

T/7-50

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 21.05.03
ENTRADA NUM. 1820

**INFLUENCIA DE LA FUENTE
NITROGENADA SOBRE LAS RESPUESTAS
AL ESTRÉS TÉRMICO EN PLANTAS DE
TOMATE Y SANDÍA**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 613653222
Nº Colección 115722417

**ROSA M RIVERO VARGAS
TESIS DOCTORAL**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
05 MAR 2003
COMISION DE DOCTORADO

GRANADA, 2003

Quiero hacer constar especialmente mi más sincero agradecimiento:

Al Profesor Dr. *Luis M^a Romero Monreal*, director de esta Memoria, por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en la investigación, por hacerme partícipe de sus conocimientos y por toda su dedicación prestada durante la elaboración de este trabajo. GRACIAS.

Al Profesor Dr. *Juan Manuel Ruíz Sáez*, codirector de esta Memoria, por su esfuerzo y dedicación y su continuo apoyo, porque sin su instrucción y consejos, aún estando en otro país, me hubiera sido imposible el llevar a cabo este trabajo. Y, sobre todo, por su continua confianza en mi. GRACIAS.

A los GÜTTIS (Pablo, Luis y Esteban), por su amistad y apoyo en todo momento, por su colaboración y todo el interés demostrado en el transcurso de mis actividades. Y, como no, por esos muy buenos momentos de los que juntos hemos disfrutado. GRACIAS.

A Gemma, Grego, Silvia, Diego y Fran, por su apoyo, ayuda técnica y colaboración desinteresada que han mostrado durante el desarrollo de este trabajo, y por la amistad que me brindaron desde el primer día. GRACIAS.

A mis hermanos, Ramón, Carmen, Jesús y el "chico", por apoyarme en todo momento en el transcurso de este trabajo, por el esfuerzo que han realizado en entenderme en aquellos momentos de más tensión, por su comprensión... GRACIAS.

Y, como no, a mi MADRE, por estar ahí en todo momento, por su confianza depositada en mi desde el comienzo de este trabajo, por su entrega, dedicación, sacrificio y entereza. GRACIAS.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. EL ESTRÉS EN PLANTAS SUPERIORES	3
--	---

2. ESTRÉS TÉRMICO EN PLANTAS SUPERIORES

2.1. BAJAS TEMPERATURAS

2.1.1. Definición y principales consecuencias	11
2.1.2. Funciones de la raíz durante un estrés por frío: daños y aclimatación	15
2.1.3. Mecanismos de aclimatación al frío.....	24
2.1.3.1. Control de la deshidratación y el estado hídrico	24
2.1.3.2. Inducción de proteínas crioprotectoras y cambios moleculares en la síntesis de proteínas.....	26

2.2. ALTAS TEMPERATURAS

2.2.1. Definición y principales consecuencias	30
2.2.2. Mecanismos de defensa vegetales	34
2.2.2.1. Fenómeno de termotolerancia adquirida	35
2.2.2.2. Genes inducidos a elevadas temperaturas	37
2.2.2.3. Proteínas de shock térmico (HSPs)	38
2.2.2.4. Antioxidantes y estrés por calor	40
2.2.2.5. Reacciones en cascada provocadas por las altas temperaturas	41
2.2.2.6. Estructura de la membrana y estrés por calor	42
2.2.3. Termotolerancia y relación con otros tipos de estrés	43
2.2.4. Estrategias moleculares para el aumento de la termotolerancia en cultivos.....	45

3. ALGUNOS PROCESOS METABÓLICOS ALTERADOS POR EL ESTRÉS TÉRMICO

3.1. METABOLISMO NITROGENADO PRIMARIO.....	47
3.2. ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS RICOS EN N: PROLINA Y CAC... 56	
3.3. METABOLISMO FENÓLICO.....	69
3.4. METABOLISMO DEL GLUTATION	76
3.5. INTEGRACIÓN DEL GSH EN EL METABOLISMO OXIDATIVO	81.

II. OBJETIVOS..... 91

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	95
2. MUESTREO DE LAS PLANTAS.....	96

3. ANÁLISIS DE LAS PLANTAS..... 97

3.1. METABOLISMO NITROGENADO PRIMARIO.....	97
3.1.1. ACTIVIDAD NR "in vivo"	98
3.1.2. ACTIVIDAD NiR.....	100
3.1.3. ACTIVIDAD GDH.....	102
3.1.4. ACTIVIDAD GOGAT	104
3.1.5. ACTIVIDAD GS.....	105
3.1.7. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS	107
3.1.8. CONCENTRACIÓN DE NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , N ORGÁNICO Y N TOTAL... 109	
3.2. CONCENTRACIÓN DE ACT Y COLINA	118
3.3.1. CONCENTRACIÓN DE ACT	118
3.3.2. CONCENTRACIÓN DE COLINA	119

3.4. METABOLISMO FENÓLICO	120
3.4.1. CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES Y ORTODIFENOLES.....	120
3.4.2. ACTIVIDAD PAL	122
3.4.3. ACTIVIDAD PPO	124
3.4.4. ACTIVIDAD GPX	125
3.5. METABOLISMO DEL GLUTATION	126
3.5.1. CONCENTRACIÓN DE CISTEÍNA	126
3.5.2. ACTIVIDAD OAS-TL	128
3.5.3. ACTIVIDAD SAT	129
3.5.4. CUANTIFICACIÓN DE GSH, GSSG Y GLUTATION TOTAL	131
3.5.5. ACTIVIDAD γ -ECS.....	133
3.5.6. ACTIVIDAD GluS.....	135
3.6. METABOLISMO OXIDATIVO	137
3.6.1. CONCENTRACIÓN DE H ₂ O ₂	137
3.6.2. CUANTIFICACIÓN DE AsA, DHA Y ASCORBATO TOTAL	138
3.6.3. ACTIVIDAD SOD	140
3.6.4. ACTIVIDAD CAT	142
3.6.5. ACTIVIDAD APX.....	143
3.6.6. ACTIVIDAD DHAR.....	144
3.6.7. ACTIVIDAD GR.....	145

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PRODUCCIÓN DE BIOMASA	149
2. METABOLISMO NITROGENADO PRIMARIO	155

ÍNDICE

3. ACUMULACIÓN DE PROLINA Y CAC	175
4. METABOLISMO FENÓLICO	195
5. METABOLISMO DEL GSH	210
6. METABOLISMO OXIDATIVO	223
V. CONCLUSIONES	251
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	255

I. INTRODUCCIÓN

1. EL ESTRÉS EN PLANTAS SUPERIORES: GENERALIDADES

En el medio en el que una planta se desarrolla a menudo se producen fluctuaciones medioambientales, las cuales dan lugar a situaciones desfavorables para el funcionamiento y desarrollo óptimo de las mismas (Alan, 1996). Estas condiciones desfavorables son conocidas, en el ámbito de la fisiología vegetal, bajo el término de *estrés* y provocan en las plantas desórdenes tanto de tipo fisiológico como metabólico. De esta manera, el término **estrés** es definido como un cambio potencialmente dañino de alguna(s) de las principales variables medioambientales, para lo cual se tiende a inhibir o alterar el ciclo de funcionamiento normal de una planta (Alan, 1999).

Las distintas especies vegetales, o incluso distintas variedades, difieren en cuanto a sus condiciones ambientales de crecimiento óptimo, mostrando una susceptibilidad particular ante los distintos tipos de estrés. Algunos autores prefieren aplicar el término *estrés* sólo a los ambientes que afectan a las plantas causándoles un daño cuantitativo, como son alteraciones de las membranas o incluso la muerte celular (Boyer, 1992). Por el contrario, otros autores consideran que un sistema está *estresado* cuando el gasto de energía se ve incrementado o cuando la energía potencial del sistema disminuye drásticamente (Chapin, 1991). Comúnmente, se considera que una planta se encuentra bajo condiciones de estrés cuando experimenta un descenso relativamente grave de sus componentes esenciales o, también, un aumento potencialmente elevado de sustancias tóxicas o dañinas para su desarrollo normal (Alan, 1999).

Larcher (1987) enfocó el estrés en las plantas desde un punto de vista fisiológico, definiéndolo como la existencia de un "estado" que provoca una tensión interna en la planta resultante de la actuación de fuerzas externas. En este estudio, Larcher (1987) detalló la dinámica que sigue un sistema sometido a estrés, dividiéndola en tres fases fundamentales (Fig. 1): a) fase de *alarma*; caracterizada por una reducción de la "vitalidad" de una planta; b) fase de

resistencia, definida como respuesta inmediata de la planta ante la actuación de un factor estresante prolongado, en la cual la planta puede adaptarse a dicho factor estresante y continuar con su funcionamiento normal; y finalmente c) fase denominada de *agotamiento*; en la cual la capacidad adaptativa de una planta ha sido sobrepasada o "vencida" por el factor estresante, produciéndose importantes desórdenes metabólicos y, en algunos casos, la muerte de la planta (Figura 1).

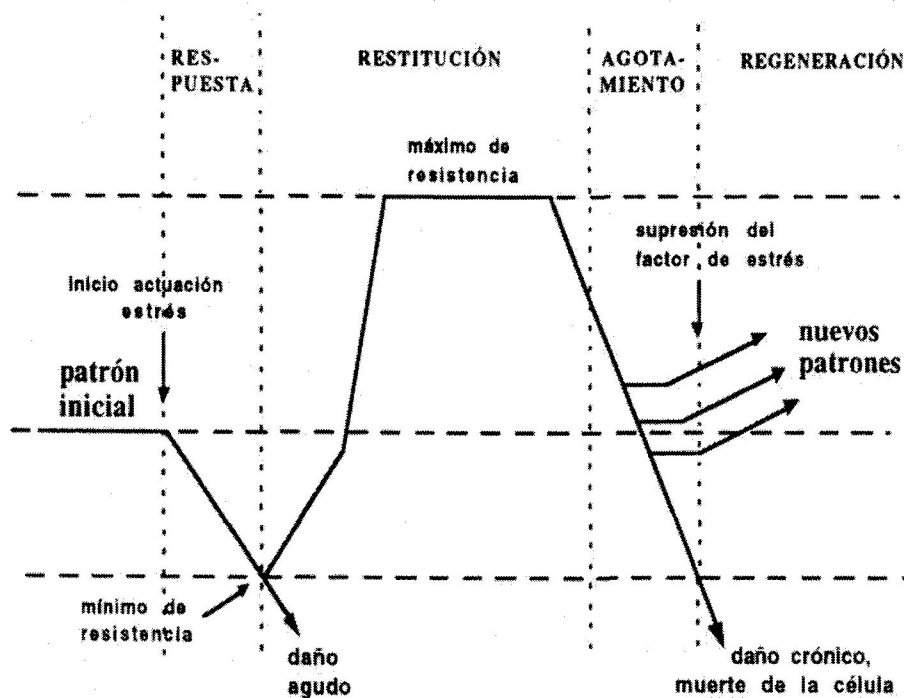


Figura 1. Incidencia y fases del estrés en plantas
(Tomada de Tobías, 1999)

La mayoría de las investigaciones que se centran en el estudio de las repuestas fisiológicas de las plantas al estrés están basados en la presunción de que la única manera de que una planta sobreviva bajo condiciones de estrés es mediante la expresión de la información genética preexistente en la misma. En este sentido, no existe ninguna diferencia entre *resistencia* (también

denominada preadaptación), *acomodación*, *aclimatación* y *adaptación*. En todos estos casos el estrés es considerado como el responsable de la expresión del programa de defensa preexistente en la planta. Este punto de vista limita considerablemente el campo de la investigación, así como la interpretación de los resultados. Ya que consideramos la respuesta vegetal como algo programado en la célula, también debemos tener en cuenta que ésta debe ser prácticamente inmediata, por lo que se supone que el tiempo no es un factor determinante en la elaboración de esta respuesta. Es decir, las proteínas y los ARNm implicados en la respuesta al estrés son sintetizados tan pronto como comienza la exposición a condiciones adversas (Ingestad y Lund, 1979; Wignarajah, 1990; Amzallag y cols., 1991).

Tras la exposición a un nivel subletal de un determinado tipo de estrés, muchas plantas han mostrado una acomodación a dichas condiciones de estrés, sin embargo, estas respuestas inducidas por un ambiente determinado no son iguales.

De entre la variedad de ejemplos que encontramos en la literatura, es evidente que la adaptación es una propiedad de las plantas. Esto, sin embargo, no ha sido estudiado seriamente por la mayoría de los investigadores que pertenecen al área del estrés vegetal. De hecho, la mayoría de los autores utilizan los términos ***acomodación***, ***aclimatación*** y ***adaptación*** como sinónimos y no son capaces de diferenciar entre adaptación y resistencia (preadaptación). Si existiese suficiente información la diferencia entre la respuesta preadaptativa y la adaptación sería en muchos casos muy fácil de diferenciar.

Cuando una planta responde a un estrés a través de su *resistencia* (respuesta preadaptativa) se produce la expresión de un programa preexistente que permite la supervivencia de la planta mientras las condiciones de estrés se mantengan. La resistencia refleja, por tanto, la capacidad de la planta para expresar, bajo condiciones de estrés, su programa de desarrollo original. En general, la expresión de este programa ocurre relativamente rápido,

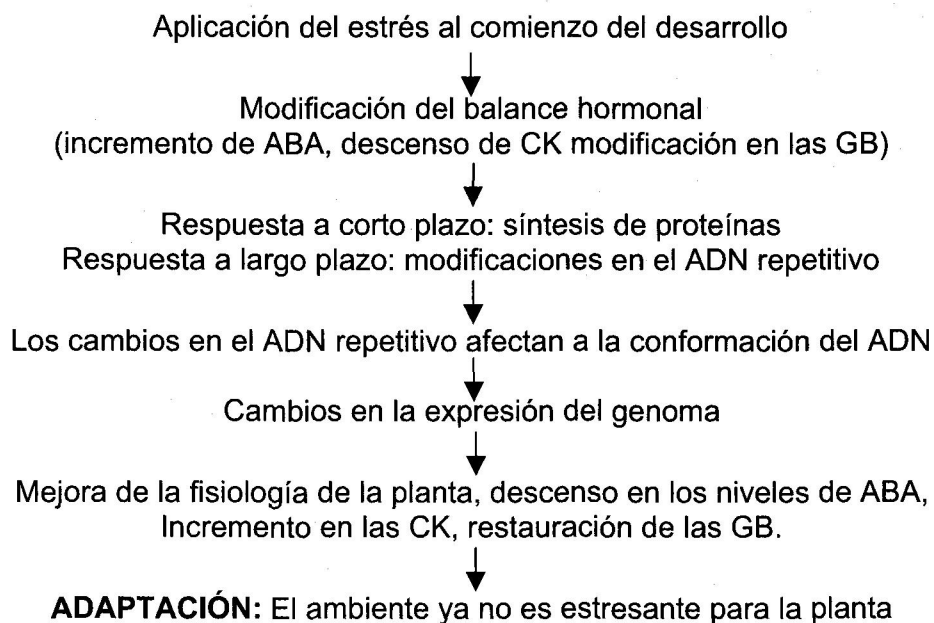
aproximadamente durante las primeras 48 horas de exposición al estrés (Amzallag y Lerner, 1995), y esta reacción no es específica de un determinado tipo de estrés, sino que se hace extensiva a prácticamente todos los tipos de estrés conocidos, tanto bióticos como abióticos (Amzallag y cols., 1990). En dichas respuestas, usualmente se produce un incremento en la concentración de ácido abscísico (ABA) en los órganos vegetales expuestos al estrés. El crecimiento sufre un descenso importante, el cual es proporcional a la intensidad del estrés e inversamente proporcional a la tolerancia (capacidad preadaptativa) de la planta al mismo. Si la planta es capaz de superar estas condiciones de estrés, tras el proceso de *acomodación*, rápidamente se estabiliza a un nuevo nivel, generalmente superior al nivel inicial (Fase de regeneración, Figura 1).

Durante la adaptación al estrés, la planta establece un nuevo programa de desarrollo como una de las funciones previas a la adaptación ante las nuevas condiciones. Al principio de este proceso de adaptación, se produce un descenso considerable del crecimiento, que es incluso mayor que el producido durante el proceso de preadaptación (Amzallag y cols, datos no publicados). Una vez que la planta se ha adaptado a las nuevas condiciones, el índice de crecimiento relativo (ICR) aumenta, pudiendo llegar a alcanzar niveles similares a los de las plantas control (Amzallag y cols., 1990). El incremento producido en este ICR al final del proceso de adaptación indica que este ambiente no es muy estresante para la planta (Ingestad y Lund, 1979; Wignararajah, 1990; Amzallag y cols., 1991). Esta respuesta adaptativa implica modificaciones en el balance hormonal, procesos metabólicos y expresión del genoma.

Contrariamente a la respuesta preadaptativa, la respuesta adaptativa no está completamente preprogramada en el genoma. La planta se adapta a unas condiciones medioambientales determinadas, siempre y cuando esas condiciones permanezcan estables durante el período de adaptación. El desarrollo de la adaptación requiere más tiempo que la respuesta preadaptativa, es decir entre 5 y 20 días. Sin embargo, una vez adaptada, la

planta es capaz de permanecer en ese ambiente durante un largo período de tiempo (Basma, 2001; Prasad, 2001). Basándonos en estos hechos (Amzallag y Lerner, 1995) proponen de manera hipotética varios estados que se dan en el proceso de adaptación en una especie vegetal.

