

RELACION ENTRE RESISTENCIA DE PAPA A HELADAS Y DIFERENCIAS
CUALITATIVAS EN PROTEINAS

TESIS

PRESENTADA AL PROGRAMA DE ESTUDIOS PARA GRADUADOS
UNIVERSIDAD NACIONAL-INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO

POR:

ELIZABETH HODSON DE JARAMILLO

Como requisito parcial para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

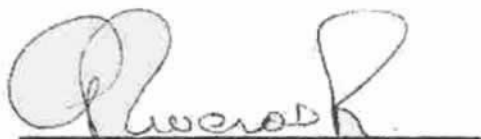
Bogotá, Colombia

1973

TESIS APROBADA POR:

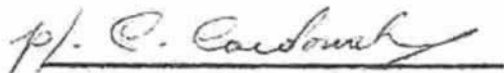
COMITE CONSEJERO

GUILLERMO RIVEROS R.

Handwritten signature of Guillermo Riveros R. in cursive script, underlined.

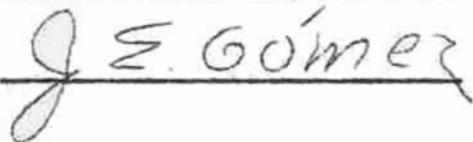
Ph.D.

NELSON ESTRADA R.

Handwritten signature of Nelson Estrada R. in cursive script, underlined.

Ph.D.

JOSE ELIECER GOMEZ R.

Handwritten signature of Jose Eliecer Gomez R. in cursive script, underlined.

Ph.D.

" El presidente de tesis y el consejo examinador de grado no serán responsables de las ideas emitidas por el candidato" .

Artículo 217 de los estatutos de la Universidad Nacional.

AGRADECÍMIENTOS

Al doctor Guillermo Riveros R. por su permanente entusiasmo, orientación y apoyo.

Al doctor Nelson Estrada R. por su gentil colaboración.

Al doctor José Eliecer Gómez R.

Al Programa de Fisiología Vegetal del Instituto Colombiano Agropecuario - Tibaitatá

Al Programa de Tuberosas del Instituto Colombiano Agropecuario-Tibaitatá.

Al departamento de Horticultura de la Universidad Minnesota.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

A MI ESPOSO

CONTENIDO

	Pag.
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 Procesos físicos y químicos	5
2.2 Teorías de daño por congelación y consecuencias de los cambios físicos y químicos en las células.....	9
2.2.1 Relación de daño celular con los eventos del congelamiento.....	17
2.3 Mecanismos de resistencia a heladas.....	18
2.3.1 Crecimiento de la planta con relación a resistencia	21
2.3.2 Bajas temperaturas y formación de hielo.....	22
2.3.3 Cambios protoplasmáticos.....	24
2.3.3.1 Núcleo y ácidos nucleicos.....	26
2.3.3.2 Proteínas y aminoácidos.....	27
2.3.3.3 Actividad enzimática.....	30
2.4 Electroforesis en gel de acrilamida.....	32
III. MATERIALES Y METODOS	35
3.1 Material vegetal utilizado.....	35
3.2 Toma y preparación de las muestras.....	36
3.3 Análisis de proteínas totales.....	37

	Pag.
3.4 Preparación del extracto de proteína.....	37
3.5 Separación de las proteínas por electroforesis.....	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	44
4.1 Evaluación de resistencia o susceptibilidad de los clones.....	44
4.2 Porcentaje de proteínas totales.....	44
4.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	48
V. CONCLUSIONES	65
RESUMEN	66
BIBLIOGRAFIA.....	68

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
FIGURA 1. Preparación y polimerización de las columnas de gel de acrilamida para efectuar la electroforesis.....	40
FIGURA 2. Geles de acrilamida y equipo completo listo para efectuar la electroforesis.....	42
FIGURA 3. Patrones electroforéticos de proteínas solubles de tejido foliar de tres clones de papa procedentes del cruzamiento 60-177-7, con diferente susceptibilidad a heladas.....	50
FIGURA 4. Caracterización de las bandas y zonas proteínicas.....	51
FIGURA 5. Patrones electroforéticos de proteínas solubles de tejido foliar de tres clones de papa procedentes del cruzamiento 60-177-7, con diferente susceptibilidad a heladas.....	52
FIGURA 6. Patrones electroforéticos de proteínas solubles de tejido foliar de tres clones de papa procedentes del cruzamiento 60-177-7, con diferente susceptibilidad a heladas.....	53
FIGURA 7. Patrones electroforéticos de proteínas solubles de tejido foliar de tres clones de papa procedentes del cruzamiento 60-177-7, con diferente susceptibilidad a heladas....	54

- FIGURA 8. Patrones electroforéticos de proteínas solubles de tejido foliar de tres clones de papa procedentes del cruzamiento 60-177-7, con diferente susceptibilidad a heladas..... 55
- FIGURA 9. Patrones electroforéticos de proteínas solubles de tejido foliar de tres clones de papa procedentes del cruzamiento 60-177-7, con diferente susceptibilidad a heladas..... 56
- FIGURA 10. Patrones electroforéticos de proteínas solubles de tejido foliar de tres clones de papa procedentes del cruzamiento 60-177-7, con diferente susceptibilidad a heladas..... 57
- FIGURA 11. Patrones electroforéticos de proteínas solubles de tejido foliar de tres clones de papa procedentes del cruzamiento 60-177-7, con diferente susceptibilidad a heladas..... 58
- FIGURA 12. Diferencias en patrones electroforéticos entre clones de papa del cruzamiento 60-177-7 de diferente susceptibilidad a heladas..... 61
- FIGURA 13. Diferencias en patrones electroforéticos entre clones de papa del cruzamiento 60-177-7 de diferente susceptibilidad a heladas..... 62

LISTA DE TABLAS

Pag.

TABLA 1. Tabla de distribución de frecuencia de los grados de susceptibilidad a bajas temperaturas de una progenie del híbrido 60-177-7.....	45
TABLA 2 Porcentaje de proteínas totales de clones de papa de la línea 60-177-7.....	46

I. INTRODUCCION

Uno de los factores ambientales que limita la producción del cultivo de la papa en la región andina son los descensos de temperatura a niveles inferiores al punto de congelación del agua, los cuales si son muy severos, llegan a ser letales.

El uso de variedades resistentes evitaría las pérdidas debidas a las heladas. Sin embargo es necesario contar con métodos adecuados de selección con el fin de acelerar la obtención de genotipos capaces de resistir los descensos de temperatura. El conocimiento de las bases fisiológicas de las relaciones entre las actividades de las plantas y el ambiente facilita la adopción de métodos que permitan evaluar gran cantidad de genotipos y seleccionar los que posean características deseables.

Las diferencias genéticas entre individuos deben manifestarse por medio de variaciones en actividades metabólicas asociadas con distinta cantidad o tipo de proteínas, especialmente enzimas.

Hay varias hipótesis con respecto a la naturaleza del daño causado por las heladas y los mecanismos de resistencia. Lo más aceptado es que sea una interacción de factores y condiciones de desarrollo en el momento de sufrir la helada. Las proteínas juegan un papel básico en ésta resistencia y son el centro de

varias hipótesis sugeridas para explicar resistencia a heladas. Las proteínas protoplasmáticas, estructurales y enzimáticas, parecen estar íntimamente involucradas en los procesos metabólicos y físicos responsables de aclimatación (5). Es probable que las más importantes sean las proteínas enzimáticas, metabólicamente activas y que determinan la mayoría de propiedades del protoplasma en un momento dado.

Las hipótesis mencionadas están basadas en las propiedades de las proteínas y varias de sus funciones en la célula. En esta forma, se aduce que diferencias en el contenido de proteínas pueden causar variaciones en: continuidad de la membrana, grado de hidratación, viscosidad y elasticidad protoplasmática, permeabilidad, estabilidad de sistemas enzimáticos, a más de las variaciones metabólicas a diferente cantidad y tipo de enzimas.

Puesto que las diferencias genéticas deben manifestarse en variaciones en los tipos de proteínas, tanto estructurales como metabólicas, si es posible detectar los cambios en ellas asociados con diferencias en grados de resistencia a bajas temperaturas, será posible utilizar este método para comparar un gran número de genotipos y seleccionar por resistencia. Las proteínas presentes en un extracto de plantas pueden ser separadas por varios métodos. Entre ellos se encuentran los que utilizan las dife -

rencias en propiedades físicas y electroquímicas como es el de la electroforesis. Después de caracterizar los patrones electroforéticos para plantas con diferente grado de susceptibilidad a bajas temperaturas, podrían ser utilizados como un método de selección y para suministrar información que contribuya a la comprensión de los sistemas de resistencia.

El presente trabajo tiene por objeto establecer por medio de electroforesis, las diferencias detectables en proteínas que puedan ser responsables o estar involucradas en los mecanismos de resistencia a bajas temperaturas.

II. REVISION DE LITERATURA

Los estudios de resistencia a heladas se han realizado desde hace alrededor de un siglo (1). A pesar del gran número de investigaciones los mecanismos asociados con resistencia a bajas temperaturas han permanecido oscuros.

Mazur (40) indica que esto es debido a que no se ha intentado establecer la relación entre los eventos fisicoquímicos relacionados con el congelamiento y sus consecuencias biológicas. Sos tiene además que una de las fallas ha sido tratar de buscar un mecanismo individual de resistencia cuando en realidad la congelación celular implica varios eventos.

Se sabe que el congelamiento de los tejidos es un proceso físico y biológico complejo que involucra muchos eventos, varios de los cuales pueden causar lesión y muerte celular. El daño ocasionado por el congelamiento depende de la naturaleza y el estado interno de las células, así como de las condiciones de congelamiento y descongelamiento. Existe la posibilidad de que en diferentes etapas del proceso se produzcan cambios desfavorables en la estructura y funciones, muchos de ellos irreversibles y que como resultado produzcan la muerte de la célula. También es posible que células de diferentes características respondan

en forma distinta a un mismo cambio y que las diferencias en respuesta esten asociadas con variaciones en las propiedades físicas y químicas del protoplasma.

Antes de entrar a discutir los posibles mecanismos de resistencia es conveniente hacer una revisión sobre los procesos físicos y químicos asociados con el congelamiento; las relaciones de estos eventos con los cambios celulares y su posible asociación con los daños ocasionados.

2.1 PROCESOS FISICOS Y QUIMICOS

Al presentarse un descenso de temperatura por debajo del punto de congelación, mientras mayor sea el potencial de agua, ésta se congela más rápidamente o sea que a medida que la concentración de solutos o coloides es mayor, será necesario un mayor descenso de la temperatura para producir congelamiento. Por lo general, el agua de los espacios intercelulares contiene menos solutos y por consiguiente se congela más fácilmente que el agua intracelular. A medida que la temperatura decrece, una mayor proporción del agua en los espacios intercelulares se convierte en hielo. Al producirse congelación exterior, el potencial de agua se hace menor que el del agua intracelular y ocurre difusión del agua de la célula hacia los espacios intercelulares donde se congela. Este movimiento continuado de agua hacia el exterior del protoplasma, causa su deshidratación y al mismo

tiempo disminuye su punto de congelación. La deshidratación resultante, ocasiona aumento de la concentración de los solutos intracelulares y precipitación de los mismos y disminuye la separación espacial de las macromoléculas.

