiempo, el aumento en la actividad oxidasa de la Rubisco, favorecida por una mayor solubilidad del O<sub>2</sub> a altas temperaturas, provoca un aumento en la fotorespiración y un desbalance en el nivel de CO<sub>2</sub> interno (Nobel, 1988). Tanto la menor incidencia de PAR como la fotorespiración son responsables de la variación detectada en la fotosíntesis neta, y por lo tanto, de la menor asimilación de CO<sub>2</sub> observada a las horas de mayor temperatura y menor humedad ambiental. Uno de los efectos primarios del estrés por alta temperatura es la alteración de la estructura de algunas proteínas (Bernstam, 1978). Es posible que la actividad de enzimas esenciales para el proceso fotosintético se afecte a las temperaturas en que se encuentra la planta durante el día (35°C en las condiciones experimentales de esta tesis), por ejemplo, la enzima Rubisco. Sin embargo, en plantas C3, se ha demostrado

que las temperaturas que provocan cambios en el comportamiento fotosintético de la planta, no afectan la actividad de la Rubisco, ya que a concentraciones atmosféricas de CO<sub>2</sub>, la actividad de esta enzima es muy estable (Berry & Björkman, 1980). Sin embargo, es posible que la disminución de la concentración interna de CO<sub>2</sub> calculada a la hora de mayor temperatura y menor humedad ambiental, favorezca la actividad oxigenasa de la Rubisco por sobre su actividad carboxilasa. En plantas C<sub>3</sub>, la asimilación de CO<sub>2</sub> aumenta a medida que la concentración interna de CO<sub>2</sub> aumenta (Taiz & Zeiger, 1991). Por otro lado, los componentes proteicos no enzimáticos del aparato fotosintético son también afectados por altas temperaturas. Tratamientos con temperaturas sobre 35°C de tejido fotosintético provocan una inactivación progresiva de los cloroplastos, principalmente por desestabilización del fotosistema II (PSII). Bauer y Sener (rev. Berry & Björkman, 1980), observaron que tanto la inactivación del transporte de electrones fotosintéticos como alteraciones en la estructura de los cloroplastos inducidas por calor, son efectos reversibles, siempre que el estrés térmico no sea suficientemente severo como para provocar ruptura de membranas y necrosis en las hojas. La inactivación por calor que presenta el PSII involucra una rápida adaptación que permite la recuperación de la actividad fotosintética a tiempos tan cortos como 30 minutos (Havaux, 1993). La respuesta bimodal de la asimilación de CO<sub>2</sub> que presentó *P. chilensis* da cuenta de un fenómeno reversible, en que la actividad fotosintética disminuye por efecto del estrés y se recupera dentro de algunas horas al bajar la temperatura

ambiental, de manera que la inactivación reversible del fotosistema II es un fenómeno que puede ocurrir en condiciones de campo y que estaría asociado a cambios diurnos o estacionales en el régimen de temperaturas de las plantas. La menor asimilación de CO<sub>2</sub> observada en *P. chilensis* se debería principalmente a un aumento en la fotorespiración. Sin embargo, este proceso podría estar asociado a una disminución temporal de la actividad del PSII por efecto de la temperatura de tratamiento.

Los estomas controlan la resistencia a la difusión de vapor de agua y CO<sub>2</sub> entre la hoja y el aire, por lo tanto, tienen una relación directa con la concentración de CO<sub>2</sub> en los espacios celulares de tejido fotosintéticamente activo. Los estomas responden a varios factores ambientales como temperatura, luz, humedad y concentración de CO<sub>2</sub>. También existe un control regulado por productos fotosintéticos y contenido de agua interno. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que la respuesta de la fotosíntesis a altas temperaturas no es un proceso relacionado con el comportamiento estomático (Mooney y col., 1978; Pearcy, 1977; Berry & Björkman, 1980) y que la disminución de la fotosíntesis observada a altas temperaturas en algunas especies no es causada por el cierre de los estomas (Raschke, 1970). En muchos casos, la conductancia estomática permanece alta o aumenta cuando la temperatura de las hojas alcanza niveles que causan daño al aparato fotosintético (Raschke, 1970; Berry & Björkman, 1980). Inclusive, se ha informado que los estomas permanecen abiertos durante la noche cuando las

hojas son calentadas a temperaturas sobre 35°C (Pemasada, 1977). El comportamiento estomático en hojas de plantas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas, se ajusta a las observaciones anteriores. Los estomas permanecen abiertos a las horas de mayor temperatura de manera que no existe una relación entre la disminución en la asimilación de CO<sub>2</sub> y la conductividad estomática. Por otra parte, cuando la planta mantiene los estomas abiertos, ocurre pérdida de agua por evapotranspiración de la hoja. Este fenómeno permite enfriar la hoja, tal como se observó en plantas de *P. chilensis*, en las que la temperatura foliar permaneció entre 1-2°C por debajo de la temperatura ambiental. El fenómeno de evapotranspiración a las horas de mayor temperatura y menor humedad ambiental provocaron una disminución en el potencial hídrico de la planta que llegó a -2,5 MPa a las 16:00 horas.

La respuesta fotosintética es un proceso que presenta aclimatación a variaciones ambientales. En la naturaleza, los cambios graduales de las condiciones climáticas estacionales y diurnas pueden dar cuenta de fenómenos de aclimatación de la fotosíntesis. La respuesta en la asimilación de CO<sub>2</sub> observada en plantas de *P. chilensis* sometidas a fluctuaciones diarias de temperatura y humedad relativa, en contraste con plantas control, demuestra la capacidad adaptativa que posee la planta para enfrentar cambios en el régimen de temperatura a la que se ve expuesta en condiciones naturales.

#### **4.2 Azúcares reductores solubles, sacarosa y prolina en *Prosopis chilensis* bajo condiciones de terreno simuladas.**

El contenido de azúcares reductores solubles determinado en plantas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas, presentó un comportamiento bimodal, similar al observado en la asimilación de CO<sub>2</sub>. El valor máximo en el contenido de azúcares reductores solubles observado a las 11:00 horas, se correlaciona con el valor más alto para la asimilación de CO<sub>2</sub> en las plantas tratadas. Otro pico más pequeño ocurre en las horas de la tarde cuando la temperatura ha declinado. Esto coincide con el aumento de asimilación de CO<sub>2</sub> que ocurre también en la tarde. En las plantas control, sin embargo, el nivel de azúcares reductores solubles presentó un aumento rápido a lo largo del día, posiblemente como producto de la acumulación y subsecuente movilización de azúcares desde los tejidos fotosintéticamente activos bajo condiciones óptimas de crecimiento a otras partes de la planta tal como ocurre en otras especies vegetales (Lucas & Madore, 1988). En plantas control, el aumento en el nivel de azúcares reductores solubles observado a las 18:00 horas no fue producto de la acumulación de sacarosa, la cual presentó poca fluctuación a lo largo del día y disminuyó en la oscuridad. El valor basal de azúcares reductores solubles encontrado temprano en la mañana podría relacionarse con la vía de síntesis de almidón a partir de estos azúcares. El almidón será posteriormente utilizado durante la noche cuando no hay fotosíntesis, lo cual es un proceso común en vegetales (Preiss, 1988). En las plantas bajo condiciones simuladas, el aumento

en el contenido de sacarosa entre las 9:00 y 13:00 horas y la disminución posterior, se correlacionan con el primer aumento en el contenido de azúcares reductores solubles. Sacarosa y otros azúcares no reductores como trehalosa, son considerados solutos compatibles capaces de realizar ajuste osmótico y de estabilizar estructuras subcelulares y proteínas, en organismos que presentan estrés por déficit de agua (De Virgilio y col., 1994; Hottiger y col., 1994; Schwall y col., 1995). Una manera de responder al estrés impuesto por las variaciones ambientales en plantas es la acumulación de solutos compatibles que estabilizarían proteínas y/o estructuras vegetales esenciales como los cloroplastos. Crowe y col. (1995), han estudiado el efecto de sacarosa y trehalosa sobre la estabilidad funcional de membranas, liposomas y proteínas lábiles, sugiriendo que la presencia de estos azúcares puede ser suficiente y necesaria para su preservación. Estos estudios se apoyan en observaciones realizadas en la planta *Craterostigma plantagineum* y en embriones de cebada en desarrollo, ya que una disminución en el contenido hídrico, provoca la inducción de la actividad de sacarosa-P-sintetasa y de sacarosa sintetasa en ambos sistemas (Bartels y col., 1993). A pesar de que la condición de déficit hídrico fue observada a lo largo del día en las plantas de *P. chilensis* bajo condiciones simuladas, el contenido máximo de sacarosa fue detectado a las 11:00 horas y no a las horas de mayor estrés térmico para la planta. Este comportamiento parece indicar que sacarosa no tiene un papel en la protección de los tejidos de *P. chilensis* cuando estos se ven afectados por altas

temperaturas. Por otra parte, ya que la acumulación de sacarosa coincide con el valor máximo en la asimilación de CO<sub>2</sub> detectado a las 11:00 horas, esta acumulación de la mañana se debería principalmente a actividad fotosintética. La disminución en el contenido de sacarosa posterior al máximo de acumulación, sería producto de la movilización de este recurso por parte de la planta a las regiones que más la necesita.