Esquema hipotético de la secuencia de procesos que se observan en las plantas durante el proceso de adaptación (según Amzallag y Lerner, 1995)



⁽¹⁾ CK: citoquininas; GB: giberelinas

No todas las especies vegetales son capaces de adaptarse a un determinado tipo de estrés. Podemos suponer que en poblaciones naturales existen una gran cantidad de respuestas a un mismo tipo de estrés entre las fases de preadaptación y adaptación. Siempre que los genotipos se adapten bien, el desencadenamiento de los procesos de adaptación se mantiene bajo un estricto control de regulación (Wignarajah, 1990).

Existe un período de tiempo muy limitado en el que la planta puede hacer frente a un determinado tipo de estrés mediante su adaptación. Este fenómeno parece ser similar al que ocurre en el mundo animal. Más aún, el desencadenamiento de la adaptación requiere un cierto umbral de estrés, y este estrés debe permanecer a un nivel constante durante el período de adaptación, ya que la respuesta vegetal se produce ante un cambio determinado en el ambiente y su inducción requiere tiempo. Este fenómeno juega un papel muy importante en el desarrollo de ecotipos adaptados a las nuevas condiciones ambientales y en la evolución de las especies, puesto que la reorganización del ADN repetitivo, el cual modifica la expresión del genoma, es una parte importante del proceso de adaptación. De hecho, los cambios ambientales inducen modificaciones rápidas e importantes en el fenotipo debido al desarrollo de un desbalance nutricional asociado, lo que afecta a la organización del ADN y es hereditario (Durrant, 1981; Cullis, 1990). Estas modificaciones se mantienen siempre y cuando la descendencia se desarrolle en un medio donde no exista un desbalance nutricional.

Actualmente, no se llegan a entender completamente los mecanismos por los cuales un organismo es capaz de modificar la expresión de su genoma como respuesta a unas condiciones ambientales determinadas. Parece ser, sin embargo, que esta propiedad es únicamente desarrollada por algunos organismos. Así, Shapiro (1984) y Cairns (1988) mostraron que en bacterias ciertas mutaciones eran guiadas por las condiciones ambientales. Hall (1992) también demostró comportamientos similares en levaduras.

Como hemos indicado anteriormente, en numerosas ocasiones la adaptación es confundida con la preadaptación (resistencia). En este sentido, el estrés era considerado como el principal responsable de la expresión de un programa genético preexistente en las células vegetales. Las enormes lagunas existentes en la bibliografía relacionada con el fenómeno de adaptación, así como en las monografías especializadas en las respuestas vegetales al estrés, muestran cómo estas dudas se han ido acumulando a lo largo del tiempo (Levitt, 1980;

Hale y Orcutt, 1987). Desafortunadamente, los trabajos realizados por Durrant (1981) y Cullis (1990) no han sido tenido demasiada aceptación, aunque están respaldados por estudios de genética clásica y por publicaciones detalladas a nivel molecular por Cullis (1990). Las revisiones de Bassi (1990, 1991) reflejaron cómo cientos de publicaciones demostraban que se producían cambios en el ADN repetitivo durante el desarrollo vegetal y como consecuencia del estrés ambiental. Esos trabajos no recibieron la atención adecuada, principalmente por los dogmas preconcebidos de los conceptos Darwinianos, en los se afirma contundentemente que los cambios genéticos únicamente pueden ser originados a partir de mutaciones y que dichas mutaciones, así como la información genética, son inalterables por el medioambiente (Amzallag y Lerner, 1995). El conocimiento pleno de estas variables permitirá el desarrollo de nuevas variedades de plantas a través de la selección de plantas con la capacidad de adaptación a un determinado tipo de estrés.

2. EL ESTRÉS TÉRMICO EN PLANTAS SUPERIORES

2.1. ESTRÉS TÉRMICO PRODUCIDO POR BAJAS TEMPERATURAS

Bajo condiciones normales de desarrollo, las plantas están constantemente expuestas a distintas situaciones de estrés medioambiental, las cuales son perjudiciales para el crecimiento y desarrollo de las mismas, limitando en gran medida la productividad de muchos cultivos de gran interés agronómico. Muchos de los más importantes cultivos agroalimentarios, tales como el maíz, el sorgo, el tomate, la soja, el arroz, etc, originarios de zonas tropicales y subtropicales, son hoy día cultivados en zonas donde las temperaturas pueden caer o sobrepasar el óptimo requerido para su crecimiento y desarrollo normal. De esta manera, cada vez más se requiere la selección de híbridos o variedades que posean un mejor crecimiento vegetativo y una mayor producción y que, con todo ello, sean capaces de desarrollarse en ambientes donde las condiciones de estrés sean habitualmente un tópic. (Greaves, 1996).

Sin embargo, los métodos tradicionales de selección de variedades resistentes, tanto a bajas como a elevadas temperaturas, muchas veces se encuentran ante la disyuntiva de elegir entre variedades que posean un desarrollo eficiente o, por el contrario, una alta producción. Recientemente, el desarrollo de técnicas moleculares nos está ofreciendo la posibilidad de producir plantas hortícolas tolerantes al estrés térmico. Sin embargo, en la actualidad aún sigue siendo necesaria más información sobre los cambios fisiológicos, bioquímicos y genéticos que pueden dar lugar a esa tolerancia térmica.

2.1.1. DEFINICIÓN Y PRINCIPALES CONSECUENCIAS

Cuando una planta es sometida a temperaturas por debajo de su óptimo de crecimiento se produce el denominado **estrés por bajas temperaturas**, el cual es uno de los principales factores medioambientales que limitan la supervivencia, el desarrollo y la productividad de muchos cultivos (Queiroz y cols., 1998). El estrés provocado por bajas temperaturas puede ser dividido en *estrés por frío*, en el cual las plantas son sometidas a bajas temperaturas, pero siempre por encima de los 0°C, y *estrés por congelación*, mediante el cual las plantas se ven sometidas a temperaturas por debajo de los 0°C (Prasad, 2001). Desde un punto de vista agronómico, es estrés por frío (siempre por encima de los 0°C) es el más importante, ya que se da más habitualmente de lo que pensamos, por lo que será tratado con especial atención en este estudio.

La mayoría de los cultivos de origen tropical y subtropical, tales como el maíz y el tomate, son muy sensibles a las bajas temperaturas (Koscielniak, 1993; Walker y McKersie, 1993; Koroleva y cols., 1994). Las alteraciones fisiológicas que pueden darse en una especie sensible por exposición a bajas temperaturas se ven reflejadas en una gran variedad de síntomas visuales (Lyons y cols., 1979). El frío afecta a la capacidad de germinación de las semillas de especies sensibles, tales como el algodón, el trigo y el tomate (Lyons y cols., 1979; Eagles and Brooking, 1981; Hodges y cols., 1994; Hodges y cols., 1997a). Una vez que la planta se ha establecido en un determinado ambiente, una temperatura excesivamente baja puede dar lugar a una pérdida de agua (Wilson, 1976; Koscielniak, 1993), un cierre estomático, un incremento en la viscosidad hídrica una reducción de la permeabilidad radical (Miedeman, 1983), así como importantes daños en la capacidad de transporte de agua en la planta (Lyons y cols., 1979; Stamp, 1984), lo que provoca un marchitamiento precoz de la misma. Estas alteraciones se manifiestan mediante síntomas visuales, como son, en primer lugar, un reducción de biomasa radical y aérea (Hodges y cols., 1995; Hodges y cols., 1997a).

A nivel celular, se han descrito numerosos daños provocados por las bajas temperaturas, como la pérdida aparente del turgor celular, vacuolización, reducción tanto del volumen citoplasmático como vacuolar, deposición de nuevos compuestos en las paredes celulares, desorganización de orgánulos, y pérdida de la estructura citoplasmática en general (Imagen 1) (Iker y cols., 1976).

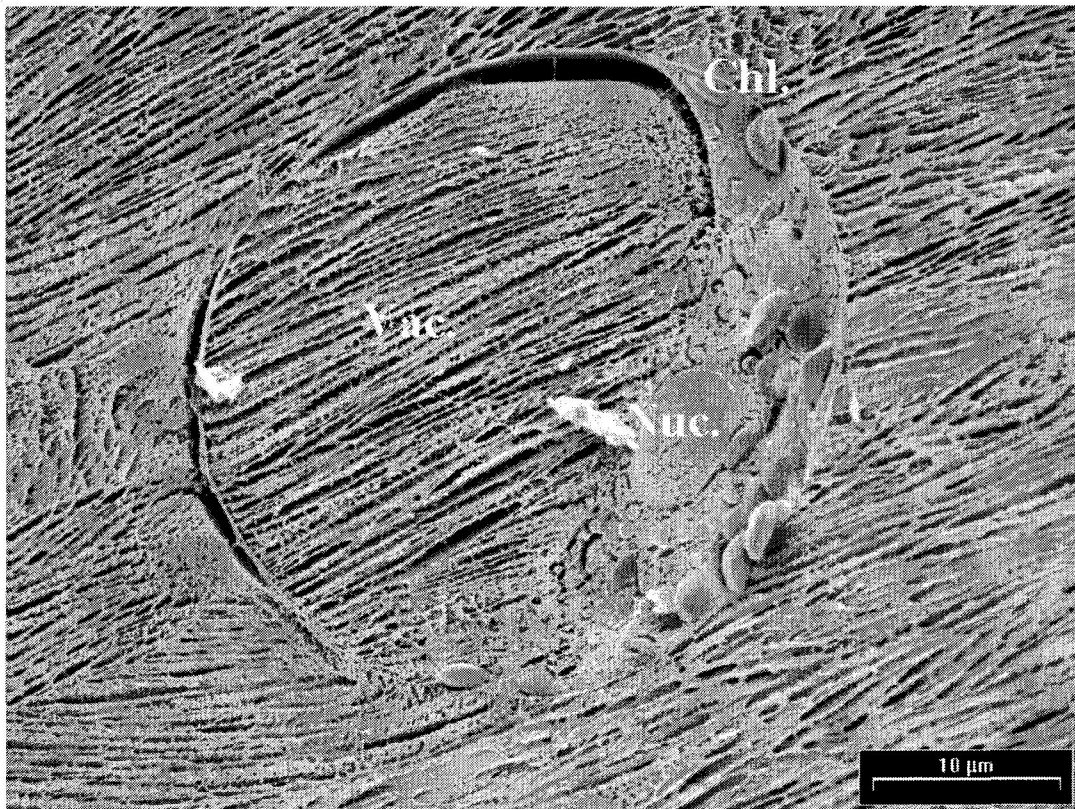


Imagen 1. Influencia del frío sobre los componentes celulares

Otros posibles efectos del estrés por frío incluyen la separación de la fase de la membrana lipídica (Parkin y cols., 1989; Hariyadi y Parkin, 1993), debilitamiento de las uniones hidrofóbicas proteína-proteína y proteína-lípido (Patterson y Graham, 1987; Parkin y cols., 1989) y distintos efectos en la compartimentalización de segundos mensajeros del estrés por frío (Imagen 2) (Price y cols., 1994; Sánchez-Casa y Klessig, 1994).

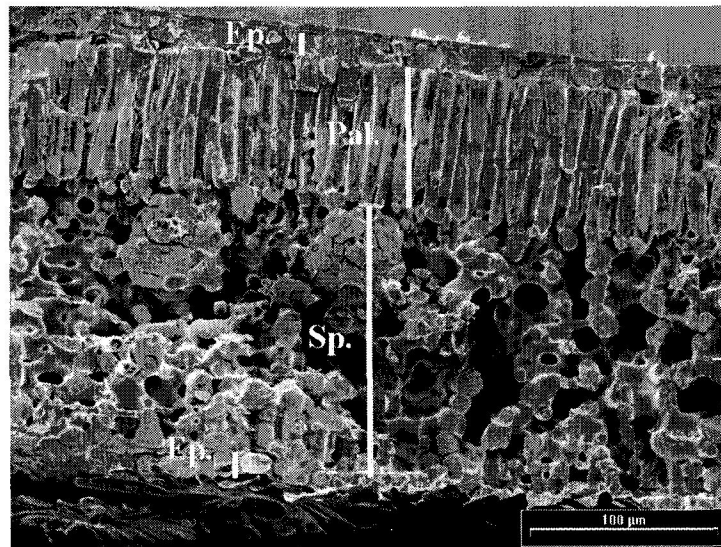
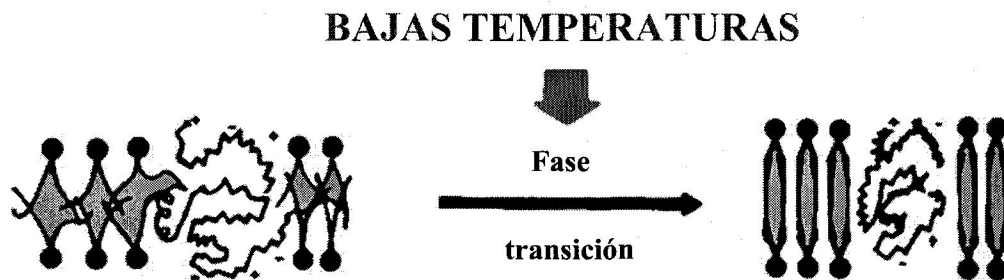


Imagen 2. Desorganización de la membrana causada por las bajas temperaturas

En la Figura 2 se propone una secuencia de sucesos que podrían permitir la tolerancia o no de los cultivos a las bajas temperaturas (Prasad, 2001). Como podemos observar, la inducción de los sistemas antioxidantes de defensa de las plantas en respuesta a un estrés por frío está correlacionado con la tolerancia o la susceptibilidad a las bajas temperaturas de muchas plantas.

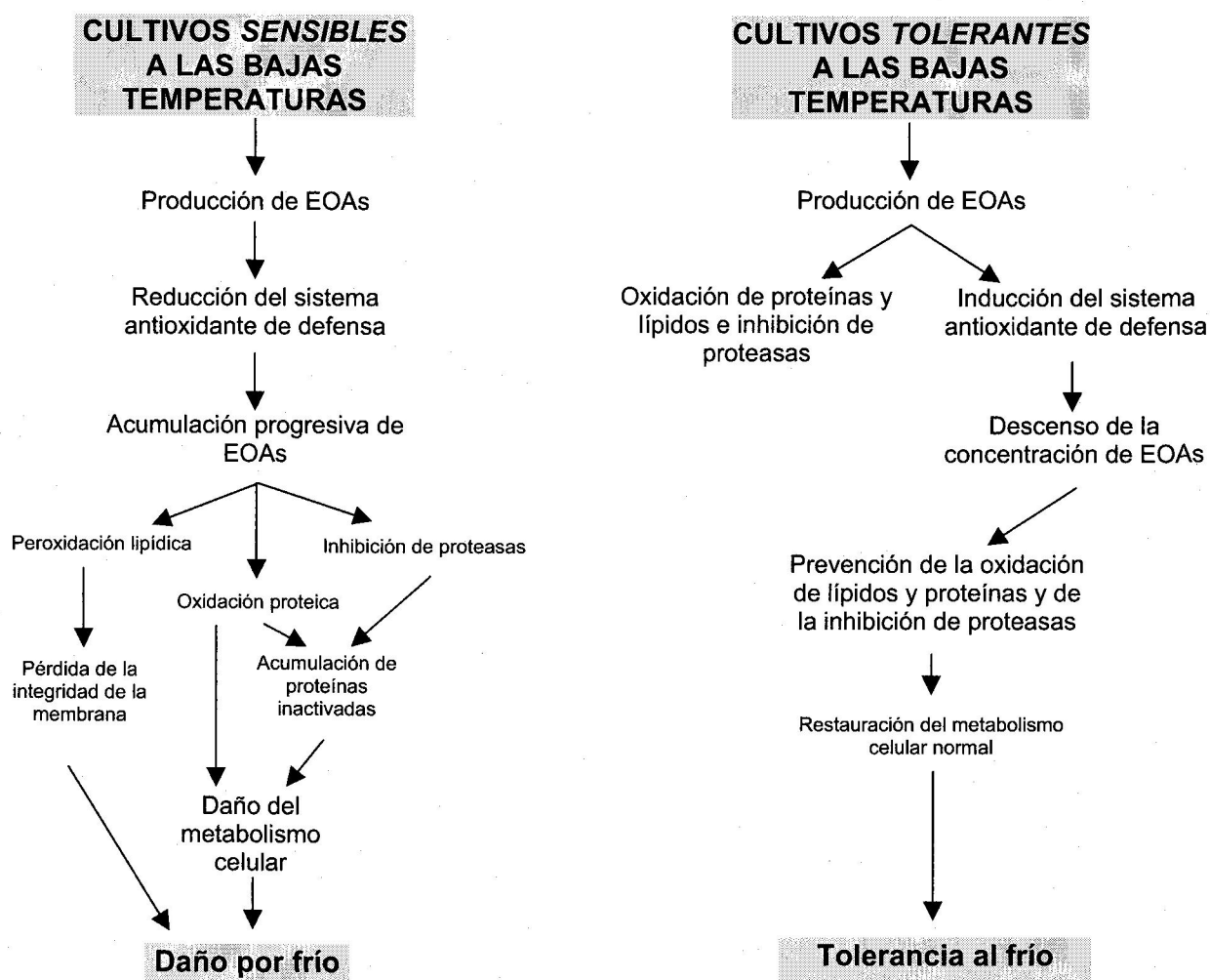


Figura 2. Tolerancia o daño al estrés por frío en plantas superiores

Se piensa que algunos de los mecanismos de tolerancia al estrés producido por las bajas temperaturas podrían ser inducidos por la sobreproducción de especies de oxígeno activadas (EOAs). Por ejemplo, el H₂O₂ acumulado en los distintos tejidos vegetales durante un período de bajas temperaturas podría favorecer la expresión génica de algunos de los principales antioxidantes en plantas sensibles al frío. En cultivos no aclimatados a las bajas temperaturas la acumulación de EOAs a niveles tóxicos se produce principalmente por inhibición o reducción en la actividad de las principales enzimas antioxidantes a esas temperaturas. Esta acumulación de EOAs incrementa potencialmente la peroxidación de los lípidos, provocando la inestabilidad de las membranas.

