

# AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LAS BASES GENÉTICA Y MOLECULAR DE LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS A LOS ESTRÉS AMBIENTALES, ESPECIALMENTE DE CALOR

Lourdes Iglesias

Mucho antes de que los seres humanos comenzaran a alterar su ambiente, los organismos, desde los más simples hasta los más complejos, iniciaron la evolución de métodos capaces de enfrentar la amplia diversidad de estrés ambientales, como son: las altas temperaturas, la sequía, la salinidad, así como la toxicidad por metales, entre otras.

Para responder ante los diferentes factores estresantes, una célula requiere de una señal específica, así como de la capacidad de interpretar adecuadamente el estímulo, en una reacción celular. En general, la señal transmitida del ambiente a la célula debe ser descifrada, de forma tal que la célula pueda reconocerla. Luego, la señal primaria o secundaria debe entonces alterar algunos componentes celulares, que directa o indirectamente median en la respuesta observada. Esta respuesta se puede presentar en fases o en cascadas ordenadas, tanto a nivel de célula como de organismo.

Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios llevados a cabo para dilucidar los mecanismos moleculares, que regulan la respuesta de los organismos a los estrés ambientales, hasta la fecha no se dispone de suficientes casos, donde se hayan podido trazar completamente los eventos fundamentales involucrados en este tipo de respuesta, que contemple des-

de la acción del agente inductor hasta los genes afectados. Por lo regular, la mayoría de los estudios realizados se han concentrado en la identificación y/o caracterización de aquellos genes inducidos por diversos estímulos, más que en la vía de traducción de las señales complejas, a través de las cuales estos fueron marcados. Un ejemplo evidente de ello lo constituye el daño oxidativo, que se presenta en bacterias y que conduce a la activación del regulador transcripcional OxyR, el cual a su vez, induce la actividad de aquellos genes, cuyos productos protegen a la célula del daño oxidativo. A pesar de que, como señalara Ames (1989), citado por Cross (1989), muchos de los genes que son activados durante este proceso han sido caracterizados, aún permanecen por dilucidar los mecanismos por los que el factor OxyR "detecta" el estrés oxidativo.

El ejemplo anterior evidencia la escasa información que por lo regular se dispone, incluso en organismos tan simples como las bacterias, de cómo la expresión génica se encuentra acoplada al estímulo que lo provoca; no obstante, en algunos casos se han podido conocer las señales primarias que desencadenan la respuesta a diversos estrés ambientales. Así, Herrlich (1989), citado por Cross (1989), encontró que el daño producido por la luz UV sobre el ADN, constituye la señal primaria que desencadena la respuesta a este estrés abiótico. De acuerdo con este autor, una vez que el núcleo ha sido notificado de la existencia de daño en el ADN, el factor

transcripcional NF-kB, que en la mayoría de los casos se encuentra almacenado en forma inactiva en el citoplasma, recupera su actividad de unirse al ADN y translocarse al núcleo, donde activa la transcripción de un subconjunto específico de genes. Aunque no se conoce el rol del factor NF-kB en las células irradiadas, es muy probable que la transcripción del mismo pudiera servir para incrementar la expresión de algunos genes específicos, implicados en los eventos que conllevan a la reparación del ADN o pudiera elevar la velocidad de transcripción de genes involucrados en la biosíntesis de flavonoides, lo cual ha sido señalado por Chappell y Hahlbrock (1984), como una vía que emplean las plantas para minimizar el daño que provoca este estrés ambiental.

Aunque la enorme heterogeneidad de agentes estresantes dificulta la comprensión de los patrones de respuestas, que tanto de tipo específico como inespecífico se desencadenan en la mayoría de los organismos vivos, se pudiera generalizar lo planteado por Buddle y Randall (1990), con relación a que el proceso de traducción de una señal externa contempla cuatro eventos consecutivos:

a) La presencia de la señal transmitida del ambiente a la célula: esta señal, denominada alarma, puede ser ambiental como la luz y la temperatura, o puede provenir de otro tejido o tipo celular, como por ejemplo, de hormonas, metabolitos, iones o agentes patogénicos.

Dra. Lourdes Iglesias, Investigador Titular del departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal No. 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

- b) El acoplamiento para la traducción de la señal a efectores o segundos mensajeros, tales como el calcio, fosfolípidos y poliproteínas, los cuales pueden regular los procesos de fosforilación y defosforilación.
- c) Cambios en el estado de fosforilación de los sustratos proteicos marcados, por la acción de efectores o segundos mensajeros, en la estimulación o inhibición de las actividades de las enzimas: proteína quinasa y proteína fosfatasa, que catalizan los procesos de interconversión.
- d) Alteración de la actividad o función proteica "marcada", con el consiguiente cambio en la bioquímica y fisiología celular.

Cabe significar, dentro de este contexto, la importancia de los cambios conformacionales en la regulación de las respuestas a estrés ambientales, atendiendo a que como los cambios conformacionales raramente requieren de síntesis de proteínas *de novo*, ellos representan un mecanismo muy adecuado, mediante el cual las células pueden responder rápidamente a las señales ambientales. De esta forma, los cambios conformacionales causados principalmente por fosforilación de las proteínas, proporcionan así un mecanismo efectivo para alterar reversiblemente la actividad enzimática o la función proteica. De hecho, el status de fosforilación de una proteína, refleja la actividad relativa de la proteína quinasa y la proteína fosfatasa, que catalizan los procesos de interconversión. En la actualidad se conocen aproximadamente 30 proteínas diferentes, en plantas que han sido identificadas como blancos de la acción de la proteína quinasa (Buddle y Randall, 1990; Randall y Blevins, 1990).

Dentro de este contexto, se deben resaltar los resultados entre otros obtenidos por Sheen (1993), en relación con el hecho de que la expresión génica inducible por la luz requiere de la actividad proteica fosfatasa en maíz, así como los detectados por Zhou *et al.* (1993), quienes encontraron que la fosforilación de la proteína 'heat shock' de 27kD (HSP27), se encuentra in-

volucrada en la termorresistencia celular en mamífero. De acuerdo con estos últimos autores, la fosforilación de la HSP27 correlaciona en tiempo con la activación transiente de la proteína quinasa HSP27 específica. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual la actividad HSP27 quinasa es inducida por 'heat shock', se ha indicado (Lavoie *et al.*, 1993) que la acumulación de HSP27 está asociada con una mayor estabilización de filamentos de actina.

A pesar de que no se han podido esclarecer, en general, la función y la identidad de estas fosfoproteínas y el efecto que ejerce la fosforilación sobre la función proteica y la(s) señal(es) de iniciación de la respuesta a estrés abióticos, sí se han podido lograr algunos avances en la comprensión del rol del calcio como segundo mensajero, en la respuesta de las plantas a estrés abióticos. Así, se ha indicado (Cheung, 1980) que la exposición de las células a una gran variedad de estímulos externos, provoca un incremento (10 a 100 veces) en los niveles de  $Ca^{2+}$  citoplasmático. Estos iones de  $Ca^{2+}$  pueden, como ha sido demostrado en *Arabidopsis* por Janet Braam y Davis (1990), unirse con algunos compuestos, como las **Calmodulinas** y desencadenar una cascada de eventos regulatorios.

Por otra parte, se ha indicado (Guerrero y Mullet, 1988) que algunas de las respuestas de las plantas a estrés ambientales, constituyen un resultado directo de cambios físicos acompañando la pérdida de turgencia celular, mientras que otras respuestas pueden estar asociadas con alteraciones en los niveles de reguladores del crecimiento de la planta. En conexión con lo antes planteado, se ha detectado que la respuesta al ácido abscísico (ABA), implicado en el ajuste osmótico de las plantas cultivadas, fundamentalmente en condiciones de sequía y salinidad (Rana Munns, 1988; Skriver y Mundy, 1990), resulta dependiente del  $Ca^{2+}$  (Napier, Chapman y Black, 1989, y Shroeder y Hedrich, 1989). Actualmente diversos autores (Skriver y Mundy, 1990; Guerrero, Janes y Mullet, 1990) se encuentran estudiando la expresión génica regulada por ABA.