La respuesta al estrés por altas temperaturas y la adquisición de termotolerancia es un fenómeno complejo en el que están involucradas vías que funcionarían en forma independiente. La acumulación del soluto compatible prolina ha sido descrita como una respuesta adaptativa a estrés ambientales, ya que la síntesis o acumulación del aminoácido es inducida por calor, estrés hídrico y salino (Aspinall & Paleg, 1981). En plantas bajo estrés ambiental, la acumulación de prolina tendría un papel protector de la estructura de organelos, además de actuar como un regulador del potencial osmótico celular (Hanson & Hitz, 1982). Sharp y col. (1995), demostraron que la contribución al ajuste osmótico producido por un aumento en el nivel de prolina es esencial para mantener el crecimiento en la región apical de raíces primarias de maíz. En plantas experimentales de *P. chilensis*, los niveles diurnos de síntesis o acumulación de prolina a las horas de mayor calor fueron 50 veces más que el valor inicial. Por lo tanto, la acumulación de prolina observada es un buen indicador de que las plantas experimentales están estresadas a las horas de mayor temperatura y menor humedad relativa. Esta variación ocurrió dentro de 2

horas y se mantuvo hasta que la temperatura ambiental comenzó a disminuir. Probablemente prolina no sólo es un indicador de estrés si no también un osmolito protector de la función de algunos sistemas membranosos como los cloroplastos. En plantas de *Brassica juncea* expuestas a distintos estrés ambientales, se registró la acumulación de prolina como una respuesta a la inhibición del transporte de electrones en mitocondrias causada por el estrés aplicado (Saradhi & Alia, 1993). Los mismos autores observaron que la formación de radicales libres provocada por estrés salino, responsable de la peroxidación de lípidos de membrana se reducía significativamente en presencia de prolina (Alia y col., 1993). Como el cloroplasto es uno de los principales sitios de producción de prolina, el sistema de membranas tilacoidales estaría particularmente protegido de la desestabilización molecular causada por el estrés térmico. En *P. chilensis*, se observó que la máxima concentración de prolina determinada en plantas tratadas, que corresponde a 50 nmoles/mg de proteína (0,15 mM), podría tener un efecto protector sobre la actividad de las membranas tilacoidales tratadas a 45° y 50°C, respecto a la actividad determinada en ausencia de prolina. Por otra parte, prolina no actuaría como un activador de la evolución de oxígeno ya que concentraciones altas de prolina (0,6 mM), permiten mantener la actividad basal de las membranas tilacoidales incubadas durante 2 horas a 50°C.

### **4.3 Evolución de etileno en plantas de *P. chilensis* sometidas a estrés térmico.**

Las hormonas vegetales participan en una serie de procesos celulares que modulan el desarrollo y comportamiento de las plantas bajo condiciones ambientales de crecimiento óptimo y bajo condiciones de estrés. Existen evidencias de la participación de ácido absísico (ABA) en la respuesta de las plantas a condiciones ambientales que involucran pérdida de agua (Chandler & Robertson, 1994). Bajo condiciones de estrés térmico, se ha sugerido que la síntesis de giberelinas (GA3) podría ser parte de algún mecanismo para sensibilizar a la planta frente a una condición fisiológicamente desfavorable (Grindstaff y col., 1996). Por otra parte, se sabe que la síntesis de etileno es una respuesta común a una variedad de estímulos ambientales que incluyen daño mecánico, infección por patógenos, altas y bajas temperaturas y déficit hídrico (Yang & Hoffman, 1984). En segmentos de tallo de arveja, la producción de etileno inducida por heridas comienza 25-30 minutos después del daño. Kononowicz y col. (1993), demostraron que la expresión de osmotinas, proteínas involucradas en la resistencia a estrés osmótico, es regulada por algunas hormonas que incluyen etileno y ABA. La magnitud de la evolución de etileno en plántulas de *P. chilensis* sometidas a estrés térmico es independiente de la temperatura pero dependiente de la edad de la planta. En plántulas de 48 horas de edad, etileno disminuye en un 45% a 45° y 50°C. Los niveles máximos de etileno se observaron en plántulas de 48 horas de edad entre 25° y 40°C, los

que disminuyeron casi 5 veces a las 96 horas de germinación. Este comportamiento se puede relacionar con el envejecimiento del tejido de los cotiledones y la emergencia de raíces secundarias, las que al romper el tejido cortical de la raíz periférica, provocarían un efecto similar al daño por heridas (Rodríguez & Cardemil, 1994). Se sabe que etileno regula muchos aspectos del crecimiento de la planta como maduración del fruto, germinación, senescencia y formación de brotes adventicios (Taiz & Zeiger, 1991). Por otra parte, el aumento entre 25° y 35°C de etileno encontrado para *Prosopis* puede ser debido a la activación de la enzima formadora de etileno (EFE). Probablemente, la enzima posteriormente se inactivaría debido al aumento de la temperatura, provocando una caída en la evolución de etileno observada entre 45° y 50°C en plántulas de 96 horas de edad. Aunque no se sabe con certeza el papel de etileno en la respuesta a estrés ambiental, algunos autores piensan que la hormona estaría involucrada en la vía de transducción de la señal gatillada por el estrés (Kononowicz y col., 1993). Se ha demostrado que la enzima formadora de etileno se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos vegetativos y se ha observado aumento en el nivel de la proteína en respuesta a estímulos ambientales (Rhodes, 1987; Gómez-Lim y col., 1993). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis no muestran una relación de los niveles de etileno como parte de la respuesta a altas temperaturas en *P. chilensis*. Tal vez, al mantener bajos niveles de etileno en plántulas sometidas a estrés térmico, se evitaría una acción de envejecimiento prematuro de los tejidos.

#### **4.4 Ubiquitina libre, ubiquitina conjugada y HSP 70 en plantas de *Prosopis chilensis* bajo condiciones de terreno simuladas.**

Los niveles de expresión de ubiquitina conjugada confirmaron que las plantas experimentales se encontraban estresadas a las horas de mayor temperatura y menor humedad relativa. Ubiquitina se ha considerado una proteína de estrés térmico ya que sus niveles de expresión aumentan con el aumento de temperatura (Bond & Schlesinger, 1985). Ubiquitina participa en la degradación de proteínas cuya conformación ha sido alterada por altas temperaturas (Vierstra, 1987). Para ejercer su acción, ubiquitina se conjuga a las proteínas desnaturalizadas y el complejo ubiquitina-proteína es posteriormente reconocido por proteasas (Vierstra, 1987; Ciechanover y col., 1984). De esta manera, ubiquitina se puede encontrar en la célula en forma libre o conjugada. El uso de un anticuerpo dirigido contra la unión peptídica de los grupos  $\alpha$ - y  $\epsilon$ -amino terminal de las proteínas y el grupo carboxilo terminal de ubiquitina, permitió determinar en *P. chilensis*, las horas del día en que ubiquitina se encontró mayoritariamente conjugada a proteínas que deben ser degradadas por estar funcionando mal a altas temperaturas (entre las 11:00 y 16:00 horas). De la misma manera, el uso de un anticuerpo dirigido contra ubiquitina libre permitió cuantificar el contenido de ubiquitina no conjugada en los extractos de *P. chilensis*. Los niveles de ubiquitina libre observados, podrían indicar que la planta no se encuentra bajo estrés durante la noche, temprano en la mañana o

al atardecer. Los niveles más bajos de ubiquitina libre determinados a las horas de mayor estrés, podrían indicar que ubiquitina se encuentra unida a proteínas desnaturalizadas, lo que provocaría un aumento en los niveles de ubiquitina conjugada.

