

HORTICULTURA

Efecto de los tratamientos poscosecha en la expresión de proteínas de estrés térmico en tomate Beatriz

S.M. Guidi¹; M. Nanni¹; C. Budde²; P.A. Negri¹⁻³; G. Polenta¹ y C.B. González¹⁻⁴

¹Instituto de Tecnología de Alimentos, CIA-INTA Castelar. ²INTA EEA San Pedro. ³Instituto de Tecnología, Universidad Argentina de la Empresa (UADE). ⁴Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). guidi.silvina@inta.gob.ar

Recibido: 9/6/14

Aceptado: 12/8/15

Resumen

Guidi, S.M.; Nanni, M.; Budde, C.; Negri, P.A.; Polenta, G. y González, C.B. 2015. Efecto de los tratamientos poscosecha en la expresión de proteínas de estrés térmico en tomate Beatriz. *Horticultura Argentina* 34(84): 25-30.

El almacenamiento de frutos de tomates (*Solanum lycopersicum* L.) a bajas temperaturas permite extender el período de mercadeo. Sin embargo, esta fruta es susceptible de manifestar daño por frío (DF). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la expresión de dos familias de proteínas de estrés térmico (HSPs) en muestras de tomates Beatriz sometidas a diferentes tratamientos térmicos poscosecha: 1) Tratamiento térmico corto (inmersión 60 min a 42 °C) = HS60m; 2) tratamiento térmico largo (incubación en cámara 24 h a 39 °C) = HS24h; y 3) no tratados, utilizados como control (C). La fruta fue analizada en tres diferentes períodos: en la cosecha (control), luego de aplicado el tratamiento térmico (0), y luego de 1 h de exposición a temperatura ambiente (+1h). Por la técnica de SDS-PAGE se observó que ambos tratamientos indujeron la sín-

tesis de una proteína con peso molecular aparente de 21 kDa. Sin embargo, no se observaron cambios en la región de 70 kDa. La sobreexpresión de las HSPs fue evaluada por la técnica de Western blot, usando un anticuerpo policlonal anti-sHSPs realizado contra la principal proteína de tomates tratados térmicamente (HSPC1) y un anticuerpo anti-HSP70 comercial. El antisuero HSPC1 detectó la presencia de una proteína de 21 kDa, especialmente en las muestras sometidas al tratamiento largo (HS24h). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la expresión de las muestras sometidas al tratamiento corto (HS60m) y el control. El anticuerpo anti-HSP70 detectó una proteína de 70 kDa sólo en las muestras sometidas al tratamiento HS24h. Entre los tratamientos ensayados, el tratamiento térmico largo (HS24h) fue el más efectivo en inducir ambas familias de HSPs.

Palabras clave adicionales: Estrés, *Solanum lycopersicum* L., desorden fisiológico.

Abstract

Guidi, S.M.; Nanni, M.; Budde, C.; Negri, P.A.; Polenta, G. and González, C.B. 2015. Effect of postharvest treatments on the expression of HSPs in tomatoes Beatriz. *Horticultura Argentina* 34(84): 25-30.

Storage of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at low temperature allows to extend the marketing period. However, these fruit are susceptible to suffer chilling injury (CI). The aim of this work was to study the expression of two families of heat shock proteins (HSPs) in tomato samples submitted at different postharvest heat treatments. The treatments assayed were: 1) short heat treatment (immersion for 60 min at 42 °C) = HS60m; 2) long heat treatment (incubation in chamber 24 h at 39°C) = HS24h; and 3) no treatment, control (C). The fruit was analyzed at three different periods: at harvest (control), at the end of heat treatment (0), and after 1 h the exposition at room temperature (+1h). Both treatments induced

the synthesis of one protein with apparent molecular mass of 21 kDa, observed by SDS-PAGE technique. No changes were observed at the 70 kDa region. The overexpression of HSPs was evaluated by western blot, using a sHSP-specific polyclonal antiserum raised against the main sHSPs from heated tomatoes (HSPC1) and a monoclonal antiserum raised against HSP70. The HSPC1 detected the accumulation of one prevalent protein with MW of 21 kDa, especially in the long treated samples (HS24h). There was no difference observed between samples submitted to HS60m and the control ones. The monoclonal HSP70 antiserum detected a 70 kDa protein only in HS24h samples. Among the treatments assayed, HS24h was more effective to induce both families of HSPs.