Además de su rol en la regulación de la actividad de los factores de transcripción, las alteraciones conformacionales también explican el efecto de las proteínas inducidas por estrés, sobre sus sustratos celulares. Al respecto, se ha indicado que las proteínas 'heat-shock' (HSP), regulan la proteólisis y el transporte celular, por alteración de la conformación de los sustratos (proteasas, sustratos de las proteasas o complejos sustratos-proteasas), a los cuales se unen los mismos (Carol Gross, 1989; Elizabeth Craio, 1989, citados por Cross, 1989).

Por otra parte, cabe significar la intrincada coordinación que presentan las respuestas de los organismos ante la adversidad ambiental. Dentro de este contexto, cabe citar los resultados obtenidos por Neidhardt (1989), citado por Cross (1989), al analizar los patrones electroforéticos bidimensionales de numerosas proteínas bacterianas inducidas por estrés abiótico. De acuerdo con este autor, de las aproximadamente 400 proteínas que se expresan, como resultado de diferentes estímulos ambientales en bacterias, alrededor de 60 son inducidas por más de una señal. Esto sugiere que las vías de señalización, poseen conjuntos solapantes de respuestas que utilizan componentes comunes.

Por ejemplo, se ha indicado (Van Bogelen, Kelley y Neidhardt, 1987) que en *E. coli* algunos agentes tóxicos como el cloruro de cadmio inducen más de un regulón (regulones 'heat shock', SOS y estrés oxidativo), dado que probablemente el mismo genera múltiples señales en las células afectadas.

En eucariotes, resultan mucho más comunes los ejemplos que ilustran la complejidad en los patrones de expresión génica que pueden generarse, incluso a partir de un mecanismo regulatorio aparentemente simple. Dentro de este contexto, cabe resaltar los resultados obtenidos por Wu (1989), citado por Cross (1989) en *Drosophila*, quien detectó la presencia de dos vías diferentes de activación de los factores de trans-

concepción 'heat-shock' y los de Kerstin Nordin, Pekka y Palva (1991), acerca de la existencia de tres vías independientes, pero convergentes, en *Arabidopsis thaliana*, implicadas en la inducción del gen tt1 140, ante las bajas temperaturas.

De acuerdo con Vierling y Kimpel (1992), muchas de estas respuestas se solapan dada las similitudes en los cambios fisiológicos que ocurren. Por ejemplo, el estrés de sequía, el de salinidad y el producido por bajas temperaturas implican problemas con la disponibilidad del agua. De este modo, la exposición ante un tipo de estrés puede inducir cierto grado de tolerancia a otro estrés.

En particular cabe significar, que se ha reconocido en muchos organismos que la respuesta 'heat-shock' (HS) es también inducida por otros agentes estresantes, tales como: etanol, anoxia, análogos de aminoácidos, iones de metales pesados y arsénio (Nagao, Kimpel y Key, 1990). Dentro de estos, solo los tratamientos con arsénito y en menor extensión con cadmio, inducen en plantas una respuesta a temperatura normal, similar a la respuesta HS (Czarnecka *et al.*, 1984), ya que como indicara Nover (1989), citado por Kennedy, Mary Rumpho y Fox (1992), las proteínas ASP expresadas durante la anaerobiosis, son diferentes a las expresadas por otros estrés, con la única excepción de las HSP de 27-28kD, observadas durante el estrés de calor en soya, que también se presentan durante la anoxia. De esta forma, como bien señalara Nagao, Kimpel y Key (1990), esta diferencia aparente en la respuesta de las plantas al estrés, puede reflejar la necesidad que tienen las plantas, como organismos no móviles, para mantener una respuesta altamente refinada ante la amplia variedad de estrés a las cuales ellas están rutinariamente expuestas.

Por otra parte, de acuerdo con Guarente (1989), citado por Cross (1989), estas múltiples posibilidades regulatorias que se presentan pueden, entre otras, estar dadas por la existencia de familias génicas de factores de transcripción. Así, según Lambs (1989), citado por Cross (1989), los genes en estas familias por lo regular muestran un alto nivel de polimorfismo y pueden, además de ejercer su rol ante la respuesta a estrés,

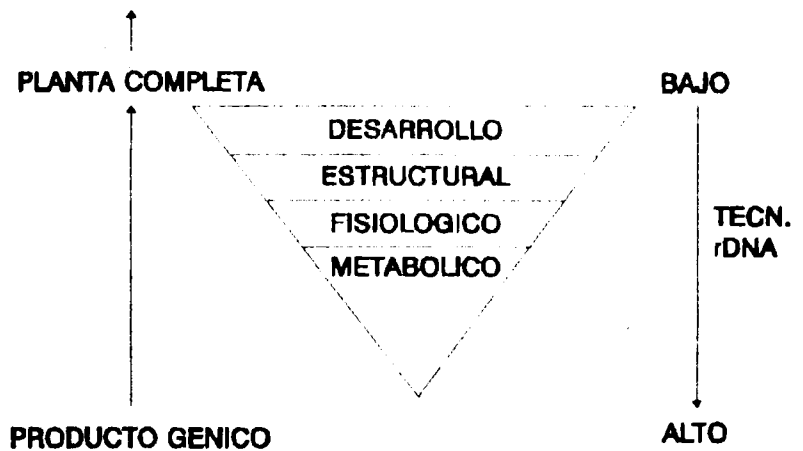
participar en aquellos eventos relacionados con el desarrollo de la planta.

Al respecto, cabe recordar que la resistencia a estrés ambientales se encuentra, como se indica en la figura 1, conferida por caracteres expresados en los cuatro niveles de organización: desarrollo, estructural, fisiológico y metabólico o bioquímico. Los caracteres expresados en los niveles superiores se encuentran, por lo regular, controlados por muchos genes y se conocen solamente muy pocos casos en plantas, de simples genes que condicionan resistencia o susceptibilidad a un estrés am-

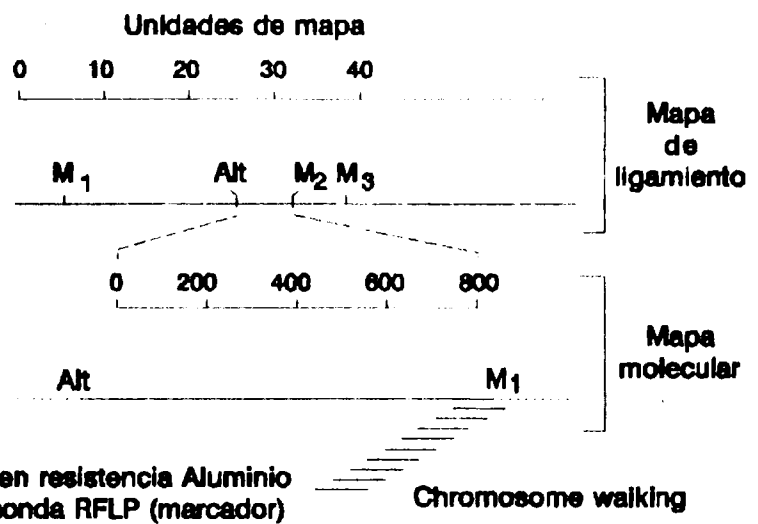
biental dado (Hanson *et al.*, 1986). Un ejemplo de ello se ilustra en la figura 2, donde se muestra la estrategia para localizar, mediante el empleo de marcadores moleculares, como el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), el gen que confiere tolerancia al aluminio en trigo, que de acuerdo con Kerridge y Kronstad (1968), se encuentra determinado por una herencia monogénica dominante.