Si la membrana celular es lo suficientemente permeable, la célula se deshidratará al grado requerido para mantener un bajo contenido de agua en el protoplasma en tal forma que no se produzca congelación intracelular, Si la membrana no es lo suficientemente permeable la difusión para lograr el equilibrio será muy lenta y al descender la temperatura se sobreenfría hasta que se equilibra por congelamiento interno. Esta formación intracelular de cristales de hielo, de acuerdo con Levitt (29, 32) es casi siempre letal para la célula. Sin embargo varias condiciones deben cumplirse antes de que ocurra formación de hielo en el protoplasma.

Se ha postulado (1, 40), en general, que puede haber descensos de temperatura por debajo del punto de congelación del protoplasma sin que este se congele debido a que es necesaria la presencia de cristales inductores que faciliten la cristalización. En muchos casos no se observa congelación dentro de la célula a temperaturas más altas que -10°C , o sea que la célula permanece sobreenfriada sin congelar. Una explicación para el sobreenfriamiento es que la membrana celular impide que haya formación in -

terna de hielo por encima de ciertas temperaturas debido a que a esas temperaturas el tamaño de los cristales de hielo presentes en los espacios intercelulares es demasiado grande para pasar por las cribas o poros de las membranas, o sea que los cristales de hielo lo suficientemente pequeños para pasar a través de las membranas tienen puntos de fusión inferiores a las temperaturas de sobreenfriamiento.

La velocidad a la cual desciende la temperatura también ejerce influencia sobre la congelación y el sobreenfriamiento. Si el descenso de temperatura es lo suficientemente lento como para permitir el movimiento de agua hacia fuera del protoplasma se pueden alcanzar temperaturas bastante bajas sin que ocurra congelación intracelular. Se ha calculado que en células enfriadas a una velocidad de descenso de temperatura de 10°C por minuto o menos, el protoplasma a temperaturas inferiores a -15°C no contiene agua sobreenfriada, esto es, se habrá deshidratado hasta alcanzar el equilibrio con la presión de vapor externa. Células enfriadas a velocidades mayores contienen cantidades mayores de agua sobreenfriada, por lo cual la posibilidad de congelamiento intracelular es mayor. Lo anterior indica que el congelamiento intracelular solo es posible por encima de cierta velocidad de enfriamiento y que el valor numérico de la velocidad crítica de enfriamiento difiere entre células y depende principalmente de

la permeabilidad de la célula al agua. A mayor permeabilidad, mayor será la velocidad crítica de enfriamiento.

Por lo general, se considera que mientras mayor sea la cantidad de agua del protoplasma, mayor será la posibilidad de formación de hielo intracelular. Por esta razón con descensos rápidos de temperatura que no permitan difusión del agua hacia el exterior, serán mayores las posibilidades de formación de cristales en el protoplasma.

A medida que mayor cantidad de agua se va convirtiendo en hielo durante el enfriamiento, la solubilidad de algunos electrolitos intra o extracelulares se sobrepasará y estos se precipitarán. Si las solubilidades varían, la precipitación diferencial de electrolitos puede causar cambios en el pH. Hay evidencia de que la congelación progresiva de una solución causa no solo aumento en la concentración de solutos sino también un cambio en su composición y en su pH.

Por debajo de cierta temperatura o zona de temperaturas toda el agua libre se convertirá en hielo y se precipitarán todos los solutos. Una célula por debajo de estas temperaturas contiene una solución muy concentrada, cuya composición iónica y pH son muy diferentes al normal.

Los cristales de hielo pequeños o no esféricos tienen mayor energía libre superficial que cristales esféricos grandes (40,43), lo cual hay tendencia de los primeros a ser convertidos en los segundos, proceso conocido como recristalización o crecimiento granular. La recristalización no requiere la existencia de líquido y puede ocurrir en estado sólido o sea a temperaturas por debajo de las cuales toda el agua se ha congelado.

Cuando ocurren heladas en condiciones naturales estas se presentan por lo general en la hora en que la pérdida de radiación es máxima o sea poco antes del amanecer. Después del amanecer la radiación incidente produce calentamiento. Este calentamiento causa fusión progresiva de la solución externa cristalizada, lo cual ocasiona aumento de la presión de vapor del agua externa por encima de la interna. Como resultado de este desequilibrio habrá flujo de agua hacia el interior de la célula aumentando la hidratación del protoplasma. La rata de hidratación depende de la velocidad de calentamiento y de la permeabilidad de la membrana celular. Esta velocidad de rehidratación también puede influir en la susceptibilidad de una planta a bajas temperaturas por cuanto puede someter la célula a tensiones físicas.

2.2 TEORIAS DE DAÑO POR CONGELACION Y CONSECUENCIAS DE LOS CAMBIOS FISICOS Y QUIMICOS DE LAS CELULAS.

La forma como el congelamiento causa muerte a las células no se

conoce definitivamente. Durante mucho tiempo se pensó que la muerte era causada por el aumento de volumen del agua congelada el cual produciría rompimiento de las membranas celulares (39). - En muchas ocasiones no se observa aumento del volumen de los tejidos al ocurrir el congelamiento y por ésta causa se han involucrado otros cambios que ocurren durante la congelación y descongelación como responsables del daño y muerte de las células.

Indudablemente hay un tipo de daño mecánico que está asociado con la formación de cristales en los tejidos vegetales (congelación intracelular) (Levitt, 28, 29; Olien 43; Stuckey y Curtis 60; Vasil'yev 61). El daño en este caso parece ser determinado principalmente por dos factores: la formación del hielo intracelular y el crecimiento subsecuente de ese hielo durante la descongelación (recristalización). Los cristales causan daño mecánico a la ultraestructura celular, lo cual puede ocasionar la muerte de las células.

Muchos investigadores han estudiado y tratado de determinar otras causas de lesión celular. El daño por congelamiento extracelular está íntimamente ligado con la deshidratación del protoplasma resultante de la formación de hielo en los espacios intercelulares (40). La manera como ésta deshidratación puede causar daño

permanente al protoplasma ha dado lugar a varias hipótesis (58): Van Sachs en 1873 postuló la teoría de precipitación de proteínas diciendo que la concentración del protoplasma aumenta con la salida de agua hasta tal punto que las proteínas no pueden permanecer en dispersión y comienzan a coagularse. La coagulación debida a mayor concentración de electrolitos también puede acompañar a la debida a deshidratación. Iljin en 1933 propuso su teoría de daño mecánico según la cual la salida de agua de la célula somete al protoplasma a tensiones físicas que producen su rompimiento.

Levitt (29, 30, 32) al estudiar los efectos de la congelación en tejidos de repollo y Saxifraga, encontró que al enfriar las células por debajo de su temperatura letal media (TL_{50}) había un descenso en el contenido de sulfhidrilos y un aumento de disulfuros; estos cambios hallados constituyen evidencia para soportar su hipótesis sulfhidrilo-disulfuro respecto a resistencia o susceptibilidad a bajas temperaturas. Sugiere que el daño por congelamiento se debe a rompimiento de enlaces protoplasmáticos que resultan de tensiones locales que surgen de la formación de hielo. Ha postulado que el daño por heladas se debe a un desdoblamiento y denaturalización de proteínas protoplasmáticas que resulta de la formación de enlaces disulfuro entre moléculas de proteínas.

Las células que se enfrían lentamente y no se congelan intrace -

lularmente se equilibran por deshidratación la cual produce varios tipos de alteraciones físicas (40) cada una de las cuales puede ser responsable de daño. Algunas de esas alteraciones son: reducción del contenido de agua celular, aumento de la concentración y consecuente precipitación de solutos, plasmólisis, cambios en el pH, reducción de la separación espacial de macromoléculas, alteración de las propiedades de las membranas. Varios de estos cambios pueden causar la denaturalización irreversible de las proteínas la cual llevaría a una desorganización completa del metabolismo y por tanto del funcionamiento normal del protoplasma. La deshidratación severa causa muerte celular y a veces el citoplasma se contrae alrededor del núcleo y se rompen las fibras del protoplasma entre células, los coloides pierden su agua estructural. También pueden ocurrir cambios químicos irreversibles fatales a la célula. Puede ocurrir daño mecánico cuando los espacios intercelulares son muy pequeños. Todo esto se traduce en manifestaciones macroscópicas como necrosis del tejido.

Los cambios en pH ocasionan modificación de la actividad enzimática: puede ocurrir inactivación o activación selectiva de enzimas proteolíticas y hay interferencia con las rutas metabólicas. Si los cambios en el pH son muy drásticos puede haber denaturalización de proteínas.

No se puede pretender asociar con un solo evento los cambios pro-

ducidos en los procesos metabólicos, actividad enzimática y en general con las propiedades protoplasmáticas ya que todos los efectos de la deshidratación están interrelacionados y pueden ser varios los responsables de la lesión.

El congelamiento también involucra tensiones como las que se crean a medida que se forma hielo en los espacios intercelulares; la forma o patrón de redistribución del agua que acompaña la formación de hielo en los espacios intercelulares depende de la estructura y composición del tejido, el contenido de humedad y las condiciones bajo las cuales se efectúa la congelación. Diferentes tipos de redistribución se asocian con diferentes tipos de tensión. La resistencia puede involucrar modificación de algunas tensiones por producción de algunas sustancias que alteren el patrón de redistribución.

También hay resistencia a otras tensiones debida a la mayor elasticidad y plasticidad protoplasmática lo cual permite tolerar mayor distorsión. Otro tipo de tensión es debida a congelamientos sucesivos. De acuerdo con Olien (43) son muchos los aspectos de redistribución respecto a estado y localización del agua que están involucrados en un proceso simple de congelación. Cada aspecto de redistribución está asociado con uno o más tipos de tensión y pueden ocurrir varias tensiones simultáneas. El efec-

to de cada tensión depende de las condiciones individuales de la planta.

Varios investigadores han estudiado el daño en las células y sus diferentes componentes; según Shikama (53) los ácidos nucleicos aparentemente no son lesionados por el congelamiento; existen además varias enzimas solubles resistentes a las bajas temperaturas, sin embargo hay algunas proteínas que pierden su actividad y se disocian a bajas temperaturas.

Procesos como la fotofosforilación pueden ser inactivados. Heber (15) encontró que el congelamiento de las membranas desacopla la fotofosforilación del transporte de electrones e inactiva la ATPasa dependiente de la luz y que requiere tiol. Dice que todas las actividades que requieren energía pueden protegerse contra esa inactivación por adición de sacarosa antes del congelamiento. Sugiere que el desacople de la fosforilación del transporte de electrones es causado por interferencia del congelamiento con una estructura involucrada en la formación de un estado de alta energía no fosforilado de los cloroplastos. Se puede suponer que el congelamiento desacopla esto por prevención de la formación de un gradiente de pH a través de las membranas debido a salida de protones a través de ellas. El daño básico parece consistir en la alteración de las propiedades de permeabilidad. Heber concluye que la inactivación de la fotofosforilación

se debe más a daño en las membranas que a inactivación de las enzimas.

Williams y Meryman (63) estudiaron el daño por congelamiento en gránulos de cloroplastos de espinaca y encontraron que los gránulos se lesionan por el mismo mecanismo y el mismo grado de deshidratación y reducción de volumen que daña las células animales. Gránulos protegidos o resistentes eluden el daño porque permiten una entrada reversible de solutos lo que previene deshidratación excesiva.