Las proteínas de estrés térmico que pertenecen a la familia de 70 Kda (HSP 70), se expresan bajo una serie de condiciones de estrés (Vierling & Sun, 1989). Análisis Western blot realizados en el laboratorio demostraron que el anticuerpo monoclonal contra HSP 72 de células HeLa, presenta reacción cruzada con dos bandas de proteínas de *P. chilensis*. Cuando la temperatura de tratamiento aumentó desde 25°C a 50°C, la expresión de estas proteínas aumentó notoriamente. En los experimentos durante las horas del día se observó que el nivel de expresión de HSP 70 se mantuvo siempre sobre cero, debido a la expresión constitutiva de algunos miembros de la familia HSP 70. El aumento en el nivel de HSP 70 en *P. chilensis* a las horas de mayor estrés, fue por un período de tiempo más corto y con fluctuaciones menos marcadas que las exhibidas por ubiquitina y ubiquitina conjugada. Es posible que 35°C, la temperatura máxima de estrés a las que fueron sometidas las plantas en condiciones simuladas, no es la temperatura de máxima inducción para HSP 70 en *P. chilensis*, por lo tanto, el aumento observado en la expresión de estas proteínas es moderado.

La familia HSP 70 se cuenta dentro de los grupos de chaperonas moleculares que protegen a la célula durante el estrés mediando la recuperación

de la conformación de proteínas que son afectadas por altas temperaturas (Vierling & Sun, 1989; Rothman, 1989; Gatenby y col., 1990). Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de HSP 70 es mayor en plantas sometidas a fluctuaciones diarias de temperatura y humedad relativa y se mantiene por al menos 2 horas más que la expresión observada en plantas control. Las HSP 70 son proteínas de expresión transitoria ya que sus niveles disminuyen cuando la temperatura vuelve a niveles normales o si el estrés térmico persiste (Cooper & Ho, 1993; Cooper y col., 1984). Las plantas experimentales de *P. chilensis* se mantuvieron bajo estrés por alta temperatura durante 4 horas, tiempo suficientemente largo para que las chaperonas moleculares lleven a cabo su función protectora.

El aumento leve observado en HSP 70, en ubiquitina libre y ubiquitina conjugada en las plantas control durante las horas del día, podría ser producto del funcionamiento de un reloj biológico impuesto sobre las plantas por el fotoperíodo y la asimilación de CO<sub>2</sub>. Se ha demostrado que ambas condiciones ambientales influyen sobre la síntesis de prolina (Aspinall & Paleg; Pahlich, 1990). No se descarta la posibilidad de que las fluctuaciones en los niveles de proteínas de estrés térmico en condiciones controladas podrían ser producto de un reloj biológico que mantienen las plantas gracias al fotoperíodo aún después de 10 días de aclimatación a condiciones constantes (50% de humedad relativa y 25°C). En hojas de tomate mantenidas en oscuridad prolongada, se ha demostrado la existencia de ritmos circadianos dependientes de la luz en los

niveles de RNA mensajero de núcleos y plástidos (Piechulla, 1988). Hennessey y col. (1993), observaron que la fotosíntesis y la apertura estomática en hojas de poroto presentaban ritmos independientes de condiciones ambientales como luz y niveles de CO<sub>2</sub> intracelular. Es posible que las plantas de *P. chilensis* bajo condiciones controladas modulen algunas de sus respuestas metabólicas como síntesis de proteínas a través de ritmos circadianos controlados por el régimen de luz al que se aclimatan las plantas.

#### **4.5 Análisis comparativo de la respuesta a estrés térmico en algarrobo y soya.**

Los experimentos de germinación a diferentes temperaturas en algarrobo y soya mostraron que el algarrobo chileno posee un amplio rango de temperaturas de germinación, llegando a germinar incluso a 45°C, una temperatura letal para semillas de soya y que ha sido considerada como una temperatura de germinación extrema para la mayoría de las plantas (Bewley & Black, 1982). Los resultados de germinación y crecimiento para ambas plantas muestran que las poblaciones de semillas presentan un comportamiento más bien homogéneo ya que no se observaron variaciones pronunciadas para los distintos tratamientos. Cuando la germinación se realizó a 35°C, la temperatura de crecimiento máximo para algarrobo fue de 40°C, 5°C mayor que la temperatura de crecimiento máximo de soya. Incluso, algunas plantas de algarrobo fueron capaces de crecer a 50°C, lo que sugiere que las plántulas de

algarrobo han adquirido termotolerancia. La capacidad de adquirir termotolerancia que presentan plántulas de algarrobo puede optimizarse si las plántulas son tratadas a 40° durante 2 horas antes de ser sometidas a 45 y 50°C durante un período más largo (Medina & Cardemil, 1993). De acuerdo a los datos experimentales, la variedad de soya utilizada no es capaz de adquirir termotolerancia cuando la temperatura de germinación aumenta a 35°C. Estos resultados difieren parcialmente de los obtenidos por Lin y col. (1984) en plantas de soya de la variedad Wayne. Estos autores mostraron que incubaciones de 1-2 horas a 45°C tenían un efecto letal sobre la sobrevivencia de las plántulas, sin embargo, un tratamiento previo por 10 minutos a 40°C, protegía a las plántulas que, entonces, podían crecer a 45°C. Ya que la respuesta a estrés ambiental es un fenómeno multigénico y dependiente de la especie, no es sorprendente que entre variedades de la misma especie se presenten diferencias fenotípicas marcadas en cuanto a las respuestas. Por otro lado, la evaluación de otros parámetros fisiológicos permitirán establecer respuestas diferenciales entre algarrobo y soya al estrés por alta temperatura.

Uno de los efectos primarios del estrés térmico sobre el sistema de membranas es un aumento en la fluidez de membranas, que se traduce en un aumento de la permeabilidad celular con la correspondiente pérdida de electrolitos. Por esta razón, determinaciones de la conductividad eléctrica en tejido sometido a estrés es un buen indicador del grado de estrés que experimentan los organismos (Samygin, 1986). La mayoría de los trabajos que

se basan en determinaciones de la conductividad eléctrica para determinar el nivel de daño sufrido por las células y el tejido vegetal, han sido realizados en condiciones de estrés por baja temperatura y congelamiento (Blake y col., 1993). Los valores de conductividad eléctrica han permitido determinar el grado de tolerancia a bajas temperaturas en cultivares de interés comercial a través de comparaciones de la  $TL_{50}$ , que es la temperatura a la cual se considera que el 50% del tejido tratado está muerto. Para establecer el grado de termotolerancia de algarrobo respecto a soya, se compararon las conductividades eléctricas en hojas. La  $TL_{50}$  en algarrobo fue  $53^{\circ}\text{C}$  y en soya  $47^{\circ}\text{C}$ , es decir  $6^{\circ}\text{C}$  mayor en algarrobo respecto a soya. Los resultados reflejan una mayor termotolerancia en tejido foliar de algarrobo, ya que en cultivares sometidos a condiciones de estrés, una diferencia de  $3^{\circ}\text{C}$  en la  $TL_{50}$  se considera evidencia de distintos grados de tolerancia (Samygin, 1986). Los tejidos en crecimiento raramente sobreviven temperaturas sobre  $45^{\circ}\text{C}$ , aunque semillas secas y polen pueden resistir hasta  $120$  y  $70^{\circ}\text{C}$ , respectivamente (Nobel, 1988). En general, sobre  $50^{\circ}\text{C}$  sólo sobreviven organismos unicelulares y sobre  $60^{\circ}\text{C}$ , sólo procariontes (Taiz & Zeiger, 1991). Una  $TL_{50}$  de  $53^{\circ}\text{C}$  en algarrobo es una evidencia de que las hojas de esta planta son más tolerantes a altas temperaturas que el tejido foliar de una planta ya descrita como termotolerante. La implicancia fisiológica de esta observación es que el aparato fotosintético de algarrobo podría ser menos sensible a aumentos de temperatura que el de soya. Una manera de

determinar tales diferencias es la emisión de fluorescencia en hojas de ambas plantas.

A temperaturas fisiológicas, la fluorescencia proviene principalmente de la clorofila a en el fotosistema II (PSII) y refleja los procesos iniciales de la fotosíntesis, como absorción de luz, distribución y transporte de la energía de excitación y la reacción fotoquímica en el PSII (Krause & Weis, 1991). Sin embargo, la relación funcional del PSII con otros componentes del aparato fotosintético, permite usar la emisión de fluorescencia como un indicador indirecto de la condición del proceso fotosintético (Georgieva & Jordanov, 1993). Se ha demostrado que la fluorescencia de la clorofila *in vivo* es un método sensible y confiable para la detección y cuantificación del efecto de la temperatura en plantas (Georgieva & Yordanov, 1993). La fluorescencia inicial ( $F_0$ ) representa la emisión de moléculas excitadas de clorofila a, que forman parte del complejo antena antes de que la energía pase a los centros de reacción.