Additional keywords: Stress, *Solanum lycopersicum* L., physiological disorder, heat shock proteins.

1. Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes en Argentina (Nakama & Lozano Fernández, 2006) no sólo por su elevado consumo, sino por su alto valor nutricional, fuen-

te de licopeno, pigmento natural antioxidante asociado a la reducción de la incidencia de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Kuit & Konuru, 2005).

Para reducir el deterioro poscosecha, al igual que en otras frutas y hortalizas, el control de la temperatura representa la principal herramienta utilizada ya que

permite mantener la calidad organoléptica y nutritiva del producto, y extender su período de comercialización. Las bajas temperaturas disminuyen la actividad enzimática y microbiana, reducen el ritmo respiratorio y, en consecuencia, el consumo de reservas. También retardan la maduración y disminuyen el déficit de presión de vapor entre el producto y el ambiente, minimizando la transpiración (Martínez-Javega, 1996).

Uno de los mayores problemas que presenta el tomate durante el almacenamiento refrigerado está dado por el desarrollo de una serie de desórdenes fisiológicos producidos en frutas y vegetales sensibles a las bajas temperaturas de almacenamiento, y que se conoce como daño por frío (DF, *chilling injury*) (Saltveit & Morris, 1990). Esta alteración ocasiona a los productores y acopiadores un problema de alto impacto económico dado que produce importantes alteraciones en la piel de los frutos reduciendo su calidad y limitando sus posibilidades comerciales (Parkin *et al.*, 1989).

Los principales síntomas del DF incluyen la maduración irregular, el desarrollo de depresiones por debajo de la epidermis (defecto conocido como *pitting*), la falta de uniformidad del color superficial, el aumento de la tasa respiratoria y de la producción de etileno, y la susceptibilidad del fruto al ataque por parte de los microorganismos. En general, estos síntomas se desarrollan luego de un período de exposición a temperaturas inductoras, y una vez que los frutos son transferidos a temperaturas mayores, como las típicas temperaturas de comercialización (Sharon *et al.*, 1994).

La exposición por un corto tiempo a temperaturas del orden de 35-40 °C previo a la conservación (conocido como golpe térmico) es una estrategia que ha sido utilizada para mantener la calidad y extender la vida útil de las frutas e inclusive para reducir el DF en frutas sensibles (Lara *et al.*, 2009; Sapitnitskaya *et al.*, 2006). En el caso particular del tomate, experiencias previas han demostrado que la exposición a altas temperaturas de estrés (36 a 40 °C) previene el desarrollo de los síntomas característicos del DF luego del almacenamiento por hasta 3 semanas a 2 °C (Lurie & Klein, 1991; Lurie *et al.*, 1993).

Diversos autores (Vierling, 1991; Parsell & Lindquist, 1993; Sabehat *et al.*, 1998) han establecido la relación entre la respuesta al golpe térmico y la protección ejercida contra diferentes tipos de estreses térmicos. Esta protección estaría conferida por la inducción de las llamadas proteínas de estrés térmico (*heat shock proteins*, HSPs), que son un grupo de proteínas cuyo peso oscila entre 15 y 115 kDa, y se expresan en distintos organismos en respuesta a estas altas temperaturas.

Es sabido que muchas HSPs funcionan como cha-

peronas moleculares, uniéndose a proteínas desplegadas o desnaturalizadas, previniendo la agregación e induciendo el correcto plegamiento proteico, ensamble y transporte, y/o dirigiendo las proteínas dañadas hacia su proteólisis, lo cual en su conjunto protege a las células de los efectos deletéreos de las altas temperaturas (Miroshnichenko *et al.*, 2005)

Actualmente se han descrito cinco familias de HSPs: la familia de HSP70, las chaperoninas (HSP60), las familias de las HSP90 y HSP100, y la familia de proteínas de bajo peso molecular (*small heat shock proteins* = sHSPs). Cuando las plantas son expuestas a altas temperaturas, sintetizan tanto las HSPs de alto peso molecular (desde 60 a 110 kDa) como las de bajo peso molecular (de 15 a 45 kDa) (Miernyk, 1997; Renault *et al.*, 2006).

