



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y
OCEANOGRÁFICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO
DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROTEÍNAS CRIOPROTECTORAS Y ANTICONGELANTES COMO
MECANISMO PROTECTOR CONTRA EL CONGELAMIENTO EN LA
SIEMPRE VERDE *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Blume
(NOTHOFAGACEAE)

TESISTA: JORGE GALLARDO CERDA
TUTOR: DR. LEÓN A. BRAVO R.
CO-TUTOR: DR. LUIS J. CORCUERA P.

RESUMEN

El género *Nothofagus* está representado en Chile por 10 especies que se distribuyen entre los 33° y los 56° S. Las especies con distribución más amplia, entre las que se encuentra *Nothofagus dombeyi*, poseen un papel fisiológico importante en los bosques del sur de Chile, ocupando diferentes hábitats, tanto en el valle central como en ambas cordilleras. Muchos de los hábitats de esta zona presentan situaciones de estrés hídrico y térmico incluyendo heladas de invierno y primavera.

N. dombeyi es una especie pionera en sitios altamente perturbados como los Lahares, sitios formados por escoria volcánica. Esta especie ha sido descrita como tolerante al congelamiento, capaz de crecer en lugares térmicamente desfavorables, asociado a la acumulación de azúcares en sus células y a eficientes mecanismos de disipación de energía en los fotosistemas.

En este trabajo se propone que *N. dombeyi* acumula proteínas crioprotectoras y anticongelantes en respuesta al frío y que estas proteínas estarían involucradas en mecanismos de resistencia al congelamiento. El objetivo de esta tesis es establecer la presencia de proteínas tipo deshidrinas (DHNs) y proteínas anticongelantes (AFPs), determinar su variación en un curso estacional, su rol en el proceso de aclimatación al frío y la posterior tolerancia al congelamiento.

Una proteína de 47 kDa (DHN 47) reconocida por un anticuerpo antideshidrinas, fue acumulada en las hojas durante las estaciones de invierno y primavera. Esta proteína tuvo actividad crioprotectora *in vitro* protegiendo a la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) de los daños producidos por ciclos de congelamiento/descongelamiento, siendo más efectivo el extracto de hojas obtenidas durante la estación de primavera. Junto con la acumulación de DHN47 en el simplasto se acumularon también AFPs en el apoplasto de las células de las hojas. Estas AFPs mostraron un patrón estacional, al igual que la

DHN 47, apareciendo en invierno y permaneciendo hasta la primavera. La actividad anticongelante *in vitro* fue similar en ambas estaciones modificando levemente la morfología de cristales de hielo en ensayos *in vitro* con valores de histéresis térmica inferiores a 0.5 °C.

El análisis proteómico de hojas de *N. dombeyi* mostró al menos 400 spots. El 98% de estos se mantienen y son comunes entre las estaciones de otoño y primavera. Muy pocas proteínas acumuladas sólo en primavera fueron visualizadas por medio de geles bidimensionales, de éstas sólo tres tuvieron la resolución suficiente para ser analizadas, las que fueron relacionadas con resistencia a estrés abiótico y biótico.

Por otra parte, el anticuerpo antideshidrinas detectó tres proteínas inducidas por frío en células del parénquima xilemático de esta especie, con masas moleculares aparentes entre 40 kDa y 15 kDa. La presencia de estas DHNs se correlacionó positivamente con la conductividad hidráulica del xilema durante eventos de congelamiento a -3°C.

Los resultados en conjunto permiten concluir que *N. dombeyi* es una especie capaz de aclimatarse en respuesta a baja temperatura, acumulando proteínas crioprotectoras y anticongelantes, lo que le confiere tolerancia al congelamiento, es decir, es capaz de tolerar la formación de hielo extra celular sin sufrir daños significativos. Además, la correlación positiva entre proteínas crioprotectoras en el parénquima xilemático y la conductividad hidráulica del xilema podría ayudar a explicar el desempeño fisiológico de esta especie bajo condiciones de estrés por baja temperatura y la capacidad de vivir cerca del límite arbóreo, donde el agua y la temperatura son factores limitantes. El análisis proteómico muestra que en *Nothofagus dombeyi* el proceso de aclimatación a baja temperatura y posterior tolerancia al congelamiento esta mediada por factores de transcripción tipo CBF lo que sugiere que la resistencia adquirida a baja temperatura es independiente de las vías de señalización mediadas por ácido absicico (ABA).