De este modo, de existir un estrecho ligamiento entre el gen deseado con un marcador molecular, es posible, por la técnica de **Chromosome walking**, 'caminar'

### ECOSISTEMA DE CULTIVO



**Figura 1. Niveles de organización en que se expresan los caracteres involucrados en la tolerancia a estrés ambientales**



**Alt:** gen resistencia Aluminio  
**M<sub>2</sub>:** sonda RFLP (marcador)

**Chromosome walking**

**Figura 2. Estrategia para localizar el gen que confiere tolerancia al aluminio en trigo mediante el empleo de marcadores RFLP (según Hanson *et al.*, 1986)**

a lo largo del cromosoma, desde el marcador al gen que confiere la tolerancia, vía fragmentos solapantes. Sin embargo, a pesar de la utilidad potencial que reviste el empleo de marcadores moleculares, como los RFLP en esta dirección (Lourdes Iglesias y Rojas, 1992), la efectividad de esta estrategia puede llegar a afectarse por la presencia de bloques de secuencias de ADN repetitivo, que pueden encontrarse separando el gen deseado del marcador molecular. A pesar de estas limitaciones, esta es la estrategia que actualmente se sigue, para identificar los genes involucrados en la tolerancia a la salinidad en arroz (Lourdes Iglesias, 1993, datos no publicados; Shouyi Chen, 1991, comunicación personal).

Es por ello, que a pesar de los numerosos estudios llevados a cabo para dilucidar los mecanismos moleculares, que regulan la respuesta de las plantas a estrés ambientales, hasta la fecha no se dispone de suficientes casos, donde se hayan podido trazar completamente los eventos fundamentales implicados en este tipo de respuesta, que contemple desde la acción del gen inductor hasta los genes implicados. Por lo regular, la mayoría de los estudios realizados se han concentrado en la identificación y caracterización de aquellos genes inducidos por diversos estímulos, más que en la vía de traducción de las señales complejas, a través de las cuales estos fueron "marcados".

A modo de ejemplo se relacionan en la tabla I algunos de los genes específicos que se expresan durante las condiciones de estrés abióticos en plantas. Dentro de ellos, uno de los que han sido mejor caracterizados son los que están implicados en la respuesta de las plantas al calor, por lo que se abordarán seguidamente algunos de los principales avances alcanzados, en el esclarecimiento de la base genético-molecular de la respuesta a este estrés ambiental en plantas.

Desde el punto de vista molecular se sabe que todos los organismos, desde la bacteria hasta el hombre, responden al estrés de

**Tabla I. Genes caracterizados implicados en reacciones de estrés abióticos en plantas**

Estrés impuesto	Planta	Gen afectado	Vía, acción génica, función	Referencias
Calor	Soya	Grupos de genes de 68-104kDa	Función exacta por dilucidar	Sachs y Ho (1986)
	Guisante	20-33 kDa	Proteína HS permite establecer termo-tolerancia	
	Tabaco	15-18 kDa		
	Tomate			
Salinidad	Maiz			
	Cebada			
	Tabaco	Prot 26kDa	Degradación Proteínas	Sing <i>et al.</i> (1989)
	Arroz	Salt 15kDa		Claes <i>et al.</i> (1990)
Cebada	Dos nuevos mRNA inducidos	Ramogopal (1987)		
Tomate	Prot 26 y 27 kDa pN24	King <i>et al.</i> (1988)		
Frio	<i>A. Thaliana</i>	It1 140	Degradación Proteínas	Nordin <i>et al.</i> (1991)
	Tomate	thiol proteasa		Schofer y Fisher (1988)
	Alfalfa	Gen inducido por ABA		Mohapatra <i>et al.</i> (1988)
Anaerobiosis	Arroz	Glucosa 6 fosfato isomerasa		Dennis <i>et al.</i> (1987)
	Sorgo	Fructosa 1,6 difosfato aldolasa		Sachs y Ho (1986)
	Guisante	Sucroasa sintetasa		
	Zanahoria	Piruvato decarboxilasa		
	Cebada	Lactato deshidrogenasa		
Estrés hídrico	Maiz	Alcohol deshidrogenasa		
	Arroz	Rab 21	Mundy y Chua (1988)	Gómez <i>et al.</i> (1988)
	Maiz	Polipéptido 15kDa		
Cebada	2kDa			
Metales pesados	Mimulus	Proteína unida-Cu	Sachs y Ho (1986)	Fujita e Inewashi (1987)
	Soya	Proteína unida-Cd		
	Soya	Proteína unida-Cd		

calor mediante la inducción de un nuevo conjunto de proteínas denominadas 'heat shock' (HSP), las cuales están codificadas por familias multigénicas (Nagao y Key, 1989), se expresan de forma coordinada y muestran diferencias sustanciales en cuanto a tamaño, con rango de sus pesos moleculares entre 15-110kD (Kimpell y Key, 1985).

A diferencia de las HSP de alto peso molecular (68-70, 84, 92kD), que resultan altamente conservadas entre los diversos organismos, se ha detectado la presencia de una mayor abundancia y complejidad en las HSP de bajo peso molecular (Lin, Roberts y Key, 1984), donde se han llegado hasta detectar 20-30 polipéptidos diferentes, dentro del grupo de proteínas correspondiente a 15-27kD (Key *et al.*, 1985). En general, sobre la base de diversos estudios

efectuados, se ha indicado que las HSP de bajo peso molecular presentan una región más conservada, situada cerca del extremo carboxílico terminal de la proteína y otra de menor homología, situada cerca de la porción aminoterminal, que especifica la localización celular de las mismas. Teniendo todo esto en consideración, Vierling *et al.* (1988) propusieron que las HSP de bajo peso molecular pudieran evolucionar de un simple gen nuclear.

Por otra parte y aunque todavía permanecen numerosas cuestiones por dilucidar, en torno a los mecanismos que operan en la regulación de la respuesta al calor, se sabe que en casi todas las células, la inducción de las HSP implica una activación transcripcional de sus genes. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en *E. coli* y en levaduras, donde la respuesta HS

es controlada primariamente a nivel transcripcional, se ha planteado (Nagao, Kimpel y Key, 1990; Kimpel *et al.*, 1990) que en plantas, existen además otros controles regulatorios, operando a nivel post-transcripcional (Ejemplo: procesamiento de ARN mensajero y traduccional).

Los avances alcanzados, particularmente a través de los estudios de inducción por calor, de los genes *hsp70* de *Drosophila*, en sistemas heterólogos, demuestran que la señal de reconocimiento en la respuesta HS resulta similar en un conjunto ampliamente divergente de especies. De esta forma, se ha confirmado la presencia de un elemento de control positivo, denominado elemento 'heat shock' (HSE), cuya secuencia nucleotídica se ha conservado notablemente en los genes 'heat shock' desde la levadura hasta el hombre. Este puede ser definido como un ordenamiento contiguo de un módulo de 5 pb 5'-nGAAn-3', en el que cada uno se encuentra invertido en relación con los módulos inmediatamente adyacentes (Pelham, 1982; Anuri, Ananthan y Voellmy, 1988; Lis y Wu, 1992).