La familia de las sHSPs incluye proteínas cuyos pesos moleculares varían desde 15 a 45 kDa. Se ha demostrado que estas proteínas dominan los perfiles de síntesis proteica, pudiendo incrementarse 2.000 veces (más del 1 % del total contenido proteico) frente a situaciones de estrés por calor (DeRocher *et al.*, 1991; Waters *et al.*, 1996).

Por otra parte, los miembros de la familia de las HSP70 están altamente conservados, encontrándose su contraparte funcional prácticamente en todo organismo vivo, desde bacterias primitivas hasta organismos superiores (Beere & Green, 2001). Las HSP70 actúan como chaperonas moleculares, asistiendo en el plegamiento proteico y en procesos de translocación, y previniendo el desarrollo de daño inducido por el estrés (Guy & Li, 1998).

En la actualidad, muchas de las investigaciones realizadas sobre la aplicación de tratamientos térmicos tienen un carácter empírico, no existiendo además trabajos en los que se compare en forma conjunta la aplicación de diferentes tipos de tratamiento térmicos poscosecha. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta bioquímica a diferentes tratamientos térmicos (TT) poscosecha, realizando la caracterización inmunológica de las dos principales familias HSPs del pericarpio de tomates, de manera de profundizar el conocimiento sobre el mecanismo implicado en la protección contra el daño por frío.

2. Materiales y métodos

Se utilizaron 75 frutos de tomates cultivar Beatriz, verde pintón, provenientes de la provincia de Corrientes, los cuales fueron divididos en tres lotes. Cada lote fue sometido a uno de los siguientes tratamientos: 1) Tratamiento de estrés térmico corto (inmersión por 60

min en un baño de agua a 42° C) = HS60m (30 frutos); 2) Tratamiento de estrés térmico largo (incubación en cámara por 24 h a 39 °C y 95 % de humedad relativa) = HS24h (30 frutos); 3) No tratados, utilizados como control = C (15 frutos). Los análisis fueron realizados al inicio (control), a la salida de los TT (0), y luego de 1 h de exposición de los frutos a temperatura ambiente (+1h).

Las proteínas fueron extraídas del pericarpio de los tomates (tres repeticiones de cinco frutos), siguiendo el método descrito por Hurkman & Tanaka (1986). Brevemente, 1 g de tejido fue homogeneizado en Ultraturrax, conteniendo 1 mL de *buffer* de extracción (100 mM Tris·HCl¹ pH 8,0, conteniendo 1 mM ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), 1 mM fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) y 2 % v/v β-mercaptoetanol) y 4 mL de fenol saturado con 100 mM de *buffer* Tris (pH 8,0). Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C. La fase fenólica fue extraída y mezclada con cuatro volúmenes de 0,1 M de acetato de amonio en metanol, e incubada toda la noche a -20 °C. Las proteínas fueron precipitadas por centrifugación a 10.000 x g durante 20 min a 0 °C. El precipitado obtenido fue lavado con acetato de amonio en metanol, y luego con acetona fría (80 % v/v), y finalmente secado a temperatura ambiente (TA). El residuo seco obtenido fue resuspendido directamente en *buffer* de siembra para electroforesis (25 mM Tris pH 6,8, 1 % p/v SDS, 10 % v/v glicerol, 5 % v/v β-mercaptoetanol y 0,2 % p/v azul de bromofenol). La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry *et al.* (1951).

El análisis electroforético fue realizado de acuerdo

al procedimiento descrito por Laemmli (1970). Para propósitos analíticos, 40 µg de proteína fueron sembrados en cada calle de 0,75 mm de espesor de la placa electroforética. Las proteínas fueron separadas mediante la utilización de geles homogéneos al 12 %, en una cuba Mini Protean III (Bio-Rad) durante 90 min a 130 V. Como marcador de peso molecular, se utilizó un estándar de Bio-Rad de bajo peso molecular (90,2 a 14,5 kDa). Luego de la corrida electroforética, los geles fueron teñidos con 0,1 % (p/v) de *Coomassie Brilliant Blue*.