Levitt (29) presenta una revisión de procesos de congelación en plantas sometidas a bajas temperaturas. Describe las curvas de congelación de tejidos vegetales como una disminución gradual de temperatura hasta un punto de enfriamiento (sobreenfriamiento) seguido por un aumento pronunciado en la temperatura hasta el primer punto de congelación; otra baja en la temperatura a un segundo "plateau" que representa un segundo punto de congelación a medida que el hielo continua formándose. Se ha sugerido (1) que el primer punto de congelación resulta de la congelación de hielo extracelular y el segundo, de la congelación del agua intracelular. El sobreenfriamiento de los contenidos celulares aumenta su resistencia a bajas temperaturas, sobre todo si es persistente y si las heladas son cortas y moderadas. Es decir, puede

proveer un mecanismo de resistencia cuando la disminución de temperatura no es tan severa y lo permite.

Olien (42) dice que la estructura de los cristales extracelulares es el factor más importante que afecta el mecanismo inicial de daño en la corona de cebada. Masas de cristales de hielo pequeñas e imperfectas causan poco daño, pero masas de cristales perfectas y grandes son destructivas. Observó tres tipos de congelación de acuerdo con la resistencia de la planta. En uno, el agua intracelular disminuye gradualmente con la congelación porque el agua libre se difundía fácilmente de los protoplasmas como respuesta a la reducción en la presión de vapor de los espacios intercelulares a medida que se forma el hielo. En este tipo de congelación no hay daño celular. En el segundo tipo, el tejido no resistente tenía un alto contenido de humedad que se congelaba con facilidad. Este tipo de congelamiento generalmente presenta daño mecánico porque ocurre rápidamente y las células no se contraen. El tercer tipo de congelación es característico de tejido tierno, se forma hielo dentro de las células, el cual rompe las membranas celulares y libera el contenido celular a los espacios intercelulares.

Uno de los aspectos interesantes de daño por heladas en plantas superiores es que la TL_{50} frecuentemente está influenciada por la

velocidad de calentamiento o descongelamiento. Células enfriadas a altas velocidades se lesionan más cuando el calentamiento es lento que cuando es rápido. Parece haber influencia de potencial osmótico y rehidratación (1, 40). La rehidratación debe ser lo suficientemente lenta como para permitir que se vaya estableciendo un equilibrio entre el agua que entra y los solutos que salen. Los daños causados durante el descongelamiento difieren y son independientes de los causados durante el congelamiento.

2.2.1 Relación de daño celular con los procesos del congelamiento.

Como el congelamiento y el descongelamiento involucra gran número de procesos interdependientes, la labor de determinar cuál de ellos es responsable del daño es difícil. Cuando se obtiene poca supervivencia con enfriamiento lento el daño puede deberse a una exposición prolongada a altas concentraciones de solutos o a niveles críticos de deshidratación. Cuando el enfriamiento es más rápido, el período de exposición a condiciones adversas es más corto, pero si es demasiado rápido aumenta la posibilidad de congelación intracelular. A velocidades de enfriamiento mayores de 10°C por minuto las consecuencias letales del hielo interno sobrepasan la acción benéfica de un menor tiempo de exposición.

La velocidad de calentamiento influye porque afecta el grado de

la recristalización: si es lenta, la recristalización es máxima y el daño es máximo (40,43).

Varias teorías tratan de asociar el daño causado por la congelación con eventos físicos o químicos simples, tales como, la alta concentración de electrólitos la remoción del agua de estabilización o la reducción del volumen de la célula a un nivel crítico o a la formación de puentes disulfuro (29,40). Estas teorías básicamente explican el daño en base a la deshidratación y no hacen distinción entre congelación intracelular y extracelular. Siempre son varios los procesos que ocurren en una helada y ninguna de éstas hipótesis unitarias puede dar una explicación clara y completa del daño ocasionado a los tejidos. Es necesario tener en cuenta todos los eventos y las condiciones individuales de la célula para interrelacionarlos y poder establecer la causa del daño.

2:3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A HELADAS

La supervivencia de una planta a bajas temperaturas generalmente se debe a su habilidad de soportar las condiciones desfavorables. La distinción entre una planta resistente y una susceptible involucra, entre otros, una diferencia básica en los procesos iniciales de congelación. La facilidad con que se forma hielo dentro del protoplasto es un índice de susceptibilidad o

resistencia. En la mayoría de las plantas resistentes la cristalización del agua se restringe a los espacios intercelulares (32,43,55,58,61).

Chandler (3) define la resistencia al frío como la habilidad de las plantas para sobrevivir a las condiciones adversas causadas por el congelamiento y esa habilidad depende en gran parte del estado de desarrollo de la planta. La resistencia de una planta debe estar asociada con su tolerancia a las condiciones perjudiciales y su habilidad de ciertos cambios o de adaptación para poder tolerarlos.

Como son varios los factores que pueden causar daño, son también varias las características celulares asociadas con la resistencia a heladas. Entre éstas características pueden citarse: la resistencia a deformaciones o al daño mecánico causado por los cristales de hielo, lo cual puede estar asociado con mayor elasticidad y plasticidad del protoplasma y éstas a su vez relacionadas con la permeabilidad y viscosidad del mismo. Resistencia a la deshidratación excesiva la cual está relacionada con el potencial osmótico, el agua ligada, el agua libre, la actividad de las membranas; la resistencia a cambios de pH y concentración iónica, relacionada principalmente con actividad enzimática y estabilidad de las proteínas y macromoléculas protoplasmáticas, lo cual influye directamente en los procesos metabólicos en la

adaptación. *

La mayor parte de la investigación respecto a heladas en plantas superiores se ha relacionado con los factores fisiológicos que inducen resistencia y los cambios bioquímicos involucrados (1,2, 29,40,62). Por ejemplo, se ha establecido que la resistencia en algunos casos es inducida por los factores que reducen el crecimiento vegetal; también se han relacionado cambios en resistencia con variaciones en los niveles de ciertas sustancias en las células vegetales una de éstas correlaciones es entre resistencia y altas concentraciones de azúcar especialmente sacarosa (29,36,44,48,64). Este comportamiento puede ser explicado por un mayor potencial osmótico, lo cual al disminuir el punto crioscópico evita hasta cierto punto la congelación intracelular; también podría estar asociado con la cantidad de agua ligada o adsorbida y posiblemente con otros aspectos. Entre otras condiciones o compuestos que se han relacionado con resistencia se encuentran pH, proteínas solubles (21), contenido de azúcares y antocianinas (44), fósforo, diferencias en tipos de aminoácidos y ácidos orgánicos (36). A pesar de las correlaciones encontradas con resistencia, aún permanece el interrogante respecto a la manera como los diferentes factores actúan. Además no se conoce con certeza qué características de la planta son determinantes de la resistencia y cuáles son secundarios.

2.3.1 Crecimiento de la planta con relación a resistencia.

Como se ha visto, la resistencia es algo complejo que involucra muchos aspectos, entre ellos el estado de desarrollo (3,28,29,61) y las características específicas de la planta.

Se ha observado inducción de resistencia por condiciones que reducen el crecimiento vegetal activo como temperaturas cerca o bajo 0°C y fotoperíodos cortos (19,20,23,27,36). En términos generales se ha establecido que la resistencia se relaciona inversamente con la succulencia del tejido, entre más succulento sea el tejido es más susceptible a los efectos de las temperaturas bajas. Las giberelinas reducen o inhiben el establecimiento de resistencia y compuestos con propiedades de retardar el crecimiento de cómo el ácido abscísico y AMO 1618 permiten la inducción de resistencia bajo condiciones en las que normalmente no aparecería (20,28,38).

El caso típico de adquisición de resistencia al frío o aclimatación es el que presentan muchas plantas de zonas con estaciones. Al llegar el otoño y debido a las condiciones ambientales de esta estación se van produciendo variaciones de adaptación a la estación de frío que se aproxima. La mayoría de las plantas de zonas templadas necesitan como prerrequisito para el desarrollo de resistencia al frío un cese en el crecimiento de la planta el cual

muchas veces es inducido por días cortos y bajas temperaturas por encima del punto de congelación (no extremas) (17,28,38,49,51,61) En términos generales (1) puede decirse que las plantas de las regiones templadas son susceptibles a las heladas durante el período de crecimiento activo y que adquieren resistencia inducida por los cambios en las condiciones ambientales, debidos a las estaciones (temperaturas y fotoperíodo). Por lo anterior puede decirse que el otoño preacondiciona a la planta para la estación rigurosa. En zonas tropicales se puede decir que el crecimiento influye en el grado de resistencia y susceptibilidad y que varía ampliamente entre especies de plantas. En condiciones de campo ésta resistencia no puede inducirse como es el caso de zonas con estaciones y depende exclusivamente de las propiedades fisiológicas inherentes.

2.3.2 Bajas temperaturas y formación de hielo.

Según se había discutido, con la formación de hielo pueden ocurrir daños y cambios fisicoquímicos irreversibles, letales al protoplasma. Se ha estudiado la formación de hielo en células y tejidos con técnicas ultrarápidas de fotografía. Hudson e Idle (18) encontraron que el hielo se forma gradualmente en el tejido subhipodérmico de papas resistentes después de haberse formado en el tejido vascular. En especies no resistentes encon-

traron que la formación de hielo era simultánea en los tejidos vascular y subhipodérmico.

Single (57) estudió la formación de hielo en tejido de trigo y encontró que la cristalización inicial ocurría con inoculación de núcleos de hielo atmosférico. A ciertas temperaturas críticas (-3 a -5°C) el tejido permanecía sin congelar si la atmósfera era seca.

Sakai (48) por su parte demostró que ramas jóvenes de plantas resistentes sobrevivieron al ser transferidas a N líquido desde temperaturas subcero mayores. Lo anterior demuestra que las células resistentes tienen mayor permeabilidad al agua, de acuerdo con Levitt (29) y que esta mayor permeabilidad les permite ser enfriadas más rápido sin que haya congelamiento intracelular.

También tiene gran importancia la velocidad de descongelación de la célula. Sakai (50) ha sugerido que la congelación en dos etapas protege por prevención de formación de hielo intracelular. Encontró que cuando la velocidad de enfriamiento era de cerca de 100°C por minuto, la supervivencia disminuía y era mayor esa disminución con congelamiento lento que con rápido. Estos datos están de acuerdo con la opinión de Mazur (40) de que muerte por encima de ciertas velocidades de enfriamiento se asocia con la formación de hielo intracelular y que la nocividad del hielo

intracelular depende la cantidad de recristalización que ocurra durante el calentamiento, siendo mayor a calentamiento lento.

2.3.3 Cambios protoplasmáticos.

No es mucha la información disponible respecto a cambios físicos que ocurren en las células expuestas a temperaturas bajas para que adquieran resistencia. Parker (45) presenta una revisión de literatura respecto a cambios en la viscosidad del protoplasma y hace énfasis en que aunque el citoplasma puede ser fluido, puede haber variaciones y describe cambios protoplasmáticos en respuesta a bajas temperaturas. Tumanov, citado por Alden y Hermann (1) discute cambios en las propiedades físicas del protoplasma durante la adquisición de resistencia y hace énfasis en la importancia de la "gelación" de la planta durante la adquisición de la resistencia. Esta gelación es promovida por la agregación y cohesión de moléculas y protege a la célula de la deformación mecánica, la deshidratación y la formación de hielo intracelular, al reducir la movilidad y orientación de las moléculas de agua. Además reduce la actividad bioquímica del protoplasma y los efectos nocivos de la concentración de solutos.