Cuando se determinó la fluorescencia inicial ( $F_0$ ), se observó un aumento de  $F_0$  en soya y en algarrobo a temperaturas de tratamiento mayores que 35°C. De acuerdo a Georgieva & Yordanov (1993), el aumento de  $F_0$  puede interpretarse como el reflejo de una menor eficiencia en el transporte de electrones desde la clorofila a al centro de reacción del PSII y/o a un mal funcionamiento de éste último. Schreiber & Armond (1978), sugirieron que los tratamientos por altas temperaturas podrían causar la disociación entre el

complejo cosechador de luz (LHC) y el centro de reacción del PSII, causando un aumento en  $F_o$ . Sin embargo, Ducruet & Lemoine (1985) consideraron que el aumento de  $F_o$  debido a altas temperaturas podría estar más bien relacionado con un cambio en el estado redox de la plastoquinona A ( $Q_A$ ). Tomando esta hipótesis en cuenta, se ha mostrado que el aumento de la emisión de  $F_o$  frente a un aumento de temperatura, no sólo se debe a una disociación parcial entre el LHC y el centro de reacción del PSII sino también a un cambio en el potencial redox del PSII (Georgieva & Yordanov, 1993).

La fluorescencia variable ( $F_v$ ), tiene su origen en la población de pigmentos fotosintéticos del PSII. La  $F_v$  es sensible a la tasa de transporte de electrones a través de los centros de reacción de este fotosistema y a cambios en la ultraestructura de las membranas tilacoidales. Los resultados muestran que  $F_v$  no presentó diferencias entre algarrobo y soya, aunque disminuyó progresivamente en el rango de temperatura entre 25-45°C con un valor máximo a 25°C en ambas plantas. Estos resultados son similares a los observados por Havaux & Lannoye (1983). Estos autores mostraron en hojas de cebada y maíz, que la  $F_v$  disminuía en forma uniforme junto con un aumento en la temperatura desde 2 a 30°C. Por otra parte, Georgieva & Yordanov (1993) observaron que la  $F_v$  en discos de hoja de arveja, no experimenta variaciones en un rango de temperatura entre 2-20°C y que temperaturas sobre 20°C provocaron una disminución progresiva en la  $F_v$ . La fluorescencia variable disminuye cuando las hojas experimentan estrés por alta temperatura. Se ha

demostrado en varias especies que la  $F_v$  comienza a disminuir cuando la temperatura de tratamiento sobrepasa  $35^{\circ}\text{C}$ . En algarrobo y soya, la temperatura de inhibición de  $F_v$  fue de alrededor de  $38^{\circ}$ . Para ambas plantas, se observó una disminución en  $F_v$  que llegó a 16% del valor inicial a  $45^{\circ}\text{C}$ . En plantas de arveja, se ha propuesto que la temperatura a la cual ocurre un 50% de inhibición de la fluorescencia variable podría ser usada como criterio para definir la sensibilidad térmica del aparato fotosintético (Georgieva & Yordanov, 1993).

La relación  $F_v/F_m$  se considera como una medida de la eficiencia del fotosistema II en los pasos iniciales de las reacciones fotoquímicas (Berry & Björkman, 1980). Factores causantes de estrés que afectan principalmente la función del PSII reducen el valor de esta relación (Klinkovsky & Naus, 1994). En algarrobo y soya, temperaturas hasta  $35^{\circ}\text{C}$  no afectaron la relación  $F_v/F_m$ , la cual disminuyó en forma constante hasta  $40^{\circ}\text{C}$  y luego se redujo rápidamente hasta llegar a un 36% de su valor inicial. De los datos se observa que la temperatura crítica a la que  $F_o$  comenzó a aumentar en soya es  $35^{\circ}\text{C}$  y en algarrobo es  $40^{\circ}\text{C}$ . Los resultados en la emisión de fluorescencia muestran que el tratamiento entre 25 y  $35^{\circ}\text{C}$  no produce cambios drásticos en la capacidad de transporte de electrones del PSII en algarrobo ni en soya. Esto se correlaciona con el resultado obtenido para la asimilación de  $\text{CO}_2$ , ya que a temperaturas ambientales de  $30\text{-}35^{\circ}\text{C}$ , la fotosíntesis no se ve afectada irreversiblemente. Sin embargo, sobre  $40^{\circ}\text{C}$  existen diferencias en las temperaturas críticas entre

ambas plantas que podrían correlacionarse con la diferencia de 6°C observada para la TL<sub>50</sub>.

Como se ha discutido anteriormente, etileno es considerada una hormona del estrés y es un buen candidato para evaluar el nivel de daño sufrido por las plantas debido a aumentos en la temperatura ambiental. Cuando se comparó la evolución de etileno en algarrobo y soya de 96 horas de edad, se observó que soya presentaba mayores niveles de la hormona que algarrobo. Si se considera etileno como un marcador de estrés, se podría pensar que las plántulas de algarrobo responden menos intensamente al calor que soya, por lo tanto, algarrobo estaría presentando mayor tolerancia al estrés por temperatura durante las primeras etapas de desarrollo. Como se sabe, etileno participa en la regulación de una serie de procesos metabólicos, entre ellos, procesos de envejecimiento celular (Taiz & Zeiger, 1991); por lo tanto, la senescencia de los cotiledones también puede ser un inductor de la síntesis de etileno observada. El nivel más alto de etileno que presentó soya podría estar relacionado con una mayor tasa metabólica de la planta, es decir, soya envejecería más rápido que algarrobo. Se sabe que el metabolismo de plantas leñosas es más lento que en herbáceas (Moore & Clark, 1995). Por otra parte, la caída en la evolución de etileno a 45 y 50°C fue más drástica en soya que en algarrobo y como se discutió antes, ésta se debe probablemente a una inactivación parcial de la EFE por exceso de calor. Ya que la disminución en el nivel de etileno en algarrobo es menos pronunciado que en soya, se podría pensar que la ruta metabólica de

etileno es más tolerante al efecto causado por altas temperaturas en algarrobo que en soya.

Ya que la termotolerancia ha sido asociada a la síntesis de proteínas de estrés térmico, la velocidad de acumulación de estas podrían ser una forma para determinar diferencias en la capacidad de responder al estrés térmico entre algarrobo y soya. Ubiquitina es una proteína de estrés térmico (Bond & Schlesinger, 1985) de 76 aminoácidos, muy abundante y que se encuentra sólo en organismos eucariontes (Jentsch, 1992). Durante el estrés térmico, ubiquitina participa en un sistema de degradación de polipéptidos que han perdido su conformación debido al calor (Finley & Chau, 1991). El nivel de ubiquitina libre determinado a través de inmuno dot blots fue mayor en soya respecto a *P. chilensis* a la temperatura control de 25°C. Se sabe que ubiquitina es sintetizada en forma constitutiva en las células y se encuentra en el citoplasma, el núcleo y la superficie celular (Jentsch, 1992). En la vía proteolítica dependiente de ubiquitina, muchas moléculas de ubiquitina se unen a proteínas que serán degradadas, en un proceso dependiente de ATP catalizado por un sistema multienzimático. Los conjugados de proteína-ubiquitina de alto peso molecular, son luego degradados por un complejo de proteasas dependiente de ATP, liberando aminoácidos y ubiquitina intacta (Boavida-Ferreira y col., 1995). A temperaturas entre 35 y 45°C, el nivel de ubiquitina libre disminuyó progresivamente en ambas plantas ya que ubiquitina se comienza a conjugar a proteínas que tienen que ser eliminadas por proteólisis debido al estrés. La

disminución de ubiquitina libre entre 25 y 35°C, fue más drástica en soya que en algarrobo lo que podría implicar que el aumento de 5°C en la temperatura de tratamiento provoca más proteólisis en soya que en algarrobo. Los resultados obtenidos para ubiquitina conjugada confirman la observación anterior, ya que entre 25 y 35°C, el aumento en el nivel de ubiquitina conjugada es de 11 y 51% en algarrobo y soya, respectivamente. A temperaturas mayores, 40 y 45°C, ubiquitina se encuentra principalmente en forma conjugada, lo que es evidencia del daño provocado a la célula por altas temperaturas. Es posible que parte de los mecanismos que hacen de algarrobo una planta termotolerante incluye la estabilización de la vida media de proteínas, por ejemplo, mediante aumentos en el nivel de prolina o de sacarosa. Por esta razón, aún cuando el sistema de ubiquitinación está activado en ambas plantas, el aumento de la temperatura entre 25 y 35°C, estaría provocando menor proteólisis en algarrobo, por lo que el nivel de ubiquitina conjugada no aumenta tanto como en soya. Temperaturas más altas, sin embargo, causarían daños mayores en las proteínas, activando en ambas plantas el sistema de hidrólisis proteolítica guiada por ubiquitina.