Los estudios en *E. coli* efectuados entre otros por Straus, Walter y Gross (1989) y Zhou y Gross (1992), han puesto en evidencia que la transcripción de los genes 'heat shock' en dicho organismo se encuentra bajo el control de  $\sigma^{32}$ , un factor  $\sigma$  alternativo de la

ARN polimerasa codificado por *rpoH* (*htpR*). De este modo, al elevarse la temperatura se incrementa transientemente hasta 20 veces la cantidad de  $\sigma^{32}$  por célula y se incrementa la transcripción de los promotores 'heat shock'. Al disminuirse la temperatura, se reprime la transcripción de los genes 'heat shock' por un mecanismo independiente de la concentración de  $\sigma^{32}$ , pero que puede llevar a una inhibición de la actividad específica de  $E\sigma^{32}$ . Así, la reducción en la expresión de genes 'heat shock' que sigue a la inhibición de proteínas en el mutante *gnpE280* sugiere que los  $\sigma^{32}$  y la  $E\sigma^{32}$  que se sintetizan de nuevo resulten funcionales, pero uno de ellos o ambos sufren un proceso de inactivación (Straus, Walter y Gross, 1989).

De esta forma, de acuerdo con el modelo propuesto por Pelham (1985) y que diagramáticamente se presenta en la figura 3, este elemento clave HSE, interactúa con un factor transcripcional conocido como factor heat shock (HSF) (Wiederecht *et al.*, 1987; Nagao, Kimpel y Key, 1990), el cual se encuentra presente constitutivamente en eucariotes y solo requiere de la 'activación' por HS para unirse fuertemente al elemento regulador HSE en el promotor y con ello promover la transcripción, probablemente a través de su posible interacción con la ARN polimerasa y/o la caja TATA (Pelham, 1985). De acuerdo con Lis y Wu

(1992), es posible que el HSF activado actúe sobre la ARN polimerasa alterando sus propiedades de elongación o sobre otros componentes del complejo promotor, para facilitar a la ARN polimerasa escapar de la pausa.

Ahora bien, cuando las células retornan a las condiciones normales de temperatura, se 'apaga' la transcripción de estos genes *hsp* y el factor HSF se vuelve inactivo. En *Drosophila* se ha indicado (Neidhard, Van Vogelen y Vaughn, 1984) que al parecer la forma inactiva de HSF, constituye un producto derivado de rompimientos proteolíticos de la forma activa, presente en las células sometidas a estrés de calor.

Estudios más recientes llevados a cabo en *Drosophila* por Westwood, Clos y Wu (1991), han permitido comprobar que la forma inactiva de los HSF se encuentra en el núcleo como pequeños oligómeros, pero que al ser sometidos a 'heat shock' se convierten en multímeros activos. De este modo, como señalaron Clos *et al.* (1993), la inducción a unirse los HSF con el ADN está dada por una transición del estado de monómero a trímero, implicando interacciones Zipper de leucina (Westwood, Clos y Wu, 1991; Rabindran *et al.*, 1993, Westwood y Wu, 1993), como se ilustra en la figura 4.

De hecho, de acuerdo con Rabindran *et al.* (1993), en dos subregiones en el extremo terminal carboxílico del HSF humano, están implicados en el mantenimiento

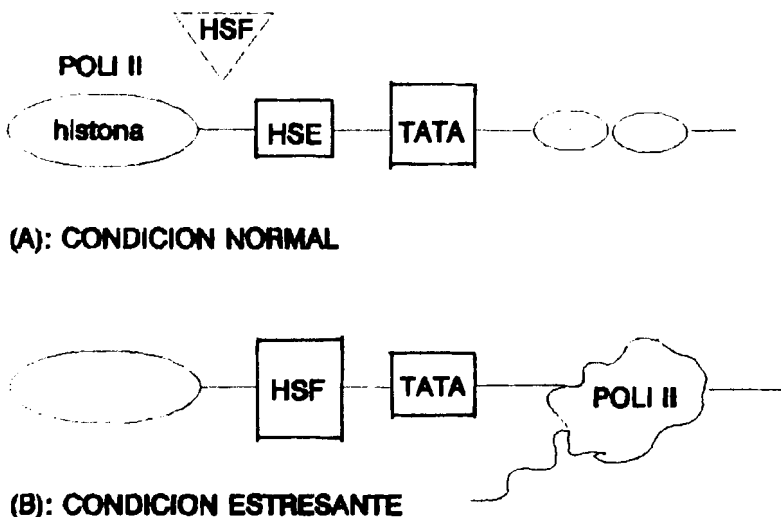


Figura 3. Representación diagramática del modelo propuesto por Pelham (1988) para explicar la respuesta 'heat shock'

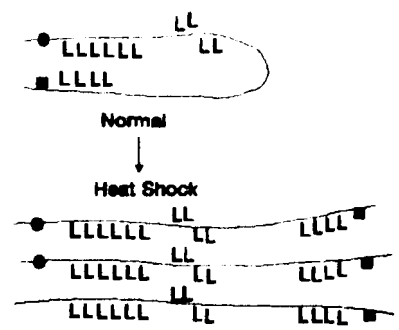


Figura 4. Modelo para la represión de la formación de trímeros de HSF<sub>1</sub> según Rabindran *et al.* (1993)

to de la forma monomérica de la proteína en condiciones normales. Aunque aún se desconoce cómo estas dos regiones actúan para reprimir la formación de trímeros, los estudios biofísicos y los cambios conformacionales que acompañan la transición de monómero a trímero están de hecho ya ayudando a alcanzar una mayor comprensión de cómo el HSF es capaz de detectar y traducir las señales 'heat shock'.

Así, como indicaran Lis y Wu (1992), es muy probable que todos los inductores no relacionados que desencadenan una respuesta 'heat shock' puedan actuar alterando la conformación nativa del factor de transcripción HSF, con lo cual la solución del enigma de la traducción de señales de estrés radicaría en la propia arquitectura molecular de la proteína HSF, así como en sus interacciones con reguladores negativos.

De los estudios de clonación y caracterización del gen HSF de levadura, efectuado por Sorger y Pelham (1988) se pudo, entre otras cosas, precisar que la actividad transcripcional que se presenta durante la respuesta HS está asociada con cambios en el estado de fosforilación de los HSF. Estos autores asimismo propusieron que la expresión de los genes HS en levadura se encuentran modulados por fosforilación del HSF asociado al ADN, lo que le permite una interacción más eficiente del factor con el complejo de transcripción. Aunque los HSF de los eucariotes superiores difieren del de levadura, en que no se une al promotor HS a temperatura normal de crecimiento, es muy posible que como sugirieran Kingston *et al.* (1987), la activación y modulación de la transcripción de los genes HS durante la inducción por calor pueda hacer uso de un mecanismo de fosforilación similar. Estudios futuros permitirán establecer el rol de la fosforilación, ya sea como un controlador de la actividad HSF en levadura como en el control posterior de su unión con el ADN en eucariotes superiores.

Ahora bien, mientras este mecanismo de activación resulta consistente con la inducción por

calor, se ha detectado la presencia de otras regiones regulatorias, que influyen en el nivel de transcripción. Así, se ha detectado que la mayoría de los genes de soya secuenciados hasta la fecha poseen también múltiples HSE (Key y Nagao, 1987).

De hecho, estudios comparativos efectuados en la región 5' de cuatro genes que codifican para proteínas de soya de 17kD, han revelado que la caja TATA (TTTAAATA) se encuentra presente en cada uno de estos genes situados entre 27 y 31 pb del sitio de comienzo de la transcripción. Más arriba, 31 a 41 pb del extremo 5' de la caja TATA se encuentran dos HSE solapantes con HSE situados a varias posiciones algo más arriba de esos genes (Nagao *et al.*, 1985).

De acuerdo con Xiao y Lis (1988), el HSE funcional incluye bases más allá de HSE de 14 pb y este elemento regulatorio puede describirse mejor como un dímero de secuencia de 10 pb (nTTCnnGAnn). Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Nagao *et al.* (1989), quienes detectaron que todos los genes secuenciados pertenecientes a la clase I del grupo de HSP de bajo peso molecular poseen la secuencia TTCnnGAA, como parte de dos pares solapantes de HSE proximales a la caja TATA (esto es: nTTCnnGAA nT (T/A)Cn).