Hay muchos estudios respecto a cambios o síntesis de ciertas sustancias en la célula como forma de aclimatación o asociados con resistencia. Siminovičh y Briggs (56) observaron una rela-

ción entre resistencia y contenido de proteínas solubles de los tejidos en la corteza de algarrobo. Estudios posteriores demostraron lo mismo en alfalfa y otras plantas (12,21,36). El aumento en contenido de proteínas solubles frecuentemente está acompañado por un aumento en RNA (21). También se han mencionado otros componentes de los tejidos que se correlacionan con resistencia como DNA (21), dinucleótido de nicotinamida adenina (NADP) (27), antocianinas (44), ciertos ácidos orgánicos (22,36). Kuiper (26) estudió la composición de lípidos de alfalfa en relación con resistencia al frío y encontró que las plantas resistentes se caracterizaban por contenidos altos de diglicéridos de mono y digalactosa y fosfatidilcolina y etanolamina. Levitt y sus colaboradores han encontrado correlaciones tanto positivas como negativas entre contenidos de sulfhidrilo (SH) y disulfuro (S-S) de los tejidos con resistencia a heladas (24,31,52). Generalmente el contenido de sulfhidrilo aumenta en los estados iniciales de resistencia y en ocasiones decrece en los estados posteriores. Heber y Santarius (16) indican que altas concentraciones de electrólitos o de iones específicos dañan las membranas de los cloroplastos, y que la sacarosa puede proteger coligativamente reduciendo las concentraciones de electrólitos; adicionalmente las proteínas pueden actuar por protección de los sitios susceptibles en la membrana contra la acción de niveles altos de ciertos iones.

Es posible que en algunas plantas la resistencia a heladas se deba a la presencia de glucosa, en otras a la presencia de ciertas proteínas y en otras aún a la presencia de otras sustancias, pero hasta ahora no se conocen bien las causas y naturaleza de las lesiones producidas por el congelamiento y por consiguiente las bases de resistencia son inseguras.

Así, Levitt (29) pone de relieve que la caña de azúcar con su alto contenido de sacarosa es una de las plantas más susceptibles a las heladas. Se ha observado que la resistencia del algarrobo no se relaciona con contenido de azúcar y Parker (44) no encontró correlación entre resistencia de Hedera sp. y la cantidad de proteínas solubles.

Además de las correlaciones entre aspectos bioquímicos y resistencia hay correlaciones con eventos fisiológicos. Se ha encontrado por ejemplo, mayor permeabilidad al agua de las células resistentes. Kuiper (25) observó que la aplicación de ácido decenilsuccínico, el cual aumenta la permeabilidad de las células vegetales, produce aumentos significativos en cuanto a la resistencia de las plantas al congelamiento.

2.3.3.1 Núcleo y ácidos nucleicos.

Li y Weiser (34) han postulado que el aumento en el con-

tenido de ácidos nucleicos es la primera etapa en los procesos de degradación de carbohidratos, aminoácidos, proteínas, lípidos y compuestos fosfatados relacionados con adquisición o inducción de resistencia a bajas temperaturas (35). También sugieren que el RNA soluble el cual alcanza su concentración máxima antes que otros ácidos nucleicos en el otoño, puede regular la síntesis posterior de RNA mediante un sistema represor-inductor, cuyos productos o substratos se acumulan a bajas temperaturas posiblemente porque las enzimas que catalizan su síntesis son más activas en esas condiciones que las que catalizan su degradación. De esta manera la resistencia al frío dependería de la capacidad genética del organismo para inducir y reprimir ciertas enzimas, así como de las diferencias en el Q_{10} de las reacciones bioquímicas y la temperatura ambiental que determina la concentración de los productos o substratos que pueden estar asociados con el control de la resistencia.

2.3.3.2 Proteínas y aminoácidos.

Aunque los componentes más abundantes de las plantas son los carbohidratos, las proteínas son el constituyente básico del protoplasma y juegan un papel vital en los procesos metabólicos. Además las proteínas, junto con los lípidos y los carbohidratos son utilizados como fuente de energía para las plantas. Parker (45)

ha investigado el metabolismo vegetal y el desarrollo de resistencia y ha encontrado relaciones con proteínas.

Se ha tratado de relacionar variaciones en contenido de Nitrógeno con resistencia. Desafortunadamente y de acuerdo con Levitt (29) los métodos empleados inicialmente eran inadecuados y fue necesario utilizar técnicas más refinadas para el análisis de sustancias nitrogenadas individuales. Siminovitch y Briggs (56) encontraron que la concentración de proteínas solubles en agua aumentaba en la corteza del algarrobo durante el otoño, al tiempo que aparecía o aumentaba la resistencia al frío. Asimismo observaron que disminuía durante el verano, esta observación los llevó a postular que en alguna forma las variaciones en proteínas solubles estaban asociadas con diferencias en resistencia. Posteriormente otros investigadores observaron la misma tendencia y es así como Alden y Hermann (1) citan varios trabajos en los cuales se ha asociado aumento de proteínas solubles en agua con resistencia al frío, por ejemplo en té, se ha observado que la proteína soluble de la planta de té aumentaba con resistencia a heladas y que las variedades con mayor contenido de proteína soluble en las hojas eran las más resistentes.

Craker, Gusta y Weiser (5) han sugerido que las proteínas están involucradas en la resistencia de plantas leñosas al frío,

porque en tejido en reposo sometido a temperatura de subcongelación variaba el patrón electroforético de proteínas. Sycheva et al, citados por Alden y Hermann (1) asocian la resistencia de hojas de papa con el pH del tejido y con la reorganización de proteínas. Ellos observaron que las heladas causan aumento del pH de los tejidos foliares, extensión de la zona isoeléctrica de las proteínas celulares y un aumento de las proteínas solubles en agua en estados iniciales de crecimiento. Lo anterior proporciona evidencia de que durante la inducción de resistencia a heladas ocurre síntesis de proteínas.

Siminovitch (54) encontró un aumento de RNA sin que hubiera incremento de DNA previo a la incorporación de glicina marcada a proteínas, síntesis neta de proteínas y resistencia a heladas en células del parénquima de corteza de algarrobo. La incorporación de glicina marcada a proteína soluble verifica el hecho de que hay síntesis de proteína involucrada. El aumento de RNA puede producir síntesis de proteínas solubles específicas que promueven resistencia a heladas por medio de reacciones determinadas que estimulan síntesis o degradación en algunos componentes del protoplasma.

El cambio en propiedades físicas del protoplasma como parte del mecanismo de resistencia permite al protoplasma resistir tensio-

nes de deshidratación resultantes del congelamiento intercelular. Li y Weiser (33) encontraron aumento en RNA ribosomal y soluble antes del desarrollo de resistencia. La síntesis rápida de RNA soluble puede ser inducida por reguladores de crecimiento endógenos. Estos investigadores sugieren que el RNA soluble con o sin aminoácidos unidos puede funcionar como regulador de la síntesis de RNA y proteína como etapa inicial del proceso de adquirir resistencia mediante el sistema represor-inductor propuesto en modelos de bacterias.

2.3.3.3 Actividad enzimática.

La mayoría de trabajos han confirmado que plantas resistentes a heladas tienen mayor energía enzimática que plantas no resistentes y que las ratas de reacciones catalizadas enzimáticamente no descienden tan rápido al descender la temperatura (61). Gerloff et al (12) han encontrado cambios en proteínas relacionados con resistencia, al igual que Coleman (4) y han asociado este aumento de proteína soluble total con aumento de actividad de enzimas específicas. También se puede asociar la activación de enzimas específicas con niveles altos de NADPH como los encontrados por Kuraishi et al (27) quienes asumen que este metabolito evita la formación de enlaces disulfuro por prevenir la oxidación de los grupos sulfhidrilos. Por su parte, Lyons y

Raison (37) han observado una disminución inmediata de respiración en mitocondrias de tejidos susceptibles a bajas temperaturas .

Hasta la aparición de la hipótesis de Levitt de sulfhidrilo-disulfuro respecto a daño y resistencia de plantas a heladas, no se contaba con una explicación sobre los cambios químicos conducentes a la denaturalización de las proteínas después del congelamiento. De acuerdo con la teoría sulfhidrilo-disulfuro, la denaturalización de proteínas durante el congelamiento o después de él sería causado por el desdoblamiento de las moléculas a causa de tensiones localizadas inducidas por la formación de nuevos enlaces intermoleculares entre proteínas adyacentes a medida que se aproxima una a otra durante la remoción de agua protoplasmática. Los enlaces intermoleculares son de naturaleza disulfuro y son relativamente estables y resisten su ruptura al retornar el agua a la célula, por lo cual el cambio causado por el congelamiento sería irreversible. Los enlaces intermoleculares disulfuro no son nocivos per si mismos, porque solo hay denaturalización de la proteína cuando la formación de puentes disulfuro es seguida por una tensión en las moléculas de proteína y causa su desdoblamiento.

Según Levitt (29, 30, 32) el mecanismo de resistencia a heladas

es la menor oportunidad de denaturalización de proteínas por impedimento y obstáculo bioquímico y físico para formación de nuevos puentes moleculares disulfuro durante el congelamiento. La formación de puentes disulfuro intermoleculares puede prevenirse mediante protección de los grupos sulfhidrilo con sustancias presentes en los tejidos de las plantas, con sustancias sintetizadas durante el proceso de adquirir resistencia o por cambios en proteínas como la pérdida o enmascare de sus grupos sulfhidrilo mientras que retienen los grupos disulfuro; la pérdida de sus componentes de cisteína y cistina o su desdoblamiento a moléculas más pequeñas.

Siendo las proteínas los agentes que regulan todos los procesos metabólicos y en vista de que variaciones en contenido de proteínas han sido asociadas con resistencia, se puede asumir que algunas de estas variaciones pueden ser utilizadas como índice para seleccionar plantas resistentes a bajas temperaturas. Gerloff et al (12) al estudiar patrones electroforéticos de plantas resistentes y susceptibles encontraron 20 bandas, dos de las cuales presentaban cambios aparentemente asociados con resistencia a heladas.

2.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA

En base a estos conocimientos y a algunas hipótesis se

planeó el presente trabajo para establecer diferencias en patrones electroforéticos de clones de papa de diferente grado de susceptibilidad a heladas considerando principalmente que las plantas en condiciones tropicales no están expuestas a cambios graduales de temperatura y mas bien las variaciones son súbitas por lo cual no sería útil la presencia de genes reprimidos de resistencia y se requeriría mas bien que estos fueran activos permanentemente, lo cual puede ser detectado al determinar las proteínas que se sintetizan bajo su control.

Los métodos y procedimientos utilizados para realizar el trabajo fueron cuidadosamente seleccionados de acuerdo con las experiencias de varios investigadores quienes han encontrado tropiezos en este tipo de trabajo ya que es muy conocida la inestabilidad de las proteínas foliares por la facilidad de autólisis y la actividad proteolítica de las proteínas foliares (41,46,59).