Para el análisis por Western blot, las proteínas previamente separadas por SDS-PAGE, fueron transferidas (50 min a 100 V y 350 mA) a una membrana de nitrocelulosa (0,45 µm) utilizando una cuba Mini Protean III (Bio-Rad). Para el análisis de las HSPs, se utilizaron dos anticuerpos primarios diferentes; antisuero policlonal anti-HSP21 (Ab-HSPC1), inoculando conejos con una proteína de 21 kDa purificada a partir de tomates Colt 45 sometidos a tratamiento térmico (Polenta *et al.*, 2007) (diluido 1:750), y un anticuerpo monoclonal comercial anti-HSP70 (SIGMA, #H5147) (diluido 1:1500). El segundo anticuerpo fue un anticabra (conejo IgG) para las sHSPs o anticabra (ratón IgG) para HSP70, ambos conjugados con fosfatasa alcalina (Bio-Rad, dilución 1:1500). Las membranas fueron reveladas con cloruro de nitroblue de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP).

Los geles y las membranas fueron procesados en un densitómetro de imagen GS-800 (Bio-Rad), obteniéndose imágenes digitales a partir de un escaneo en alta resolución, para la posterior cuantificación de las bandas proteicas.

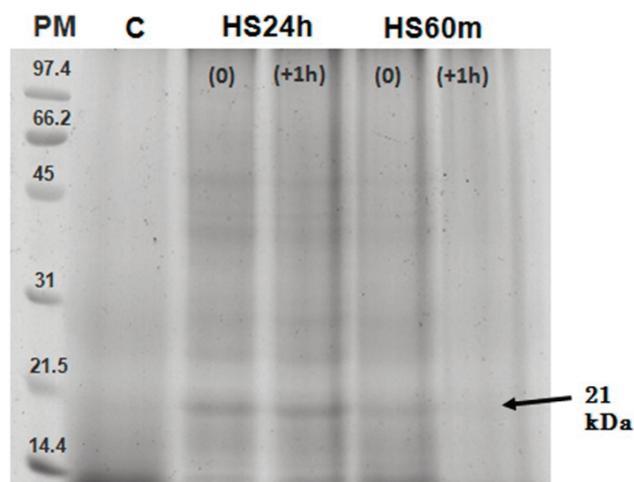


Figura 1. Análisis por SDS-PAGE de los extractos proteicos de tomates Beatriz no tratados (C) y tratados térmicamente (HS24h y HS60m), evaluados a la salida del tratamiento térmico (0) y luego de 1 h de exposición a temperatura ambiente (+1h).

3. Resultados y discusión

La Figura 1 muestra el perfil electroforético de los extractos de tomates correspondientes a los frutos control (C) y a los sometidos a ambos tratamientos térmicos (HS24h y HS60m). El análisis se realizó a la salida del tratamiento térmico (0), y luego de 1 h de exposición a TA (+1h). En la región de bajo peso molecular se observa una banda proteica de aproximadamente 21 kDa (señalada con flecha), que se manifiesta luego de la aplicación de los tratamientos de calor, la cual es más intensa en las muestras de tomates sometidos al tratamiento largo (HS24h). Contrariamente, en la región próxima a los 70 kDa, no se encontraron diferencias en la expresión de HSPs entre el control y las muestras sometidas a ambos TT.

Con el propósito de corroborar si la banda proteica de bajo PM se correspondía con una HSPs, se utilizó

la técnica de Western blot. Así, la Figura 2 muestra el análisis por Western blot de los extractos proteicos de tomates control y tratadas térmicamente. El anticuerpo policlonal (Ab-HSPC1) inmunoreaccionó con una banda proteica cuyo PM fue estimado en 21 kDa. El procesamiento digital de la intensidad de la banda de 21

kDa, permitió establecer la sobreexpresión (80 % mayor aproximadamente) en las muestras sometidas al tratamiento largo (HS24h) inmediatamente luego de aplicado el tratamiento (0), y en menor medida (60 %) luego de 1 h de exposición a TA, respecto del los frutos control. Sin embargo, no se encontraron diferencias en cuanto a la expresión entre los frutos control (C) y aquellos sometidos al tratamiento térmico corto (HS60m), luego de aplicado el tratamiento (0). Más aún, la señal disminuyó luego que los frutos de tomate fueron expuestos posteriormente durante 1 h a TA (+1h).