En la mayoría de los tejidos de eucariontes, la síntesis de proteínas de estrés térmico es inducida dentro de minutos cuando la temperatura se eleva sobre los niveles requeridos para el crecimiento normal de las células (Ougham & Howarth, 1988). Utilizando este criterio para comparar niveles de termotolerancia en algarrobo y soya, se realizaron experimentos de cinética para la detección de ubiquitina libre y conjugada en ambas plantas. Los resultados no

mostraron diferencias en tiempo e intensidad de respuesta para ubiquitina libre. La cinética para ubiquitina conjugada tampoco presentó diferencias en el tiempo de detección de la proteína, sin embargo, en algarrobo el nivel de ubiquitina conjugada fue mayor. La relación entre ubiquitina conjugada/ubiquitina libre fue levemente más alta para algarrobo que para soya. Estos resultados parecen indicar que algarrobo poseería un sistema más sensible frente al aumento de temperatura, lo que le permitiría responder más eficientemente frente al estrés. Esta observación no necesariamente implica que el estrés es mayor en algarrobo, ya que el mecanismo de ubiquitinación está activo en forma constitutiva en las células eucariontes (Finley & Chau, 1991) y éste podría ser más eficiente en algarrobo. Además, en ambas plantas, el nivel de ubiquitina conjugada aumenta dentro de los primeros 10 minutos, presenta un máximo a los 60 minutos y vuelve a niveles basales a los 90 minutos de tratamiento. Es posible que la conjugación de ubiquitina y la correspondiente degradación de proteínas dañadas ocurra dentro de los primeros 90 minutos de estrés térmico. Esta respuesta rápida se relaciona con la disminución drástica de ubiquitina libre dentro de los primeros 5 minutos de tratamiento y el aumento progresivo de la proteína observado a partir de los 30 minutos; una vez que la planta ha respondido, la maquinaria celular comenzaría a sintetizar ubiquitina para procesos de degradación posteriores. Las temperaturas óptimas de inducción de proteínas de estrés térmico varían entre especies; en el caso de plántulas de soya de 48 horas de edad, se encuentra entre 35 y 37,5°C (Ougham & Howarth,

1988) y para ejes embrionarios de algarrobo es 45°C (Medina & Cardemil, 1993). La temperatura experimental para las cinéticas fue 40°C, por lo tanto, es posible que a esta temperatura la maquinaria para la transcripción y/o traducción de proteínas de estrés en soya esté parcialmente inhibida (Bernstam, 1978), de manera que no se observan aumentos en los niveles de ubiquitina libre. En el caso de algarrobo se podría pensar que 40°C no es una temperatura suficientemente alta para inducir la síntesis de algunas proteínas de estrés, ubiquitina entre ellas.

Las proteínas de estrés térmico de 70 KDa, están involucradas en el plegamiento correcto de proteínas que han perdido su estructura producto del estrés (Georgopoulos & Welch, 1993). Los experimentos de cinética en algarrobo y soya, permitieron detectar la presencia de HSP70 a 40°C, aún a tiempo cero. Se sabe que las funciones de la familia de chaperonas de 70 Kda no están restringidas a condiciones de estrés y van desde facilitar el plegamiento y ensamblaje correcto de las proteínas a la desagregación de gránulos de proteína (Yalovsky y col., 1992). Por lo tanto, esta familia de proteínas se sintetiza en forma constitutiva en la célula y sus niveles aumentan bajo condiciones de estrés térmico (Wu y col., 1993). Por otra parte, las cinéticas para HSP70 en algarrobo y soya presentaron curvas similares, lo que implica que no hay mayores diferencias en los tiempos de expresión y/o acumulación de esta proteína de estrés en ambas plantas. En algarrobo, el contenido de HSP70 fue mayor que en soya para todos los tiempos. Se ha

postulado que HSP70 podría ser parte de un "termómetro" celular que detecta proteínas que han perdido su conformación debido al calor, y de esta manera funcionaría como transductor de la señal para la síntesis de otras proteínas de estrés térmico (Sorger, 1991). Si se considera el nivel de HSP70 presente en la planta como un marcador de estrés y del daño provocado por éste sobre la estructura proteica, se podría especular que el sistema mediado por HSP70 en algarrobo presenta mayor sensibilidad frente al aumento de temperatura que en soya. A partir de 30 minutos de tratamiento a 40°C, el nivel de HSP70 en algarrobo se mantuvo por sobre el nivel basal y fue casi 20% mayor que en soya. Si bien es cierto, estas diferencias podrían ser producto de una mayor sensibilidad al estrés térmico en las plantas de algarrobo, también es posible que la detección de niveles de HSP70 mediante inmuno dot blots no permita discriminar entre miembros de la familia que son expresados constitutivamente o que son inducidos por calor. Se sabe que las HSP70, tanto citosólicas como presentes en organelos, muestran alta conservación a nivel de aminoácidos, aún entre especies tan distantes como bacterias y células animales (Rensing & Maier, 1994; Rochester y col., 1986; Watts y col., 1992; Wang y col., 1993; Marshall & Keegstra, 1992; Silver & Way, 1993). En plántulas de algarrobo sometidas a estrés térmico, el anticuerpo monoclonal anti HSP71 Kda presentó reacción con 2 miembros de esta familia de 68 y 71 Kda. La detección mediante inmuno dot blots podría estar dando cuenta de niveles más altos de HSP70

expresada constitutivamente en algarrobo respecto a soya y no necesariamente a miembros inducibles por calor.

#### **4.6. Estabilidad de mRNA para ubiquitina en *P. chilensis***

La respuesta de los tejidos vivos sometidos a estrés por alta temperatura, generalmente se caracteriza por una reducción o inhibición de la síntesis de proteínas que son sintetizadas normalmente, y una rápida producción de proteínas que se conocen como proteínas de estrés térmico (HSPs) (Ougham & Howarth, 1988; Key y col., 1981). El control de la síntesis de HSPs parece ser principalmente a nivel de la transcripción, aunque existen algunas evidencias de control postranscripcional (Gallie, 1993). Mediante análisis "run-on" en núcleos de maíz, Christensen & Quail (1989), demostraron que el control de la expresión de ubiquitina es a nivel de la transcripción, aunque la estabilidad de los mensajeros para ubiquitina juega un papel importante en la regulación de la expresión de este gen. Las hibridaciones tipo Northern fueron realizadas en *P. chilensis* con una sonda para ubiquitina de embrión de pollo, lo que demostró la alta conservación de la proteína (Ozkaynak y col., 1984; Vierstra y col., 1985). Aunque se observó expresión de ubiquitina en cotiledón y radícula de *P. chilensis* a la temperatura control de 25°, y en el tratamiento a 40°C, la expresión máxima se observó en cotiledón a 45°C. La unión de ubiquitina a proteínas parece tener múltiples funciones, entre ellas, la respuesta celular a estrés (Finley & Chau, 1991), de modo que ubiquitina se expresa

constitutivamente en todos los tejidos eucariontes en que ha sido descrita (Jentsch, 1992). Polímeros de ubiquitina son sintetizados a partir de RNA mensajero codificado por varios genes (Agell y col., 1988). En maíz, la ubiquitina es codificada por una pequeña familia multigénica de 10 miembros los que originan mensajeros de varios tamaños que se expresan a diferentes temperaturas, dependiendo del tiempo de exposición al estrés térmico (Christensen & Quail, 1989). Aunque en *P. chilensis* el número de genes que codifican para ubiquitina no ha sido descrito, es posible que la expresión máxima observada a 45°C es producto de la inducción de alguno de los miembros de la familia de ubiquitina. Por otra parte, el nivel de mensajeros para ubiquitina a 40°C podría ser el reflejo de una disminución en la tasa de transcripción de uno de los genes inducibles por temperatura. En maíz, entre 3 a 4 horas después del estrés térmico, la abundancia de uno de los mensajeros para ubiquitina inducidos por calor, disminuyó rápidamente, aún cuando la tasa de transcripción permanecía constante (Christensen & Quail, 1989). En base a las masas moleculares para los RNAs ribosomales de plantas descritos por Davies & Larkins (1980), el tamaño estimado del mensajero para ubiquitina en *P. chilensis* fue aproximadamente 0,7 Kb, menor al observado en otras especies. En embrión de pollo se encontró un mensajero para ubiquitina inducible por calor de 1,2 Kb, y otro de 1,7 Kb, expresado sólo en células estresadas (Bond & Schlesinger, 1985). En maíz se han detectado mensajeros para ubiquitina de tamaños entre 0,8 y 2,1 Kb (Christensen & Quail, 1989). La

variación en el tamaño de los mRNAs para ubiquitina se debe a que una molécula de RNA mensajero para ubiquitina puede dar origen a varias moléculas de proteína ya que ésta se sintetiza como poliubiquitina o como proteína de fusión (Agell y col., 1988).