Por ésta razón se seleccionaron como condiciones de extracción: bajas temperaturas, condiciones alcalinas para aumentar la cantidad de proteína extraída (59) y compuestos como el metabisulfito de sodio que ayudan a estabilizar las proteínas (8,59).

La electroforesis se realizó en disco de gel de acrilamida, un método reproducible para separar fracciones de proteínas

vegetales solubles. Este método está basado en la movilidad diferencial de las proteínas en un campo eléctrico por causa de sus diferencias en carga eléctrica en condiciones dadas (pH) y en la acción de tamizado molecular de los geles. Fue desarrollado inicialmente por Ornstein y Davis, y ha sido utilizado por numerosos investigadores (5,6,7,8,9,10,11,13,14,47). Entre las ventajas del método está su rapidez puesto que el tiempo requerido para el análisis completo es menor principalmente porque no es necesario hacer una concentración de proteínas extraídas como la mayoría de métodos usuales y por consiguiente no es necesario utilizar grandes cantidades de muestra de proteína lo cual en ocasiones puede ser limitante. El método permite la utilización de muestras pequeñas y va concentrando los componentes proteínicos de las muestras en zonas iniciales del gel muy delgadas, al utilizar las propiedades de fricción del gel para ayudar a la separación por tamizado molecular (47).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL UTILIZADO

Con el fin de establecer diferencias en patrones electroforéticos característicos para plantas de papa resistentes y susceptibles a heladas, es necesario utilizar o comparar plantas genéticamente similares en vista de que algunos autores han encontrado variación entre las bandas de diferentes híbridos y especies, y han caracterizado los genotipos por medio de estas bandas (6,9,10,11),

Para el presente trabajo se utilizó una progenie del cruzamiento 60-177-7 (Solanum tuberosum ssp Andigena x S. stenotomum x S. stenotomum) obtenida por autofecundación, la cual presentó en una helada natural en el campo una escala de resistencia que variaba desde plantas muy susceptibles hasta plantas resistentes, de acuerdo con la Tabla 1.

Se sembraron en promedio 7 tubérculos de cada clon en materos de 25 cm de diámetro, que contenían una mezcla de suelo esterilizado, formada de 2 partes de suelo por una de arena. Los materos fueron colocados en una casa de malla en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Instituto Colombiano Agro-

pecuario en Tibaitatá, localizado a 2.550 m.s.n.m. y con una temperatura promedio de 12,5°C. Se efectuaron 2 siembras; en Abril 28 y Julio 28 de 1972.

Las prácticas culturales efectuadas fueron: fertilización del suelo con 20 gr de 10-30-10 por matero de 1,5 kg de suelo seco: riego con agua corriente y aplicación a cobertura completa del follaje de pesticidas para control de hongos e insectos (solución Manzate 0,25% y Dibrom 800 al 0,2%).

3.2 TOMA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Se tomaron muestras de follaje en tres estados de desarrollo de la planta: aparición de botones florales, floración completa y 30 días después de la floración o sea, alrededor de 60, 90 y 120 días después de la siembra. Se puso especial atención en no utilizar material que presentara síntomas de infección con virus ya que esto podía interferir con los resultados.

Se colectaron en promedio 5 hojas por planta y se reunieron las hojas correspondientes al mismo clon. Las hojas fueron tomadas de la parte media de la planta, evitando las muy jóvenes y las muy viejas.

Las hojas se lavaron cuidadosamente con agua destilada mientras

estaban aún en la planta; se permitió que secaran espontáneamente y una vez secas se cosecharon y se llevaron inmediatamente a un congelador. Cuando están completamente congeladas se liofilizan. En este caso se utilizó un liofilizador Virtis modelo Unitrap 10-102.

Las muestras deben liofilizarse para estabilizar las proteínas en vista de su gran inestabilidad en los tejidos vegetales verdes. (McCown, 41; Pirie 46; Stahmann 50). Después de liofilizadas las muestras se maceran, se muelen y pueden ser almacenadas en un desecador.

3.3 ANALISIS DE PROTEINAS TOTALES

Se analizó el porcentaje de proteínas totales en base a peso seco (muestra liofilizada) según el método de micro-Kjeldahl.

3.4 PREPARACION DEL EXTRACTO DE PROTEINA

Para facilitar la difusión de las proteínas celulares en la solución se maceran los tejidos. Debido a que las proteínas se degradan fácilmente y a que la temperatura y el pH del medio se encuentran entre los factores que afectan esta degradación, fue necesario adoptar técnicas adecuadas para la extracción y preparación de la muestra (8,59).

La maceración y extracción se efectuaron a baja temperatura para lo cual se trabajó en un cuarto frío mantenido a 4°C. Se tomaron 500 mg de las muestras de hojas liofilizadas y se colocaron en un mortero pequeño de porcelana; sobre la muestra se colocó arena fina previamente lavada con agua destilada en un volumen aproximadamente igual a la mitad del volumen de la muestra. Se agregaron 7 ml de solución buffer a base de Tris (Amino hidroximetil propanediol)-glicina y metabisulfito de sodio, a un pH de 8.7. El metabisulfito de sodio se utilizó para inactivar las enzimas proteolíticas y evitar la degradación de las proteínas (8,59).

El material homogenizado se pasó a tubos especiales y se centrifugó en frío a 15.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido fué el extracto de proteína y se almacenó en el congelador hasta el momento de iniciar la separación electroforética.

3.5 SEPARACION DE LAS PROTEINAS POR ELECTROFORESIS

Se utilizó en general el método de electroforesis en gel de acrilamida desarrollado por Ornstein y Davis con la modificación introducida por Reisfeld et al (47) con el cual diferentes investigadores han obtenido una excelente separación de proteínas a partir de muestras pequeñas en mezclas complejas de proteínas

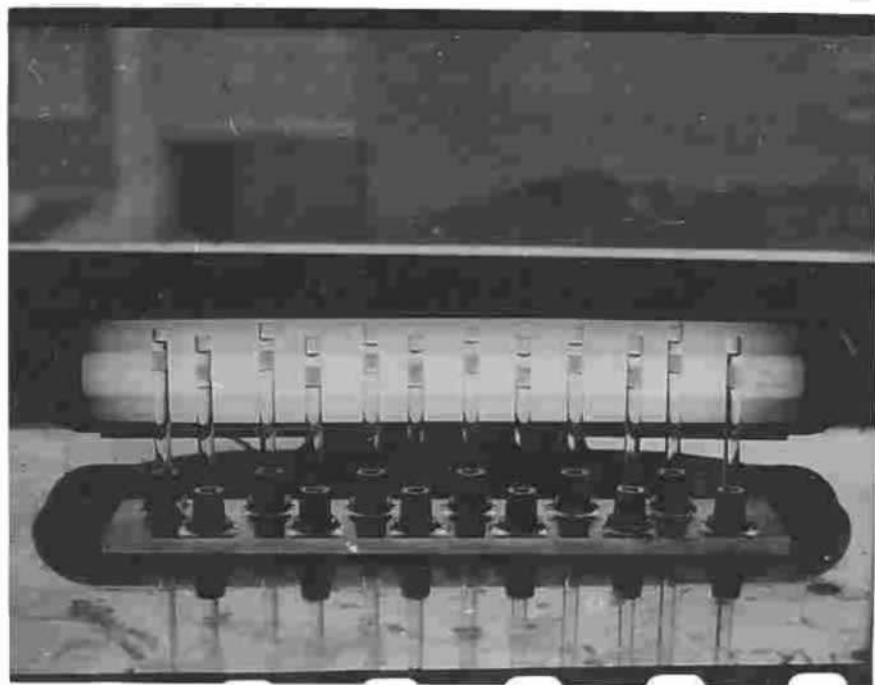
y péptidos.

La mezcla de proteínas es colocada sobre una columna de gel de acrilamida y al aplicarse un potencial eléctrico, las diferentes proteínas se mueven a velocidad característica la cual depende de sus cargas eléctricas superficiales, del pH, y del tamaño y peso molecular.

La columna de gel se prepara en tubos de vidrio huecos los cuales se insertan en receptáculos de caucho mientras se prepara y polimeriza el gel (Fig 1). Primero se llenan con gel de poro pequeño (acrilamida 7.5%). Esta solución fresca se cubre lenta y cuidadosamente con una capa de agua y se le permite polimerizar. Una vez solidificado el gel se remueve la capa de agua y se añade una capa de 8 mm de gel espaciador de poros más grandes (acrilamida 3.3%) y se agrega otra capa de agua. Se colocan los tubos frente a una lámpara fluorescente hasta que el gel se polimeriza completamente. Una vez polimerizado, se remueve la capa de agua y la columna queda lista para efectuar la separación electroforética de las proteínas.

La parte superior de los tubos que contienen las columnas se inserta en la base de un recipiente circular perforado que se llena de solución buffer. La parte inferior se introduce en otro recipiente también con solución buffer. En cada uno de

FIGURA 1. Preparación y polimerización de las columnas de gel de acrilamida para efectuar la electroforesis.

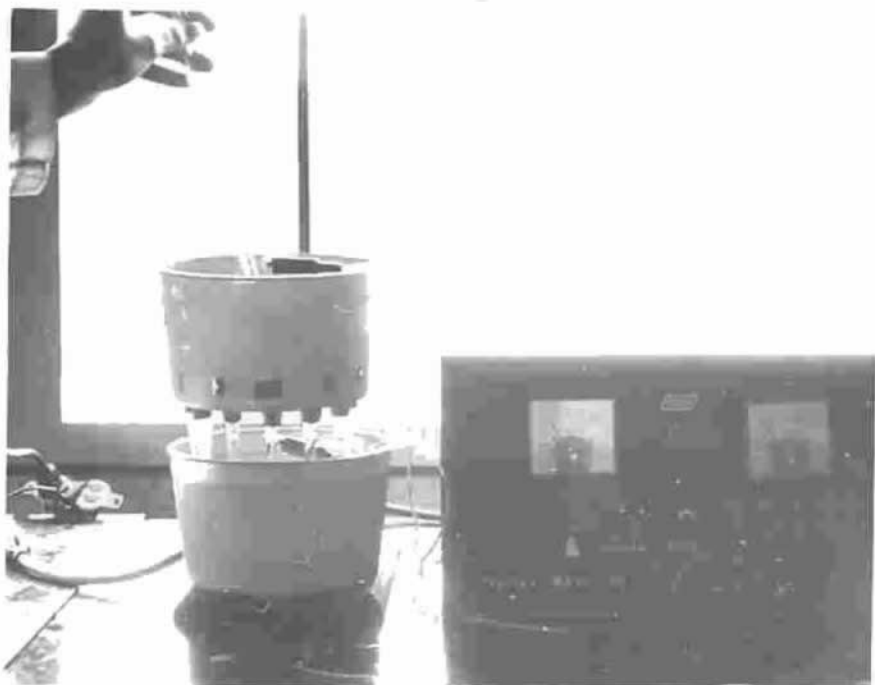


estos recipientes va un electrodo. Los recipientes con el buffer se colocan en un incubador, a 4°C , en estas condiciones se agrega a la parte superior de la columna, 0.3 ml de una solución de partes iguales del extracto de proteína y sacarosa saturada y se conecta la fuente de corriente (Fig 2). La sacarosa se agrega con el fin de hacer más pesada la muestra lo cual evita que se disperse en el buffer (47). Las muestras se colocaron por duplicado y se analizaron por lo menos cinco veces.

Varios autores (6,7,8,9,10,47) aconsejan utilizar una corriente de 5 miliamperios (mamp) por tubo, pero en este caso se trabajó con alrededor de 40 mamp para los 12 tubos y una diferencia de potencial de 400 voltios.

Inicialmente se utilizó el colorante azul de Bromofenol mezclado con el extracto de proteína para observar el desplazamiento de la muestra y calcular así el tiempo de duración de la electroforesis. Bajo las condiciones en que se realizaron las pruebas fue necesario mantener la corriente 1 hora y 45 minutos. Al cabo de este tiempo se retiraron los tubos y cuidadosamente se desprendieron las columnas de gel con la ayuda de una jeringa y aguja hipodérmica, usando agua destilada.

FIGURA 2. Geles de acrilamida y equipo completo listo para efectuar la electroforesis.



Los geles, fueron colocados en tubos de ensayo individuales y se colorearon con anilina azul-negro al uno por ciento, disuelta en ácido acético del 7 por ciento. Se permitió colorear por 45 minutos; al cabo de este tiempo se removió el colorante con agua destilada y se decoloraron mediante lavados con ácido acético al 7 por ciento.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 EVALUACION DE RESISTENCIA O SUSCEPTIBILIDAD DE LOS CLONES

La progenie del cruce 60-177-7 sembrada en el campo sufrió una helada natural de -5.8 C por 3 horas y se evaluó la resistencia o susceptibilidad de los clones en base a porcentaje de follaje necrosado después de la helada. Se observó una escala completa de valores de variación en resistencia, desde plantas resistentes hasta plantas muy susceptibles.

La distribución de frecuencias de resistencia o susceptibilidad se observa en la Tabla 1.

4.2 PORCENTAJE DE PROTEINAS TOTALES

Se analizó el porcentaje de proteínas totales del primer y segundo muestreo. Los resultados se pueden observar en la Tabla 2.

Al comparar los resultados obtenidos en contenido de proteínas totales (Tabla 2) entre grupos de clones de diferente susceptibilidad en la misma época de desarrollo, no se encontraron diferencias notables. Los promedios obtenidos, de acuerdo con la tabla de distribución de frecuencias fueron:

TABLA 1. Distribución de frecuencia de los grados de susceptibilidad a bajas temperaturas de una progenie del cruce 60-177-7.

% follaje necrosado	Número del clon
0	30
5	20,26
10	38,49
15	39
20	2, 23, 50
25	19
30	8, 32, 33, 37, 51
40	1, 5, 6, 12, 31, 35, 40, 53, 55, 57, 58, 59.
45	15, 17
50	3, 4, 36, 41, 54
60	7, 14, 16, 25, 52
65	13
70	9,10,18,24,27,44, 56,60
80	11,22,34,45,46,47
85	21
90	29
95	28, 42, 43, 48

La evaluación se realizó visualmente en porcentaje de follaje necrosado después de una helada natural de $-5,8^{\circ}\text{C}$ por tres horas, el 16 de Febrero de 1972.

TABLA 2. Porcentajes de proteínas totales de clones de papa procedentes del cruce 60-177-7 según el método de micro-Kjeldahl en dos épocas de desarrollo

No. clon	60 días	90 días
1	23.4	33.2
2	28.3	35.7
3	24.2	33.9
4	26.8	33.8
5	25.8	33.7
6	24.6	34.4
7	25.3	34.2
8	27.1	33.7
9	22.9	36.3
11	28.2	37.5
12	29.9	35.3
16	27.5	37.7
19	22.7	34.3
20	24.9	32.8
21	30.5	36.1
23	26.8	36.3
25	24.6	35.0
27	25.3	33.1
28	26.2	38.8
29	24.8	36.3
30	29.9	40.0
31	23.2	32.6
33	32.5	37.0
34	23.1	36.1
37	27.0	39.6
38	24.0	30.5
39	26.8	39.2
40	25.6	34.7
41	29.7	37.4
47	25.9	39.6
50	24.6	33.1
51	29.3	39.6
53	33.9	39.1
54	23.3	34.3
56	20.5	30.1
58	25.2	35.3
60	30.2	39.2

	Proteínas totales	
	60 días	90 días
Plantas con susceptibilidad de 0 a 30%	26.9%	35.1%
Plantas con susceptibilidad de 40 a 60%	26.2%	35.0%
Plantas con susceptibilidad de más del 90%	25.8%	36.3%

Es interesante anotar que se observó mucha variabilidad en el contenido de proteínas totales entre todos los clones, independientemente de su grado de resistencia. No se analizaron de nuevo las muestras por escasez de material, el cual prefirió reservarse para los estudios electroforéticos.

Como los resultados obtenidos en los primeros análisis fueron inconsistentes y poco indicativos y por limitación de muestra, se decidió no analizar el contenido de proteínas totales en el tejido a los 120 días. De todas maneras se sugiere que en futuros trabajos se hagan nuevos análisis de proteínas. Los resultados sugieren que si la resistencia está asociada con proteínas esta diferencia es principalmente cualitativa y no cuantitativa. Varios investigadores (5,12,44,56) han encontrado aumento en el contenido de proteína soluble durante el proceso de la adquisición de resistencia al frío de varias plantas, lo cual parece indicar que este proceso está asociado con la activación de una o varias proteínas solubles, metabólicamente activas.

4.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Se efectuó la separación electroforética de proteínas en 37 clones con susceptibilidad a heladas variable entre completamente resistentes y susceptibles, de acuerdo con su evaluación respecto a comportamiento en el campo ante una helada de -5.8°C por tres horas.

Por tratarse de plantas de alta afinidad genética las diferencias esperadas eran mínimas como se observó en los resultados. Las diferencias en posición o intensidad o la presencia de bandas y zonas diferentes entre los clones se suponen asociadas con diferencias en resistencia.

Primordialmente se logró estabilizar el método y demostrar su reproducibilidad y efectividad. Esto se logró mediante ensayos repetidos y variando algunos factores.

Se observa la facilidad y agilidad del método y se sugiere que serviría para probar y seleccionar segregantes en programas de fitomejoramiento.

Los patrones electroforéticos de las proteínas solubles de hoja

de papa de una progenie del híbrido 60-177-7 obtenidos en gel de acrilamida se presentan en la figura (3). Como puede observarse en la figura, los análisis electroforéticos en las condiciones en que se trabajó revelaron varias bandas visibles de proteínas. Se pueden considerar varias bandas diferenciadas las cuales fueron numeradas arbitrariamente (Figura 4), en numeración sucesiva desde el frente de la muestra (banda No. 1) hasta la base del gel (banda No. 7) y también se observaron dos zonas proteínicas denominadas como Z_1 y Z_2 y las cuales a su vez podrían contar de varias bandas.

Las bandas obtenidas después de permitir correr la muestra durante una hora y 45 minutos se caracterizaron por anchura, intensidad y posición (Figuras 5 a 11).

Banda 1: La banda proteínica que más avanzó en el estudio con el frente de la muestra. Localizada a unos 6.3 cm de la base del gel de poro pequeño, coloreada intensamente y muy nítida en todos los geles, no es muy ancha.

Banda 2: Avanzó un poco menos, se localizó a unos 5.3 cm desde la base del gel de poro pequeño. Es una banda coloreada muy intensamente y ancha, entre 1 y 2 mm.

Figura 3. Patrones electroforéticos de proteínas solubles de tejido foliar de tres clones de papa procedentes del cruzamiento 60-177-7, con diferente susceptibilidad a heladas, obtenidos en gel de poliacrilamida.

Clon No. 30
0% susceptibilidad



Clon No. 53
40% susceptibilidad



Clon No. 28
95% susceptibilidad

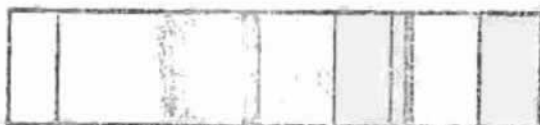


Figura 4. Caracterización de bandas de proteínas de la progenie del cruzamiento de papa 60-177-7; patrón electroforético de proteínas solubles del tejido foliar, obtenido en gel de acrilamida.

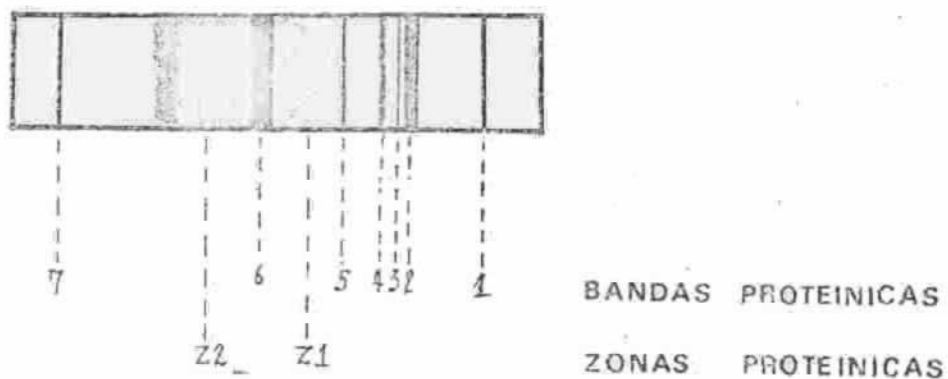


Figura 5. Patrones de electorforéisis de proteínas solubles en tejido foliar de clones de papa del cruzamiento 60-177-7, con diferente susceptibilidad a heladas, obtenidos en gel de poliacrilamida.

Clon No. 30
0% susceptibilidad



Clon No. 26
5% susceptibilidad



Clon No. 38
10% susceptibilidad



Clon No. 2
20% susceptibilidad



Figura 6. Patrones electroforéticos de tejido foliar de clones de papa obtenidos del cruzamiento 60-177-7, con diferente susceptibilidad a heladas, obtenidos en gel de poliacrilamida.

Clon No. 50
20% susceptibilidad



Clon No. 8
30% susceptibilidad



Clon No. 37
30% susceptibilidad



Clon No. 51
30% susceptibilidad



Figura 7. Patrones electroforéticos de proteínas solubles de tejido foliar de clones de papa obtenidos del cruzamiento 60-177-7 con diferente susceptibilidad a heladas, obtenidos en gel de poliacrilamida.

Clon No. 5
40% susceptibilidad



Clon No. 1/
40% susceptibilidad



Clon No. 53
40% susceptibilidad



Clon No. 4/
50% susceptibilidad



Figura 8. Patrones electroforéticos de proteínas solubles de tejido foliar de clones de papa procedentes del cruzamiento 60-177-7 con diferente susceptibilidad a heladas, obtenidos en gel de poliacrilamida.

Clon No. 58
40% susceptibilidad



Clon No. 3
50% susceptibilidad



Clon No. 36
50% susceptibilidad



Clon número 41
50% susceptibilidad



Figura 9. Patrones electroforéticos de proteínas solubles de tejido foliar de clones de papa procedentes del cruzamiento 60-177-7 con diferente susceptibilidad a heladas, obtenidos en gel de poliacrilamida.

Clon No. 54
50% susceptibilidad



Clon No. 16
60% susceptibilidad



Clon No. 9
70% susceptibilidad



Clon No. 27
70% susceptibilidad



Figura 19. Fracciones electroforéticas de proteínas solubles de tejido foliar de clones de papa procedentes del cruceamiento 60-177-7 con diferente susceptibilidad a heladas, obtenidos en gel de poliacrilamida.

Clon No. 56
70% susceptibilidad



Clon No. 60
70% susceptibilidad



Clon No. 34
80% susceptibilidad



Figura 11. Patrones electroforéticos de proteínas solubles de tejido foliar de clones de papa procedentes del cruzamiento 60-177-7 con diferente susceptibilidad a heladas, obtenidos en gel de poliacrilamida.

Clon No. 46
80% susceptibilidad



Clon No. 21
85% susceptibilidad



Clon No. 28
95% susceptibilidad



- Banda 3: Localizada a unos 5.1 cm desde la base del gel de poro pequeño. Es una banda delgada que no se colorea muy intensamente ni es muy nítida.
- Banda 4: Localizada a unos 4.8 cm desde la base del gel de poro pequeño. Esta banda en algunos clones es relativamente ancha y densa, en algunos delgada o casi imperceptible y en otros no aparece. La intensidad de la coloración también varía, pero en ningún caso colorea con mucha intensidad.
- Banda 5: Situada a unos 4.2 cm de la base del gel de poro pequeño. Está localizada al extremo de una de las zonas proteínicas: La zona 1. Es una banda delgada que colorea con poca intensidad.
- Banda 6: Situada a unos 3.1 cm de la base del gel de poro pequeño. Se localiza entre las dos zonas proteínicas y es una banda muy ancha (2 a 3 mm) que colorea muy intensamente.
- Banda 7: Situada a 0.6 cm de la base del gel de poro pequeño. De regular anchura, colorea intensamente.

Zona proteínica 1: Z_1 Está localizada entre las bandas 5 y 6; es de alrededor de 1 cm de anchura y colorea con poca intensidad.

Zona proteínica 2: Z_2 Localizada inmediatamente después (hacia la base del gel) de la banda 6, de alrededor de 1 cm de anchura y colorea más intensamente que la zona 1 pero no tan intensamente como la banda 6.

Según estos resultados se puede observar que se encontró que los patrones electroforéticos de los clones eran similares, excepto por la banda intermedia 4. En los clones considerados como resistentes se observa una banda adicional al patrón de los otros clones: la banda 4 (Figuras 1 y 4) la cual en los clones considerados de susceptibilidad intermedia es muy delgada o casi imperceptible. Esta banda no se observa en los clones considerados como susceptibles. Esta fue la única diferencia encontrada al comparar los patrones electroforéticos de tejido foliar de varios clones de una misma línea de papa de diferente susceptibilidad a heladas, lo cual sugiere que esta banda adicional puede relacionarse con la resistencia o susceptibilidad del clon a bajas temperaturas (Figuras 3 a 13).

FIGURA 12. Diferencias en patrones electroforéticos entre clones de papa del cruzamiento 60-177-7 de diferente susceptibilidad a heladas.

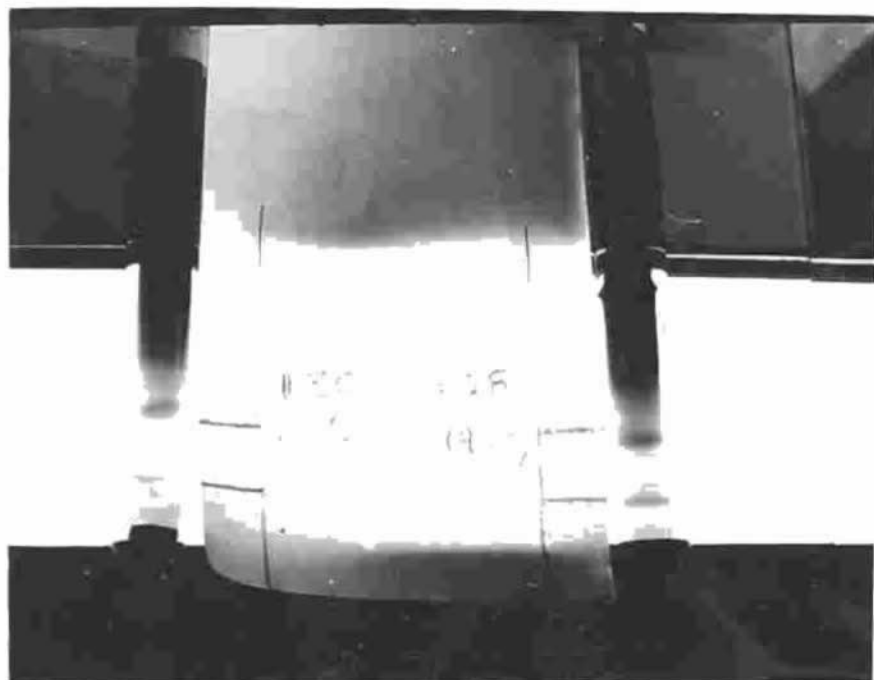
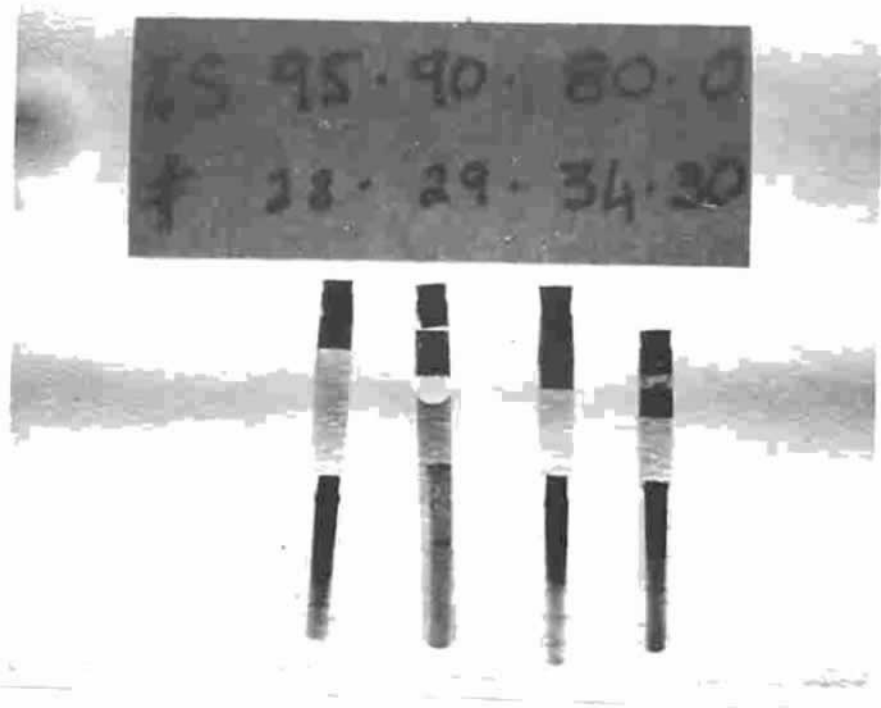


FIGURA 13. Diferencias en patrones electroforéticos entre clones de papa del cruzamiento 60-177-7 de diferente susceptibilidad a heladas.



Estos requisitos indican que para plantas de papa del cruzamiento 60-177-7 hay una banda de proteínas aparentemente asociada con resistencia a heladas. En este caso se puede relacionar una proteína o una banda proteínica con el grado de resistencia o susceptibilidad a heladas. Los datos coinciden con los resultados obtenidos por Gerloff et al (12) y por Colemann et al (4) en raíces de diferentes variedades de alfalfa Medicago sativa quienes concluyen que existen diferencias en proteínas solubles entre condiciones de resistencia y no resistencia y que el aumento es preferiblemente en enzimas específicas.

Parece que los componentes proteínicos presentes en la banda 4 del patrón electroforético en gel de acrilamida reflejan el grado de resistencia, ya que la banda es más densa en los clones considerados como resistentes, en los de susceptibilidad intermedia es débil y no se observa en los susceptibles.

Se requiere información adicional, especialmente determinar si la banda en cuestión representa proteínas estructurales simples o enzimas, partiendo de la base de que existe una diferencia de bandas en patrones electroforéticos de clones resistentes y susceptibles.

Los resultados demuestran la utilidad del método para comparar

patrones electroforéticos y tratar de asociar esos patrones con resistencia o susceptibilidad. Es necesario una identificación de la banda de proteínas, la cual podría hacerse con técnicas de inmunolectroforesis. Es conveniente buscar diferencias en actividades enzimáticas específicas (como peroxidas y catalasa). - Esto se puede realizar con métodos diferentes de tratar y colorear el gel. Es bastante probable que habiéndose encontrado diferencias con electroforesis en gel de acrilamida con coloración de anilina azul-negro se encuentren mayores diferencias al estudiar actividades enzimáticas.

Es muy interesante haber encontrado diferencias en bandas utilizando electroforesis en gel de acrilamida con coloración de anilina azul-negro, ya que varios autores (5) opinan que este colorante no detecta todas las proteínas y sugieren que técnicas enzimáticas más sensibles separan bandas adicionales.

V, CONCLUSIONES

Existen diferencias entre los patrones electroforéticos de una progenie del cruzamiento de papa 60-177-7 la cual había presentado en una helada natural en el campo una escala de valores de resistencia que variaba desde plantas muy susceptibles hasta plantas resistentes. Los individuos que resistieron la helada en el campo presentan una banda proteínica definida detectable por electroforesis en gel de acrilamida. En los individuos con resistencia moderada la banda es menos notoria y está ausente en las plantas susceptibles. Lo anterior indica que hay correspondencia entre la resistencia a heladas y los patrones electroforéticos.

Los análisis de contenido de proteínas totales (como Nitrógeno total) no muestran diferencias consistentes entre los promedios de grupos de diferente susceptibilidad.

La electroforesis en disco de gel de poliacrilamida es un método rápido y reproducible para separar proteínas de tejidos foliares y útil para evaluar y seleccionar segregantes en estudios de mejoramiento de papa por resistencia a heladas.

RESUMEN

Se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida extractos foliares de 37 clones de papa de una progenie del cruzamiento 60-177-7 los cuales habian presentado en el campo en una helada de -58°C por 3 horas; diferentes grados de susceptibilidad. Se buscaba determinar si habia diferencias entre los patrones electroforéticos de plantas resistentes y susceptibles a heladas.

Se logró estabilizar el método y se demostró su efectividad y reproducibilidad bajo condiciones específicas. Al utilizar este sistema se logró obtener una separación que mostró 6 o 7 bandas visibles de proteínas y dos zonas proteínicas denominadas arbitrariamente: las *bandas* : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y las zonas Z_1 y Z_2 .

Se observó que 6 de las bandas eran comunes a todos los clones: 1, 2, 3, 5, 6 y 7. Una banda adicional, la 4, se encontró en los clones considerados como resistentes. Esta banda era densa (gruesa) en los clones más resistentes y se hacía más delgada o casi imperceptible a medida que disminuía el grado de resistencia y no se observaba en los clones considerados como susceptibles.

Estos resultados permiten concluir que los individuos de la progenie estudiada presentan por lo menos una banda proteínica, detectable por electroforesis en gel de acrilamida, asociada con el grado de resistencia o susceptibilidad a bajas temperaturas. Este método además puede ser utilizado para seleccionar material de papa resistente a bajas temperaturas.

Por otra parte, al determinar el contenido de proteínas totales, según el método de Kjeldahl no se encontraron diferencias consistentes entre promedios de grupos de diferente susceptibilidad, lo cual permite suponer que las diferencias en proteínas entre plantas resistentes y susceptibles pueden ser principalmente cualitativas y no cuantitativas.

BIBLIOGRAFIA

1. ALDEN, J. and R.K. HERMANN. 1971. Aspects of the cold hardiness mechanism in plants. Bot. Rev. 37:37-142.
2. BULA, R.J. and D. SMITH. 1954. Cold resistance and chemical composition in overwintering alfalfa, red clover and sweetclover. Agron. J. 46:397-401.
3. CHANDLER, W.H. 1954. Cold resistance in horticultural plants. A review. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 64:552-572.
4. COLEMAN, E.A., R.J. BULA and A.L. DAVIS. 1966. Electrophoretic and immunological comparisons of soluble root protein of Medicago sativa L. genotypes in the cold hardened and non-hardened condition. Plant Physiol. 41:1681-1685.
5. CRAKER, L.E., L.V. GUSTA and C.J. WEISER. 1969. Soluble proteins and cold hardiness of two woody species. Canad. J. Pl. Sci. 49:279-286.
6. DESBOROUGH SHARON and S.J. PELOQUIN. 1966. Disc electrophoresis of tuber proteins from Solanum species and interspecific hybrids. Phytochem. 5:727-733.
7. _____ 1967. Esterase isozymes from Solanum tubers. Phytochem. 6:989-994.
8. _____ 1968a. Disc electrophoresis of proteins and enzymes from styles, pollen and pollen tubes of self-incompatible cultivars of Lilium longiflorum. Theoret. Appl. Genet. 38:327-331.

9. DESBOROUGH SHARON and S.J. PELOQUIN. 1968b. Potato variety identification by use of electrophoretic patterns of tuber proteins and enzymes. *Amer. Pot. J.* 45:220-229.
10. _____ 1969a. Acid gel electrophoresis of tuber proteins from Solanum species. *Phytochem.* 8:425-429.
11. _____ 1969b. Tuber proteins from haploids, selfs and cultivars of group tuberosum separated by acid gel disc electrophoresis. *Theoret. Appl. Genet.* 39:43-47.
12. GERLOFF, E.D., M.A. STAHMANN and D. SMITH. 1967. Soluble proteins in alfalfa roots as related to cold hardiness. *Plant Physiol.* 42:895-899.
13. HALL, T.C., et al. 1969. A comparative investigation of isozyme fractions separated from plant tissues. *Phytochem.* 8:385-391.
14. HART, G.E. and C.R. BHATIA. 1967. Acrylamide gel electrophoresis of soluble leaf proteins and enzymes from Nicotiana species. *Can. J. Genet. Cytol.* 9:367-374.
15. HEBER, U.W. 1967. Freezing injury and uncoupling of phosphorylation from electron transport in chloroplasts. *Plant Physiol.* 42:1343-1350.
16. _____ and K.A. SANTARIUS. 1964. Loss of adenosine triphosphate synthesis caused by freezing and its relationship to frost hardiness problems. *Plant Physiol.* 39:712-719.

17. HOWELL, G.S. and C.J. WEISER. 1970. The environmental control of cold acclimation in apple. *Plant Physiol.* 45:390-394.
18. HUDSON, M.A. and D.B. IDLE. 1962. The formation of ice in plant tissues. *Planta.* 57:718-730.
19. IRVING, R.M. and F.O. LANPHEAR. 1967. Environmental control of cold hardiness in woody plants. *Plant Physiol.* 42: 1191-1196.
20. _____ 1968. Regulation of cold hardiness in *Acer negundo* *Plant Physiol.* 48:9-13.
21. JUNG, G.A., S.C. SHIH and D.C. SHELTON. 1967. Influence of purines and pyrimidines on cold hardiness of plants. III. Associated changes in soluble proteins and nucleic acid content and tissue pH. *Plant Physiol.* 42:1653-1657.
22. KETCHIE, D.O. 1966. Fatty acids in the bark of Helehaven peach as associated with hardiness. *Am. Soc. Hort. Scie.* 88:204-207.
23. KOHN, H. and J. LEVITT. 1965. Frost hardiness studies on cabbage grown under controlled conditions. *Plant Physiol.* 40:476-480.
24. _____ 1966. Interrelations between photoperiod, frost hardiness and sulfhydryl groups in Cabbage. *Plant Physiol.* 41:792-796.

25. KUIPER, P.J.C. 1964. Inducing resistance to freezing and desiccation in plants by decenylsuccinic acid. *Science*. 146:544-546.
26. _____ 1970. Lipids in alfalfa leaves in relation to cold hardiness. *Plant Physiol.* 45:684-686.
27. KURASHI, S, et al. 1968. Oxidized and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate levels of plants hardened and unhardened against chilling injury. *Plant Physiol.* 43: 238-242.
28. LEVITT, J. 1951. Frost, Drought and heat resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 2:245-268.
29. _____ 1956. The hardiness of plants. *Agronomy* 6. Academic Press, New York. 278p.
30. _____ et al. 1961. Sulfhydryls: A new factor in frost resistance. I. Changes in SH content during frost hardiness. *Plant Physiol.* 36:611-616.
31. _____ et al. 1962. Sulfhydryls: A new factor in frost resistance. III. Relation of SH increase during hardening to protein, glutathione and glutathione oxidizing activity. *Plant Physiol.* 37:266-271.
32. _____. 1966. Winter hardiness of plants, In: H.T. Meryman, ed. *Criobiology*. Academic Press, New York. pp.495-563.

33. LI, P.H. and C.J. WEISER. 1968. Metabolism of nucleic acids in apple twing during cold acclimation. *Criobiol.* 4:275.
34. _____ 1969a, Metabolism of nucleic acids in one year old apple twigs during cold hardening and dehardening. *Plant Cell Physiol.* 10:21-30.
35. _____ 1969b. Influence of photoperiod and temperature on potato foliage protein and 4S RNA. *Plant Cell Physiol.* 10:929-934.
36. _____ and R.B. Van HUYSTEE. 1965. Changes in metabolitos of red-osier dogwood during cold acclimation. *Amer. Soc. Hort. Sci.* 86:723-729.
37. LYONS, J.M. and J.K. RAISON. 1970. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissues sensitive and resistant to chilling injury. *Plant Physiol.* 45:386-389.
38. MARTH, P.C. 1965. Increased frost resistance by application of plant growth retardant chemicals. *J. Agr. Food Chem.* 13:331-33.
39. MAXIMOV, N.A. 1946. *Fisiología Vegetal.* Acme Agency. Soc. Resp. Ltda., Buenos Aires. pp. 317-319.

40. MAZUR, P. 1969. Freezing injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20:419-448.
41. McCOWN, B.H., G.E. BECK and T.C. HALL. 1968. Plant leaf and stem proteins. I. Extraction and electrophoretic separation of the basic, water soluble fraction. *Plant Physiol.* 43:578-582.
42. OLIEN, C.R. 1964. Freezing processes in the crown of "Hudson" barley, Hordeum vulgare (L. emend. Lam.) Hudson. *Crop Sci.* 4:91-95.
43. _____ 1967. Freezing stresses and survival. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 18:387-408.
44. PARKER, J. 1962. Relationships among cold hardiness, water soluble protein, anthocyanins and free sugars in Hedera helix L. *Plant Physiol.* 37:809-813.
45. _____ 1963. Cold resistance in woody plants. *Bot. Rev.* 29:123-201.
46. PIRIE, N.W. 1959. Leaf proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 10:33-52.
47. REISFELD, R.A., U.J. LEWIS and D.E. WILLIAMS. 1962. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature.* 195:281-283.
48. SAKAI, A. 1965. Survival of plant tissue at super-low temperatures. III. Relation between effective prefreezing temperatures and the degree of frost hardiness. *Plant Physiol.* 40:882-887.

49. SAKAI, A. 1966. Studies of frost hardiness in woody plants. II. Effect of temperature on hardening. *Plant Physiol.* 41:353-359.
50. _____ and YOSHIDA, S. 1967. Survival of plant tissue at super-low temperatures. VI. Effects of cooling and rewarming rates on survival. *Plant Physiol.* 42:1695-1701.
51. SCARTH, G.W. and J. LEVITT. 1937. The frost hardening mechanisms of plant cells. *Plant Physiol.* 12:50-78.
52. SCHMUTZ, W., C.Y. SULLIVAN and J. LEVITT. 1961. Sulfhydryls a new factor in frost resistance. II. Relation between sulfhydryls relative resistance of fifteen wheat varieties. *Plant Physiol.* 36:617-620.
53. SHIKAMA, K. 1965. Effect of freezing and thawing on the stability of double helix of DNA. *Nature* 207:529-530.
54. SIMINOVITCH, D. 1963. Evidence form increase in ribonucleic acid an protein synthesis in autumn for increase in protoplasm during the frost hardening of black locust bark cells. *Canad. J. Bot.* 41:1301-1308.
55. _____ and D.R. BRIGGS. 1953a. Studies on the chemistry of the living bark of the black locust in relation to its frost hardiness. III. The validity of plasmolysis and desiccation tests for determining the frost hardiness of bark tissue. *Plant Physiol.* 28:15-34.

56. SIMINOVITCH, D. and D.R. BRIGGS. 1953b. Studies on the chemistry of the living locust tree in relation to frost hardiness. IV. Effects of ringing on translocation, protein synthesis and the development of hardiness. *Plant Physiol.* 28:177-200.
57. SINGLE, W.V. 1964. Studies on frost injury to wheat. II. Ice formation within the plant. *Austral. J. Agr. Res.* 15:869-875.
58. SMITH, D. 1964. Freezing injury of forage plants. *In*: Forage plant Physiology and soil-range relationships. Ed. by American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. pp.32-56.
59. STAHMANN, M.A. 1963. Plant proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 14³⁸:137-158.
60. STUCKEY, I.H. and O.F. CURTIS. 1938. Ice formation and the dead of plant cells by freezing. *Plant Physiol.* 13:815-833.
61. VASIL'YEV., I.M. 1956. Wintering of plants. Ed. by J. Levitt. *Am. Inst. Biol. Sci*, Washington, 1961. 300 p.
62. WILDING, M.D., M.A. STAHMANN and D. SMITH. 1960. Free aminoacids in alfalfa as related to cold hardiness. *Plant Physiol.* 35:726-732.

63. WILLIAMS, R.J. and H.J. MERYMAN. 1970. Freezing injury and resistance in spinach chloroplast grana. *Plant Physiol.* 45:752-755.
64. YOUNG, R. and A. PEYNADO. 1965. Changes in cold hardiness and certain physiological factors of red blush grapefruit seedlings as affected by exposure to artificial hardening temperatures. *Am. Soc. Hort. Sci.* 86:244-252.