Otros estudios desarrollados por Czarnecka *et al.* (1989), citado por Nagao *et al.* (1990), han permitido comprobar la presencia de al menos cinco regiones del sitio 5' de comienzo de la transcripción, que pueden jugar importantes ro-

les regulatorios en la expresión de los genes HS. Estas regiones incluyen, además de la caja TATA, dos regiones en la secuencia -40 a -100 que incluye al HSE proximal a la caja TATA (Sitio 1) y una secuencia HSE más arriba (Sitio 2) además de una región rica en A-T situada: -120 a -150, que se requiere para una completa actividad (Czarnecka *et al.*, 1990) y una región situada entre -180 y -244 que contiene además de TATA una diada parcial de HSE (TATAACAATTTC), que contribuye en cerca de un 65 % a la actividad del promotor.

Además de las secuencias precedentes, las cuales parecen jugar roles importantes en la expresión del gen Gmhsp17.5-E de soya, se han detectado otras secuencias, que pueden ejercer un rol regulatorio en la expresión inducida por el calor (Czarnecka *et al.*, 1989, citado por Nagao, Kimpely Key, 1990). Una de ellas es la secuencia similar a la caja CCAAT (-87 a -81), situada inmediatamente al extremo 3' del HSE y la otra una secuencia alrededor de un HSE, con un mínimo consenso, que incluye una secuencia semejante al 'enhancer' SV40, que solapa al HSE y, a su vez, está precedido por un segmento de residuos alternantes de purina y pirimidina (Czarnecka *et al.*, 1989, citado por Nagao, Kimpely y Key, 1990).

En la figura 5 se muestra la representación diagramática del promotor Gmhsp17.5-E de soya (Key y Nagao, 1987), donde se puede apreciar la posición de algunas de las secuencias relatorias antes enunciadas. Dentro de este contexto cabe resaltar las secuencias ricas en A-T, que al parecer constituyen elementos accesorios

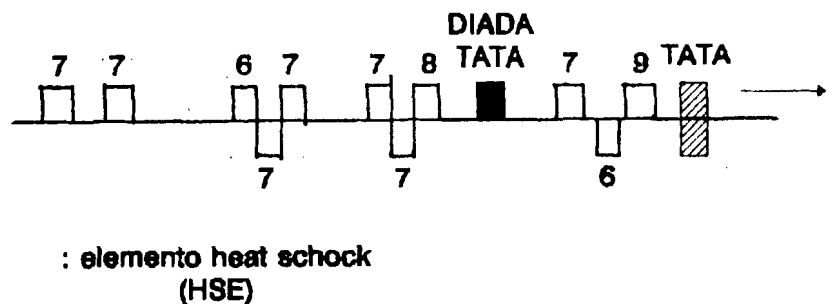


Figura 5. Promotor HS del gen Gmhsp17.5-E de soya según Gurley *et al.* (1987)

que contribuyen a la máxima termoestabilidad. En este sentido, se ha especulado (Key y Nagao, 1987) que estos tipos de regiones puedan ser responsables de la mayor abundancia de proteínas de bajo peso molecular detectadas en plantas.

Los estudios por otra parte realizados por Rochester, Winer y Shah (1986), han permitido comprobar que la estructura de los genes de maíz, que codifican para HSP70, difieren de otros descritos hasta la fecha, en que contienen un intron situado en la misma posición que el gen hsc1, que se expresa de forma constitutiva en *Drosophila*.

En particular, se ha indicado que los genes hsp70 se han conservado notablemente aún entre organismos remotamente relacionados (Rochester *et al.*, 1986 y Jadwiga Wild *et al.*, 1992). Al respecto Bardwell y Craig (1984) hallaron hasta un 47 % de homología entre la HSP70 del maíz y la proteína DnaK de *E. coli* que es un miembro de esta familia. Más recientemente Perrey y Wink (1991) encontraron que el ción cADN pPLZ17 presentaba hasta un 73.9 % de homología con los genes hsp70 de organismos no relacionados.

Aún más sorprendente resulta la notable homología, que como se puede apreciar en la tabla II, presentan los promotores 'heat shock' en eucariotes. Esto sustenta también el criterio de que los mecanismos implicados en la inducción de genes hsp, han sido altamente conservados en eucariotes. Evidencia de ello, lo constituye el hecho de que el promotor hsp70 de *Drosophila*, funciona y es inducible al calor en tabaco (Spena *et al.*, 1985; Spena y Schell, 1987), y que el gen híbrido hsp70 construido a partir de dos genes hsp de maíz, resulta termalmente inducible en una planta transgénica de *Petunia*, además del hecho de que este gen pudo ser expresado a partir de su propio promotor (Rochester, Winer y Shah, 1986). De acuerdo con Ruth Tsuchido, Van Bogelen y Nudhart (1986), es

**Tabla II. Secuencias comunes en promotores heat shock**

Gen	Secuencia HSE	Distancia a TATA	TATA
<b>Drosophila</b>			
hsp70	ATAAAGAATATTCTAGAA +	215	TATAAATAGAGGCGC
	CTCGAGAAATTTCTCTGG +	144	
	TTCTCGTTGCTTCGAGAG +	38	
	GCCTCGAATGTTCCGCGAA +	15	
hsp 68	GACTGGAATGTTCTGACC ATCTCGAATTTTCCCCTC +	45 12	TATAAATACGGGCGC
hsp 22	CCCCAGAAACTTCCACGG	147	TATAAATAGCCACCG
	GCGAAGAAAATTCGAGAG	48	
	TGCCGGTATTTTCTAGAT	26	
hsp 23	CCCAGAGAAGTTTCGTGTC	97	TATAAATAACCGCAC
HSP 26	TTCCGGACTCTCTAGAA	13	TATAAAGCAGCGTC
<b>Soya</b>			
hsp 17	ATCCCGAAACTTCTAGTT	129	TTTAAATACCCCATG
	GTCCAGAAATGTTTCTGAA	98	
	TTTCAGAAAATTCAGTT	78	
	CCCAAGGACTTCTCGAA	28	
<b>Idea Básica</b>	C GAA TTC G		TA TATAAA AG

muy probable que la conservación genética universal de la respuesta 'heat shock' tenga al menos en parte su base en alguna característica universal de la división celular.

A pesar de que, aún no se conoce cómo se encuentra regulada la respuesta HS en los organismos estudiados, se ha señalado (Camoto y Tanguay, 1982) que los cambios observados en el grado y los patrones de metilación de las histonas que se presentan bajo 'heat shock', pueden estar implicadas en la reorganización estructural de la cromatina que acompaña la supresión de la síntesis de ARN mensajero normal. Por otra parte, los estudios realizados en *Drosophila* por Di Domenico, Bugaisky y Lindquist (1982) han revelado que la HSP70 juega un rol en la regulación de su propia síntesis, así como de otras HSP tanto a nivel transcripcional como traduccional.

Similarmente se ha confirmado en *E. coli*, que la disminución en la síntesis de HSP, que se produce

durante HS, se debe a la acumulación de la proteína DnaK (homóloga al HSP70), de modo que esta puede considerarse un regulador negativo de la síntesis de HSP (Neidhard, Van Bogelen y Vaughn, 1984).

Al respecto, se cuenta actualmente con suficientes evidencias que indican que las proteínas DnaK junto con la DnaJ y la GrpE actúan como un termómetro celular, regulando la estabilidad, la síntesis y la actividad del factor  $\sigma$  de ARN polimerasa,  $\sigma^{32}$  en respuesta a la disponibilidad de sus substratos (Craig y Gross, 1991). Se ha indicado así mismo (Jadwiga Wild *et al.*, 1992) que tanto la DnaK como la DnaJ están implicadas en la exportación de algunas proteínas, actuando posiblemente como sus chaperonas y que en particular la DnaK pueda resultar un regulador clave, cuya función consista en coordinar la actividad de una amplia variedad de proteínas neces-

rias para mantener un incremento balanceado en un ambiente fluctuante.