2.1.2. FUNCIONES DE LA RAÍZ DURANTE UN ESTRÉS POR FRÍO: DAÑOS Y ACLIMATACIÓN

Aunque no está totalmente reconocido, las bajas temperaturas edáficas pueden afectar al sistema radical y, en general, a la fisiología de la planta completa en muchas situaciones agronómicas reales (Sanders y Markhart, 2001). Una temperatura media en el suelo de unos 15°C antes del desarrollo de la parte aérea de las plantas de maíz causa un retraso en el crecimiento de más de una semana, comparadas con las plantas desarrolladas en suelos con 25°C de temperatura (Bollero y cols., 1996). La temperatura del suelo es también crítica durante la germinación y el establecimiento de una planta en un ambiente determinado. De hecho, suelos muy fríos pueden limitar la fotosíntesis, aunque las funciones fisiológicas más afectadas por las bajas temperaturas son, por lo general, la captación de agua y nutrientes (Sanders y Markhart, 2001).

Para muchas plantas de origen tropical sensibles al frío (judía, maíz, tomate, pimienta, algodón, etc) temperaturas edáficas o ambientales de 10 a 15°C son limitantes del crecimiento vegetal (Dickson y Boettger, 1984; Scott y Jones, 1986; Bradow, 1990; Bollero y cols., 1996). Una baja temperatura edáfica da

lugar a un estrés hídrico en términos de transpiración, ya que se produce una reducción o total inhibición del movimiento de agua a través de la raíz (Kramer, 1940; McWilliam y cols., 1982; Bradow, 1990). La absorción de nutrientes es también reducida y las plantas sometidas a un estrés por frío durante largos períodos sufren graves deficiencias nutricionales (Cumbus y Nye, 1985; Engels y cols., 1992; Engels y Marschner, 1996).

Por lo tanto, y considerando estos efectos adversos, la membrana lipídica es una estructura candidata para actuar como un sensor térmico (Lyons y cols., 1979; Raison y Orr, 1990; Murata y Los, 1997). Recientemente, Murata y Los (1997) establecieron el papel de la fluidez de la membrana en la percepción térmica y en la transducción de la señal de estrés. Aunque la composición lipídica de la membrana no proporciona una completa explicación de la sensibilidad al frío en todos los casos (Wu y Browse, 1995), muchos de los estudios más recientes han demostrado el papel de los lípidos de membrana en la resistencia al frío (Vigh y cols., 1993; Kodama y cols., 1995; Ishizaki-Nishizawa y cols., 1996).

La absorción de agua se ve marcadamente reducida bajo condiciones de bajas temperaturas (Kramer, 1940; Wolfe y King, 1983; Marhart, 1986; Bolger y cols., 1992; Cui y Nobel, 1994). Por ejemplo, Wraith y Ferguson (1994) comprobaron que en plantas de trigo desarrolladas a 10°C se producía una reducción importante en la absorción de agua. Esta reducción va generalmente acompañada de una transpiración moderada, lo que puede causar la pérdida del turgor foliar (McWilliam y cols., 1982; Fennell y cols., 1990). El flujo de agua a través del sistema radicular está limitado por los lípidos de membrana (Makhart y cols., 1979a; Peterson y cols., 1993). Si recurrimos a la lógica, podríamos pensar que la raíz bajo estas condiciones puede llegar a ser más permeable debido a los daños que las bajas temperaturas producen sobre estos componentes de la membrana plasmática; sin embargo esta situación es diferente. Cuando la captación de agua viene determinada por las bajas temperaturas, el efecto es inmediato, de manera que los índices de flujo

descienden considerablemente a la vez que baja la temperatura. El flujo de agua puede seguir cayendo irreversiblemente, aunque la temperatura ya haya alcanzado el límite previsto (Figura 3) (Smith-Spinks y cols., 1984; Sanders, 1997).

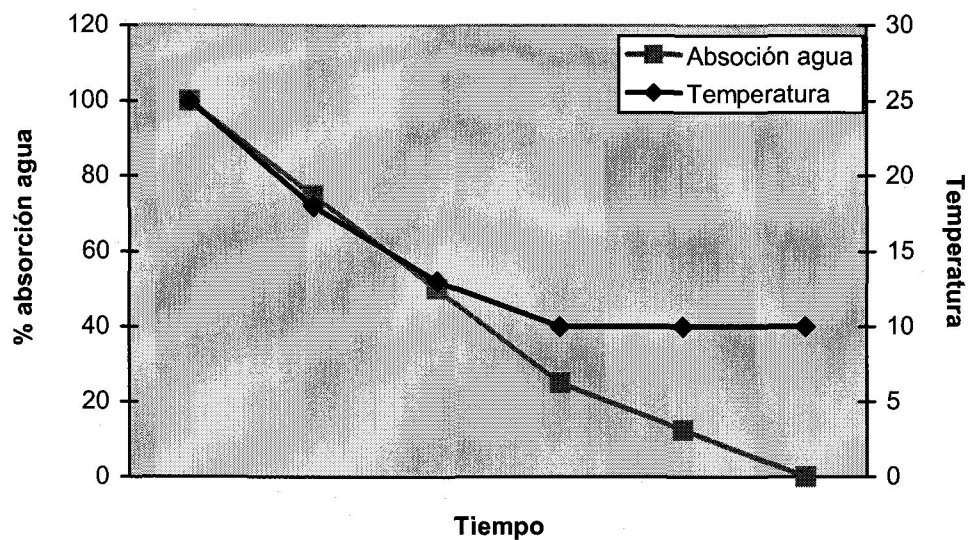


Figura 3. Reducción de la absorción de agua en relación a la caída de temperatura

La respuesta del potencial hídrico inducida por las bajas temperaturas afecta a la planta completa. Cuando las raíces de plantas de algodón eran tratadas a bajas temperaturas, el potencial hídrico y la transpiración descendían significativamente cuando la parte aérea se desarrollaba tanto a 20 como a 13°C, de tal manera que el descenso de la conductancia hidráulica de la planta se producía inevitablemente (Radin, 1990). La tolerancia al frío puede ser debida tanto a factores de la raíz, como de los estomas o a la actuación conjunta de ambos, ya que dicha tolerancia radica en el mantenimiento de la captación de agua o la reducción de las pérdidas de la misma.

Otro de los mecanismos más fuertemente influenciados por las bajas temperaturas, y que afectan al sistema radical, es la captación de nutrientes.

Los efectos del frío sobre la absorción de N, P y K en plantas de maíz cuyas raíces fueron expuestas a bajas temperaturas eran notables desde el primer día, con una reducción del 35, 20 y 15% respectivamente respecto a las mismas plantas desarrolladas a una temperatura óptima, independientemente de la temperatura existente en la parte aérea (Engels y cols., 1992). Ante una exposición prolongada al frío (unas seis semanas), el crecimiento de plantas de *Antirrhinum* y la captación de nutrientes fue similar a la presentada por estas plantas a 22°C, sugiriendo además de la tolerancia al frío por estas plantas, el que a bajas temperaturas el crecimiento de una planta viene determinado por la captación de nutrientes (Hood y Mills, 1994). Bajo una exposición prolongada a bajas temperaturas, el estado nutricional de la parte aérea podría estar limitado por la absorción de la raíz o por el reducido crecimiento de la misma. Es decir, si el crecimiento de la parte aérea disminuye debido a las bajas temperaturas, la reducida captación de nutrientes llevada a cabo en estas condiciones podría ser suficiente para mantener la demanda de la planta completa.

Las bajas temperaturas edáficas inhiben el crecimiento sistémico de la raíz mediante elongación o acumulación de biomasa. Es de sobra conocido que las limitaciones inducidas sobre del crecimiento radical por el estrés térmico afectan considerablemente a las funciones de la parte aérea, aunque ésta última se encuentre a una temperatura óptima (Cumbus y Nye, 1985). La temperatura edáfica es crítica para la emergencia de la radícula durante la germinación y, por lo tanto, para el primer establecimiento de la semilla (Dickson y Boettger, 1984; Rab y Salveit, 1996). El índice de elongación y desarrollo lateral de la raíz se inhibe en cultivos sensibles a las bajas temperaturas (Pritchard y cols., 1990; McMichael y Burke, 1994). Por ejemplo, Scott y Jones (1986) evaluaron la tolerancia al frío en algunas líneas de tomate, de manera que el índice de crecimiento relativo (ICR) a 10°C era tres veces inferior al obtenido a 20°C. Al igual que el crecimiento, la producción de biomasa también está limitada por las condiciones de bajas temperaturas en la raíz. El peso seco de raíces de calabaza y pepino no incrementaba a partir del cuarto día a 10°C (Reyes y Jennings, 1994). Estas plantas fueron

posteriormente trasladadas a un ambiente con una temperatura de 26°C (temperatura óptima), observándose que las raíces no volvían a tener un crecimiento normal, lo que indicaba el daño irreversible producido por el frío.

Por otro lado, las bajas temperaturas radiculares pueden afectar de forma importante al crecimiento y fisiología de la parte aérea. Así en *Phaseolus vulgaris*, una temperatura radicular de 10°C durante 9 días daba lugar a una reducción del tamaño de las hojas en un 40% en comparación con las plantas tratadas a condiciones óptimas (Milligram y Dale, 1988). Estas investigaciones enfatizan la importancia de la temperatura radicular en el crecimiento de la planta completa. Los mecanismos influidos por estas respuestas radiculares no están definidos en la mayoría de los casos, sin embargo se sabe que en una planta desarrollada a bajas temperaturas radiculares se produce un déficit hídrico, diversas alteraciones hormonales y deficiencias nutricionales (Imagen 3).

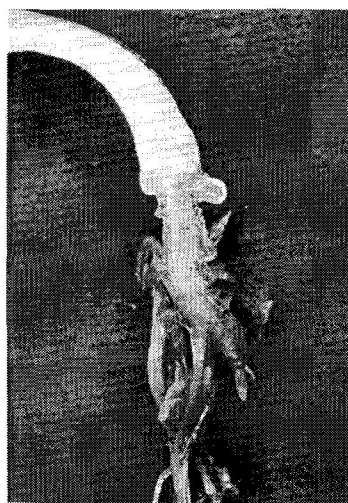


Imagen 3. Pérdida de biomasa radical por una inhibición de la absorción de agua (deseccación) debida al estrés por frío

Además de todos estos efectos que acabamos de describir, las bajas temperaturas edáficas por efecto directo sobre las raíces, producen otras modificaciones importantes desde un punto de vista fisiológico, como son la producción de hormonas de crecimiento y la maduración de la planta. Un incremento en la concentración de ácido abscísico (ABA) ha sido correlacionado con la tolerancia a las bajas temperaturas en varios tejidos vegetales, así como a otros tipos de estrés medioambiental, aunque el papel específico del ABA en esta tolerancia es aún desconocido. La inducción del cierre estomático, la inhibición del crecimiento y los posibles efectos de las bajas temperaturas sobre la expresión génica han sido descritos como mecanismos potenciales de tolerancia a las bajas temperaturas (Kurkela y Franck, 1990; Anderson y cols., 1994; Gusta y cols., 1996; Janowiak y Dörffling, 1996). Por ejemplo, los niveles endógenos de ABA incrementan a medida que aumenta el tiempo de exposición al frío en toda la planta de cultivos tolerantes de arroz. Sin embargo, esto no se produce en cultivos sensibles a las bajas temperaturas (Lee y cols., 1993), ya que en éstos sólo se observa un incremento en la concentración de ABA en la savia xilemática, producido posiblemente como consecuencia de un rápido cierre de los estomas.

Sin embargo, Janowiak y Dörffling (1996) concluyeron que en genotipos tolerantes de maíz que acumulaban ABA también se observaban síntomas de déficit hídrico. Los efectos de las bajas temperaturas sobre el sistema radicular y las alteraciones producidas sobre los procesos fisiológicos más importantes asociados a la raíz y la parte aérea se pueden resumir en el siguiente esquema:

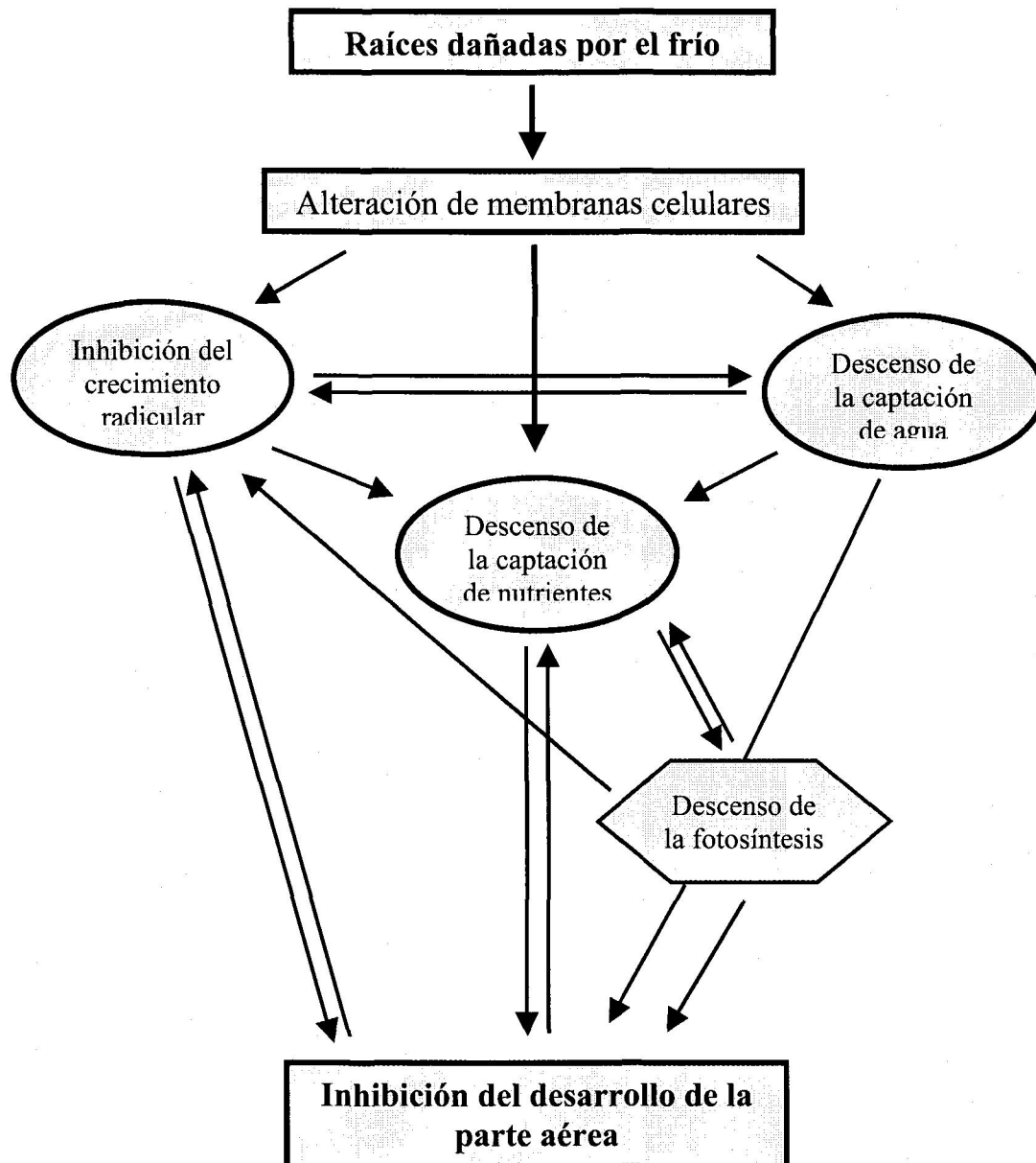


Figura 4. Procesos metabólicos alterados por bajas temperaturas en la raíz

Las hipótesis formuladas por Lee y cols (1993) y, posteriormente, por Janowiak y Dörffling (1996) dieron lugar al inicio de nuevas investigaciones basadas en el estudio de la relación entre el ABA y la tolerancia a las bajas temperaturas

mediante aplicaciones exógenas de esta hormona. Cuando se aplicaba ABA de forma exógena a la raíz la captación de agua y conductancia hidráulica aumentaban en especies vegetales sensibles al frío (Markhart y cols., 1979b; BassiriRad y Radin, 1992). Sin embargo, el papel de esta hormona en la tolerancia o aclimatación a las bajas temperaturas es aún un campo desconocido.

Otra hormona que se ve alterada por este tipo de estrés es el etileno. La producción de etileno en hojas, frutos y flores incrementa después del período de frío y, en algunos casos, durante el mismo (Tong y Yang, 1987; Field y Barrowclough, 1989; Guye, 1989). La magnitud del incremento en la producción de etileno depende de la duración del período de frío y de factores secundarios, tales como la senescencia (Field y Barrowclough, 1989). Se ha observado que tras un largo período de exposición a bajas temperaturas los tejidos apicales pierden la capacidad de producir etileno, lo cual es interpretado por muchos investigadores como un indicador de la sensibilidad al frío (Rab y Salveit, 1996).