Es sabido que la acumulación de HSPs en frutas tratadas térmicamente se correlaciona con la adquisición de la tolerancia a bajas temperaturas de almacenamiento (Sabehat *et al.*, 1996; Lafuente *et al.*, 1991). Particularmente, las sHSPs tienen actividad de chaperonas que, en contraste con las HSP de alto peso molecular, son independientes de ATP. De esta manera, las sHSPs ejercen su rol protector contra el estrés provocado por las bajas temperaturas de almacenamiento, estabilizando las proteínas, y manteniendo la fluidez y la integridad de la membrana celular (Horváth *et al.*, 2008). Varios autores han demostrado la acumulación de sHSPs en distintas especies de frutas tratadas por calor, dentro de las cuales puede mencionarse a las frutillas (Civello *et al.*, 1997), las manzanas (Ritenour *et al.*, 2001) y las papayas (Paull & Chen, 1990). En el presente trabajo de investigación pudo establecerse una relación entre el aumento en la síntesis

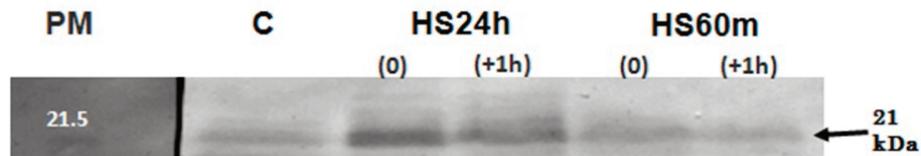


Figura 2. Análisis por Western blot de los extractos proteicos de tomates Beatriz no tratados (C) y tratados térmicamente (HS24h y HS60m), evaluados a la salida del tratamiento térmico (0) y luego de 1 h de exposición a temperatura ambiente (+1h). La membrana fue revelada con el antisuero policlonal Ab-HSPC1.

de proteínas reactivas al antisuero anti-HSPC1 y el incremento en la intensidad del tratamiento aplicado (HS24h).

Cuando se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-HSP70 para evaluar la respuesta de esta familia de HSPs (Figura 3), el anticuerpo inmunoreaccionó con una banda proteica solamente en las muestras sometidas al tratamiento térmico largo (HS24h), cuyo peso molecular fue estimado en 70 kDa. Esta banda se manifestó en ambas situaciones evaluadas, a la salida del tratamiento (0) y luego de 1 h de exposición a TA (+1h). Por el contrario, el anticuerpo no inmunoreaccionó con la muestra control (C), y con las muestras sometidas al tratamiento térmico corto (HS60m).

El resultado del análisis inmunológico confirma la reactividad cruzada existente entre las HSPs de distintas especies, como consecuencia del alto grado de conservación evolutiva que presentan este grupo de proteínas (Lindquist & Craig, 1988; Vierling, 1991; Waters *et al.*, 1996). En esta investigación, las proteínas de tomate reaccionaron con el anticuerpo monoclonal comercial obtenido contra una HSP70 de cerebro de vaca. Esta reactividad cruzada fue informada previamente por otros autores (Rensing & Maier, 1994; Dunlap & Matsumura, 1997). Por ejemplo, Dunlap y Matsumura (1997) produjeron un anticuerpo policlonal contra la secuencia de aminoácidos más conservada de la HSP70, el cual reaccionó en forma cruzada con numerosas proteínas inducibles por calor, de peso molecular de entre 65 y 82 kDa, y en especies muy diferentes evolutivamente como peces, sapos, calamar y plantas de arroz. Miernyk (1997) indicó que las proteínas de 70 kDa pueden expresarse en forma constitutiva (HSC70), y en forma inducible (HSP70). En estudios realizados en leguminosas por Ortiz y Cardemil (2001) se comprobó que un mismo anticuerpo era capaz de reconocer a dos tipos de

proteínas reactivas al antisuero anti-HSPC1 y el incremento en la intensidad del tratamiento aplicado (HS24h).