Sin embargo, como bien señalan Lis y Wu (1992), la posibilidad de que las proteínas 'heat shock' afecten la multimerización del HSF y de este modo proporcionen un medio de regulación 'feedback', requiere de una mayor sustentación experimental.

Dentro de este contexto, cabe significar los resultados obtenidos en soya, donde se han podido apreciar las propiedades de autorregulación durante HS continuo, ya que los HSARN mensajeros se acumulan a niveles máximos durante una a dos horas de HS y luego comienzan a declinar gradualmente (Nagao *et al.*, 1986; Key y Nagao, 1987). Los HSP sintetizados, a partir de estos ARN mensajeros, se acumulan en el tejido y son estables durante varias horas. Asimismo, los HSARN mensajeros sintetizados durante un segundo ciclo de calor pueden ser aún más estables que durante el tratamiento inicial de calor (Kimpel *et al.*, 1990).

De acuerdo con Kimpel *et al.* (1990), todos estos resultados indican que los HSP70 funcionan como regulador negativo o 'feedback' de esta respuesta. Es posible, como apuntaran dichos autores, que la HSP70 de soya posee un rol similar en la regulación de esta respuesta en plantas y que uno o más, de la masa abundante de HSP de bajo peso molecular pudiera ejercer un rol regulatorio en dicha respuesta. Debe destacarse dentro de este contexto la reciente revisión efectuada por Vierling (1991), acerca de los roles de las proteínas 'heat-shock' en plantas.

Aunque los conocimientos que se disponen actualmente, en relación con la significación biológica de esta respuesta en plantas, resultan todavía un tanto rudimentarios, se ha indicado (Marmilori *et al.*, 1990; Sivaramakrishnan, Patil y Soman, 1990; Lin, Roberts y Key, 1984) la existencia de una estrecha relación entre la síntesis de HSP con la termotolerancia en diversos cultivos.

Al respecto cabe señalar, que se ha indicado que la localización selectiva de las HSP en la estructura celular, durante la respuesta HS, constituye la base de la termoprotección (Schelesinger, Aliperti y Kelley, 1982; Lin, Roberts y Key, 1984). Así, es conocido que la familia HSP70 se localiza durante la respuesta HS, primariamente en el núcleo, concentrándose en los nucleolos (Lindquist, 1986). A esta familia HSP70, se le ha atribuido recientemente algunas funciones, dentro de las cuales se ha indicado (Pelham, 1988), que las mismas están implicadas en las interacciones proteicas que protegen a las proteínas precursoras y (o) mantiene las estructuras desplegadas en forma correcta, hasta que estas alcancen el sitio de inserción en la membrana. Ellis (1987) se refirió a esta función general, como "chaperona molecular", ya que asegura que se produzca correctamente el plegamiento de ciertas cadenas polipeptídicas y su reunión en estructuras oligoméricas. Así, estas HSP pueden interactuar con otras proteínas, para facilitar la desagregación de los agregados de proteínas dañadas, lograr la estabilización de las proteínas celulares o agregados durante el estrés y posiblemente también la reunión en estructuras apropiadas durante la recuperación. Estas además pudieran estar también implicadas en la reunión y estabilización de las membranas (Deshaies, Kegk y Schekman, 1988).

A pesar de la abundancia de las HSP de bajo peso molecular en plantas, no se cuenta hasta el momento con un modelo lo suficientemente fuerte, que explique la función biológica de las mismas, aunque se presume que ellas puedan tener una función estructural en las células estresadas (Schlesinger, 1986). De hecho, se ha encontrado que las mismas se encuentran asociadas, con algunos compartimentos celulares durante la respuesta HS (núcleo, ribosomas, retículo endoplasmático, mitocondria).

Estudios detallados al respecto, efectuados en diversos or-

ganismos, han establecido firmemente que estas proteínas forman agregados citoplasmáticos durante la respuesta HS, que se concentran en la región perinuclear (Arrigo, 1987; Nover, Scharf y Neumann, 1983). De acuerdo con Nover, Scharf y Neumann (1989), estos agregados referidos como gránulos 'heat-shock' se encuentran estrechamente asociados con los ARN mensajeros, con lo cual estos ejercen una función protectora en la conservación de la mayor parte de los ARN mensajeros celulares, aunque ellos no se traduzcan durante el estrés de calor. Adicionalmente ciertas HSP parecen que tienen funciones específicas en los cloroplastos, dados los resultados obtenidos por Schuster *et al.* (1988), quienes indicaron el posible rol de las HSP situadas en los cloroplastos en prevenir el daño del centro de reacción del fotosistema II durante el estrés de calor, que se produce en condiciones de iluminación.

De cualquier forma, como señalara Key, Lin y Chen (1981), tanto los procesos de inducción como de recuperación en la respuesta HS resultan rápidos y pueden jugar un rol importante en la supervivencia de las plantas sometidas a temperaturas extremadamente altas. Es por ello, que si como ha sido sugerido por Ashburner y Bonner (1979), la respuesta HS en *Drosophila* es homeostática y tiene como objetivo "corregir" o proteger de anomalías en los procesos celulares, muestre como se ha indicado anteriormente, una alta estabilidad como sistema genético durante el curso evolutivo.

Desafortunadamente, a pesar de los grandes avances alcanzados, aún permanecen muchas cuestiones por dilucidar, en relación con la respuesta de las plantas, a los factores abióticos en general y en particular en torno a la respuesta HS, por lo cual se impone continuar los esfuerzos encaminados a lograr mayores progresos en el entendimiento de estos fenómenos, como una vía para poder utilizar las técnicas del ADN recombinante en la solución de los serios efectos que estos factores provocan en nuestra producción agrícola.