Numerosas investigaciones han tratado los mecanismos por los cuales el sistema radical se adapta a las bajas temperaturas. Estas investigaciones han sido y son fundamentales, puesto que si el crecimiento radical y la captación de agua y nutrientes se producen con normalidad a bajas temperaturas, el estrés a nivel de planta completa puede ser reducido (Deane-Drummond y Glass, 1983; Sanders, 1997). Es por ello que las raíces juegan un papel muy importante en la aclimatación de otros órganos a las bajas temperaturas (Kacperska y Szaniawski, 1993). La aclimatación de la planta en cuanto a lo que a captación de nutrientes se refiere ha sido, por estos motivos, uno de los aspectos más estudiados.

En la regulación de la captación de agua ante condiciones de estrés ambiental las denominadas **acuoporinas** juegan un papel fundamental. Las *acuoporinas* pueden definirse como canales proteicos selectivos para la absorción de agua

y son muy importantes en el movimiento del agua a través de los distintos tejidos vegetales (Chrispeels, 1994; Steudle y Henzler, 1995; Maurel, 1997). Aunque el significado de estos canales en el flujo de agua en la planta es aún desconocido, su presencia en la misma sugiere la posibilidad de que actúen de forma decisiva en la regulación del transporte de agua. Por lo tanto, la capacidad de abrir canales específicos para el agua cuando el flujo de la misma disminuye a través de la bicapa lipídica podría ser un factor importante en los procesos de reducción de los daños causados por las bajas temperaturas (Maurel y cols., 1995; Johansson y cols., 1996). De esta manera, la actividad de las *acuoporinas*, su regulación y su expresión génica son uno de los temas de investigación con mayor futuro en relación a los mecanismos de aclimatación de las plantas al estrés.

Como hemos indicado anteriormente, la aclimatación al frío de una planta puede venir dada por cambios en los lípidos de membrana, los cuales podrían incrementar su permeabilidad al agua y evitar los efectos negativos de las bajas temperaturas sobre la captación de la misma. Las membranas compuestas mayoritariamente por ácidos grasos insaturados (por ejemplo, mayor cantidad de ácido linolénico que oleico) son más fluidas cuando se dan situaciones de bajas temperaturas (McElhaney y cols., 1973; Träuble, 1971). De esta manera, un incremento en la concentración de lípidos insaturados en la raíz podría constituir un mecanismo de tolerancia a las condiciones de estrés provocado por bajas temperaturas (Somolenska y Kuiper, 1977; Markhart et al., 1980; Sanders y Markhart, 2001), aunque es necesaria más información al respecto para confirmar estos aspectos.

2.1.3. MECANISMOS DE ACLIMATACIÓN AL FRÍO

La mayoría de las plantas que tienen que vivir en áreas del mundo donde en invierno las temperaturas caen muy por debajo de su óptimo de crecimiento han debido de desarrollar cambios morfológicos, tales como la pérdida parcial o total de estructuras aéreas y la formación de órganos especializados, como son tejidos enrollados en tubos y yemas. Sin embargo, los cambios más importantes se producen a nivel fisiológico, mediante los cuales una planta se hace tolerante o sensible a las condiciones de estrés por frío. La adquisición de la tolerancia a las bajas temperaturas suele definirse como *aclimatación al frío* (Ferullo y Griffith, 2001).

Los principales cambios fisiológicos se basan en la acumulación en los distintos tejidos vegetales de aminoácidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, algunas fitohormonas y solutos osmoprotectores (Li, 1984). Esas modificaciones van acompañadas de cambios en distintas actividades enzimáticas, en la concentración de las distintas isoenzimas (Levitt, 1980) y en la expresión génica de estas enzimas e isoenzimas (Walbot y Hahn, 1989; Guy, 1990; Castonguay y cols., 1993; Ferullo y Griffith, 2001). El significado de este fenómeno con respecto al desarrollo de la tolerancia a las bajas temperaturas es hoy día desconocido y tema principal de muchas de las más recientes investigaciones, siendo aún difícil establecer una clara relación entre los cambios metabólicos y morfológicos que se dan durante la aclimatación al frío.

2.1.3.1. Control de la deshidratación y el estado hídrico celular

Como hemos indicado anteriormente, durante la exposición prolongada de una planta a bajas temperaturas se produce una menor captación de agua por parte de las raíces, lo que da lugar a una deshidratación del protoplasto de la mayoría de las células, proceso letal para las mismas. Con el fin de evitar esta situación, las células vegetales llevan a cabo la acumulación de ciertos solutos

osmóticos y pequeños compuestos hidrofílicos, los cuales son capaces de estabilizar las estructuras celulares más importantes dañadas durante la deshidratación celular producida por condiciones de estrés por frío (Ferullo y Griffith, 2001). Se ha comprobado que durante la aclimatación al frío se produce una acumulación masiva de hidratos de carbono, aminoácidos, aminas y proteínas, los cuales serán tratados con más detalle posteriormente.

Por otro lado, ha sido propuesto que el ajuste de la rigidez celular puede ser otro de los factores más importantes en el control de la deshidratación celular durante la aclimatación al frío (Rajashekar y Bruke, 1996). Durante este período, la formación de hielo en la célula puede dar lugar a una reducción del volumen de la misma, a una contracción del protoplasma y, por último, al colapso celular (Rajashekar y Brike, 1996; Fijikawa y cols., 1997).

El equilibrio entre el espacio intra y extracelular viene dado por la diferencia entre el potencial hídrico y osmótico de la célula, la cual debe ser muy negativa para evitar las pérdidas excesivas de agua, lo que depende, a su vez, de la rigidez de las estructuras que rodean a la célula, como son la membrana plasmática y la pared celular. Numerosos trabajos indican cómo las proteínas de la pared celular son las primeras estructuras en sufrir cambios adaptativos durante la aclimatación al frío. En alfalfa, Laberge y cols (1993) aislaron un ARNm inducido bajo condiciones de estrés por frío, *MsaCiA*, el cual codificaba una pared celular rica en proteínas constituidas por glicina. El nivel de acumulación de estas proteínas estaba positivamente correlacionado con la tolerancia a las bajas temperaturas de distintas variedades de alfalfa. Por estas razones los autores sugieren que esta proteína juega un papel fundamental en la tolerancia al frío a través de la limitación de la deshidratación (Laberge y cols., 1993). Sin embargo, esto aún es tema de investigación ya que no se conoce mucho sobre estos péptidos de membrana.

La temperatura y la disponibilidad de agua afectan tanto a la propiedades físicas como biológicas de las membranas. Como resultado de esto las

membranas, especialmente la membrana plasmática, son las principales y primeros puntos dañados por frío (Ferullo y Griffith, 2001). Steponkus y Webb (1992) demostraron que la respuesta de la membrana plasmática a las condiciones de bajas temperaturas es radicalmente modificada tras la aclimatación al frío. En algunas especies de plantas, se dan cambios en la composición de los lípidos de membrana durante la aclimatación al frío (Palta y cols., 1993). Los cambios más significativos se traducen, en términos generales, en un aumento de la proporción de fosfolípidos y de ácidos grasos insaturados, así como un descenso de esterol en los fosfolípidos (Palta y cols., 1993). Diferentes experimentos, tales como modificaciones artificiales de la composición lipídica del protoplasto (Steponkus y cols., 1988) y comparaciones de los lípidos encontrados tras la tolerancia al frío (Palta y cols., 1993) han demostrado que los cambios producidos en la composición lipídica son fundamentales en la fríoestabilidad de la membrana plasmática, jugando un papel fundamental en la aclimatación al frío.

Existe muy poca información sobre los mecanismos celulares responsables del ajuste de la composición lipídica de la membrana durante la aclimatación al frío. Debido a la complejidad que muestran estos estudios sobre el metabolismo lipídico vegetal, las próximas investigaciones se deberán centrar en las diferencias existentes en la fríoestabilidad de la membrana de especies sensibles y tolerantes a las bajas temperaturas, así como en la capacidad de las especies tolerantes para cambiar su composición lipídica tras el período de aclimatación.

2.1.3.2. Inducción de proteínas crioprotectoras y cambios moleculares en la síntesis de proteínas.

Existe una familia de proteínas denominadas *proteínas abundantes tras la embriogénesis* (**LEA**, late-embryogenesis-abundant protein), cuya síntesis es inducida bajo numerosas situaciones de estrés ambiental, incluyendo la

deshidratación, el estrés salino y el frío (Close et al., 1993). Las principales características de estas proteínas son la presencia de un grupo de aminoácidos altamente conservado y la ausencia de residuos de triptófano, cisteína y fenilalanina. Estas proteínas están formadas por una fracción constituida por 7-9 residuos de serina que se encuentra en la parte central del polipéptido. Además, son altamente hidrofílicas y permanecen en estado soluble por encima del punto de ebullición.

La inducción de los genes responsables de la síntesis de las proteínas LEA durante la aclimatación al frío ha sido publicada en interesantes trabajos realizados con distintas especies vegetales. Por ejemplo, comparando distintas líneas de gramíneas sensibles y tolerantes a las bajas temperaturas, Danyluk y cols. (1994) mostraron que todas las plantas examinadas contenían genes homólogos para las proteínas LEA, pero esos genes eran expresados únicamente en especies tolerantes a las bajas temperaturas. La acumulación de las proteínas LEA durante un estrés que causa directa o indirectamente deshidratación sugiere que éstas están implicadas en mecanismos de tolerancia a bajos niveles hídricos. Durante los períodos de frío, las pérdidas de agua y la consecuente acumulación de sales y otros solutos en el citosol da lugar a un ambiente físico-químico que potencia la desnaturalización de las proteínas, membranas y complejos enzimáticos. La estructura repetitiva característica de las proteínas LEA es indicativa de que su función principal es estructural y no enzimática. Debido a su elevado contenido en residuos hidrofílicos (asp/asn, glu/gln, lys, thr) podrían interaccionar con otros componentes celulares dando lugar a un microambiente que mantiene un adecuado estado de solvatación celular (Hughes y Dunn, 1996).

Sin embargo, y a pesar de los numerosos estudios que muestran que las proteínas LEA juegan un papel fundamental en la tolerancia a la deshidratación celular, son necesarios estudios equivalentes para confirmar dicha función. En la naturaleza, las proteínas LEA no se acumulan de la misma manera en todos los tejidos vegetales. Particularmente, se ha observado que las células

meristemáticas de plantas de trigo aclimatadas a las bajas temperaturas poseían una elevada concentración de proteínas LEA (Kazouka y Aeda, 1994).

Un gran número de mecanismos moleculares tiene lugar durante la aclimatación al frío, los cuales no participan directamente en la “elaboración” de la tolerancia al mismo; más bien, se cree que dichos mecanismos mantienen la eficiencia de los procesos celulares esenciales afectados por las bajas temperaturas, tales como la ralentización del grado de reacción y/o el descenso en la disponibilidad de agua. Algunas evidencias muestran que la acumulación de ciertas proteínas denominadas *chaperonas* llevan a cabo el ajuste de los procesos implicados en las síntesis de proteínas necesarias para que se produzca el fenómeno de aclimatación al frío.

Otras proteínas acumuladas en gran cantidad a bajas temperaturas son aquellas ricas en glicina. Aunque su papel en la planta es aún desconocido, se cree que la mayoría de estas proteínas están implicadas en el metabolismo del ARNm. Una segunda clase de mRNA inducido bajo condiciones de bajas temperaturas codifica proteínas ricas en arginina, las cuales podrían actuar estabilizando ARNm específicos durante los períodos de frío (Ferullo y Griffith, 2001).

Por último, en todos los organismos vivos conocidos, la fosforilación de proteínas juega un papel fundamental en la regulación de numerosas funciones celulares, tales como la actividad de una gran cantidad de enzimas así como las interacciones proteína-DNA y proteína-proteína. La fosforilación de las proteínas viene determinada por proteínas kinasas específicas y las fosforilaciones en cascada están implicadas en la percepción y transmisión intracelular de las señales informativas celulares. Es de sobra conocido que la fosforilación proteica es un mecanismo molecular de adaptación a las bajas temperaturas (Monroy et al., 1993), no sólo a nivel de señalización del daño celular, sino que también participan en algunos ciclos metabólicos esenciales para la tolerancia a las bajas temperaturas (Ferullo y Griffith, 2001).

RESUMIENDO, las bajas temperaturas, tanto edáficas como aéreas, dan lugar a serios daños a nivel morfológico y fisiológico en las plantas que las sufren. El crecimiento radical, la captación de agua y nutrientes y los mecanismos asociados se ven rápida y significativamente afectados por este tipo de estrés térmico. El daño localizado, tal como el cese de la elongación radical, puede dar lugar a rápidas y nefastas consecuencias, las cuales derivan en una disminución en la captación de nutrientes que se manifiesta, en última instancia, en la parte aérea. Por otro lado, la inhibición de la captación de agua da lugar a una reducción directa de la fotosíntesis neta, así como una disminución crecimiento de la parte aérea.

En definitiva, podríamos decir que el estudio de los mecanismos celulares asociados con la aclimatación al frío han permitido la caracterización de numerosos compuestos y productos génicos que se acumulan en los distintos tejidos vegetales durante este período. Las propiedades bioquímicas de esos compuestos, deducidas de su estructura química, están, en la mayoría de los casos, correlacionados más con los efectos potenciales del estado hídrico celular o con la crioestabilización de la membrana plasmática y/o proteínas. Sin embargo, el modelo preciso de acción de cada uno de esos compuestos es desconocido hasta el momento, por lo que es necesaria más información a partir de estudios anatómicos, citológicos y biofísicos con el fin de elaborar un modelo de las estrategias llevadas a cabo por las plantas para sobrevivir a las duras condiciones del invierno.

2.2. ESTRÉS TÉRMICO PRODUCIDO POR ALTAS TEMPERATURAS

2.2.1. DEFINICIÓN Y PRINCIPALES CONSECUENCIAS

El estrés térmico producido por temperaturas superiores al óptimo de crecimiento de una especie vegetal es uno de los estreses abióticos más importantes que afectan a la productividad de los cultivos (Boyer, 1982). Aproximadamente un 23% de la superficie terrestre muestra una temperatura media anual por encima de los 40°C. En estas zonas, se han registrado temperaturas edáficas hasta de 60°C y la temperatura en el ápice de la parte aérea de algunas especies de césped que se desarrollan en estas zonas puede llegar a ser de 40°C durante algunas horas del día (Klueva y cols., 2001). La exposición de las plantas a un estrés por altas temperaturas usualmente se repite varias veces a lo largo del día (Pollock y cols., 1993) y suele venir acompañado por otros tipos de estrés, tales como un estrés hídrico, bajas temperaturas nocturnas y contaminación por metales pesados (Klueva y cols., 2001). Se ha comprobado que las altas temperaturas y la sequía afectan a un 25% del total de las tierras cultivadas. En Estados Unidos, la producción media de la mayoría de los cultivos es siete veces menor que la producción estimada para los mismos, siendo las altas temperaturas alcanzadas en esas zonas y la sequía las causas de la mayor parte de esas pérdidas (Klueva y cols., 2001).

La enorme demanda humana de una mayor producción agrícola para su consumo hace que las investigaciones sobre la resistencia de las plantas a los distintos tipos de estrés ambiental, y el aumento en la producción y calidad de esos cultivos sea cada vez mayor (Zhang y cols., 1999). Como resultado, en los últimos años se han realizado numerosas investigaciones basadas en la resistencia de las plantas a varios tipos de estrés ambiental mediante el estudio y la manipulación de la mayoría de las especies hortícolas (Klueva y cols., 1999).

La extensión del daño causado por las altas temperaturas difiere dependiendo del tipo de cultivo, del estado de crecimiento y del tipo de tejido vegetal. Ciertos estados del ciclo de vida de las plantas son más susceptibles a las altas temperaturas que otros, y un estrés por calor durante esos períodos podría ser crítico para la obtención de la producción final, siempre y cuando el régimen térmico del resto del período de crecimiento de la planta sea óptimo. Por ejemplo, en *Pennisetum americanum* el estado de plántula es el más vulnerable debido a las elevadas temperaturas alcanzadas por la superficie del suelo (Howarth y cols., 1997). Otras fases críticas son aquellas relacionadas con las funciones reproductivas, tales como la maduración de frutos y semillas, las cuales usualmente ocurren durante los meses de más calor. Si esto ocurre, los síntomas del estrés térmico se ven reflejados directamente en la productividad y calidad de los cultivos (Hall, 1992).

A nivel de planta completa, el estrés por calor causa una aceleración de los procesos de crecimiento, el aborto del desarrollo de las semillas y un desigual relleno del grano. A nivel fisiológico, las elevadas temperaturas afectan a la mayoría de las funciones celulares, incluyendo fotosíntesis, metabolismo energético y translocación de asimilados (Levitt, 1980; Berry y Bjorkman, 1980; Burke, 1990; Paulsen, 1994).

Los compuestos celulares que son más afectadas por las altas temperaturas son las proteínas, en particular, las enzimas. El estrés por calor interfiere en la biosíntesis *de novo* de las proteínas, inhibe la actividad de importantes enzimas e induce la degradación de las proteínas ya existentes (Nover, 1991). Una inhibición inducida por calor de la síntesis de proteínas constitutivas, junto con un incremento en el índice de degradación enzimático, puede dar lugar a un importante descenso del pool enzimático esencial para las funciones celulares durante un estrés por calor (Nover, 1991). Muchas de las enzimas vegetales más conocidas son termolábiles, incluyendo la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (Weis, 1981), la sacarosa sintasa (Rijven, 1986), la catalasa

(Feierabend y cols., 1992; Willenkens y cols., 1995) y la superóxido dismutasa (Matters y Scandalios, 1986). Una inhibición de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa es la principal causa de la inactivación producida por altas temperaturas de la fijación de CO₂ (Weis, 1981). También el estrés por calor inhibe severamente la capacidad de las plantas de transformar sacarosa en almidón en la mayoría de las plantas, indicando que una o más enzimas de este ciclo son específicamente inhibidas por el calor (Burke, 1990). Por otra parte, temperaturas excesivamente elevadas dan lugar a la inhibición de la actividad catalasa en la mayoría de las especies vegetales, mientras que otras enzimas antioxidantes pueden no verse afectadas (Feierabend y cols., 1992).