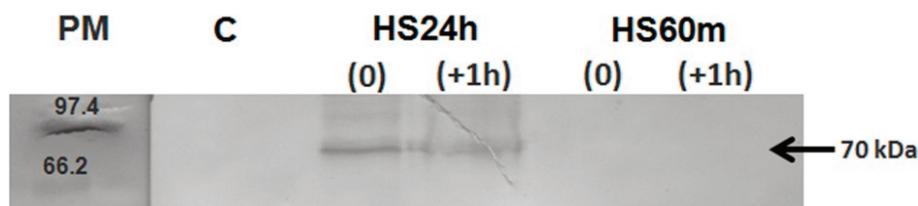


Figura 3. Análisis por Western blot de los extractos proteicos de tomates Beatriz no tratados (C) y tratados térmicamente (HS24h y HS60m), evaluados a la salida del tratamiento térmico (0) y luego de 1 h de exposición a temperatura ambiente (+1h). La membrana fue revelada con el anticuerpo monoclonal anti-HSP70.

HSP70, una de 69 kDa que se expresaba en forma constitutiva y otra de 71 kDa que era inducible por el golpe térmico. En el presente trabajo de investigación, el anticuerpo monoclonal comercial utilizado (HSP 70), si bien reconoce ambas formas de HSP70 (Perdue *et al.*, 1998), solamente inmunoreaccionó con las proteínas de 70 kDa inducidas por el tratamiento térmico largo (HS24h) (Figura 3). Resultados similares fueron descritos por Zhang *et al.* (2005), en uvas tratadas térmicamente (incubación por aire a 38 °C por 10 h). Estos autores observaron un incremento en la expresión de las HSP70, postulando que la acumulación de este grupo de proteínas contribuía a preservar la integridad de las membranas plasmáticas. Este hecho tendría una estrecha relación con la resistencia al DF en la fruta conferida por la aplicación del tratamiento térmico.

4. Conclusiones

El tratamiento de estrés térmico largo (incubación en cámara por 24 h a 39 °C y 95 % de humedad relativa; HS24h) aplicado a los frutos de tomate Beatriz fue el más efectivo en la inducción de las familias de proteínas de estrés como las sHSPs y HSP70.

Los resultados obtenidos resaltan la gran utilidad de este tipo de técnicas bioquímicas para el análisis de la respuesta de frutos a la aplicación de tratamientos térmicos, siendo posible la evaluación en forma precisa y objetiva del nivel de protección generado por los mismos. La correlación entre la concentración de HSPs inducida por las distintas combinaciones de tiempo-temperatura y la efectividad de los tratamientos, permitirá a futuro su aplicación optimizada y el desarrollo de herramientas analíticas de monitoreo robustas.

5. Bibliografía

- Beere, H.M. & Green, D.R. 2001. Stress management-heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 11: 6-10.
- Civello, P.; Martinez, G.A.; Chávez, A.R. & Añón, M.C. 1997. Heat treatments delay ripening and postharvest decay of strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4589-4594.
- DeRocher, A.E.; Helm, K.W.; Lauzon, L.M & Vierling, E. 1991. Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat-shock protein during heat stress and recovery. *Plant Physiology*, 96: 1038-1047.
- Dunlap, D.Y. & Matsumura, F. 1997. Development of broad spectrum antibodies to heat shock protein 70s as biomarkers for detection of multiple stress by pollutants and environmental factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37: 238-244.
- Guy, C.L. & Li, Q.B. 1998. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene families. *Plant Cell*, 10: 539-556.
- Horváth, L.; Multhoff, G.; Sonnleitner, A. & Vigh, L. 2008. Membrane-associated stress proteins: more than simply chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778: 1653-1664.
- Hurkman, W. & Tanaka, C. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*, 81: 802-806.
- Kuit, J.O. & Konuru, H.B. 2005. Effects of genotype and cultivation environment on lycopene content in red-ripe tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 2021-2026.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-684.
- Lafuente, M.T.; Belver, A.; Guye, M.G. & Saltveit, M.E. 1991. Effect of temperature on chilling injury of cucumber cotyledons. *Plant Physiology*, 95: 443-449.
- Lara, M.V.; Borsani, J.; Budde, C.O.; Lauxmann, M.A.; Lombardo, V.A.; Murray, R.; Andreo, C.S. & Drincovich, M.F. 2009. Biochemical and proteomic analysis of "Dixiland" peach fruit (*Prunus persica*) upon heat treatment. *Journal of Experimental Botany*, 60: 4315-4333.
- Lindquist, S. & Craig, E.A. 1988. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 22: 631-677.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Lurie, S. & Klein, J.D. 1991. Acquisition of low temperature tolerance in tomatoes by exposure to high temperature stress. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences*, 116: 1007-1012.
- Lurie, S.; Klein, J.D.; Walkins, C.; Ross, G.; Boss, P. & Ferguson, I.F. 1993. Prestorage heat treatment of tomatoes prevents chilling injury and reversibly inhibits ripening. *Acta Horticulturae*, 343: 283-285.
- Martínez-Javega, J.M. 1996. Manejo en frío: Conservación y transporte de frutos cítricos. 1ª Reunión Internacional de Postcosecha y Mercados Cítricos. FAORAC. Concordia (Argentina). pp: 73-81.