## BIBLIOGRAFIA

- Amin, J., J. Ananthan y R. Voellmy. Key Features of Heat Shock Regulatory Elements. *Mol. Cell Biol.* 8:3761-3769, 1988.
- Arrigo, A. P. Cellular Localization of HSP23 During *Drosophila* Development and Following Subsequent Heat Shock. *Dev. Biol.* 122:39-48, 1987.
- Ashburner, M. y J. J. Bonner. The Induction of Some Gene Activity in *Drosophila* by Heat Shock. *Cell* 17:247-254, 1979.
- Bardwell, J. C. A. y E. A. Craig. Major Heat Shock Gene of *Drosophila* and The *Escherichia coli* Heat-Inducible dnaK Gene Are Homologous. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. (Nueva York)* 81:848-852, 1984.
- Braam, Janet y R. W. Davis. Rain, Wind, and Touch-Induced Expression of Calmodulin and Calmodulin Related Genes in *Arabidopsis*. *Cell* 60:357-364, 1990.
- Buddle, R. J. A. y D. D. Randall. Light as a Signal Influencing The Phosphorylation Status of Plant Proteins. *Plant Physiol. (Alexandria)* 94:1501-1504, 1990.
- Camoto, R. y R. M. Tanguay. Changes in The Methylation Pattern of Core Histones During Heat Shock in *Drosophila* Cells. *Embo Journal (Oxford)* 1:1529-1532, 1982.
- Chandler, P. M. *et al.* Expression of ABA-Inducible Genes in Water-Stressed Cereals Seedling. *J. Cell Biochem.* 12:143, 1988.
- Chappell, J. y K. Hahlbrock. Transcription of Plant Defense Genes in Response to UV-Light or Fungal Elicitors. *Nature (Nueva York)* 311:76-78, 1984.
- Cheung, M. Y. Calcium and Cell Function. Ed. by M. Y. Cheung. - New York. Academic Press, 1980.
- Claes, B. *et al.* Characterization of a Rice Gen Showing Organ-Specific Expression in Response to Salt Stress and Drought. *Plant Cell (Nueva York)* 2:19-27, 1990.
- Clos, J. *et al.* Induction Temperature of Human Heat Shock Factors is Reprogrammed in a *Drosophila* Cell Environment. *Nature (Nueva York)* 364:252-255, 1993.
- Craig, E. A. y C. A. Gross. Is hsp70 The Cellular Thermometer?. *Trends Biochem. Sci.* 16:135-140, 1991.
- Cross, Sh L. Coping with Stress. *The New Biologist* 1(1):28-31, 1989.
- Czarnecka, E. *et al.* Comparative Analysis of Physical Stress Responses in Soybean Seedlings Using Cloned Heat Shock cDNAs. *Plant Mol. Biol. (Dordrecht)* 3:45-58, 1984.
- Czarnecka, E., J. L. Key y W. B. Gurley. Regulator y Domains of The Gmhsp17.5-E Heat Shock Promoter of Soybean: A Mutational Analysis. *Mol. Cell. Biol. (Londres)*, 1989.
- Czarnecka, E., P. C. Fox y W. B. Gurley. *In Vitro* Interaction of Nuclear Proteins With The Promoter of Soybean Heat Shock Gene Gmhsp17.5-E. *Plant Physiol. (Alexandria)*, 1990.
- Dennis, E. S. *et al.* Molecular Analysis of The Alcohol Dehydrogenase (Adh) Gene of Maize. *Nucleic Acid Res.* 12:3983-4000, 1984.
- Deshaies, R. J., B. D. Koch y R. Schekman. The Role of Stress Proteins in Membrane Biogenesis. *Trends Biochem. Sci.* 13:384-388, 1988.
- Di Domenico, J. J., G. E. Bugaisky y S. Lindquist. The Heat-Shock Response Is Self Regulated at Both Transcriptional and Post-Transcriptional Levels. *Cell* 31:593-603, 1982.
- Ellis, J. Proteins as Molecular Chaperones. *Nature (Londres)* 328:378-379, 1987.
- Gómez, J. *et al.* A Gene Induced by The Plant Hormone Abscisic Acid in Response to Water Stress Encodes Codes a Glycine Rich Protein. *Nature (Londres)* 334:262-264, 1988.
- Guerrero, F. D. y J. E. Mullet. Reduction of Turgor Induces Rapid Changes in Leaf Translatable RNA. *Plant Physiol. (Alexandria)* 88:401-408, 1988.
- Guerrero, F. D., J. T. Jones y J. E. Mullet. Turgor-Responsive Gene Transcription and RNA Levels Increase Rapidly When Pea Shoots Are Wilted. Sequence and Expression of Three Inducible Genes. *Plant Mol. Biol. (Dordrecht)* 15:11-26, 1990.
- Iglesias, Lourdes y R. Rojas. Utilización del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción en el mejoramiento de plantas. *Cultivos Tropicales (La Habana)* 14(2): 74-89, 1992.
- Kennedy, R. A., Mary E. Rumpho y T. C. Fox. Anaerobic Metabolism in Plants. *Plant Physiol. (Alexandria)* 100:1-6, 1992.
- Kerridge, P. C. y W. E. Kronstad. Evidence of Genetic Resistance to Aluminium Toxicity in Wheat (*Triticum aestivum* Vill. Host.). *Agronomy Journal (Madison)* 60:710-711, 1988.
- Key, J. L., C. Y. Lin y Y. M. Chen. Heat Shock Proteins of Higher Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Nueva York)* 78(6):3526-3530, 1981.
- Key, J. L. Heat Stress: Expression and Structure of Heat Shock Protein Genes. / J. Key; R. T. Nagao. - En: *Plant Molecular Biology*. - Londres : Plenum, 1987. - p. 385-387.
- Key, J. L., J. A. Kimpel y R. T. Nagao. Heat Shock Gene Families of Soybean and The Regulation of Their Expression. *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.* 62:87-97, 1987.
- Kimpel, J. A. y J. L. Key. Heat Shock in Plants. *Trends Biochem. Sci.* 10:353-357, 1985.
- Kimpel, J. A. *et al.* Regulation of The Heat Shock Response in Soybean Seedlings. *Plant Physiology (Alexandria)* 94(3):988-995, 1990.
- King, G. J. *et al.* Isolation and Characterization of a Tomato cDNA Clone Which Codes For a Salt-Induced Protein. *Plant Mol. Biol. (Dordrecht)* 10:401-412, 1988.
- Kingston, R. E., T. J. Schuetz y Z. Larin. Heat Inducible Human Factor That Binds to a Human hsp70 Promoter. *Mol. Cell. Biol.* 7:1530-1534, 1987.
- Lavoie, J. N. *et al.* Induction of Chinese Hamster HSP27 Expression in Mouse Cells Confers Resistance to Heat Shock. *The Journal of Biological Chemistry* 268(5):3420-3429, 1993.
- Lin, C. Y., J. K. Roberts y J. L. Key. Acquisition of Thermotolerance in Soybean Seedlings: Synthesis and Accumulation of Heat Shock Proteins and Their Cellular Localization. *Plant Physiol. (Alexandria)* 74:152-160, 1984.
- Lindquist, S. The Heat-Shock Response. *Annu. Rev. Biochem.* 55:1151-1191, 1986.
- Lie, J. y C. Wu. Heat Shock Factor. En: "Transcriptional Regulation". Cold Spring Harbor Lab. Press 907-930, 1992.
- Mamiloni, M. *et al.* Induction of Heat Shock Proteins and Acquisition of Thermotolerance in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Variations Associated With Growth Habit and Plant Development. *J. Plant Physiology* 135(3):269-273, 1990.
- Mohapatra, S. S., R. J. Poole y R. S. Dhindsa. Abscisic Acid-Regulated Gen Expression in Relation to Freezing Tolerance in Alfalfa. *Plant Physiol. (Alexandria)* 87:468-473, 1988.
- Mundy, J. y H. H. Chua. Abscisic Acid and Water Stress Induce The Expression of a Novel Rice Gene. *EMBO Journal (Oxford)* 7:2270-2286, 1988.
- Munns, Rana. Why Measure Osmotic Adjustment? *Aust. J. Pl. Physiol. (Melbourne)* 15:717-726, 1988.
- Nagao, R. T. *et al.* The Heat Shock Response: A Comparative Analysis. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell. Biol.* 3:384-438, 1986.
- Nagao, R. T. *et al.* Genes for Low-Molecular-Weight Heat Shock Proteins of Soybeans: Sequence Analysis of a Multigene Family. *Mol. Cell. Biol.* 5:3417-3428, 1985.
- Nagao, R. T. Heat Shock Protein Genes of Plants. / R. T. Nagao y L. Key. - En: "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants". - San Diego : Academic Press, 1989. - p. 297-328.
- Nagao, R. T., J. A. Kimpel y J. L. Key. Molecular and Cellular Biology of The Heat Shock Response. *Advances in Genetics* 28:235-274, 1990.
- Napier, J. A., J. M. Chapman y M. Black. Calcium-Dependent Induction of Novel Proteins by Abscisic Acid in Wheat Aleurone Tissue of Different Developmental Stage. *Planta (Nueva York)* 179:156-164, 1989.
- Neidhardt, F. C., R. A. Van Bogelen y V. Vaughn. The Genetics and Regulation of Heat-Shock Proteins. *Ann. Rev. Genet.* 18:295-329, 1984.
- Nordin, Kertin, H. Pekka y E. T. Palva. Separate Signal Pathways Regulate The Expression of a Low Temperature Induced Gene in *Arabidopsis thaliana* (L.) Hevnh. *Plant Mol. Biol. (Dordrecht)* 18:1061-1071, 1991.