Otros efectos del estrés por calor se ven reflejados en los daños causados en la integridad de la membrana plasmática, aumentando considerablemente su permeabilidad a solutos e iones (Buerke y Orzech, 1988). Simultáneamente, la actividad de las enzimas integradas en las membranas que realizan las funciones celulares básicas, como son la fotosíntesis, la respiración celular y la translocación de distintos compuestos, se ven seriamente interrumpidas. Bajo condiciones de elevadas temperaturas las membranas del retículo endoplasmático son dañadas selectivamente, dando lugar a una degradación de la ARNm α -amilosa (mensajero del ácido ribonucleico) (Belanger y cols., 1986). Los daños producidos en la permeabilidad de la membrana plasmática debido a las altas temperaturas afectan al potencial redox de la mayoría de los compartimentos celulares y, como resultado, a los principales procesos metabólicos, lo que deriva finalmente en una desintegración total de la membrana, mezclándose los contenidos de los distintos compartimentos celulares y, en casos extremos, produciéndose la muerte celular (Klueva y cols., 2001).

El estrés oxidativo ha sido recientemente reconocido como uno de los principales factores de daño por altas temperaturas en muchos organismos, incluidos las plantas, siendo la mayor causa de muerte celular (Davidson y cols., 1996). En plantas, un estrés por calor da lugar a un desbalance entre la

energía solar capturada por los pigmentos fotosintéticos y el transporte electrónico a través de los citocromos, conociéndose este proceso como *fotoinhibición*. Este exceso de energía puede ser transferido al oxígeno, dando lugar a la generación de EOAs. Los sitios intracelulares críticos de formación de EOAs son los cloroplastos y mitocondrias, ya que en estos orgánulos las altas temperaturas inducen la desorganización del transporte electrónico. En cloroplastos, un estrés por calor da lugar a una fotoinhibición de la fotosíntesis y a una inhibición de la actividad catalasa, lo que derivaría en una acumulación masiva de EOAs y en el bloqueo completo del cloroplasto (Willenkens y cols., 1995). Además, un estrés por calor induce una alteración de la composición de las membranas tilacoidales del cloroplasto (Suss y Yordanov, 1986), así como una disgregación irreversible de los componentes funcionales de complejo PSII. Esto da lugar, por un lado, al desacople de la cadena de transporte electrónico existente entre el PSI y PSII y, por otro lado, a un incremento del flujo electrónico al oxígeno molecular y, consecuentemente, a la formación masiva de EOAs (Burke y cols., 1988).

Finalmente, el estrés por calor produce profundas modificaciones en todos los metabolismos celulares conocidos a nivel de planta completa. Los principales sitios de acción son las proteínas, fundamentalmente enzimas, y membranas. Éstas son dañadas como consecuencia de la subida de la temperatura intracelular que da lugar a estreses secundarios, como es el daño oxidativo y la deshidratación celular. Cuando una planta es sometida a temperaturas por encima de su óptimo de crecimiento, lo que primeramente se observa es una importante reducción en la producción de biomasa, lo cual es consecuencia directa de una inhibición de las enzimas fotosintéticas y la pérdida de la integridad de las membranas (Hall, 1992; Monteith y Elston, 1993; Howarth y cols., 1997).

Debido a los efectos sumamente importantes que tiene un estrés por calor sobre el metabolismo y fisiología de las plantas, éstas han tenido que

desarrollar una serie de mecanismos protectores frente a los daños inducidos por las altas temperaturas.

2.2.2. MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE AL DAÑO INDUCIDO POR LAS ALTAS TEMPERATURAS.

Todos los microorganismos y las especies vegetales pueden ser clasificadas en tres grupos de acuerdo con su índice de termotolerancia, entendiendo por éste la máxima temperatura que es capaz de soportar un organismo por encima de la cual éste no es capaz de sobrevivir (Larcher, 1995):

- a. *Especies sensibles al calor*: comprende especies que no son capaces de soportar temperaturas por encima de los 39 ó 40°C, como son la mayoría de las algas eucariotas, cormófitos acuáticos y líquenes en estado hidratado.
- b. *Eucariotas relativamente resistentes al calor*: Se refiere a plantas de sol y de lugares secos, capaces de adquirir cierta resistencia al calor y de sobrevivir unos 30 minutos a 50°C.
- c. *Especies tolerantes al calor*: Son la mayoría de los procariotas y son capaces de resistir temperaturas entre 75 y 90°C. Por ejemplo, las arqueobacterias y eucariotas unicelulares son capaces de sobrevivir por encima de los 105°C tras un tratamiento de aclimatación (Trent, 1996). Los organismos adaptados a estas temperaturas tan extremas poseen una gran cantidad de componentes celulares termoestables.

El índice de adaptación a elevadas temperaturas en plantas hortícolas no puede ser comparado con las especies silvestres. Por ejemplo, las plantas hortícolas no pueden utilizar mecanismos de escape al estrés por calor

utilizados por su especie en estado salvaje (Levitt, 1980). Simultáneamente, la tolerancia a las altas temperaturas en muchas de las especies hortícolas ha sido adquirida a lo largo del tiempo mediante una larga selección natural a través del aumento del potencial de productividad y la demanda humana de dichas especies vegetales ecológicamente ubicadas. Ejemplos del desarrollo de estos mecanismos utilizados por muchas especies hortícolas se basan en un aumento de la transpiración para disminuir la temperatura interna de la planta y en la evasión de la luz solar mediante el movimiento de las hojas, pudiéndose reducir la temperatura mediante estos mecanismos en unos 10°C. (Hall, 1982).

2.2.2.1. Fenómeno de termotolerancia adquirida

Howarth y Ougham (1993) puntuaron que el término **termotolerancia** es usado indistintamente por muchos científicos y, por este motivo, debe quedar claro su significado. La tolerancia a las elevadas temperaturas en plantas tiene dos componentes: la *termotolerancia inherente* propia de cada especie y la *termotolerancia adquirida*. La *termotolerancia inherente* o intrínseca es un componente constitutivo de la especie vegetal que resulta de la adaptación evolutiva térmica de la misma. La *termotolerancia adquirida* es la capacidad de una especie vegetal para sobrevivir a temperaturas normalmente letales para la misma tras una exposición a un ligero estrés térmico. Esta termotolerancia depende de la inducción de rutas específicas durante el período de aclimatación y el subsecuente desarrollo (es decir, adquisición) de la termotolerancia. De esta manera, ha sido postulado que la termotolerancia inherente y adquirida poseen diferentes mecanismos moleculares (Levitt, 1980; Shen y Li, 1982; Krishnan y cols., 1989; Fokar y cols., 1998).

En general, existen diferencias intraespecíficas en la capacidad de termotolerancia adquirida, mientras que la variación en la termotolerancia inherente entre especies es normalmente muy pequeña. Así, la medida de la

termotolerancia adquirida es más usada en el contexto de la selección y procreación de especies vegetales (Krishnan y cols., 1989; Fokar y cols., 1998).

La adquisición de la termotolerancia en plantas es un fenómeno complejo que va acompañado de modificaciones fisiológicas, moleculares y bioquímicas (Levitt, 1980). Estas modificaciones incluyen cambios en la composición de isoenzimas, transformaciones en el aparato fotosintético, alteraciones de la composición de la membrana, y síntesis y señalización intracelular de moléculas protectoras, tales como las proteínas de shock térmico (PSTs) (Nover, 1991), otras chaperonas y antioxidantes.

En cultivos, los métodos más utilizados para cuantificar el grado de termotolerancia adquirida son la determinación de la estabilidad de la membrana celular y el método basado en la viabilidad celular del trifenil tatrazolio cloruro (TTC) son rutinariamente los más utilizados para cuantificar el nivel de termotolerancia adquirida (Blum, 1988). El test de estabilidad de la membrana celular estima el índice de filtración de electrolitos a través de la membrana plasmática en tejidos previamente tratados con altas temperaturas por medidas conductivimétricas de las soluciones, en las cuales los tejidos vegetales han sido inmersos e incubados hasta alcanzar el equilibrio (Sullivan et al., 1977; Blum, 1988). De esta manera, este test muestra el daño causado por las altas temperaturas sobre la membrana celular. Por otro lado, el test TTC está basado en el principio de reducción de la sal tetrazolio formada a partir de las enzimas respiratorias y, de esta manera, evaluar la actividad respiratoria residual de tejidos estresados por elevadas temperaturas (Towill y Mazur, 1974; Chen et al., 1982; Krishnan et al., 1989). Aunque ambos tests llevan a cabo la determinación de la termoestabilidad y de dos importantes funciones celulares (transpiración y respiración), deberían ser tenidos en cuenta también otros componentes potencialmente importantes para que se produzca la tolerancia al estrés por calor en una planta.

Actualmente, el desarrollo de investigaciones o estudios que nos permitan comprender los mecanismos moleculares de la termotolerancia adquirida se ven truncadas por el pobre conocimiento genético que existe sobre este campo y la dificultad de obtener mutantes tolerantes a los daños causados por las altas temperaturas (Piper, 1993).

2.2.2.2. Genes inducidos por el estrés por calor

A nivel molecular, la mayoría de las alteraciones más importantes causadas por temperaturas excesivamente elevadas en células vegetales se reflejan en modificaciones de la síntesis proteica, incluyendo la síntesis de las denominadas proteínas de shock térmico (PSTs) y de las enzimas antioxidantes, así como alteraciones de composición y estructura de la membrana.

Aquellos genes cuya expresión es inducida por un estrés por calor son generalmente denominados *genes de shock térmico*, cuyos productos dan lugar a la formación de las PSTs. Las plantas, a diferencia del resto de los organismos, expresan una gran cantidad de PSTs de bajo peso molecular que representan los principales componentes de la respuesta vegetal a un estrés por calor (Vierling, 1991; Nguyen, 1994). Las PSTs están presentes en las células vegetales bajo condiciones normales de crecimiento (Nguyen, 1994). Tras ser sintetizadas en el citoplasma, muchas de las PSTs son específicamente transportadas a varios compartimentos intracelulares. Tanto PSTs localizadas en mitocondrias como cloroplastos fueron identificadas en plantas de soja, guisante, maíz, trigo y tomate (Nguyen y cols., 1993; Lenne y cols., 1995; LaFayate y cols., 1996). También han sido detectadas algunas PSTs codificadas específicamente por un orgánulo determinado (Sinibaldi y Turpen, 1985).

A parte de las PSTs, el estrés por calor da lugar a la inducción de otras clases de proteínas. En *Arabidopsis thaliana* un estrés por altas temperaturas provoca la inducción de calmodulina, una proteína que modula la concentración intracelular de calcio (Braam, 1992). Además, las altas temperaturas también inducen la síntesis de catalasas y SODs (Willenkens y cols., 1995), provocan una modificación de la fluidez de la membrana, y actúan sobre la estimulación de los ciclos de biosíntesis de los lípidos de membrana (Howarth, 1990; Gyorgyey y cols., 1991; Dong y Dunstan, 1996). Esto demuestra que un estrés por calor es la causa de importantes perturbaciones que derivan en numerosas alteraciones moleculares en las células vegetales.

2.2.2.3. Proteínas de shock térmico (PSTs)

Ya que la adquisición de la termotolerancia en plantas requiere la exposición a temperaturas casi al borde de la letalidad de la planta y que usualmente coinciden con la inducción de la síntesis de las PSTs, se ha postulado durante mucho tiempo que éstas son el principal factor necesario para que una planta desarrolle el estado de termotolerancia (Howarth y Ougham, 1993). La correlación espacial y temporal entre la expresión (y/o acumulación) de las PSTs y el desarrollo de la termotolerancia adquirida ha sido demostrado a través de numerosos estudios. Más aún, se ha propuesto que la expresión de las PSTs juega un papel crucial en la capacidad de adquisición de la termotolerancia (O'Connell, 1994).

En cultivos de soja, el desarrollo de la termotolerancia, estudiada siguiendo el estrés por un tratamiento con arsenito, era paralelo a la inducción y acumulación de las PSTs (Lin y cols., 1984). Además, se realizaron otras observaciones correlativas en plantas y cultivos de tejidos de cebada, trigo, maíz y algodón (Nguyen, 1994; Marmioli y cols., 1996). Posteriormente, se estudió la función y la localización subcelular de las PSTs en bacterias, hongos y sistemas animales, comprobándose que existe una conservación evolutiva

muy elevada de las PSTs, lo que sugiere que sus funciones en plantas superiores podrían ser similares a las que tienen en otros sistemas (Kobayashi y cols., 1994; Zur Nieden y cols., 1995).

Aunque algunas PSTs tienen un mecanismo de acción específico, la función como "chaperona" es común a todas ellas (Hartl, 1996; Miernyk, 1997). Las chaperonas son definidas como proteínas que ayudan a mantener la conformación funcional de otras proteínas y facilitar su correcto procesamiento, incluyendo su plegamiento, ensamblaje, translocación y degradación (Ellis, 1990). Esta función no es únicamente llevada a cabo por las PSTs *per se*, sino también por las denominadas proteínas PSTs análogas, las cuales son homólogos estructurales de las PSTs y se expresan constitutivamente a temperaturas normales de desarrollo. Bajo condiciones de estrés por calor, las chaperonas previenen la desnaturalización y degradación de proteínas celulares y llevan a cabo el mantenimiento de la actividad enzimática (Kobayashi y cols., 1994; Zur Nieden y cols., 1995; Miernyk, 1997).

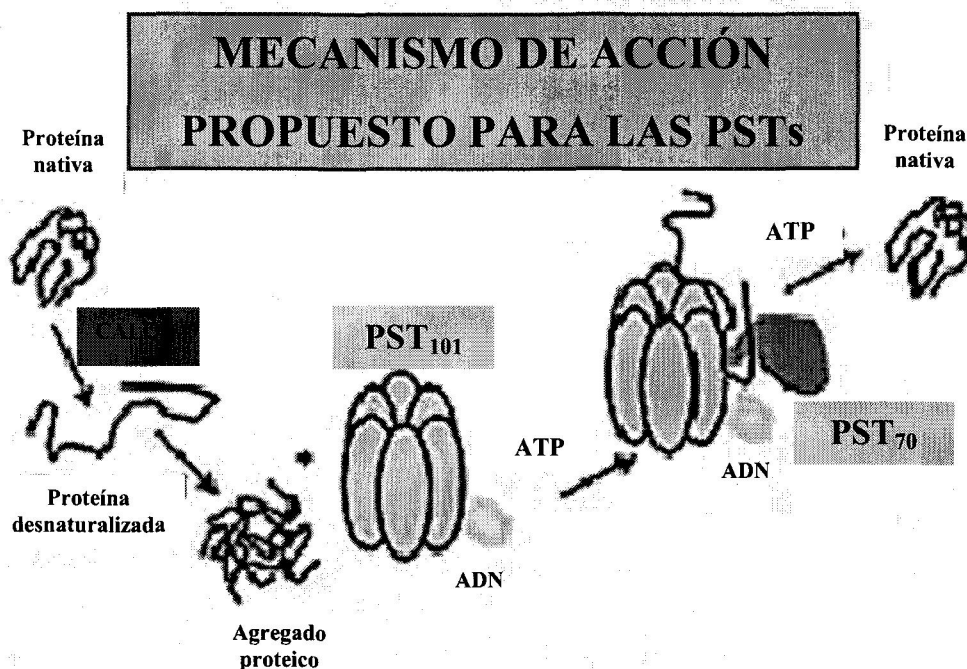


Figura 5. Mecanismo de acción de las PSTs en la restauración de proteínas dañadas por las altas temperaturas

Experimentos realizados *in vitro* muestran que las PSTs purificadas llevaban a cabo la protección enzimática y prevención de desnaturalización e inactivación de otras proteínas (Figura 5) (Hartl, 1996). Por ejemplo, en células animales, las PSTs han sido implicadas específicamente en la protección de los componentes del citoesqueleto (Liang y MacRae, 1997). En los orgánulos celulares, las PSTs y las PSTs análogas están implicadas en el importe y ensamblaje de otras proteínas (Hartl, 1996; Miernyk, 1997).

2.2.2.4. Antioxidantes y estrés por calor

Como hemos indicado anteriormente, el estrés oxidativo ha sido recientemente reconocido como una de las causas principales responsables del daño y muerte celular causados por las altas temperaturas en muchos organismos, incluido el reino vegetal (Davidson y cols., 1996). En plantas, un estrés por calor produce un desbalance entre la energía solar capturada por los pigmentos fotosintéticos y el transporte electrónico a través de los citocromos. Este proceso es conocido con el nombre de **fotoinhibición**, y el exceso de energía producido puede ser transferido al oxígeno, dando lugar a la formación de las denominadas **EOAs**.

Los compuestos enzimáticos y no enzimáticos que son capaces de regular y aliviar los efectos negativos llevados a cabo por estas EOAs en las células se denominan **antioxidantes**. Ejemplos de antioxidantes presentes en las células vegetales son las superóxido dismutasas (SODs), catalasas (CATs), peroxidasas (PODs), glutatión (GSH), ácido ascórbico y pigmentos. De acuerdo con las investigaciones realizadas al respecto, los antioxidantes juegan un papel esencial en la adaptación de las plantas al estrés abiótico, incluyendo el estrés por calor y el estrés lumínico (Klueva y cols., 2001).