- Miernyk, J. 1997. The 70 kDa stress-related proteins as molecular chaperones. *Trends in Plant Science*, 2(5): 180-187.
- Miroshnichenko, S.; Tripp, J.; Nieden, U.Z.; Neumann, D.; Conrad, U. & Manteuffel, R. 2005. Immunomodulation of function of small heat shock proteins prevents their assembly into heat stress granules and results in cell death at sublethal temperatures. *The Plants Journal*, 41: 269-281.
- Nakama, M. & Lozano Fernández, J. 2006. Boletín electrónico de tomate. Disponible en www.mercadocentral.com.ar
- Ortiz, C. & Cardemil, L. 2001. Heat-shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1711-1719.
- Parkin, K.; Marangoni, A.; Jackman, R.; Yada, R. & Stanley, D. 1989. Chilling injury. A review of possible mechanisms. *Journal of Food Biochemistry*, 13: 127-153.
- Parsell, D.A. & Lindquist, S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damage proteins. *Annual Review of Genetics*, 27: 437-496.
- Paull, R.E. & Chen, N.J. 1990. Heat shock response in field grown ripening papaya fruit. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 115: 623-631.
- Perdue, D.O.; Mitcham, E.J. & Neven, L.G. 1998. Transient expression of HSC70 in cherry fruit subjected to heat Shock. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 4447-4450.
- Polenta, G.A.; Calvete, J.J. & González, C.B. 2007. Isolation and characterization of the main small heat shock proteins induced in tomato pericarp by thermal treatment. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, 274: 6447-6455.
- Renaut, J.; Hausman, J.F. & Wisniewski, M.E. 2006. Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. *Physiologia Plantarum*, 126: 97-109.
- Rensing S.A. & Maier, U.G. 1994. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *Journal of Molecular Evolution*, 39: 80-86.
- Ritenour, M.; Kochhar, S.; Schrade, L.; Tsui-Ping, H. & Ku, M. 2001. Characterization of heat shock expression in apple peel under field and laboratory condition. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 126: 564-570.
- Sabehat, A.; Weiss, D. & Lurie, S. 1996. The correlation between heat-shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit. *Plant Physiology*, 110: 531-547.
- Sabehat, A.; Lurie, S. & Weiss, D. 1998. Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. A possible role in protecting against chilling injury. *Plant Physiology*, 117: 651-658.
- Saltveit (Jr), M.E. & Morris, L.L. 1990. Overview on chilling injury of horticultural crops. In: *Chilling Injury of horticultural crops*. CRC Press. Boca Raton, Florida. 3-15. (Wang, C.Y. ed.).
- Sapitnitskaya, M.; Maul, M.; McCollum, G.T.; Guy, C.L.; Weiss, B.; Samach, A. & Porat, R. 2006. Postharvest heat and conditioning treatments activate different molecular response and reduce chilling injuries in grapefruit. *Journal of Experimental Botany*, 57: 2943-2953.
- Sharon, M.; Willwmont, C. & Thompson, J.E. 1994. Chilling injury induces lipid phase changes in membranes of tomato fruit. *Plant Physiology*, 105: 305-308.
- Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review on Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 579-620.
- Waters, E.R.; Lee, G.J. & Vierling, E. 1996. Evolution structure and function of the small heat shock protein in plants. *Journal of Experimental Botany*, 47: 325-338.
- Zhang, J.; Huang, W.; Pan, Q. & Liu, Y. 2005. Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. *Jingxiu*) by heat pretreatment. *Postharvest Biology and Technology*, 38: 80-90.