La cinética de aparición para los mensajeros de ubiquitina en *P. chilensis*, mostró que estos se encuentran presentes en ausencia de estrés, aunque sólo son detectados hasta los 20 minutos a 25°C. Sin embargo, cuando las plantas son sometidas a estrés térmico a 40°C, los mensajeros para ubiquitina son acumulados desde 5 minutos y hasta 30 minutos de duración del tratamiento. La síntesis de proteínas de estrés térmico es una respuesta rápida de las células (Taiz & Zeiger, 1991). En maíz, la acumulación del mensajero para ubiquitina de 2,1 Kb comienza luego de los primeros minutos de estrés y alcanza un máximo dentro de 1 hora a 42°C (Christensen & Quail, 1989). La baja acumulación observada para los mensajeros de ubiquitina puede deberse a que la cinética se realizó a 40°C. Se ha demostrado que la temperatura máxima de expresión de proteínas de estrés térmico en *P. chilensis* es 45°C (Medina & Cardemil, 1993).

#### 4.7 CONCLUSIONES

La discusión de los resultados en relación a los objetivos de esta tesis, permiten concluir que:

- I. *Prosopis chilensis* presenta estrategias anatómicas, fisiológicas y moleculares (evapotranspiración, plegamiento de hojas, acumulación de prolina, síntesis de proteínas de estrés como ubiquitina y HSP70), que le permiten evadir y tolerar el estrés provocado por las altas temperaturas a que se ve expuesto en condiciones de terreno. Ya que las fluctuaciones de temperatura y humedad ocurren durante el día, estas respuestas son rápidas y plásticas.
  
- II. La comparación del grado de termotolerancia en los parámetros de germinación, crecimiento, TL<sub>50</sub>, emisión de fluorescencia y evolución de etileno entre *P. chilensis* y *G.max* (soya var. McCall) , permiten concluir que *P. chilensis* es más tolerante a altas temperaturas que *G.max*.
  
- III. La velocidad de la respuesta a estrés térmico a nivel de acumulación de las proteínas ubiquitina y HSP70 no es diferente entre *P. chilensis* y *G.max*. Sin embargo, los niveles basales mayores de estas proteínas en *P. chilensis*, sugieren que la planta podría ser más sensible a variaciones de temperatura y

por lo tanto responder en forma más eficiente al daño proteico causado por el estrés térmico.

IV. *P. chilensis* acumula mensajeros para ubiquitina bajo condiciones de estrés térmico, presentando una respuesta más intensa en cotiledones. Este resultado sugiere que el sistema proteolítico mediado por ubiquitina es una estrategia universal que también está presente en *P. chilensis* como parte de la respuesta al estrés por alta temperatura.

Los resultados de esta tesis apoyan la hipótesis propuesta y sugieren que *Prosopis chilensis* es una planta altamente termotolerante, gracias a la capacidad para evadir el estrés provocado por altas temperaturas mediante el plegamiento de sus hojas y evapotranspiración. La modulación de la fotosíntesis y la acumulación de solutos compatibles son evidencias de la adaptación de *P. chilensis* a condiciones de alta temperatura y baja humedad relativa presentes en el medioambiente natural de la planta. La mayor capacidad de germinación y crecimiento a temperaturas sobre 40°C y los resultados de temperatura letal y emisión de fluorescencia sugieren que *P. chilensis* es una especie excepcionalmente tolerante a altas temperaturas en comparación a *G. max* una planta descrita como termotolerante. La acumulación de proteínas de estrés térmico ubiquitina y HSP70 son una estrategia común a *P. chilensis* y *G. max* frente a altas temperaturas, aunque *P. chilensis* podría presentar un mecanismo

de respuesta más eficiente frente al daño proteico provocado por estrés ambientales.

## REFERENCIAS

- Agell N., Bond U. & Schlesinger M.J. (1988). In vitro proteolytic processing of a diubiquitin and truncated diubiquitin formed from in vivo generated mRNAs. PNAS USA 85: 3693-3697.
- Alia, Saradhi P.P. & Mohanty P. (1993). Influence of proline on the free radical generating capacity of thylakoids and cotyledonary leaves of *Brassica juncea* raised under sodium chloride stress. En Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress (ed. Close T.J. & Bray E.A.), pp 271.
- Ananthan J., Goldberg A.L. & Voellmy R. (1986). Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. Science 232:522-524.
- Apuya N. R. & Zimmerman J.L. (1992). Heat shock gene expression is controled primarily at the translational level in carrot cells and somatic embryos. The Plant Cell. 4:657-665.
- Arce P. & Balboa O. (1988). Some aspects of the biology of *Prosopis* growing in Chile. En The Current State of Knowledge on *Prosopis juliflora* (ed. Habit M.A & Saavedra J.C.), pp 313-326.
- Aspinall D. & Paleg L.G. (1981). Proline accumulation: physiological aspects. En Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants (ed. L.G. Paleg & D. Aspinall), Academic Press Inc. New York, pp 205-241.
- Barker N.R., Long S.P. & Ort D.R. (1988).. En Plants and Temperature (ed. S.P. Long & F.I. Photosynthesis ant temperature, with particular reference to effects on quantum yield Woodward), pp 347-375.
- Bartels D., Alexander R., Schneider K., Elster R., Velasco R., Alamillo J., Bianchi G., Nelson D. & Salamini F. (1993). Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress (ed. Close T.J. & Bray E.A.), pp 119-127.
- Bates L.S., Walden R.P. & Teare I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39:205-207.
- Bernstam V.A. (1978). Heat effects on protein biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. 29:25:46.
- Berry J. & Björkman O. (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 31:491-543.

Bewley J.D. & Black M. (1982) *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*, vol 2. Springer-Verlag. Berlin.

Blake T., Tragoonrung S., Walton M., Wright S., Jones B., Chen T. & Hates P. (1993). Mapping the genes for cold tolerance in barley. *En Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress* (ed. Close T.J. & Bray E.A.), pp 202-210.

Boavida-Ferreira R.M., Rodrigues-Ramos P.C., Franco E., Pinto C.P. & Nascimento A.R. (1995). Changes in ubiquitin-protein conjugates during seed formation and germination. *J. Exp. Bot.* 46:211-219.

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

Bond U., Agell N., Haas A.L., Redman K. & Schlesinger M.J. (1988). Ubiquitin in stressed chicken embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 263:2384-2388.

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

Browse J., Kunst L., Anderson S., Hugly S. & Somerville C. (1989). A mutant of *Arabidopsis* deficient in the chloroplast 16:1/18:1 desaturase. *Plant Physiol.* 90:522-529.

Burke J.J., Hatfield J.L., Klein R. & Mullet J.E. (1985). Accumulation of heat shock proteins in field-grown cotton. *Plant Physiol.* 78:394-398.

Chandler P.M. & Robertson M. (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:113-141.

Chandrashekhar P.J. & Nguyen H.T. (1995). 5' untranslated leader sequences of eukaryotic mRNAs encoding heat shock induced proteins. *Nucl. Ac. Res.* 23:541-549.

Chen Q., Lauzon L., DeRocher A. & Vierling E. (1990). Accumulation, stability and localization of a major chloroplast heat shock protein. *J. Cell Biol.* 110:1873-1883.

Ciechanover A., Finley D. & Varshavsky A. (1984). Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cells cycle mutants ts85. *Cell* 37:57-66.

- Cooper P. & Ho D.T. (1983). Heat shock proteins in maize. *Plant Physiol.* 71:215-222.
- Cooper P., T-h. D. Ho & Hauptmann R.M. (1984). Tissue specificity of the heat shock response in maize. *Plant Physiol.* 75:431-441.
- Christensen A.H. & Quail P.H. (1989). Sequence analysis and transcriptional regulation by heat shock of polyubiquitin transcripts from maize. *Plant Mol. Biol.* 12:619-632.
- Cress A.E. & Gerner E.W. (1980). Cholesterol levels inversely reflect the thermal sensitivity of mammalian cells in culture. *Nature* 283:677-679.
- Crowe J.H., Crowe L.M, Leslie S.B. & Fisk E. (1995). Mechanisms of stabilization of dry biomolecules in anhydrobiotic organisms. *En Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress* (ed. Close T.J. & Bray E.A.), pp 11-20.
- Davies E. (1987). Plant responses to wounding. *En The Biochemistry of Plants, a comprehensive treatise*, vol 12 (ed. P.K. Stumpf & E.E. Conn), pp 243-265.
- Davies E. & Larkins B.A. (1980). Ribosomes. *En The Biochemistry of Plants, a comprehensive treatise*, vol 1 (ed. P.K. Stumpf & E.E. Conn), pp 413-438.
- DeRocher A.E., Helm K.W., Lauzon L.M. & Vierling E. (1991) Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat stress and recovery. *Plant Physiol.* 96:1038-1047.
- De Virgilio C., Hottiger T., Domínguez J, Boller T & Wiemken A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast.I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur. J. Biochem.* 219:179-185.
- DiDomenico B.J., Bugaisky L., Schöffl F and Key J.L. (1982). The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and postranscriptional levels. *Cell* 31:593-603.
- Ducruet J.M. & Lemoine J. (1985). Increased heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in triazine resistant biotypes from different plant species. *Plant Cell Physiol.* 26:419-429.
- Edington B.V., Whelan S.A. & Hightower L.E. (1989). Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. *J. Cell Physiol.* 139:219-228.

Ellis R.J. & Hemmingsen S.M. (1989) Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *TIBS* 14:339-342.

Enami I., Kitamura M., Tomo T., Isokawa Y., Ohta H. & Katoh S. (1994). Is the primary cause of thermal inactivation of oxygen evolution in spinach PSII membranes release of the extrinsic 33 kDa protein or of Mn?. *Biochim. Biophys. Acta* 1186:52-58.

Finley D. & Chau V. (1991) Ubiquitination. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:25-69.

Fromm J. & Eschrich W. (1988). Seimonastic movements in Mimosa. En *The Pulvinus: Motor Organ for Leaf Movement. Current Topics in Plant Physiology* (ed. R.L. Satter, H.L. Gorton & T.G. Vogelmann), pp 25-43. American Society for Plant Physiologists Series, Rockville, Maryland.

Fung P.A., Gaerting J., Gorovsky M.A. & Hallberg R.L. (1995). Requirement of a small cytoplasmic RNA for the establishment of thermotolerance. *Science*.268:1036-1039.

Gallie D. (1993). Postranscriptional regulation of gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 44:77-105.

Gatenby A.A., Viitanen P.V. & Lorimer G.H. (1990). Chaperonin assisted polypeptide folding and assembly: implications for the production of functional proteins in bacteria. *Trends in Biotechnology* 5:354-357.

Georgieva K. & Jordanov I. (1993). Temperature dependence of chlorophyll fluorescence parameters of pea seedlings. 142:151-155.

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

Gething M-J. & Sambrook J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* 355:33-45.

Gombos Z., Wada H., Hideg E. & Murata N. (1994). The unsaturation of membrane lipids stabilizes photosynthesis against heat stress. *Plant Physiol.* 104:563-567.

Gómez-Lim M.A., Valdés-López V. Cruz-Hernández A. & Saucedo-Arias L. J. (1993). Isolation and characterization of a gene involved in ethylene biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 134:217-221.

- Grindstaff K.K., Fielding L.A. & Brodl M.R. (1996). Effect of gibberellin and heat shock on the lipid composition of endoplasmic reticulum in barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 110:571-581.
- Haas A.L. & Bright P.M. (1985). The immunochemical detection and quantitation of intracellular ubiquitin-protein conjugates. *J. Biol. Chem.* 262:11315-11323
- Halberg E.M., Fung P.A. & Hallberg R.L.. (1992). *Nucl. Acid Res.* 20:912.
- Hanson A. & Hitz W.D. (1982). Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:163-203.
- Harding S.A., Guikema J.A. & Paulsen G.M. (1990). Photosynthetic decline from high temperature stress during maturation of wheat. *Plant Physiol.* 92:648-653.
- Harrison C.J., Bohm A.A. & Nelson H.C.M. (1994). Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science* 263:224-227.
- Hartl F.U., Hlodan R. & Langer T. (1994). Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *TIBS* 19:20-25.
- Hatfield P.M, Callis J & Vierstra R. (1990). Cloning of ubiquitin activating enzyme from wheat and expression of a functional protein in *Escherichia coli*. *J.Biol. Chem.* 265:15813-17.
- Havaux M. (1993). Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. *Plant Cell and Environ.* 16:461-467.
- Havaux M. & Lannoye R. (1983). Temperature dependence of delayed chlorophyll fluorescence in intact leaves of higher plants. A rapid method for detecting the phase transition of thylakoid membrane lipids. *Photosynth. Res.* 4:257-263.
- Hennessey T.L., Freeden A.L. & Field C.B. (1993) Environmental effects on circadian rhythms in photosynthesis and stomatal opening. *Planta* 189:369-376.
- Hernández E. & Vierling E. (1993) Heat shock protein expression in the field. *Plant Physiol.* 101:1209-1216.
- Hottiger T., De Virgilio C., Hall M.N., Boller T. & Wiemken A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeasts. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *Eur. J. Biochem.* 219:187-193.

- Iida H. & Yahara I. (1985). Yeast heat-shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase. *Nature* 315:688-690.
- Jentsch S. (1992) The ubiquitin-conjugation system. *Ann. Rev. Genet.* 26:179-207.
- Key J.L., Lin C.Y. & Chen Y.M. (1981). Heat shock proteins of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3526-3530.
- Kimpel J.A. & Key J.L. (1985). Presence of heat shock mRNAs in field grown soybeans. *Plant Physiol.* 79:672-678.
- Klee H. & Stelle M. (1991). Molecular genetics approaches to plant hormone biology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 42:529-551.
- Klinkovsky T. & Naus J. (1994). Sensitivity of the relative Fpl level of chlorophyll fluorescence induction in leaves to the heat stress. *Photosyn. Research* 39:201-204.
- Kononowicz A., Raghothama K.G., Casas A.M. Reuveni M., Watad A-E. A., Liu D., Bressan R.A. & Hasegawa P.M. (1993). Osmotin: regulation of gene expression and function. *En Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress* (ed. Close T.J. & Bray E.A.), pp 144-158.
- Krause G.H. & Weis E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42:313-349.
- Laemli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
- Lee Y-R. J., Nagao R. T., Lin Ch-Y. & Key J.L. (1996). Induction of a heat shock gene expression by an amino acid analog in soybean seedlings. *Plant Physiol.* 110:241-248.
- Lin Ch-Y., Roberts J.K. & Key J.L. (1984). Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings. *Plant Physiol.* 74:152-160.
- Lucas W.J. & Madore M.A. (1988). Recent advances in sugar transport. *En The Biochemistry of Plants, a comprehensive treatise.* vol 14. (ed. P.K.Stumpf & E.E. Conn), pp 35-85.
- Marshall J.S. & Keegstra K. (1992) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the major Hsp70 of the pea chloroplastic stroma. *Plant Physiol.* 100:1048-1054.

- Medina C. & Cardemil L. (1993). *Prosopis chilensis* is a plant highly tolerant to heat shock. *Plant Cell and Envir.* 16:305-310.
- Miernyk J.A. & Hayman G.T. (1996) ATPase activity and molecular chaperone function of the stress70 proteins. *Plant Physiol.* 110:419-424.
- Mitchel J.B., Russo A., Kinsella T.J. & Glatstein E. (1983). Glutathione elevation during thermotolerance induction and thermosensitization by glutathione depletion. *Cancer Res.* 43:987-991.
- Mooney H.A., Björkman O. & Collatz, G.J. (1978). Photosynthetic acclimation to temperature in the desert shrub, *Larrea divaricata*. I. Carbon dioxide exchange characteristics of intact leaves. *Plant Physiol.* 61:406-410.
- Nachtmann F. & Budna K.W. (1977). Sensitive determination of derivatized carbohydrates by High-Performance-Liquid-Chromatography. *J. Chromato.* 155:107-110.
- Nieto-Sotelo J. & Ho T-H. D. (1986) Effect of heat shock on the metabolism of glutathione in maize roots. *Plant Physiol.* 82:1031-1035.
- Nieto-Sotelo J., Vierling E. & Ho T-H. D. (1990). Cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding a plastid-localized heat shock protein in maize. *Plant Physiol.* 93:1321-1328.
- Nobel P.S. (1988). Principles underlying the prediction of temperature in plants, with special reference to desert succulents. En *Plants and Temperature* (ed.S.P.Long & F.I. Woodward), pp 1-25.
- Ortiz, C., Bravo, L., Pinto, M. & Cardemil, L. (1994) Physiological and molecular responses of *Prosopis chilensis* under field and simulation conditions. *Phytochemistry*, 40, 1375-1382.
- Ougham H.J. & Howarth C.J. (1988). Temperature shock proteins in plants. En *Plants and Temperature* (ed.S.P.Long & F.I. Woodward), pp 259-281.
- Ozkaynak E., Finley D., Varshavsky A. (1984). The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature* 312:663-666.
- Pahlich E. (1990). Switching of proline metabolism in water stressed plants. *Bulletin Société Botanique de France* 137:3-11.
- Pareek A., Singla S.L. & Grover A. (1995). Immunological evidence for accumulation of two high-molecular-weight (104 and 90 kDa) HSPs in response

to different stresses in rice and in response to high temperature stress in diverse plant genera. *Plant Mol. Biol.* 29:293-301.