Diversos estudios realizados con mutantes de tabaco que mostraban una elevada actividad CAT concluyeron que esta enzima juega un papel

importantísimo en la actividad fotosintética durante los períodos de estrés (Willenkens y cols., 1995). De hecho, una inhibición de esta enzima daba lugar a una reducción en la capacidad de adquisición de termotolerancia en la planta (Piper, 1993). Mutantes de levadura a los que se les suprimía los genes responsables de la síntesis de la CAT, SOD y citocromo peroxidasa eran más sensibles al estrés por calor que las plantas control en las cuales esos genes eran mantenidos (Dadvison y cols., 1996).

Recientemente, se ha descubierto una intrigante conexión entre la expresión de un tipo de PSTs y la actividad de los antioxidantes. La sobreexpresión de PSTs de bajo peso molecular se ha relacionado con un descenso de los niveles intracelulares de las EOAs, lo que iba acompañado de un incremento del contenido en glutation, previniendo, de esta manera, la formación de necrosis inducida por el daño oxidativo (Mehlen y cols., 1996).

De esta manera y según la literatura disponible al respecto, la manipulación de la capacidad antioxidante de un sistema vegetal parece ser un componente decisivo en la tolerancia al estrés por calor en plantas. Sin embargo, aún sigue siendo necesario el desarrollo de nuevos estudios sobre la actividad antioxidante de un sistema y su relación con la tolerancia a las altas temperaturas.

2.2.2.5. Reacciones en cascada provocadas por las altas temperaturas

Los iones calcio y la calmodulina, proteína que regula los niveles intracelulares de Ca^{+2} , actúan como segundos mensajeros en células eucariotas. Fluctuaciones en las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{+2} se han correlacionado con la señalización durante un estrés por calor en células vegetales y podrían estar implicados en mecanismos de tolerancia a las altas temperaturas en las mismas. Un estrés por calor da lugar a un incremento de los niveles de Ca^{+2} en el citoplasma de células de tabaco (Gong y cols., 1998)

e induce la síntesis de calmodulina en *Arabidopsis* (Braam, 1992). La implicación del Ca^{+2} y la calmodulina en la tolerancia al estrés térmico también ha sido demostrada en semillas de maíz: un descenso en la concentración de Ca^{+2} coincidía con la reducción de la termotolerancia de esas semillas, mientras que aplicaciones exógenas de este ión producía un aumento de dicha termotolerancia (Gong y cols., 1997). Al menos una PST, la PST₇₀, posee calmodulina en su sitio de unión, lo cual indica que las PSTs podrían estar implicadas en los procesos de señalización celular llevados a cabo por el Ca^{+2} (Miernyk, 1997).

En levaduras, el estrés por calor activa una ruta de señalización que regula la integridad celular a través de una cascada de kinasas. El crecimiento de las células de levadura a elevadas temperaturas causa la ruptura de la pared celular, lo que provoca alteraciones en las interacciones que tienen lugar en la membrana plasmática. Al mismo tiempo, en la membrana se activan canales específicos para iones, denominados *canales iónicos mecanosensitivos*, lo que provoca un incremento del importe de iones Ca^{+2} hacia el citoplasma y, de esta manera, la sobrerregulación de las enzimas que modifican la estructura y composición de la membrana, evitando la ruptura de la misma (Kamada y cols., 1995) y adquiriendo, de esta manera, las células de levadura la termotolerancia. Similarmente, la tolerancia al estrés por calor en plantas podría ser conferida por la modificación de los canales señalizadores activados por el calor.

2.2.2.6. Estructura de la membrana y estrés por calor

La composición y estructura de la membrana plasmática es de vital importancia para el funcionamiento de la célula completa durante las situaciones de estrés térmico. Las modificaciones en la composición y estructura de la membrana bajo condiciones de estrés por calor han sido observadas en un gran número de especies vegetales. En numerosos estudios, la saturación de los lípidos de

membrana está correlacionada con la resistencia al calor (Gibson y cols., 1994) Por otro lado, algunos osmolitos, sobre todo aquellos implicados en la tolerancia al estrés osmótico en plantas, han sido recientemente relacionados con los mecanismos de tolerancia al estrés por calor. De esta manera, la acumulación, por ejemplo, de glicinabetaína ha sido relacionada con la estabilidad de la membrana plasmática y la actividad del PSII bajo condiciones de elevadas temperaturas (Yang y cols., 1996).

Numerosas evidencias muestran que la estabilización de la membrana plasmática bajo condiciones de altas temperaturas a través de cambios en su composición e interacción con compuestos protectores, juega un papel fundamental en la tolerancia de las plantas a las altas temperaturas.

2.2.3. TERMOTOLERANCIA Y SU RELACIÓN CON OTROS TIPOS DE ESTRÉS.

Las plantas, por lo general, se desarrollan en ambientes donde confluyen más de un tipo de estrés ambiental. El estrés por calor está asociado normalmente a un estrés hídrico, altas intensidades lumínicas y una elevada radiación ultravioleta (UV).

La sobreproducción de EOAs que se produce bajo estos tipos de estrés y los daños causados en el PSII pueden ser los factores más importantes que limitarían la supervivencia de una planta bajo estas condiciones. Paulsen (1994) observó que un estrés por calor dañaba la capacidad de ajuste osmótico de una planta, un importante mecanismo de tolerancia ante la sequía de muchas especies. De esta manera, los mecanismos de defensa de las plantas frente al daño inducido podría ser simultáneamente empleados por una planta frente a las condiciones adversas producidas en condiciones de campo.

Numerosas evidencias muestran que las PSTs juegan un importante papel en la protección de la planta frente a numerosos tipos de estrés ambiental. Muchas PSTs son inducidas frente a un estrés por metales pesados (Wollgiehn y Neumann, 1995; Marmioli y cols., 1996), estrés salino (Pareek y cols., 1995; Zhu y cols., 1997), estrés hídrico (Almoguera y cols., 1993) y estrés térmico, tanto por altas como por bajas temperaturas (Pareek y cols., 1995). Sin embargo, no todas las PSTs pueden ser inducidas por diferentes factores de estrés ambiental y ningún tipo de estrés, excepto el estrés por calor, induce a todas las PSTs conocidas. Por ejemplo, el tratamiento de cultivos celulares de plantas de tabaco con metales pesados no afectaba a la expresión de un grupo de PSTs (Wollgiehn y Neumann, 1995). Más aún, la localización intracelular de las PSTs causada por un estrés por calor o por metales pesados es distinta. Por lo general, la expresión de las PSTs inducida por otros tipos de estrés distintos al estrés térmico es menos intensa (Pareek y cols., 1995; Wollgiehn y Neumann, 1995).

Por otra parte, las plantas pueden llegar a ser resistentes a otro tipo de estrés ambiental tras ser expuestas a un estrés por calor. Las plantas aclimatadas al estrés producido por temperaturas excesivamente elevadas poseen una elevada tolerancia al estrés osmótico (Harrington y Alm, 1988), al tratamiento con etanol (Nover, 1991), y a la exposición de metales pesados (Heenan y Carter, 1977). Además, una exposición de una planta a un estrés por calor confiere resistencia al PSII frente a elevadas intensidades lumínicas (Havaux y cols., 1991) e, igualmente, la previa exposición de las plantas a una elevada intensidad luminosa previene al PSII de los daños causados por las altas temperaturas (Stapel y cols., 1993).

2.2.4. ESTRATEGIAS MOLECULARES PARA EL AUMENTO DE LA TERMOTOLERANCIA EN CULTIVOS

Los progresos realizados en la manipulación genética para inducir la termotolerancia a determinadas especies vegetales se ha visto ralentizada debido a las limitaciones de nuestros conocimientos en la tolerancia de las plantas a las elevadas temperaturas. Los mayores avances se han realizado en la modificación de la cinética térmica de las enzimas vegetales, en la transformación de los genes de las PSTs, y en la inducción de la termotolerancia adquirida en cultivos. Las plantas adaptadas a diferentes ambientes térmicos difieren en cuanto a la temperatura óptima *in vitro* de sus enzimas (Burke, 1990; Burke y Oliver, 1993). Recientemente, en experimentos con plantas transgénicas, se ha visto que las características térmicas de una enzima pueden ser transferidas entre distintas especies vegetales. Cuando el gen de la enzima *NADPH-hidroxipiruvato reductasa* de pepino (una especie con una elevada temperatura óptima de crecimiento) fue introducido en tabaco (especie con una baja temperatura óptima), las características térmicas de la enzima del pepino se mantenían en las plantas de tabaco (Oliver y cols., 1995). No obstante, se necesita un conocimiento más profundo de los ciclos metabólicos y la características térmicas de las enzimas vegetales para que estas técnicas se desarrollen con más profundidad en los próximos años.

Todos los datos aquí expuestos indican que las respuestas vegetales a los diferentes tipos de estrés ambiental muestran rutas moleculares comunes, incluyendo la inducción de las proteínas de estrés. También es comúnmente aceptado que la mayoría de los estreses abióticos causan ciclos de señalización dependientes de Ca^{+2} (Gong y cols., 1997), siendo este un mecanismo de regulación de un gran número de genes inducibles bajo condiciones de estrés ambiental (Knight y cols., 1997). Actualmente, aún no está claro cómo modificaciones en la concentración de Ca^{+2} citoplasmático pueden ser trasladadas a la activación de grupos de genes específicos bajo

distintas situaciones de estrés. Esta cuestión necesitaría ser estudiada con más detalle en estudios futuros.

RESUMIENDO, la termotolerancia en plantas es una compleja característica multigénica. Muchos de los componentes de la termotolerancia, tales como las PSTs, antioxidantes, estabilidad de la membrana plasmática, del ARN y de las proteínas, han sido identificadas en los últimos años. Esos componentes controlan los procesos fisiológicos que afectan a la termotolerancia de la planta. La disponibilidad de la planta para llevar a cabo estos procesos puede ser un factor crítico para las determinación de la productividad y viabilidad de un cultivo. Las distintas partes que conforman la termotolerancia de una especie vegetal podrían tener comportamientos distintos dependiendo del estado de desarrollo de la misma y del órgano a estudiar. Por ejemplo, la termotolerancia en órganos reproductivos puede venir determinada por mecanismos moleculares específicos que no se encuentran o no son tan importantes en órganos vegetativos.

En los últimos años, se han realizado algunos avances en la comprensión de las bases moleculares de la termotolerancia en plantas. La acumulación de PSTs y la capacidad antioxidante de las células son conocidas como dos de los factores más importantes para la adquisición de termotolerancia por una especie vegetal. Aunque han sido aislados y caracterizados muchos de los genes de las PSTs, sus funciones en la célula vegetal aún no están totalmente definidas. El potencial de la mejora genética para la inducción de la termotolerancia en una especie vegetal se ve limitado por las distintas variaciones genéticas debidas a los procesos de "domesticación". De esta manera, la conservación de las fuentes genéticas y la utilización de herramientas génicas conocidas es crucial para las disponibilidad, en un futuro, de una inducción artificial de la termotolerancia en un cultivo determinado, con el fin de mejorar la productividad y calidad del mismo en ambientes con temperaturas extremas.

3. PROCESOS METABÓLICOS ALTERADOS POR EL ESTRÉS TÉRMICO

3.2. METABOLISMO NITROGENADO PRIMARIO

El nitrógeno (N) es uno de los factores más limitantes para el crecimiento de una especie vegetal, de manera que la mayoría de las plantas poseen distintos mecanismos para maximizar la captación de N desde el suelo. Sistemas complejos de captación, asimilación y movilización evitan que se produzca un derroche de N y energía en los sistemas vegetales. Estos sistemas complejos son el resultado de una adaptación progresiva de las plantas a las condiciones ambientales donde se desarrollan, las cuales podrían limitar un óptimo abastecimiento de N desde el suelo a la planta.

El N es un componente esencial de muchas e importantes biomoléculas, tales como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, coenzimas y pigmentos. En el suelo, las formas disponibles de N para las plantas son muy variadas e incluyen amonio (tanto NH_3 como NH_4^+), nitratos, aminoácidos, péptidos solubles y compuestos insolubles ricos en N. Sin embargo, si en el medio existen las formas inorgánicas NO_3^- y NH_4^+ éstas son preferidas y primeramente absorbidas por las plantas (Williams y Miller, 2001).

La absorción de NO_3^- es un proceso activo que se produce en contra del gradiente electroquímico, como resultado de un simporte (McClue y col., 1990). La absorción de este ión lleva asociado el transporte simultáneo de H^+ , de manera que por cada NO_3^- absorbido por la planta se produce la absorción de dos H^+ , con un gasto energético de dos moléculas de ATP. Por otro lado, la absorción de NH_4^+ por las plantas desde el suelo se produce a través de un proceso de uniporte y se trata de un proceso pasivo sin coste energético para la planta (Raven y Smith, 1973; Ulrich, 1987). A pesar del coste energético que

le supone a la planta la absorción de NO_3^- , esta forma es predominantemente la preferida por la mayoría de las plantas debido a los efectos tóxicos provocados en las mismas y asociados a la absorción de NH_4^+ (Givan, 1979; Fernandes y Rosiello, 1986; Magalhaes y Huber, 1987; Silva y col., 1987; Magalhaes y Huber, 1989).

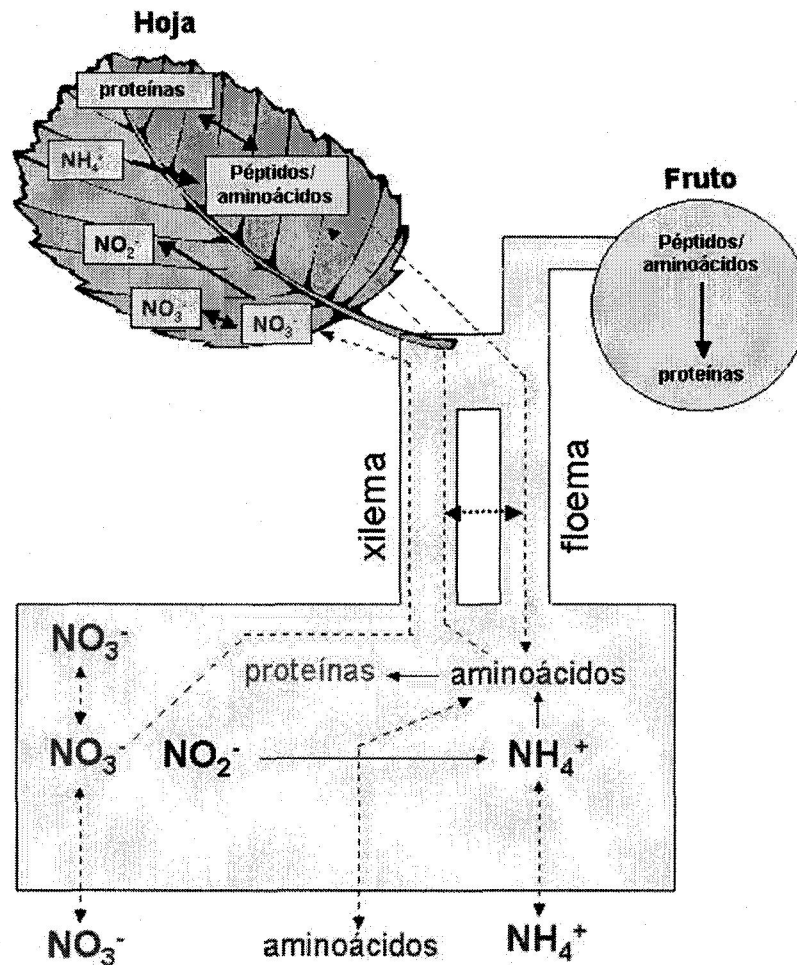


Figura 5. Absorción y asimilación del N y principales rutas de transporte intercelular de los principales compuestos nitrogenados en plantas. Las líneas continuas muestran las conversiones químicas, mientras que las líneas discontinuas representan el transporte del compuesto en cuestión (Lea, 1993)

Una vez que los NO_3^- han entrado en la célula, éstos son asimilados en el tejido vegetal por medio de una serie de etapas, en las cuales están implicadas distintas enzimas. La nitrato reductasa (NR) cataliza la reducción de los NO_3^- a NO_2^- (Warner, 1987) por transferencia de dos electrones desde el NAD(P)H a los NO_3^- , produciendo la reducción de esta forma nitrogenada (Solomonson y Narber, 1990). Posteriormente, la enzima nitrito reductasa (NiR) cataliza la transformación de NO_2^- a NH_4^+ , lo que implica la transferencia de seis electrones (Guerrero y cols., 1987; Sivasankar y Oaks, 1996).

Este NH_4^+ , así como el procedente de la fotorrespiración, de la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides y del catabolismo de los aminoácidos es incorporado a formas orgánicas gracias a la actividad de dos enzimas, glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), integradas en un ciclo denominado GS/GOGAT (Sivasankar y Oaks, 1996; Temple y cols., 1998), dando como resultado la síntesis de dos moléculas de glutamato. Los glutamatos sintetizados pueden ser de nuevo reutilizados como sustratos de la enzima GS o pueden, a partir de su grupo amino, ser utilizados para formar otros compuestos nitrogenados.

Un importante destino del glutamato y de la glutamina es la síntesis de aspartato y asparagina, producidos en las reacciones catalizadas por la enzima aspartato aminotransferasa (AAT). Estos aminoácidos son importantes ya que son compuestos nitrogenados de transporte para muchas plantas (Sivasankar y Oaks, 1996; Temple y cols., 1998).