- Nover, L., K. D. Scharf y D. Neumann. Formation of Cytoplasmic Heat Shock Granules in Tomato Cell Cultures and Leaves. *Mol. Cell. Biol.* 3:1648-1655, 1983.
- Nover, L., K. D. Scharf y D. Neumann. Cytoplasmic Heat Shock Granules Are Formed From Precursor Particles and Are Associated with a Specific Set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 9:1298-1308, 1989.
- Osmotin: A Protein Associated With Osmotic Stress in Plant Cells. / N. K. Singh... / *et al.* - En: Environmental Stress in Plants.- New York : Springer Verlag, 1989.- p. 62-87.
- Pelham, A. R. B. A Regulatory Upstream Promoter Element in The *Drosophila* HSP70 Heat-Shock Gene. *Cell* 30:517-528, 1982.
- Pelham, H. Activation of Heat-Shock Genes in Eukaryotes. *Trends Genet* 1:31-35, 1985.
- Pelham, H. R. B. Evidence That Luminal ER Proteins Are Sorted From Secreted Proteins in a Post-ER Compartment. *EMBO J. (Oxford)* 7:913-918, 1988.
- Perrey, R. y M. Wink. Constitutive Expression and Molecular Characterization of a cDNA Clone Encoding a Partial HSP70 Gene in Cell Suspension Cultures of *Lupinus polyphyllus*. *J. Plant. Physiol.* 137:744-748, 1991.
- Physiological and Molecular Analyses of The Heat Shock Response in Plants. / J. L. Key... / *et al.* - En: Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress.- New York : Academic Press, 1985.- p. 327-348.
- Rebindran, S. K. / *et al.* Regulation of Heat Shock Factor Turner Formation : Role of a Conserved Leucine Zipper. *Science* 259:230-234, 1993.
- Ragomopal, S. Differential mRNA Transcription During Salinity Stress in Barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Nueva York)* 84:94-96, 1987.
- Randall, D. D. Plant Protein Phosphorylation: Dephosphorylation, Calcium and Calcium Binding Proteins / D. D. Randall, D. G. Blevins.- En: Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology.- Columbia University of Missouri, 1990
- Rochester, D. E., J. A. Winer y D. M. Shah. The Structure and Expression of Maize Genes Encoding The Major Heat Shock Protein HSP70. *EMBO J. (Oxford)* 5(3): 451-458, 1986.
- Sachs, M. M. y D. Ho Tuan-Hua. Alteration of Gene Expression During Environmental Stress in Plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. (Alexandria)* 37:363-378, 1986.
- Schraffer, M. A. y R. L. Fisher. Analysis of mRNAs That Accumulate in Response to Low Temperature Identifies a Thiol Protease Gene in Tomato. *Plant. Physiol. (Alexandria)* 87:431-436, 1988.
- Schlesinger, M. J., G. Aliperti y P. M. Kelley. The Response of Cells Heat Shock. *Trends in Biochem. Sci.* 7:222, 1982.
- Schlesinger, M. J. Heat Shock Proteins: The Search For Functions. *J. Cell. Biol.* 103:321-325, 1986.
- Schuster, G. / *et al.* Evidence For Protection by Heat-Shock Proteins Against Photoinhibition During Heat-Shock. *EMBO J. (Oxford)* 7:1-6, 1988.
- Sheen, J. Feedback Control of Gene Expression. *Photosynthesis Research* 26, 1993.
- Shroeder, J. I. y R. Hedrich. Involvement of Ion Channels and Active Transport in Osmoregulation and Signaling of Higher Plant Cells. *Trends Biochem. Sci.* 14:187-192, 1989.
- Sivaramakrishnan, S. V., V. Z. Patil y P. Soman. Heat Shock Proteins of Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* (L. R. Br.) C. V. C.) With Different Heat Tolerance at Seedling Establishment Stage. *J. Exp. Bot.* 41:249-254, 1990.
- Skriver, K y J. Mundy. Gene Expression in Response to Abscisic Acid and Osmotic Stress. *Plant Cell* 2:503-512, 1990.
- Sorger, P. K. y H. R. B. Pelham. Yeast Heat Shock Factor is an Essential DNA-Binding Protein That Exhibits Temperature-Dependent Phosphorylation. *Cell* 54:855-864, 1988.
- Spena, A. / *et al.* Construction of a Heat-Inducible Gene For Plants. Demonstration of Heat-Inducible Activity of The *Drosophila* hsp70 Promoter in Plants. *EMBO J. (Oxford)* 4:2739-2743, 1985.
- Spena, A. y J. Schell. The Expression of a Heat-Inducible Chimeric Gene in Transgenic Tobacco Plants. *Mol. Gen. Genet.* 206:436-440, 1987.
- Straus, D. B., W. A. Walter y C. A. Gross. The Activity of  $\sigma^{32}$  is Reduced Under Conditions of Excess Heat Shock Protein Production in *Escherichia coli*. *Genes & Development* 3:2003-2010, 1989.
- Tsuchido, T., Ruth A. Van Bogelen y F. C. Neidhardt. Heat Shock Response in *E. coli* Influences Cell Division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA ( Nueva York)* 83:6959-6963, 1986.
- Van Bogelen, Ruth, P. M. Kelley y F. C. Neidhardt. Differential Induction of Heat Shock, SOS, and Oxidation Stress Regulons Acid Accumulation of Nucleotides in *Escherichia coli*. *J. of Bacteriology* 1:28-32, 1987.
- Vierling, E. / *et al.* Specific Heat-Shock Protein is Translated Into Chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Nueva York)* 83:361-365, 1986.
- Vierling, E. / *et al.* A Heat Shock Protein Localized to Chloroplasts is a Member of a Eukaryotic Superfamily of Heat Shock Proteins. *EMBO J. (Oxford)* 7:575-581, 1988.
- Vierling, E. Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:579-620, 1991.
- Vierling, E. y J. A. Kimpel. Plant Responses to Environmental Stress. *Current Opinion in Biotechnology* 3:164-170, 1992.
- Westwood, T., J. Cios y C. Wu. Stress-Induced Oligomerization and Chromosomal Relocalization of Heat Shock Factor. *Nature (Nueva York)* 353:822-827, 1991.
- Wiederrecht, G. / *et al.* The *Saccharomyces* and *Drosophila* Heat Shock Transcription Factors are Identical in Size and DNA Binding Properties. *Cell* 48:507-515, 1987.
- Wild, J. J. / *et al.* Partial Loss of Function Mutations in DnaK, the *Escherichia coli* Homologue of The 70 kDa Heat Shock Protein... Affect Highly Conserved Amino Acids Implicated in ATP Binding and Hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Nueva York)* 89:7139-7143, 1992a.
- Wild, J. J. / *et al.* DnaK y DnaJ Heat Shock Proteins Participate in Protein Export in *Escherichia coli*. *Genes & Development* 6:1165-1172, 1992b.
- Xiao, H. y J. T. Lis. Germine Transformation Used to Define Key Features of Heat-shock Elements. *Science* 239:1139-1142, 1988.
- Zhou, M., H. Lambert y J. Landry. Transient Activation of a Distinct Protein Kinase is Responsible for 27kDa Heat Shock Protein Phosphorylation in Nitrogen-Stimulated and Heat-Shocked Cells. *J. Biol. Chem.* 268(1):35-43, 1993.
- Zhou, Y. N. y C. A. Gross. How a Mutation in the Gene Encoding  $\sigma^{70}$  Suppresses the Defective Heat Shock Response Caused by a Mutation in the Gene Encoding  $\sigma^{32}$ . *J. Bacteriology* 174(22): 7128-7137, 1992.

Recibido: 17 de noviembre de 1993  
Aceptado: 21 de enero de 1994