Pearcy R.W. (1977). Acclimation of photosynthetic and respiratory CO<sub>2</sub> exchange to growth temperature in *Atriplex lentiformis* (Torr.) Wats. *Plant Physiol.* 59:795-799.

Pemasada M.A. (1977). Stomatal responses to high temperature in darkness. *Ann. Bot.* 41:969-976.

Phillips T.A., Van Bogelen R.A. & Neidhardt. (1984). Lon gene product of *Escherichia coli* is a heat shock protein. *J. Bacteriol.* 159:283-287.

Picard D., Khursheed B., Garabedian M.J. & Fortin M.G. (1990). Reduced levels of Hsp 90 compromise steroid receptor action *in vivo*. *Nature* 348:166-168.

Piechulla B. (1988) Plastid and nuclear mRNA fluctuations in tomato leaves-diurnal and circadian rhythms during extended dark and light periods. *Plant Molecular Biology* 11:345-353.

Pinto M. (1989). CO<sub>2</sub> assimilation in young *Prosopis* plants. *Ann. Sci. For. Suppl.* 46:433-438.

Piper P. (1987). How cells respond and adapt to heat stress through alterations in gene expression. *Sci. Prog., Oxf.* 71:531-544.

Preiss J. (1988). Biosynthesis of starch and its degradation. En *The Biochemistry of Plants, a comprehensive treatise*, vol 14 (ed. P.K. Stumpf & E.E. Conn), pp 181-254.

Quinn P.J. & Williams W.P. (1985). Environmentally induced changes in chloroplast membranes and their effect on photosynthetic function. In *Photosynthetic Mechanisms and the Environment* (ed. J.Barber & N.R. Baker), pp 1-47, Elsevier, Amsterdam.

Raschke K. (1970). Temperature dependence of CO<sub>2</sub> assimilation and stomatal aperture in leaf sections of *Zea mays*. *Planta* 91:336-363.

Raymond C.A., Harwood C.E. & Owen J.V. (1986). A conductivity method for screening populations of *Eucalyptus* for frost damage and frost tolerance. *Aus. J. Bot.* 34:377-393.

Rechsteiner M. (1987). Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 3:1-30.

Rhodes D. (1987). Metabolic responses to stress. En *The Biochemistry of Plants*, a comprehensive treatise, vol 12 (ed. P.K. Stumpf & E.E. Conn), pp 202-243.

Rensing S.A. & Maier U.G. (1994) Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *J. Mol. Evol.* 39:80-86.

Riazi A., Matsuda K. & Arslan 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.

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

Rodríguez J.G. & Cardemil L. (1994). Cell wall proteins in seedling cotyledons of *Prosopis chilensis*. *Phytochem.* 35:281-286.

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

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup>Ed. Cold Spring Harbor NY. Press.

Samygin G.A. (1986) Dynamics of changes in electrical conductivity of tissues in the freeze-thaw process. *Fiziologiya Rastenii.* 33:738-745.

Santarius K.A. & Müller M. (1979). Investigation on heat resistance of spinach leaves. *Planta* 146:529-538.

Saradhi P.P. & Alia (1993). Loss in the mitochondrial electron transport is the prime cause for proline accumulation during environmental stresses. En *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress* (ed. Close T.J. & Bray E.A.), pp 270.

Satter R.L. (1988). Leaf movements: an overview of the field. In *The Pulvinus: Motor Organ for Leaf Movement. Current Topics in Plant Physiology* (ed. R.L. Satter, H.L. Gorton & T.G. Vogelmann), American Society of Plant Physiologists Series, Rockville, Maryland, pp 1-9.

Schmid D., Baici A., Gehring H. & Christen P. (1994) Kinetics of molecular chaperones action. *Science* 263:971-973.

Schönfelder M., Horsch A. & Schmid H-P. (1985). Heat shock increases the synthesis of the poly(A)-binding protein in HeLa cells. Proc. Acad. Sci. USA 82:6884-6888.

Schreiber U. & Armond P.A. (1978). Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and related heat-damage at the pigment level. Biochim. Biophys. Acta 502:138-151.

Schwall G., Elster R., Ingram J., Bernacchia G., Bianchi G., Gallagher L., Salamini F. & Bartels D. (1995). Carbohydrate metabolism in the desiccation tolerant plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. En Sucrose Metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology (ed. H.G. Pontis, G.L. Salerno & E.J. Echeverria), pp 245-254.

Sharp R.E., Voetberg G.S., Saab I.N. & Bernstein N. (1995). Role of abscisic acid in the regulation of cell expansion in roots at lower water potentials. En Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress (ed. Close T.J. & Bray E.A.), pp 57-66.

Silver P.A. & Way J.C. (1993) Eukaryotic DNAJ homologs and the specificity of Hsp70 activity. Cell. 74:5-6

Sorger P.K. (1990). Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators. 62:793-805.

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

Sundby C.A., Melis P. Mäenpää P & Andersson B. (1986). Temperature-dependent changes in the antenna size of photosystem II. Bioch. Biofis. Acta 851:475-483

Taiz L. & Zeiger E. (1991). Stress physiology. En Plant Physiology (ed. The Benjamin/Cummins Publ. Co. Inc.), pp 360-362.

Towbin H., Satehelin T. & Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. PNAS, USA 76:4350-4354.

Vierling E. (1990). Heat shock proteins, function and expression in plants. En Stress Responses in Plants: Adaptation Mechanisms (ed. R.Asher), pp. 357-375.

Vierling E. (1991). The roles of heat shock proteins. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42:579-620.

Vierling E. & Sun A. (1989). Developmental regulation of heat shock proteins in higher plants. En *Environmental Stress in Plants*, NATO ASI Series (ed. J. Cherry), Springer-Verlag, Berlin, vol19, pp 343-354.

Vierstra R.D., Langon S.M. & Schaller G.E. (1985). Complete aminoacid sequence of ubiquitin from the higher plant *Avena sativa*. *Biochemistry* 25:3105-3108.

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

Viitanen P.V., Schmidt M., Buchner J., Suzuki, T., Vierling E., Dickson R., Lorimer G., Gatenby A. & Soll J. (1995). Functional characterization of the higher plant chloroplast chaperonins. *J. Biol. Chem.* 270:18158-18164.

Wang C.Y. & Adams D.O. (1980). Ethylene production by chilled cucumbers (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiol.* 66:841-843.

Wang H., Goffreda M. & Leustek T. (1993) Characteristics of an Hsp70 homolog localized in higher plant chloroplasts that is similar to DnaK, the Hsp70 of prokaryotes. *Plant Physiol.* 102:843-850.

Watts F.Z., Walters A.J. & Moore A.L. (1992) Characterization of PHSP1, a cDNA encoding a mitochondrial HSP70 from *Pisum sativum*. *Plant Mol. Biol.* 18:23-32.

Weiss E. & Berry J.A. (1988). Plants and high temperature stress. En *Plants and Temperature* (ed. S.P. Long & F.I. Woodward), pp 329-345.

Wu D.H., Laidman D.L. & Smith C.J. (1993) Heat-shock protein 70 levels in temperature-stressed mung bean shoots. *J. Exp. Bot.* 44:457-461.

Yalovsky S., Paulsen H., Michaeli D., Chitnis P.R. & Nechushtai R. (1992) Involvement of a chloroplast HSP70 heat shock protein in the integration of a protein (light-harvesting complex protein precursor) into the thylakoid membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5616-5619.

Yang S.F. & Hoffman N.E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:155-189.

Zúñiga G.E., Argandoña V.H. & Corcuera L. J. (1991). Distribution of glycine - betaine and proline in water stressed and unstressed barley leaves. *Phytochemistry* 27:419-420.