La Figura 5 representa esquemáticamente el proceso de asimilación del N en plantas

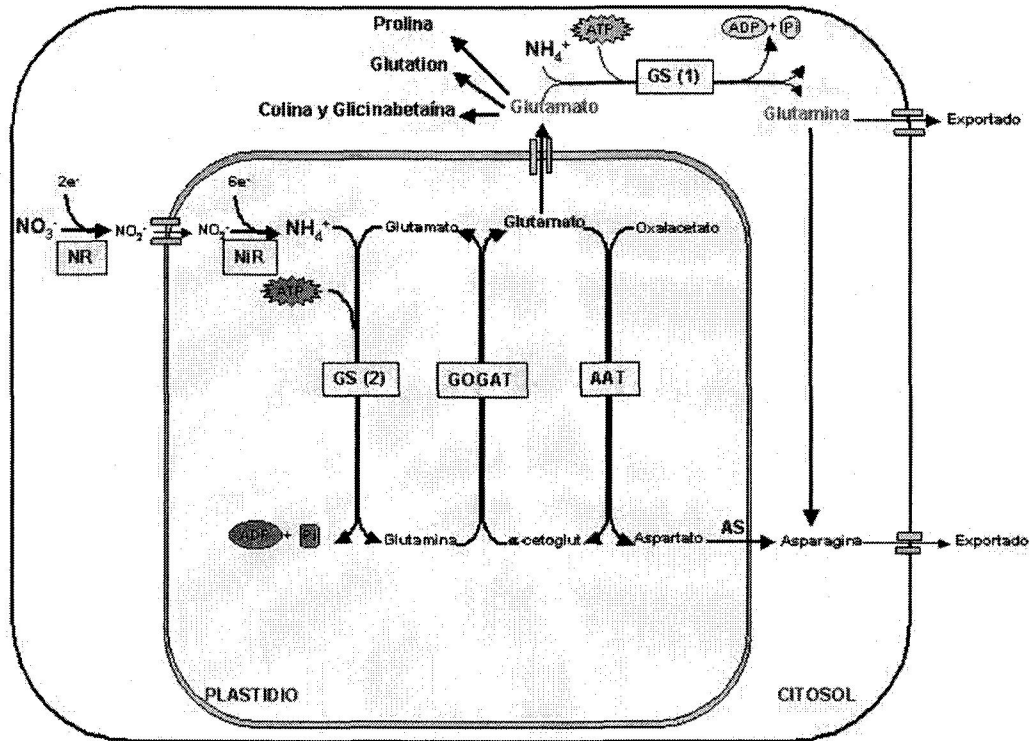


Figura 5. Asimilación del N en plantas superiores. NR, nitrato reductasa; NIR, nitrito reductasa; GS(1), glutamina sintetasa citosólica; GS(2), glutamina sintetasa plastidial; GOGAT, glutamato sintasa; AAT, aspartato aminotransferasa; PEP, fosfoenol pirúvico.

Al igual que otros procesos fisiológicos y bioquímicos, la captación y asimilación del N son procesos fuertemente relacionados con la temperatura ambiental, de tal forma que bajo una temperatura óptima para una determinada especie vegetal, la absorción y asimilación del N se dan favorablemente y, cualquier desviación de este óptimo afectaría adversamente a todos y cada uno de estos procesos. A continuación veremos la influencia que temperaturas por encima o por debajo de este óptimo causan sobre el metabolismo nitrogenado en plantas.

3.2.4. Bajas temperaturas

En general, un estrés térmico provocado por temperaturas extremas (tanto por encima como por debajo del óptimo de una especie) afecta a la absorción y metabolismo de todos y cada uno de los nutrientes necesarios para el desarrollo de una planta. La mayoría de los estudios se han basado en los procesos de absorción del N, de tal forma que la bibliografía existente respecto a la asimilación de este nutriente es mínima

Cuando una planta es sometida a temperaturas por debajo de su óptimo de crecimiento, el índice de captación de la mayoría de los nutrientes esenciales para las plantas disminuye considerablemente. Una vez se reestablece la temperatura radicular, estos índices de absorción van aumentando paralelamente a la temperatura (Deane-Drummond y Glass, 1983). Tras unas pocas horas, y cuando el índice de captación de macronutrientes ha sido recuperado parcialmente, puede llegar a ser menos afectado por cambios térmicos posteriores. Si este proceso de recuperación que se produce en la mayoría de las plantas es un mecanismo de aclimatación o no es aún un tema de debate (Siddigni y cols., 1984; White y cols., 1987; Clarckson y cols., 1988; Engels y cols., 1992; MacDuff y cols., 1994; Engels y Marschner, 1996). La planta ¿se recupera debido a factores de la raíz, a la síntesis *de novo* de transportadores iónicos en la raíz, a la mejora de la conductancia hidráulica radicular, o a un incremento de la demanda de nutrientes por la parte aérea?

El índice parte aérea/raíz es un término crítico para comprender la respuesta completa de la planta ante los cambios inducidos por las bajas temperaturas. Un aumento de este índice puede dar lugar a un incremento de la absorción por unidad radical, debido a un aumento de la demanda por la parte aérea y no, como se creía durante algún tiempo, a cambios en las características de la raíz (White y cols., 1987; Engels y cols., 1992). Por ejemplo, bajo una aportación de NO_3^- limitada, plantas de maíz que se desarrollaban a una temperatura radicular de 7°C poseían una mayor absorción de NO_3^- cuando eran

transferidas a 17°C que las plantas que se desarrollaban a esta última temperatura durante todo su período de desarrollo, sugiriendo la existencia de un mecanismo de aclimatación por parte de las plantas sometidas a un pretratamiento con bajas temperaturas (MacDuff y cols., 1994).

En otro estudio, tras mantener las raíces de plantas de maíz durante 3-5 días a bajas temperaturas, los índices de exudación de savia xilemática aumentaban, siempre y cuando la parte aérea fuera mantenida a una temperatura óptima para estas plantas. Esto era debido posiblemente a una elevada demanda nutricional por la parte aérea de la planta (Engels y cols., 1992).

La absorción y translocación de nitrógeno, fósforo y potasio no sufren un proceso de aclimatación a las bajas temperaturas *per sé*, sino que incrementan en respuesta a la demanda de nutrientes por la parte aérea. Esto únicamente ha sido documentado en plantas en las que la raíz era sometida a un estrés por frío y la parte aérea se mantenía a la temperatura óptima de crecimiento de la planta (Engels y cols., 1992; Engels y Marschner, 1996), por lo que son necesarios más estudios e investigaciones al respecto.

La absorción de N, su metabolismo y su compartimentalización se ven sumamente alteradas en plantas que se desarrollan a bajas temperaturas. En plantas de *Brassica napus* tolerantes al frío, la captación de NO_3^- por las raíces a 7°C era la mitad que cuando estas mismas plantas se desarrollaban a 17°C, siempre y cuando la parte aérea fuese mantenida a una temperatura de 25°C (MacDuff y cols., 1982). Por otra parte, cuando plantas completas de *Brassica* y de centeno, es decir tanto raíz como parte aérea, eran sometidas a temperaturas muy bajas, tanto la absorción de N como su translocación hacia la parte aérea vía xilema era inhibida drásticamente, provocándose un incremento en la concentración de N en la raíz, lo que podría dar lugar a una inhibición de la captación de este nutriente posteriormente (Lainé y cols., 1994).

Por otro lado, una baja temperatura edáfica provoca alteraciones en los índices relativos de absorción de NO_3^- y NH_4^+ , como ya fue demostrado por MacDuff y Wild (1989). Por ejemplo, la absorción de NO_3^- es más sensible a las bajas temperaturas que la de NH_4^+ en especies de césped tolerantes a las bajas temperaturas (Clarckson y Warner, 1989). En plantas de tomate sensibles al frío, sin embargo, la absorción de NH_4^+ , que no la de NO_3^- , era inhibida irreversiblemente tras 4 horas de exposición al frío, de manera que la absorción de este ión no se reestablecía una vez que aumentaba la temperatura de crecimiento (Smart y Bloom, 1991). Por otra parte, ni la absorción de NO_3^- ni la de NH_4^+ se veían perjudicadas en genotipos de tomate resistentes al frío.

La compartimentalización de la actividad NR entre las raíces y las hojas también puede variar considerablemente cuando sometemos a las plantas a tratamientos de frío y, además, esto afecta a la concentración de NO_3^- foliar, como ha sido indicado por Lawlor y cols. (1987). Por otro lado, la actividad NR era mayor en raíces de cebada sometidas a bajas temperaturas que en raíces desarrolladas a temperaturas óptimas. Además, esta actividad NR permanecía elevada durante el período de oscuridad, mientras que las raíces tratadas a temperaturas óptimas no mostraban actividad alguna durante este período (Deane-Drummond y cols., 1980). Ya que la NR es una enzima inducible por el sustrato, el nivel intracelular de NO_3^- en el pool activo juega un importante papel en la regulación de la actividad de esta enzima (Ruiz y cols., 1999a; Ruiz y Romero, 1999a). Como hemos indicado anteriormente, las bajas temperaturas dan lugar a una reducción en la captación de NO_3^- por las raíces, lo que podría ser la causa de la disminución de la actividad NR bajo estas condiciones (Walsh y Layzell, 1986). Sin embargo, y contrariamente a estos resultados, en ciertos casos se ha observado un incremento en la absorción de N por parte de las raíces bajo condiciones de bajas temperaturas (Vogel y Dawson, 1991). Estos autores demostraron que en cultivos de aliso negro (*Alnus glutinosa*) con dos semanas de tratamiento a temperaturas de 1-4°C la absorción de N aumentaba, y era durante el período de oscuridad cuando la actividad NR en raíces y en hojas jóvenes sufría el mayor incremento,

comparándolas con plantas de la misma especie que no habían sufrido este tipo de estrés térmico. Estos autores sugirieron que esto podría ser debido a que las bajas temperaturas podrían estar ejerciendo un efecto positivo sobre la naturaleza constitutiva de la enzima NR, provocando su sobreexpresión.

A pesar de los numerosos estudios realizados en relación a los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de absorción y distribución del N en plantas bajo condiciones de estrés, aún nuestro conocimiento sobre los mismos es incompleto, debido a que existe poca información sobre los mecanismos moleculares, los sistemas de proteínas sensibles a la concentración endógena de NO_3^- , las señales de transducción ambiental, los NO_3^- como inductores de proteínas reguladoras, genes que se transcriben como resultado de su inducción por NO_3^- o NH_4^+ , etc. Además, serían necesarios estudios más detallados sobre la naturaleza de los transportadores y translocadores de NO_3^- y NH_4^+ , la regulación de la NR y otras enzimas que actúan en el metabolismo nitrogenado bajo condiciones de estrés térmico.

3.2.5. Temperaturas elevadas

Como hemos indicado anteriormente, una temperatura excesivamente alta va a afectar negativamente al crecimiento y producción de una planta, a la germinación de sus semillas, e incluso podrían inducirse un elevado número de alteraciones metabólicas. Este aumento de temperatura también afecta a la absorción de nutrientes desde el suelo, debido a que las enzimas implicadas en su asimilación ven disminuida su actividad considerablemente (Polissety y Hagemann, 1989; Oaks y cols., 1990).

La diferencia entre las temperaturas día/noche está íntimamente relacionada con la absorción de NO_3^- por las plantas, así como las diferencias térmicas que se producen durante el periodo de luz. Polissety y Hagemann (1989) observaron que durante el período de luz un aumento en la temperatura

ambiental en cultivos de maíz conducía a una disminución de la absorción de NO_3^- , así como a una inhibición del desarrollo de la raíz y de la parte aérea.

La distribución de N a los distintos órganos vegetales se ve afectada también por un aumento de la temperatura de crecimiento de la planta. Así, por ejemplo, Hafeez y cols (1991) observaron que el contenido en N en la parte aérea disminuía debido a un aumento de la temperatura de 30 a 41°C, comparándolas con plantas control desarrolladas a 30°C.

Con respecto a las actividades de las enzimas implicadas en la asimilación del N, cabe decir que todas ellas se ven seriamente afectadas por las altas temperaturas. Por ejemplo, la actividad nitrato reductasa (NR), principal enzima responsable de la absorción y asimilación del N, es muy sensible a los cambios térmicos, de tal manera que temperaturas por encima del óptimo de crecimiento de una determinada especie vegetal afectan negativamente a nivel de NR endógeno y, además, pueden llegar a provocar su inhibición (Chandra y Pareck, 1990). El grado de inactivación o disminución del nivel endógeno de esta enzima depende a su vez del rango de temperatura óptima permitido por la especie vegetal (Srivastava, 1980).

Chandra y Pareck (1990) observaron que en plantas de mijo un incremento de la temperatura de 28 a 38°C causaba más de un 60% de inhibición de la actividad NR en estado vegetativo y un 30% de reducción de la misma en período de antesis o floración. De la misma forma, cultivos de maíz desarrollados entre 18 y 20°C mostraron seis veces más actividad NR que el mismo cultivo desarrollado a 28-30°C (Newbould, 1989). En cultivos de cebada, la inducción de la actividad NR no tuvo lugar cuando las siembras fueron realizadas a 41°C (Jackson, 1978). Sin embargo, aún está por investigar si temperaturas excesivamente elevadas causan una inactivación, una disminución de la síntesis o un aumento en la degradación de la enzima NR.

Entre las enzimas implicadas en la asimilación del NH_4^+ , la glutamina sintasa (GS) parece ser la más sensible a las altas temperaturas, considerando previamente que la enzima glutamina deshidrogenasa (GDH) es estable al calor en un intervalo que va desde los 50 a los 70°C en muchas especies de plantas (Sharma y Garg, 1985). Esta estabilidad de la enzima GDH parece ser debida a una importante adaptación de las plantas que se desarrollan a temperaturas tales que serían capaces de asimilar el NH_4^+ a través de la ruta GDH y no GOGAT/GS que sería lo más normal. Numerosos trabajos indican cómo un estrés por calor causaba un serio daño sobre las enzimas GS y GOGAT, provocando una inhibición de la asimilación del NH_4^+ a través de esta ruta (Mifflin y Lea, 1980; Turner y Kramer, 1980).

3.2. ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS RICOS EN NITRÓGENO BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS TÉRMICO: PROLINA Y COMPUESTOS AMONIO CUATERNARIOS

Existen una gran cantidad de compuestos ricos en N que son acumulados en las células vegetales bajo situaciones de estrés ambiental. Numerosos libros y revisiones detallan los efectos y consecuencias del estrés medioambiental sobre la acumulación de dichos compuestos (Paleg y Aspinall, 1981; Galston, 1984). Los compuestos nitrogenados que normalmente son acumulados bajo situaciones de estrés ambiental incluyen aminoácidos proteicos (arginina, prolina, lisina, histidina, glicina y serina), aminoácidos no proteicos (citrulina y ornitina), amidas (glutamina y asparagina), diaminas (Agmatina y putrescina) y poliaminas (espermina y espermidina). Estos compuestos son denominados comúnmente *solutos compatibles* (Johnson y cols., 1968), ya que, aún siendo acumulados a elevadas concentraciones, no interfieren ni inhiben la actividad de otras enzimas celulares. Es más, los solutos compatibles actúan como potentes protectores de enzimas y membranas frente al efecto deletéreo

causado por la desestabilización iónica inducida bajo cualquier situación de estrés ambiental (Yancey y cols., 1982).

De esta manera, la acumulación de solutos compatibles podría definirse como una adaptación metabólica producida por un amplio número de especies vegetales tolerantes a un tipo de estrés determinado, sugiriendo la evolución convergente de todas ellas (Wyn Jones y Storey, 1981; Yancey y cols., 1982; Rhodes y Hanson, 1993).

La función atribuida por los científicos a la acumulación de estos compuestos en las células vegetales es diversa, y depende del tipo de estrés bajo el cual son acumulados. Aspinall y Paleg (1981) detallaron una serie de causas por las que estos compuestos eran acumulados, como son su participación en la hidratación de biopolímeros, utilización como fuente de energía reutilizable tras su degradación gracias a sus esqueletos carbonados existentes en su estructura química, y como una forma de almacenaje de N durante períodos de condiciones de crecimiento no óptimas.

Por su importante acumulación en células vegetales durante el estrés térmico y por su función sobre la regulación de los procesos fisiológicos celulares alterados bajo estas condiciones, en este trabajo nos centraremos en la acumulación de prolina y compuestos amonio cuaternarios en condiciones de temperaturas extremas.

3.2.1. ACUMULACIÓN DE PROLINA

La acumulación de prolina representa una de las respuestas metabólicas comunes en la mayoría de plantas superiores bajo condiciones de déficit hídrico. La prolina es un aminoácido altamente soluble que es acumulado a niveles osmóticamente significativos en todos los órganos vegetales. Adicionalmente a esta función como osmoportector, la acumulación de prolina

bajo situaciones de estrés ambiental puede servir para la obtención de poder reductor y como fuente de N (Blum y Ebecon, 1976). Así, la degradación de prolina da lugar a la producción de glutamato, el cual actúa como fuente de N para la síntesis de otros aminoácidos. Además, también puede actuar como fuente de energía primaria para favorecer el crecimiento (Hong-gu y cols., 1982). Por último, la acumulación de prolina tiene la ventaja sobre la acumulación de otros compuestos de no interferir con las reacciones bioquímicas del metabolismo celular (Bohnert y cols., 1993) y de servir como agente protector de muchas enzimas y estructuras celulares muy importantes para el metabolismo vegetal (Schobert y Tschesche, 1978).

En plantas superiores, la prolina puede ser sintetizada a partir del glutamato o de la ornitina (Schubert y Boland, 1990; Delauney y Verma, 1993) (Figura 5). El **ciclo del glutamato** (Figura 6) se inicia con la fosforilación del L-glutamato a L-glutamil fosfato, gracias a la actividad de la enzima *γ-glutamil kinasa* (γ -GK). Posteriormente, el L-glutamil fosfato es transformado en glutamil semialdehído (GSA) por la enzima *glutamil semialdehído deshidrogenasa* (GSA-DH). Finalmente, este GSA, mediante una reacción espontánea se transforma en Δ -*pirrolina-5-carboxilato* (P5C), el cual es reducido por la enzima *Δ -pirrolina-5-carboxilato-reductasa* (P5CR) a *prolina* (Delauney y cols., 1993; Zhang y cols., 1995). El ciclo de síntesis de la prolina a partir de ornitina se inicia mediante la transformación del aminoácido ornitina en GSA, gracias a la acción de la enzima *ornitina aminotransferasa* (OAT) (Delauney y Verma, 1993; Hare y cols., 1999) y, posteriormente el GSA se incorpora al ciclo de síntesis de prolina descrito anteriormente. Recientemente se ha descubierto una nueva enzima implicada de forma directa en la síntesis de prolina: *Δ -pirrolina-5-carboxilato-sintetasa* (P5CS), enzima bifuncional, ya que es capaz de funcionar como una γ -GK o como una GSA-DH (Delauney y Verma, 1993; Andersen y cols., 1995; Hare y cols., 1999).

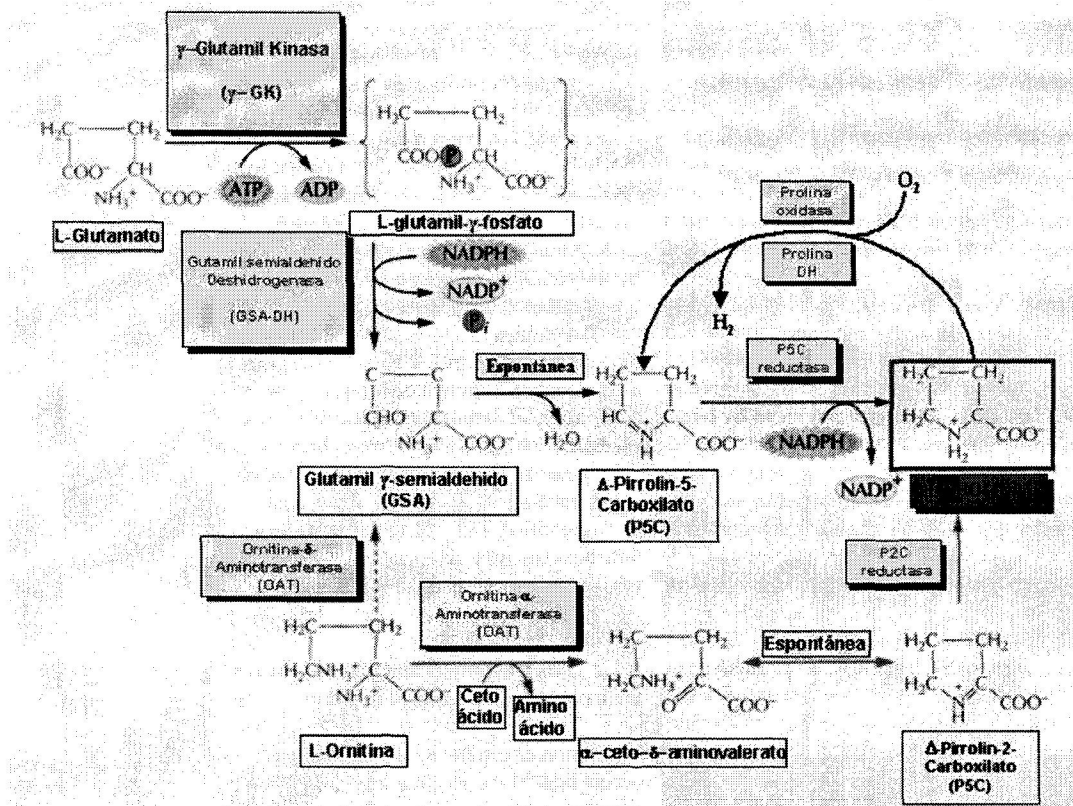


Figura 6. Síntesis y oxidación de la prolina en plantas superiores

La acumulación de prolina en las células vegetales puede ser debida a: (1) disminución en la degradación de este aminoácido, debida a una inhibición de las enzimas encargadas de la oxidación del mismo, como son la *prolina oxidasa* (PO) y *prolina deshidrogenasa* (PDH) (Figura 6); (2) aumento en la síntesis de prolina, principalmente a partir de glutamato; (3) por conversión de otros aminoácidos, tales como la ornitina; (4) por un descenso en la síntesis de proteínas; y, finalmente, (5) por hidrólisis de proteínas ricas en prolina o hidroxiprolina.

Aún es desconocido si la acumulación de prolina se produce a través de una modulación metabólica o mediante una modulación térmica de las enzimas relacionadas con el metabolismo de este aminoácido (Simon y cols., 1986).

3.2.1.1. Acumulación de prolina a bajas temperaturas

La acumulación de prolina está relacionada, en la mayoría de los casos, con la reducción de la hidratación de los tejidos, lo que se produce con especial importancia en aquellas situaciones donde la temperatura actúa como principal factor de estrés (Charest y Phan, 1990).

Es lógico pensar que un incremento en los niveles de prolina suele ir acompañado por un aumento en la proteólisis y/o una disminución de la síntesis de proteínas (Singh y cols., 1973). Sin embargo, Cloutier (1983), y en contraposición con Singh y cols. (1973), indicaron que la síntesis de proteínas era mayor durante la aclimatación al frío en plantas de trigo, especialmente en la variedad "trigo de invierno", sugiriendo que el contenido y naturaleza de esas proteínas podría jugar un papel importante en los procesos de resistencia al frío.

En cuanto a la vía de síntesis de la prolina, Shevyakova (1984) observó que la síntesis de ácido glutámico, principal precursor de la prolina, era más elevada en aquellas situaciones donde existía un incremento en la síntesis de prolina. La actividad GDH, enzima que transforma el α -cetoglutarato en ácido glutámico, incrementaba sorprendentemente cuando las plantas de trigo eran sometidas a una temperatura de 5°C, lo que podría explicar la capacidad de estas plantas para acumular prolina (Shevyakova, 1984).

Charest y Phan (1990) estudiaron la acumulación de prolina y las actividades de las principales enzimas implicadas en esta acumulación en distintas variedades de trigo cultivadas a bajas temperaturas. Estos autores postularon que la aclimatación al frío de estas plantas implicaba una acumulación de prolina, como consecuencia de un descenso en el contenido hídrico y un aumento en el contenido de proteínas solubles. Además, para las dos variedades de trigo utilizadas en este experimento, la aclimatación al frío supuso una modulación de las propiedades enzimáticas de la PDH, enzima

implicada en la oxidación de la prolina, y un aumento de la actividad OAT. Este último resultado hizo pensar que, en plantas de trigo, la aclimatación al frío viene determinada por un aumento en la concentración de prolina, la cual era sintetizada vía ornitina (Charest y Phan, 1990).

Recientemente, Ruiz y cols. (2002) examinaron la relación entre el metabolismo de la prolina y la actividad de la enzima NAD kinasa bajo condiciones de bajas temperaturas. En estos ensayos, los autores observaron que las plantas mostraban una acumulación de prolina, de manera que las actividades de las enzimas OAT y PDH determinaban la acumulación de este aminoácido. Además, encontraron una relación altamente positiva entre la actividad NAD kinasa y el metabolismo de la prolina, sugiriendo que la respuesta de aclimatación de las plantas a las bajas temperaturas iba precedida de un incremento en la actividad de esta enzima.

Por lo tanto, la acumulación de prolina producida a bajas temperaturas no parece ser debida a una modulación enzimática de la PDH, sino más bien a un gran aumento en la síntesis de este aminoácido, principalmente vía OAT, y en la de sus principales precursores (ácido glutámico).

3.1.1.2. Acumulación de prolina a elevadas temperaturas

Las restricciones en el crecimiento y desarrollo de los cultivos, así como su productividad, causada por las altas temperaturas se hace especialmente importante en las regiones áridas y semiáridas de todo el mundo. Bajo estas condiciones, las pérdidas de agua en la planta que se producen como consecuencia de las altas temperaturas suelen convertirse en otro factor limitante, convirtiéndose la acumulación de prolina, en estas condiciones, en una de las estrategias de adaptación de las plantas más importantes al ambiente dominante (Nover y cols., 1984; Vierling, 1991; Guo y Oosterhuis, 1995).

El papel protector y osmorregulador de la prolina ha sido demostrado en muchas investigaciones. Kuznestov y Shevyakova (1997) indicaron que la adición de hidroxiprolina, un inhibidor de la biosíntesis de prolina, al medio de crecimiento de *Nicotiana sylvestris* desarrollada a elevadas temperaturas, daba como resultado un grave descenso en la acumulación de prolina y, por tanto, una disminución de la tolerancia a las altas temperaturas de esas plantas. Esto les llevó a sugerir que la prolina participaba del fenotipo de termotolerancia. Estos mismos autores también demostraron que, bajo condiciones de estrés salino, la prolina también ofrecía un papel protector frente a la hipertermia. Teniendo en cuenta que la salinidad y las altas temperaturas son dos factores de estrés que generalmente van ligados en muchas de las regiones áridas y semiáridas del mundo, la acumulación de prolina se presenta como el mejor candidato para hacer frente a estas condiciones (Kuznestov y Shevyakova, 1997).

Recientemente, se ha demostrado que la prolina se acumula significativamente en *Gracilaria tenuistipitata* desarrollada a 35°C, temperatura muy por encima de los límites de supervivencia de esta especie, y que bajo estas condiciones la planta era capaz de sobrevivir un tiempo indeterminado (Lee y cols., 1999). Estos mismos autores también mostraron que una exposición prolongada de *Gracilaria tenuistipitata* a 35°C provocaba una importante reducción en el índice de crecimiento, indicando que esta temperatura era estresante para la planta, aunque bajo esas condiciones continuaba sobreviviendo. Por otro lado, el constante nivel de proteínas solubles encontrado indicaba que la proteólisis podría estar implicada en la acumulación de prolina a 35°C. Adicionalmente a esta proteólisis, Chang y Lee (1999) observaron que la actividad PDH, enzima oxidante de la prolina, disminuía significativamente a esta temperatura. Esto parece sugerir que la inhibición de la oxidación de este aminoácido también era un factor importante en la acumulación de prolina libre producida en estas plantas. Camacho y González (1998) implicaron a la enzima PO en la supervivencia y tolerancia de las plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L.) al

estrés hídrico causado como consecuencia de las altas temperaturas. Estos autores establecieron una correlación positiva entre el contenido de prolina y la tolerancia a la sequía.

Por último, la estimulación de la síntesis de prolina por una estimulación simultánea de las actividades OAT, P5CR y P5CS, en combinación con aumentos en la proteólisis e inhibición de la oxidación de este aminoácido, son factores determinantes en la acumulación de prolina bajo condiciones de altas temperaturas (Charest y Phan, 1990; Koster y Lynch, 1992; Hare y cols., 1999). Sin embargo, la acumulación de prolina puede resultar inútil en la adaptación al estrés térmico si no existe un perfeccionamiento de las características de los procesos adaptativos de la planta, tales como el balance metabólico, la biosíntesis de otros osmolitos y la consecuente modificación y adaptabilidad de las membranas a las nuevas condiciones ambientales (Santos y Ochoa, 1990; Bohnert y cols., 1995).

3.2.2. ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS AMONIO CUATERNARIOS

Cuando observamos el desarrollo de una planta en un ambiente estresante es difícil distinguir entre respuestas metabólicas con un valor adaptativo (es decir, aquellas respuestas vegetales elaboradas frente a un ambiente determinado, las cuales contribuyen a mantener el crecimiento y supervivencia de una planta) y aquellas respuestas que poseen un efecto deletéreo o simplemente son consecuencias accidentales del estrés sobre la planta. Esas situaciones deberían ser esbozadas antes de usar cualquier criterio metabólico en la elaboración de proyectos o investigaciones basadas en la mejora de la resistencia vegetal al estrés (Hanson y Nelsen, 1978).

El papel de la acumulación de compuestos amonio cuaternarios (CAC) bajo estrés ha sido revisado extensamente en la última década (Wyn Jones y Storey, 1981; Anthoni y cols, 1991; Rhodes y Hanson, 1993; Gorham, 1995).

Estos compuestos incluyen a glicinabetaínas, colina-O-sulfato, β -alaninabetaína, prolinabetaína e hidroxiprolinabetaína. Todos ellos poseen sus grupos metilo sustituidos por un átomo de nitrógeno, creando una carga positiva permanente en el N y un grupo carboxilo cargado negativamente (en el caso de las betaínas) o en el grupo sulfato (en el caso de la colina). Los CAC se acumulan en plantas sometidas a estrés a unos niveles relativamente elevados ($> 5 \mu\text{mol g}^{-1}$ p.s.) y, generalmente, y al igual que la prolina, son considerados como *solutos compatibles* por las mismas razones nombradas en la definición de éstos.

La función de los CAC como osmoprotectores fue demostrada mediante la estimulación del crecimiento de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia Coli* en un medio salino (Strom y cols., 1983; Hanson y cols., 1991; 1994a). Similarmente, se ha demostrado que la glicinabetaína y compuestos estructuralmente relacionados están implicados en la estabilización de enzimas y membranas (Rhodes y Hanson, 1993), así como en la protección de las mismas (Kishitani y cols., 1994; Nomura y cols., 1995).

La glicinabetaína, uno de los CAC más importantes en la protección de las plantas frente al estrés, es sintetizada mediante dos pasos de oxidación a partir de la colina vía betaína-aldehído. La colina ejerce su función principal como precursor de la fosfatidil colina, compuesto dominante en la membrana fosfolipídica de eucariotas (Rathinasabapathi, 2000). Pese a esto, una amplia proporción de colina libre es derivada a la producción de glicinabetaína en plantas que acumulan de forma natural este compuesto en respuesta al estrés. En plantas, la oxidación de la colina implica la participación de distintas enzimas, como son la *colina monooxigenasa* (CMO), enzima dependiente de ferredoxina, y la *betaína-aldehído deshidrogenasa* (BADH) (Figura 7) (Brouquisse y cols., 1989; McCue y Hanson 1992).

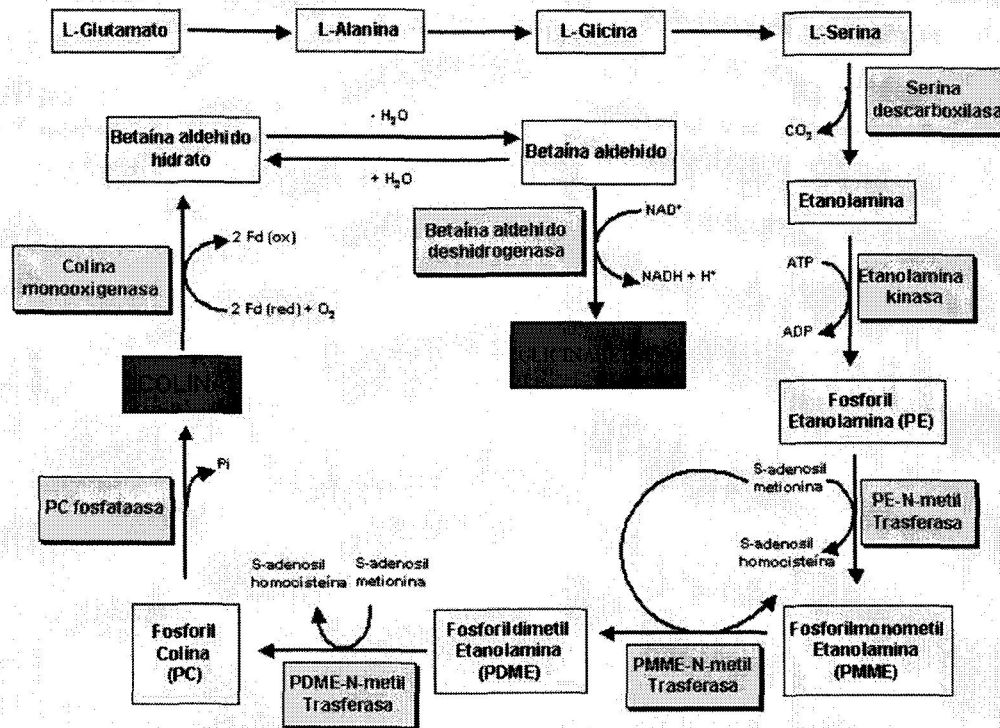


Figura 7. Síntesis de colina y glicinbetaina en plantas superiores

Se ha demostrado que, tanto la CMO como la BADH, son enzimas estromáticas e inducibles bajo condiciones de estrés ambiental (Trossat y cols., 1997; Vojtechova y cols., 1997).

Se ha demostrado que la aplicación exógena de ABA no ejercía efecto alguno sobre los niveles de GB (Landfald y Strom, 1986), inversamente a lo que sucede con otros compuestos, como la prolina, cuya síntesis se ve aumentada por la aplicación exógena de esta hormona, lo que indicaría que la regulación de la síntesis de los CAC es distinta a la de la prolina.

En los últimos años se han descrito una serie de funciones adicionales para los CAC, tales como:

