

UCH-FC  
Biotecnología  
H 887  
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**“Análisis de la expresión del gen hsp70  
mediante RT-PCR semi-cuantitativo, en plantas de  
*Aloe barbadensis* Miller sometidas a estrés térmico e hídrico”**

Seminario de Título  
Entregado a la  
Universidad de Chile  
En cumplimiento parcial de los requisitos  
Para optar al título de  
Ingeniera en Biotecnología Molecular



Por  
Claudia Mónica Huerta Calderón  
Septiembre, 2009  
Santiago - Chile

Director de Seminario de Título: Dra. Liliana Cardemil Oliva



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

### CLAUDIA MÓNICA HUERTA CALDERÓN

**“Análisis de la expresión del gen hsp70 mediante  
RT-PCR semi-cuantitativo, en plantas de *Aloe barbadensis* Miller  
sometidas a estrés térmico e hídrico”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

*Dra. Liliana Cardemil Oliva*  
**Director Seminario de Título**

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

*Dra. Claudia Stange Klein*  
**Co- Directora Seminario**

Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

#### Comisión de Evaluación Seminario de Título

*Dr. Marcelo Baeza Cancino*  
**Presidente Comisión**

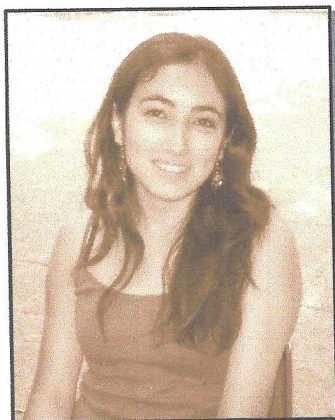
Firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.  
Sello circular de la Facultad de Ciencias, Biblioteca Central, Universidad de Chile.

*Dr. Francisco Chávez Espinosa*  
**Corrector**

Santiago de Chile, Septiembre de 2009

# AUTOBIOGRAFÍA

Claudia Mónica Huerta Calderón



En realidad, esto de hablar de mí misma, me resulta un poco extraño y también complicado, como si ya escribir esta tesis no lo fuera, pero veamos que puedo hacer.

Nací un 17 de junio de 1985 en Santa Cruz, una pequeña pero linda ciudad de la VI región. Nací siendo la menor de 5 hermanos, razón por la cual, creo que he tenido mayores libertades que ellos, y menos responsabilidades por ser “el conchito”, aunque obviamente, sin salvarme de sus ventajas y desventajas.

He vivido toda mi vida en Cunaco, una localidad cercana a Santa Cruz, en donde el ambiente de campo me permitió tener una infancia libre y feliz, y donde se forjó mi personalidad, si bien un tanto introvertida, también puedo decir que alegre y relajada. Realicé mis estudios básicos con resultados bastante satisfactorios, aunque entonces no tenía la más mínima idea de lo que eso podría significar. Un factor que marcó mi vida fue la ausencia de mi hermana Isabel, sin embargo creo que me fortaleció para conseguir mis logros venideros. La enseñanza media la realicé en el Colegio María Auxiliadora, desde donde tengo los mejores recuerdos. El cambio de colegio y de ambiente indujo el inicio de mi despertar al mundo: aquí hice grandes amigos y aquí me di cuenta de mi interés por la biología y las ciencias en general.

“¿Ingeniería en que que qué?” era la pregunta que me hacía mi familia cuando escogí la carrera; “ah... como científica”, “mmm” ...y es que en una familia tradicional como la mía era totalmente raro que estudiara algo que ni siquiera podía explicarles con todas sus letras, principalmente porque eso lo fui descubriendo ya en la universidad. Sin embargo, considerando el camino recorrido, y ahora con título en mano, puedo explicarles y demostrarles que esta fue la mejor elección que pude haber tomado.

## AGRADECIMIENTOS



Quiero agradecer en primer lugar a mi familia, el pilar fundamental de mi vida. Agradezco especialmente a mis padres por su amor y apoyo incondicional, a mis hermanos Yoli, Marcos y Paulina, y a mis cinco sobrinos lindos: Mayra, Nacho, Anita, Isa y Simona, los cuales me llenan de alegría y orgullo. Mención especial se merece un angelito que tengo, Isabel, que estoy segura ha tenido gran participación en el cumplimiento de este sueño.

También quiero agradecer a la Dra. Liliana Cardemil, mi jefa en el laboratorio, por permitirme trabajar con ella, por sus constructivas críticas, esenciales en mi formación, y muy especialmente por su paciencia.

A toda mi gente del laboratorio de Biología Molecular Vegetal: a los profes Claudia, Mike y Lorena por su permanente ayuda y buena onda. A la Lore y Mariela por ser quienes prácticamente me enseñaron a pipetear cuando entré al lab. A mis compañeros del team LCO: Isa, Carlos, Mati y Darío, porque realmente ha sido un agrado trabajar con ellos; a la Ange por toda su ayuda, al Seba por su buena voluntad, y a cada uno de mis compañeros del lab por generar, sin proponérselo, ese ambiente de trabajo tan exquisito.

A las personas tan especiales que he conocido en la U: a Felipe, Jorge, Lore, Mati, Ori y Patito por esos momentos inolvidables que compartimos y que hicieron que mi paso por la U fuera una de las mejores etapas de mi vida. A mis compañeros de la carrera, con los cuales no sólo compartí maratónicas jornadas de estudio sino también de descanso y distracción, y que gracias a ellos sentí que todos estos años se me fueron volando. Y por supuesto gracias a mis chicas LPs, gloriosa agrupación de féminas por una causa, bueno varias en realidad, simplemente por ser como son.

A mis amigas de la vida: Paola, Yely, Tato, Nino, Channy y Nata que son mi mayor tesoro del colegio y que desde entonces han estado conmigo, sin importar su localización geográfica.

Espero haber transmitido mi sincera gratitud a cada una de las personas mencionadas, ya sea directa o indirectamente, pues cada una de ellas tiene un trocito de mi corazón.



*A mis padres  
por su amor incondicional  
a quienes debo todo lo que soy*

## INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS.....	2
INDICE DE FIGURAS.....	4
INDICE DE TABLAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCION.....	12
1.1. Efectos del estrés térmico e hídrico en las plantas.....	12
1.2. Mecanismos de respuesta de las plantas frente al estrés térmico e hídrico.....	14
1.2.1. Respuesta "Estrés térmico": HSP70.....	14
HIPOTESIS.....	19
OBJETIVOS.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos.....	19
2. METODOLOGIA.....	20
2.1. Análisis Bioinformático: Diseño de partidores.....	20
2.2. Experimentos Fisiológicos.....	21
2.2.1. Tratamiento de plantas de Aloe vera con condiciones de estrés hídrico y térmico.....	21
2.2.2. Tratamiento previo de las muestras.....	22
2.3. Cuantificación del mRNA de hsp70.....	22
2.3.1. Extracción de RNA total y tratamiento con DNAsas.....	22
2.3.2. Transcripción Reversa.....	22
2.3.3. Extracción del DNA.....	23
2.3.4. Amplificación por PCR.....	24



2.3.5. Electroforesis en geles de agarosa.....	24
2.3.6. Cuantificación de los ácidos nucleicos.....	25
2.4. Clonación del cDNA del gen hsp70. ....	25
2.4.1. Reacción de ligación. ....	25
2.4.2. Preparación de las células competentes .....	26
2.4.3. Transformación .....	27
2.4.4. Identificación de colonias transformadas con el vector recombinante. ....	27
2.4.5. Secuenciación.....	28
2.4.6. Análisis de las secuencias.....	28
3. RESULTADOS.....	29
3.1. Los partidores diseñados para hsp70, hsp100 y ubiquitina amplifican una banda del tamaño esperado en Aloe vera. ....	29
3.2. Clonación del fragmento de cDNA de hsp70 en <i>E. coli</i> .....	32
3.2.2. Secuencia del fragmento es homóloga a la secuencia de hsp70 de otras especies.....	33
3.3. Acumulación de mRNA en condiciones de estrés.....	36
3.3.1. Cuantificación del mRNA de hsp70 en plantas bajo estrés térmico.....	38
3.3.2. Cuantificación del mRNA de hsp70 en plantas bajo estrés hídrico.....	41
3.3.3. Características fenotípicas de plantas de Aloe vera bajo estrés. ....	43
3.4. Amplificación de otros genes de estrés térmico: hsp100 y ubiquitina. ....	44
4. DISCUSION Y PROYECCIONES.....	45
5. CONCLUSIONES.....	53
6. BIBLIOGRAFÍA.....	54
7. ANEXOS.....	59



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del vector pGEM®-T Easy, que incluye puntos de referencia en la secuencia.....	26
Figura 2.- Alineamiento de las secuencias de cDNA de los genes de estrés térmico, mostrando la ubicación de los partidores diseñados.....	30
Figura 3.- Análisis de electroforesis muestra que los partidores diseñados para hsp70 amplifican la banda esperada desde el cDNA y DNA de Aloe vera.....	31
Figura 4.- Electroforesis de los ácidos nucleicos de las colonias transformadas con el vector ligado al fragmento de 609 pb de hsp70.....	32
Figura 5.- Digestión enzimática del DNA plasmidial permite corroborar el tamaño del fragmento clonado.....	33
Figura 6.- Secuencia del fragmento clonado de hsp70, obtenido por PCR con los partidores hsp70F y hsp70R.....	34
Figura 7.- Secuencia aminoacídica del fragmento de HSP70 en estudio.....	34
Figura 8. Esquema de la proteína HSP70, donde se destaca la región que fue analizada en Aloe vera, y los dominios conservados.....	36
Figura 9.- Estandarización del número de ciclos de amplificación para cada par de partidores.....	37
Figura 10.- Aumento en la expresión de hsp70 correlacionada con un aumento en la temperatura.....	38
Figura 11.- Incremento relativo en la expresión del gen hsp70 con respecto al control interno 18S, en hojas de Aloe vera sometidas a estrés de temperatura.....	39
Figura 12.- Aumento en la expresión de hsp70 correlacionada con una menor disponibilidad de agua.....	41
Figura 13.- Incremento relativo en la expresión del gen hsp70 con respecto al control interno 18S, en hojas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico.....	41





Figura 14. Fotografía de plantas de Aloe vera cultivadas en el Centro Experimental de las  
Cardas, sometidas a estrés hídrico.....43

Figura 15.- Partidores diseñados para hsp100 y ubiquitina amplifican banda del tamaño  
esperado en cDNA de Aloe vera.....44



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Secuencias utilizadas para el diseño de partidores para los genes hsp70, hsp100 y ubiquitina.....	20
Tabla 2.- Secuencia de los partidores utilizados en este Seminario de Título .....	30
Tabla 3.- Análisis de BLAST con la secuencia nucleotídica y aminoacídica de hsp70 .....	35
Tabla 4.- ANOVA y Test de Tukey para mediciones de cuantificación de mRNA de hsp70 con respecto a 18S en hojas de Aloe vera sometidas a estrés de temperatura .....	40



## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	: Análisis de varianza
ATP	: Adenosín Trifosfato
BiP	: Proteína de unión a inmunoglobulina
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
CAM	: Metabolismo del Ácido Crasuláceo
cDNA	: DNA complementario
CTAB	: Bromuro de Cetil Trimetil Amonio
DEPC	: Dietilpirocarbonato
DIG	: DNA digerido
DMSO	: Dimetilsulfóxido
DNAsa	: Desoxirribonucleasa
dNTP	: Desoxirribonucleótido
EDTA	: Ácido etilendiaminotetracético
GABA	: Ácido gamma-aminobutírico
HSP	: Heat Shock Protein
HSF	: Heat Shock Factor
kDa	: Kilo Dalton
LB	: Luria Bertani
NCBI	: Nacional Center for Biotechnology Information
mRNA	: RNA mensajero
PCR	: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	: Polietilenglicol
RNAsa	: Ribonucleasa
ROS	: Especie reactiva del Oxígeno
rRNA	: RNA ribosómico
RT-	: Control negativo de Transcripción Reversa
RT	: Transcripción Reversa
st PM	: Estándar de Peso Molecular
T1	: Tratamiento de riego 1
TAE	: Tris- Ácido Acético- EDTA
Tm	: Temperatura de melting (fusión)
TSS	: Transformation Storage Solution

## RESUMEN

*Aloe barbadensis* Miller, cuyo nombre común es Aloe vera, es una planta perteneciente a la familia Asphodelaceae y naturalmente adaptada a zonas áridas y de gran oscilación térmica. El gel de Aloe es de gran importancia económica debido a las propiedades alimenticias, farmacéuticas y cosmetológicas que se le atribuyen. Por esta razón, su cultivo en el norte de Chile ha tenido una gran expansión, pese a no existir un manejo agronómico adecuado.

El siguiente trabajo pretende aportar al conocimiento de esta planta frente a las condiciones de estrés hídrico y de alta temperatura, en cuanto a la expresión de proteínas de estrés térmico, como HSP70, una chaperona que repliega las proteínas desnaturalizadas. Se diseñaron partidores desde secuencias de hsp70 homólogas en otras plantas, para amplificar por PCR. La clonación y secuenciación del fragmento obtenido, junto con un análisis bioinformático de su secuencia, confirmó que los partidores amplifican el gen hsp70 de Aloe vera. Con el uso de estos partidores se analizó la expresión del gen hsp70 mediante RT-PCR semi-cuantitativo. Se analizó la expresión de este gen en estrés térmico, incubando a 25°, 35°, 40° y 45°C, y se observó un aumento en la expresión del 47% a 40°C y 45°C. En estrés hídrico, se observó un aumento en la expresión en cada tratamiento T1, T2, T3 y T4 (1600, 1200, 800 y 400 mL/planta/15 días), correlacionado con la intensidad del estrés. Estos resultados sugieren que en Aloe vera el gen hsp70 aumentaría sus niveles de mRNA, y probablemente también de la proteína, a altas temperaturas y en déficit hídrico, replegando las proteínas dañadas en estas condiciones. Este mecanismo sería parte de la respuesta que se activa en Aloe vera frente al estrés hídrico y térmico.

Además, se diseñaron partidores para estudiar la expresión los genes de estrés térmico, hsp100 y ubiquitina, obteniendo por PCR bandas del tamaño esperado, lo cual permitirá realizar similares estudios de expresión.

Estos resultados comprueban que Aloe vera es una planta con aumentada tolerancia al estrés térmico e hídrico, por lo cual puede considerarse como una planta modelo para estudios de mejoramiento vegetal, para producir plantas para cultivo con mayor rendimiento en condiciones de estrés ambiental.

## ABSTRACT

*Aloe barbadensis* Miller, also known as Aloe vera, is a CAM plant of the Asphodelaceae family, and is well-adapted to arid regions with extreme thermal oscillations. The gel of Aloe is economically important due to their cosmetic, pharmaceutical and alimentary properties. For this reason, there has been an expansion in the cultivation of this species, even though appropriate agricultural practices are lacking.

The following work intends to contribute to the knowledge of how Aloe vera responds to water and heat stress, focusing on the expression of heat shock proteins, such as HSP70, a chaperone which has been extensively studied due to its ability to repair denatured proteins. PCR primers were designed against conserved regions of orthologous hsp70 gene sequences from plants. Cloning and sequencing of the amplified fragment, and analysis of the resulting sequence, showed that these primers did indeed amplify a partial hsp70 gene from Aloe vera. Expression of hsp70 was quantified by semi-quantitative RT-PCR at high temperatures and under drought conditions. Expression of hsp70 increased by 47% at 40°C and 45°C, compared to the expression levels at 25°C. Under restrictive water conditions, the relative expression of this gene increased gradually from a normal water irrigation regime T1 to T2, T3 and T4 (1600 to 1200, 800 and 400 mL/plant/15 days, respectively), according to the intensity of stress. These results suggest that in Aloe vera subjected to high temperature or water deficit conditions, the expression of hsp70 increases, as a means to refold proteins damaged under these stresses. This mechanism would form a part of the response that is activated in *Aloe barbadensis* Miller under heat and drought stress.

Moreover, in order to study the expression of other heat shock genes, primers were designed to amplify hsp100 and ubiquitin, and the corresponding fragments

amplified from Aloe vera were of the expected size. These primers are thus a tool which will allow similar expression studies of these genes to be performed.

This results verify that Aloe vera is a plant with high tolerance to heat and drought stress, so it can be considered as a model plant for vegetal improvement in order to obtain crops with higher yield in field with ambiental stress.

## 1. INTRODUCCION

En la actualidad la mayoría de los cultivos de importancia económica en el mundo, son afectados negativamente por la exposición a altas temperaturas (Hall, 2001; Giaveno y Ferrero, 2003). Esto trae como consecuencia una disminución en la cantidad y calidad de la biomasa producida, lo que constituye un serio problema para la industria agrícola. Si agregamos a esto que la población mundial está en constante crecimiento, lo que implica un aumento en la demanda, surge entonces la necesidad de expandir los terrenos cultivables a las regiones menos explotadas, como las áridas y semiáridas. Sin embargo, son pocas las especies vegetales capaces de sobrevivir en este tipo de ambientes, por lo cual se hace necesario conocer qué efectos causa el estrés de temperatura en las plantas, y qué mecanismos despliegan éstas para contrarrestarlos. Esta información permitirá desarrollar herramientas biotecnológicas para la generación de plantas con una mejorada tolerancia al estrés abiótico.

### ***1.1. Efectos del estrés térmico e hídrico en las plantas***

Se puede considerar el estrés térmico como el aumento en temperatura más allá del nivel umbral por un período de tiempo suficiente para causar daño irreversible al crecimiento y desarrollo de la planta. Sin embargo, sabemos que el estrés térmico es una función compleja que depende de la intensidad, duración y la tasa de incremento en la temperatura (Wahid y col., 2007).

Los principales daños causados por las altas temperaturas, y por el estrés abiótico en general son la desnaturalización y agregación de las proteínas y una fluidez incrementada de los lípidos de membrana. Esto produce la inactivación de enzimas, ya sean del citoplasma, del cloroplasto y mitocondriales; la inhibición de la síntesis proteica, la degradación de proteínas y la pérdida de la integridad de las membranas



(Howarth, 2005). El estrés térmico también afecta la organización de los microtúbulos y la formación de ásteres en las células mitóticas (Smertenko y col., 1997). Estas injurias pueden llevar a la inhibición del crecimiento, la reducción del flujo de iones, y la producción de compuestos tóxicos y especies reactivas del oxígeno (ROS) (Schöffl y col., 1998; Howarth, 2005). Como consecuencia de esto, se alteran las actividades a nivel celular y del organismo, aunque el umbral de temperatura y los efectos causados varían considerablemente con el estado del desarrollo, con la especie vegetal y con el estado fenológico (Wollenweber y col., 2003).

En cuanto a los efectos en la fisiología, podemos destacar que el status hídrico de la planta es una de las variables más importantes bajo las condiciones inestables de temperatura ambiental, y de suministro hídrico (Mazorra y col., 2002). Se ha reportado que disminuye el potencial hídrico de la hoja y la conductividad hidráulica en la raíz (Morales y col., 2003; Añon y col., 2004; Wahid y Close, 2007), lo que dificulta el transporte del agua por la planta.

La fotosíntesis se ve fuertemente alterada por las altas temperaturas, siendo los principales sitios afectados las reacciones fotoquímicas en las lamelas del tilacoide, y el metabolismo del carbono en el estroma del cloroplasto (Wise y col., 2004). Además, se produce un desequilibrio entre la fotosíntesis y la respiración; en general, la tasa fotosintética decrece mientras la tasa respiratoria aumenta considerablemente (Taiz y Zeiger, 1998).

Por otro lado, el estrés abiótico en general puede inducir estrés oxidativo, lo que implica la generación de ROS, cuyas reacciones causan la peroxidación autocatalítica de los lípidos de membrana y los pigmentos, llevando a la pérdida de semi-permeabilidad de membrana y la alteración de sus funciones (Xu y col., 2006)

Además, bajo el estrés térmico se han observado alteraciones en la homeostasis hormonal, como cambios en la estabilidad, la biosíntesis y la compartimentación de las hormonas ácido absícico y etileno (Maestri y col., 2002).

Considerando todos estos efectos adversos, las plantas activan mecanismos de respuesta para contrarrestarlos y/o disminuir la intensidad del daño causado. Esta respuesta, que es similar en los distintos tipos de estrés abiótico, será descrita a continuación.

### ***1.2. Mecanismos de respuesta de las plantas frente al estrés térmico e hídrico.***

Entre los mecanismos que activan las plantas para paliar los efectos del estrés abiótico, figura la acumulación de ciertos compuestos orgánicos de bajo peso molecular, comúnmente conocidos como solutos compatibles (Hare y col., 1998), entre los cuales destacan la glicina-betaína, la prolina y el GABA, que actúan como osmorreguladores. Esta respuesta se activa tanto en el estrés a altas temperaturas, como en el déficit hídrico y la alta salinidad (Wahid y col., 2007).

Por otro lado, para contrarrestar el estrés oxidativo que desencadena el estrés abiótico, las plantas activan una serie de sistemas de detoxificación enzimática, tales como la sobreexpresión de las enzimas ascorbato peroxidasa y superóxido dismutasa (Sairam y Tyagi, 2004; Tang y col., 2006; Salinas y col., 2007; Ramírez y col., 2007), enzimas que remueven las ROS.

#### ***1.2.1. Respuesta "Estrés térmico": HSP70***

Existe una respuesta, universal en los seres vivos, denominada Respuesta "Estrés térmico", que es bastante conservada desde los microorganismos hasta el *Homo sapiens* (Vierling, 1991). A nivel molecular, es una reprogramación transitoria de

las actividades celulares, caracterizada por la síntesis de las proteínas de estrés térmico (*heat shock proteins*, o HSP), en conjunto con un cese de la síntesis de proteínas. Las HSPs se acumulan de manera correlacionada con la intensidad del estrés para proteger las células y proveer un nivel superior de termotolerancia. En general, esta respuesta se activa frente a varios tipos de estrés ambiental, tales como el déficit hídrico, las altas temperaturas, el exceso de radiación, la alta salinidad (Zhu 2002) y el estrés oxidativo (Iba 2002).

Las proteínas de estrés térmico son chaperonas moleculares que se acumulan en la célula para proteger a las proteínas de la desnaturalización en condiciones de estrés. Entre ellas destacan HSP70, cuya función principal durante el estrés es replegar las proteínas que se han desnaturalizado, previniendo la agregación. Por otro lado, existe HSP100, que solubiliza los agregados de proteínas para que éstas puedan ser renaturalizadas, y Ubiquitina, que destina al proteasoma las proteínas excesivamente dañadas para su degradación, debido a que se vuelven potencialmente peligrosas. La importancia de esta respuesta radica en que, al devolver su estructura a las proteínas, y por ende su función, se corrigen los efectos adversos en el resto de las actividades celulares (Wang y col., 2004).

La proteína HSP70 es la chaperona más estudiada, la cual es codificada por una familia génica. En plantas, varios genes *hsp70* han sido identificados, pero gracias a los estudios en *Arabidopsis thaliana* se ha logrado una mejor caracterización de esta familia. Su genoma contiene 18 genes *hsp70*, los cuales se dividen en distintas subfamilias de acuerdo a su localización subcelular (Fietto y col, 2007). En condiciones normales, HSP70 asiste en un amplio rango de procesos, como el plegamiento y ensamblaje de las proteínas recién sintetizadas, la reestructuración de las proteínas mal plegadas y agregadas, la translocación de las proteínas secretorias y organelares, y el control de la actividad de las proteínas regulatorias (Mayer y Bukau, 2005). Las

HSP70s son proteínas de 70 kDa que constan de un dominio ATPasa en el N-terminal, de 45 kDa, un dominio central de unión a sustrato de 15 kDa, y un dominio C-terminal de 10kDa involucrado en la unión de co-chaperonas (Erbse y col., 2004). Esencialmente, la proteína existe en un estado abierto, unido a ATP, donde las proteínas desplegadas pueden ingresar al bolsillo de unión, y una vez adentro, el ATP se hidroliza y el bolsillo se cierra para reparar la proteína dañada. Para que esto ocurra, el sustrato o proteína debe estar desplegado, ya que HSP70 se une a regiones extendidas ricas en residuos hidrofóbicos, que en estado nativo, no son accesibles. Esta interacción, además, es asistida por co-chaperonas de la familia de proteínas con dominio J, en plantas conocida como HSP40, la cual media la interacción HSP70-sustrato, al facilitar la hidrólisis del ATP (Mayer y Bukau, 2005).

Los transcritos de *hsp70* se acumulan bajo condiciones de estrés ambiental, tales como las altas temperaturas, el frío y la sequía, así como durante la exposición a químicos y otros (Guy y Li, 1998; Lin y col., 2001; Sung y col., 2001). *Prosopis chilensis*, una planta del desierto chileno presenta altos niveles basales de la proteína HSP70, los cuales aumentan con la intensidad del estrés térmico aplicado (Ortiz y Cardemil, 2001). Además, se ha reportado la acumulación del mRNA de *hsp70*, *hsp100* y ubiquitina en plantas de tabaco y *arabidopsis* sometidas a estrés térmico e hídrico (Rizhsky y col., 2002, Rizhsky y col., 2004).

La respuesta “Estrés Térmico” es importante, además, porque existen estudios que avalan la protección cruzada que brinda contra varios tipos de estrés (Reyes y col., 2003). La sobreexpresión de BiP, un homólogo de HSP70 del retículo endoplásmico, confirió tolerancia al estrés hídrico en tabaco (Alvim y col. 2001), mientras que el homólogo DnaK bacteriano, al sobreexpresarlo en la cianobacteria *Aphanothece halophytice*, otorgó tolerancia al estrés salino y las altas temperaturas (Wang y col., 2004). Este cruzamiento entre la respuesta a los estímulos ambientales diferentes

proviene, en parte, de que todos ellos producen estrés oxidativo y osmótico. Por otro lado, las señales iniciales de estrés abiótico, por ejemplo cambios en la temperatura o fluidez de membrana, que desencadenan la activación de factores de transcripción, son comunes en distintos tipos de estrés, lo cual explica la activación de los mismos genes. Esto, está avalado por los estudios de transcriptoma en *Arabidopsis*, los cuales han identificado una sobreposición de los genes inducidos por las distintas condiciones de estrés (Sung y col., 2001). Los factores de transcripción de estrés térmico (HSF, heat shock factor) son activados frente a distintos tipos de estrés ambiental, induciendo su oligomerización, lo que los vuelve activos y listos para unirse a la región promotora de los genes de estrés térmico, en el DNA, y activar su transcripción.

Por lo tanto, estudiar la respuesta al estrés térmico e hídrico es de suma importancia, pues permite conocer la tolerancia de la planta no sólo frente a estos tipos de estrés, sino que también al de salinidad, el frío, entre otros, los cuales en conjunto constituyen los principales factores limitantes en la producción mundial de los cultivos para la alimentación (Hall, 2001). Esto adquiere mayor relevancia para el caso de las plantas con importancia económica, no sólo desde el punto de vista alimenticio, sino también desde el punto de vista farmacológico y cosmético. Este es el caso de *Aloe barbadensis* Miller, de nombre común Aloe vera, una planta de desierto que ha despertado un gran interés por la utilización de su gel para la elaboración de medicamentos, cosméticos y como complemento alimenticio.

Las propiedades curativas del Aloe vera abarcan desde el tratamiento de heridas (Krishnan, 2006), quemaduras (Wickline, 2004) e inflamaciones (Yagi y Takeo, 2003; Langmead y col., 2004), hasta el tratamiento de enfermedades más severas, como algunos tipos de cánceres (Heggie y col., 2002; Acevedo-Duncan y col., 2004; Su y col., 2004; Im y col., 2005), diabetes mellitus (Yongchaiyudha y col., 1996), e incluso SIDA (Schweitzer, 1994; Pugh y col., 2001; Chow y col., 2005, Govindarajan,

2005). Para la industria cosmetológica, el Aloe vera es de gran interés por sus estudiadas propiedades hidratantes y cicatrizantes, por lo cual se ha incorporado a productos de belleza, como jabones, protectores solares y cremas (Eshun y He, 2004).

Estas importantes propiedades han convertido al Aloe vera en una planta de gran interés comercial, por lo que su cultivo se ha expandido alrededor del mundo. En nuestro país, se ha incrementado la superficie plantada en la zona norte, área donde predomina el clima árido y semiárido.

La planta de Aloe vera posee ciertas características que hacen suponer que estaría naturalmente adaptada a las condiciones del norte de Chile. Perteneciente a la familia de las Asphodalaceae, Aloe vera es una planta de hojas suculentas que permiten retener agua en condiciones de escasez, y mediante el metabolismo del ácido crasuláceo, invierte el ritmo estomático, evitando la pérdida de agua por evaporación. Además, considerando lo anteriormente expuesto, es de esperar que Aloe vera active eficientemente la respuesta “Estrés Térmico”, acumulando las proteínas de estrés ya mencionadas en las condiciones que se presentan en el norte de Chile. Ya se ha visto en plantas del desierto chileno (*Prosopis chilensis*) altos niveles basales de estas proteínas y que aumentan con la intensidad del estrés térmico aplicado, en comparación con plantas de climas templados como soya (Ortiz y Cardemil, 2001).

No obstante, no se sabe si Aloe vera estaría naturalmente protegida a nivel de las HSPs, por lo que se propone realizar estudios al respecto. En este trabajo se investigó si existe correlación entre la producción de proteínas de estrés térmico y la capacidad de resistir el estrés. Esto será complementado con otros estudios a nivel fisiológico y bioquímico, lo cual permitirá conocer mejor la respuesta de esta planta al estrés abiótico, y generar conocimientos aplicables al mejoramiento vegetal, lo que permitiría obtener nuevas variedades, tolerantes a las condiciones desfavorables producidas por el fenómeno del cambio climático.

## HIPOTESIS

El tratamiento de las plantas de Aloe vera a temperaturas sub-letales o sometidas a déficit hídrico, aumenta la expresión del gen hsp70 lo que contribuye a la tolerancia de *Aloe barbadensis* Miller a estos dos estrés presentes en el desierto chileno.

## OBJETIVOS

### ***Objetivo General***

Estudiar la expresión de hsp70 en *Aloe barbadensis* Miller frente al estrés térmico e hídrico, midiendo los niveles de mRNA para este gen, en plantas sometidas a distintas temperaturas y regímenes de riego.

### ***Objetivos Específicos***

1. Diseñar partidores para la amplificación de los genes hsp70, hsp100 y ubiquitina a partir de las secuencias de plantas cercanas filogenéticamente a Aloe vera.
2. Clonar y secuenciar el cDNA de hsp70 amplificado por RT-PCR.
3. Cuantificar los niveles de mRNA de hsp70 en plantas de Aloe vera sometidas a estrés térmico e hídrico, mediante RT-PCR semi-cuantitativo.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Análisis Bioinformático: Diseño de partidores

Dado que no son conocidos los genes hsp70, hsp100 y ubiquitina de *Aloe barbadensis* Miller, se diseñaron partidores desde las secuencias de cDNA de estos genes en otras especies relacionadas filogenéticamente, especialmente plantas monocotiledóneas, al igual que Aloe vera. Para hsp70, se consideraron además, tres secuencias de *Arabidopsis thaliana*, pues en esta especie la familia hsp70 consta de 12 miembros (Sung y col., 2001), y esto permitiría abarcar un espectro más amplio de genes de hsp70. Para hsp100, se consideró una secuencia de *Arabidopsis*, y para ubiquitina se utilizaron secuencias de tres plantas dicotiledóneas, considerando la alta conservación nucleotídica de este gen (Sharp y Li, 1987), lo cual se corroboró en los análisis realizados. En la Tabla 1 se muestran las secuencias utilizadas.

**Tabla 1. Secuencias utilizadas para el diseño de partidores para los genes hsp70, hsp100 y ubiquitina.** Se muestra el código de acceso a *GenBank* para cada una de ellas. (™)Plantas monocotiledóneas.

hsp70		hsp100		ubiquitina	
AF005993.1	<i>Triticum aestivum</i> ™	AF174433.1	<i>Triticum aestivum</i> ™	AY862401.1	<i>Triticum aestivum</i> ™
X67711.2	<i>Oryza sativa</i> ™	AJ970536.2	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>Durum</i> ™	AY072820.1	<i>Oryza sativa</i> ™
AY914601.1	<i>Zea mays</i> ™	AK105433.1	<i>Oryza sativa</i> ™	M73787.1	<i>Zea mays</i> ™
AY059885.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF332981.1	<i>Oryza sativa</i> ™	DQ793134.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AY054183.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF133840.1	<i>Zea mays</i> ™	D16248.1	<i>Glycine max</i>
AY054190.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATU13949	<i>Arabidopsis thaliana</i> *	DQ445914.1	<i>Gladiolus grandiflorus</i>



Para diseñar los partidores, se determinaron las regiones con mayor similitud nucleotídica entre las secuencias realizando un alineamiento múltiple con ClustalW (Labarga y col., 2007). Entre las regiones encontradas, se prefirieron aquellas que tenían mejores características para un partidador, tales como un alto y similar contenido de G-C, Tm, longitud y presencia de G ó C en el extremo 3'.

## **2.2. Experimentos Fisiológicos**

### **2.2.1. Tratamiento de plantas de Aloe vera con condiciones de estrés hídrico y térmico.**

Las plantas de Aloe vera fueron sometidas a estrés hídrico y térmico por separado. Para los experimentos de estrés térmico, se utilizaron plantas de Aloe vera cultivadas en el laboratorio, en una cámara de crecimiento a una temperatura constante de 25°C, y con fotoperíodo de 16 h luz. Se recolectaron 3 series de muestras para cada tratamiento, extraídas desde el ápice de las hojas. Cada muestra consta de tejido de 3 plantas distintas, por lo cual se utilizaron 9 plantas. Las muestras fueron incubadas en un baño húmedo durante 2 h, tiempo suficiente para funcionar como estrés (Ortiz y Cardemil, 2001), a 25°, 35°, 40° y 45°C. Luego, las muestras se almacenaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido, y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

Para el estrés hídrico, se utilizaron plantas cultivadas en el Centro Experimental Las Cardas de la Universidad de Chile, ubicado en la IV Región de Coquimbo. Se establecieron 4 regímenes de riego por goteo, de tal manera que las plantas recibían en cada tratamiento 1600, 1200, 800 y 400 mL de agua, cada 15 días, denominados T1, T2, T3 y T4, respectivamente. Las muestras recolectadas fueron guardadas inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y trasladadas al laboratorio en hielo seco, donde se almacenaron a -80°C. Se utilizó el ápice de la hoja para los análisis posteriores.

### **2.2.2. Tratamiento previo de las muestras.**

Para la extracción de DNA y RNA, se maceró el tejido en molinillo eléctrico enfriado con N<sub>2</sub> líquido, sin dejar descongelar la muestra, hasta la formación de un fino polvo. Este polvillo se reservó a -80°C hasta su utilización.

### **2.3. Cuantificación del mRNA de hsp70.**

#### **2.3.1. Extracción de RNA total y tratamiento con DNAsas**

La extracción del RNA se realizó utilizando un kit de extracción de RNA (Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit, de Invitex, Alemania), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se utilizó como material inicial aproximadamente 100 mg de polvo del tejido congelado.

El RNA obtenido fue cuantificado con el espectrofotómetro ND-1000 V3.3, NanoDrop Technologies, Inc., cuyo error de medición es del 2%. Además se verificó la integridad del RNA en geles de agarosa al 1%.

Para el tratamiento con DNAsas se utilizaron 90 ng de RNA, 1U DNasa I (Fermentas) más su búffer 1X correspondiente y 10U inhibidor de RNAsas Ribolock™, (Fermentas). El volumen fue ajustado con agua nanopura tratada con DEPC al 1%. Esta mezcla de reacción se incubó a 37°C por 15 min, y finalmente se adicionó EDTA hasta una concentración final de 2,5 mM.

#### **2.3.2. Transcripción Reversa**

La técnica de RT-PCR se desarrolló en el termociclador MyCycler™ (BIO-RAD).

La mezcla de reacción de transcripción reversa incluyó 45 ng del RNA tratado con DNAsas y el partidor oligo-dT a 0,5 mM, la cual se incubó a 70°C por 5 min y luego en hielo por 5 min. Se adicionó a esta mezcla búffer 1X de la enzima transcriptasa reversa RT-Improm II (Promega), 6,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM dNTPs, 20U del inhibidor de RNAsas

Ribolock™ (Fermentas) y 1U de la enzima. Para el control negativo, se agregó agua tratada con DEPC en lugar de enzima. Se continuó con el programa de transcripción reversa, incubando a 25°C por 5 min, a 42° por 60 min, a 70°C por 15 min, y una incubación final a 4°C.

Para probar la eficiencia de los partidores sobre el cDNA, se realizó la transcripción reversa utilizando oligo-dT y para los análisis de expresión semi-cuantitativa, se utilizaron los partidores hsp70R, 18SR, hsp100R y ubiqR, ya que esto arrojó resultados más satisfactorios en cuanto a cantidad y calidad del producto de PCR. Las secuencias de estos partidores se encuentran en la Tabla 2.

### 2.3.3. Extracción del DNA

La extracción del DNA se realizó en base al método del búffer CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amonio: 2% CTAB, 1,4 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris) que permite extraer DNA de una manera rápida y eficiente, adaptado del procedimiento descrito por Murray y Thompson (1980). Se utilizaron aproximadamente 100 mg del polvo de tejido congelado, se agregaron 3 µL de β-mercaptoetanol y se homogeneizó la mezcla. Luego se agregaron 600 µL de búffer CTAB y se incubó a 70°C por 30 min. Se adicionaron 400 µL de búffer CTAB y se incubó nuevamente a 70°C por 15 min. En seguida, se agregaron 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, y se mezcló adecuadamente, para separar las proteínas y los polisacáridos. La mezcla se centrifugó por 10 min a 15.000 x g y se rescató el sobrenadante con el DNA. Para precipitarlo, se agregaron 750 µL de isopropanol y se incubó a -20°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó por 10 min a 15.000 x g y el precipitado formado se lavó con 700 µL de 70% etanol frío, se resuspendió en vórtex y se centrifugó por 5 min a 15.000 x g. Se retiró el etanol y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. Este precipitado, que contiene el DNA, se resuspendió en 50 µL

de agua nanopura. Para las reacciones de PCR, se utilizó 1  $\mu$ L de este extracto de DNA.

#### 2.3.4. Amplificación por PCR

Para realizar la reacción de PCR, se optimizaron las condiciones de acuerdo a las características de cada par de partidores, y del tamaño del fragmento que amplifican. Así, para hsp70 se obtuvo el siguiente programa de PCR: una etapa de incubación a 94°C por 5 min, 36 ciclos que incluyen intervalos de temperatura de 95°C por 50 s, 50,5°C por 50 s y 72°C por 40 s. Finalmente, una etapa de 72°C por 10 min y una incubación final a 4°C. La mezcla de reacción incluyó: 2  $\mu$ L cDNA, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,2 mM cada partidor, 1U enzima *Taq* polimerasa (Favorgen) y su búffer 1X respectivo.

Para la amplificación del gen 18S, existen algunas diferencias, como la utilización de 0,5  $\mu$ L de cDNA y 24 ciclos de amplificación.

El producto de PCR fue separado y visualizado por electroforesis en geles de agarosa.

#### 2.3.5. Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar el RNA y el DNA, se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1% en búffer TAE (40 mM Tris, 19 mM ácido acético glacial y 1 mM EDTA pH 8), con 0,5  $\mu$ g/mL bromuro de etidio. Las muestras se cargaron en el gel con un búffer que posee los colorantes azul de bromofenol y xylencianol. (Sambrook y col, 1989) La visualización de los geles se realizó en el transiluminador Syngene, modelo MultiGenius.

Para estimar los tamaños de las bandas, se utilizaron dos estándares de peso molecular, Ladder GeneRuler™ de 100pb y 1kb (Fermentas)

La electroforesis se desarrolló al aplicar una diferencia de potencial de 70 y 100 V, para el RNA y el DNA, respectivamente, durante 20 min aproximadamente.

### 2.3.6. Cuantificación de los ácidos nucleicos

Con el programa *GeneSnap* (Syngene), se fotografiaron los geles que contenían el producto de PCR separado por electroforesis. A partir de estas imágenes se comparó la intensidad de las bandas con respecto a las del estándar para estimar la cantidad de DNA. Este análisis se realizó con el programa *GeneTools* (Syngene).

## 2.4. Clonación del cDNA del gen *hsp70*.

### 2.4.1. Reacción de ligación.

Para clonar y secuenciar el cDNA de *hsp70*, se transformaron bacterias con un vector portador del fragmento del gen amplificado por PCR. Este fragmento se ligó al vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega), de 3 kb, cuyo mapa se muestra en la Figura 1.

Para realizar la reacción de ligación, se incubaron el fragmento y el vector en una razón molar 3:1, óptima de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para determinar las cantidades, se consideró la siguiente relación:

$$\frac{ng \text{ vector} \times kb \text{ inserto}}{kb \text{ vector} (3 \text{ kb})} \times \text{razón inserto:vector} (3) = ng \text{ inserto}$$

La mezcla de reacción consistió en: 2U de T4 DNA Ligasa (Fermentas) y su búffer 1X correspondiente, 50 ng de vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy, y aproximadamente 30 ng del producto de PCR. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 2 h.

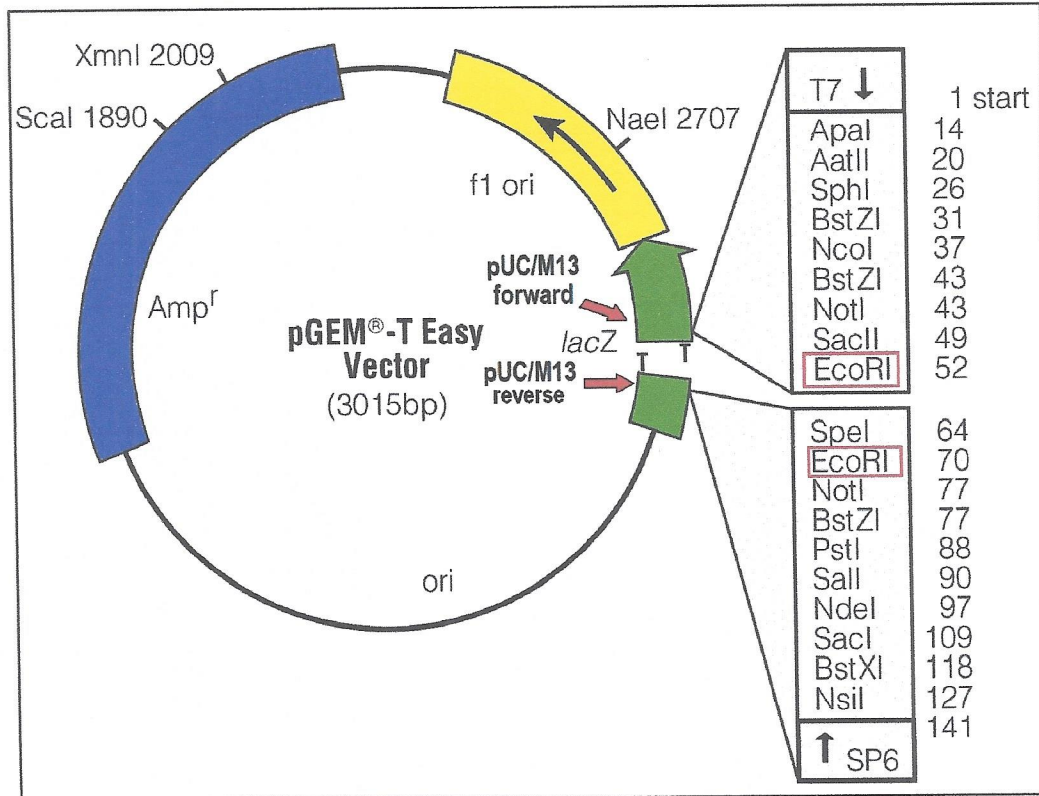


Figura 1. Mapa del vector pGEM®-T Easy, que incluye puntos de referencia en la secuencia. Se indica con flechas rojas la ubicación de los partidores pUC/M13F y pUC/M13R utilizados en la secuenciación. En recuadro rojo se destaca la enzima *EcoRI*, cuyos sitios de corte flanquean el sitio de clonamiento.

#### 2.4.2. Preparación de las células competentes

Las células de *Escherichia coli* de la cepa DH5 $\alpha$  se llevaron a un estado de competencia, para ser transformadas mediante un golpe térmico. Para ello, se creció un cultivo de esta cepa en medio Luria-Bertani (LB: 1% NaCl, 1% triptona y 0,5% extracto de levadura) a 37°C con agitación constante, hasta alcanzar una D.O<sub>600</sub>= 0,3-0,4. Las células se centrifugaron a 1.000 x g por 10 min a 4°C, y luego se resuspendieron en TSS 1X (10% PEG, 5% DMSO y 50 mM MgCl<sub>2</sub> en medio LB), utilizando 1/10 del volumen de cultivo inicial. Las células competentes se guardaron en 80% glicerol a -80°C hasta su utilización.

### 2.4.3. Transformación

La transformación fue realizada incubando toda la reacción de ligación con 200  $\mu$ L de las células competentes en hielo por 30 min. Luego se incubó en un baño húmedo a 42°C por 75 s. En seguida se incubó en hielo por 2 min y luego a 37°C durante 1 h en 1 mL de medio LB, con agitación constante. Las células se sedimentaron centrifugando a 7.500 x g durante 3 min y se resuspendieron y sembraron en placas de LB-Agar-Ampicilina (1,5% Agar, 100  $\mu$ g/mL Ampicilina, en medio LB). Las placas se incubaron a 37°C por 16 h o toda la noche.

### 2.4.4. Identificación de colonias transformadas con el vector recombinante.

#### Análisis rápido de colonias

Para identificar aquellas colonias que incorporaron el vector ligado al fragmento, se realizó un análisis rápido, consistente en la extracción de todos los ácidos nucleicos. Para ello, las colonias formadas se pasaron a medio LB líquido con 100  $\mu$ g/mL Ampicilina, para mantener la presión selectiva, y se crecieron a 37 °C por 16 h con agitación constante. A partir del cultivo obtenido, se tomaron 150  $\mu$ L y se centrifugaron a 7.500 x g por 3 min. El precipitado celular formado se resuspendió en 40  $\mu$ L de solución de extracción (6% sacarosa y 0,1% azul de bromofenol). Luego, se agregaron 14  $\mu$ L de la solución fenol:cloroformo 1:1, y se agitó vigorosamente. La mezcla se centrifugó a 13.000 x g por 3 min y se cargó el sobrenadante en un gel 1% agarosa para su análisis por electroforesis. Como controles, se cargaron el vector sin inserto y el extracto de ácidos nucleicos de una colonia portadora del vector sin inserto.

#### Extracción del DNA plasmidial

A partir de las colonias transformadas con el vector recombinante se extrajo el DNA plasmidial utilizando el kit Axyprep™ Extraction Miniprep (Axygen, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

## Digestiones enzimáticas

El DNA plasmidial se analizó mediante digestión enzimática, para lo cual se combinaron 200 ng de DNA, 5U de enzima *EcoRI* (Fermentas) y su respectivo búffer 1X y agua destilada hasta un volumen final de 20  $\mu$ L. Esta mezcla fue incubada a 37 °C por 90 min. La digestión se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

### 2.4.5. Secuenciación

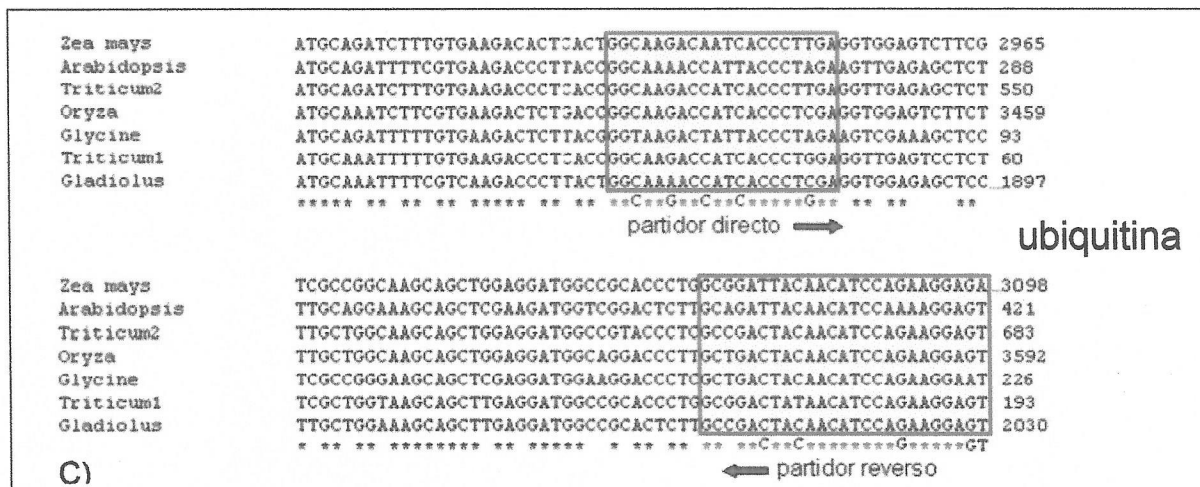
El fragmento insertado en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy fue secuenciado en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Chile, a partir de una alícuota de 500 ng de DNA plasmidial. Para la secuenciación se utilizó el equipo ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), el kit de secuenciación DYEnamic<sup>™</sup> ET terminator (Amersham, Inglaterra), y los partidores universales pUC/M13F y pUC/M13R, directo y reverso respectivamente. Las secuencias se muestran en la Tabla 2, y los sitios de hibridización al vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy se indican en la Figura 1.

### 2.4.6. Análisis de las secuencias.

La secuencia nucleotídica del cDNA fue traducida a proteína con Expasy (Gasteiger y col., 2003), y luego ambas fueron comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante BLAST (Atschul y col. 1990, Atschul y col., 1997) para encontrar la similitud con otras especies. Se analizó la secuencia aminoacídica para verificar a qué región de la proteína corresponde, mediante ClustalW (Labarga y col., 2007) y se buscaron motivos conservados mediante InterProScan (Quevillon y col., 2005)







**Figura 2.- Alineamiento de las secuencias de cDNA de los genes de estrés térmico, mostrando la ubicación de los partidores diseñados. En A) hsp70, B) hsp100 y C) ubiquitina. Se destaca en recuadro las regiones de mayor similitud nucleotídica seleccionadas para diseñar los partidores. Los números indican la longitud de las secuencias.**

Las secuencias de los partidores diseñados para amplificar hsp70, hsp100 y ubiquitina se muestran en la Tabla 2.

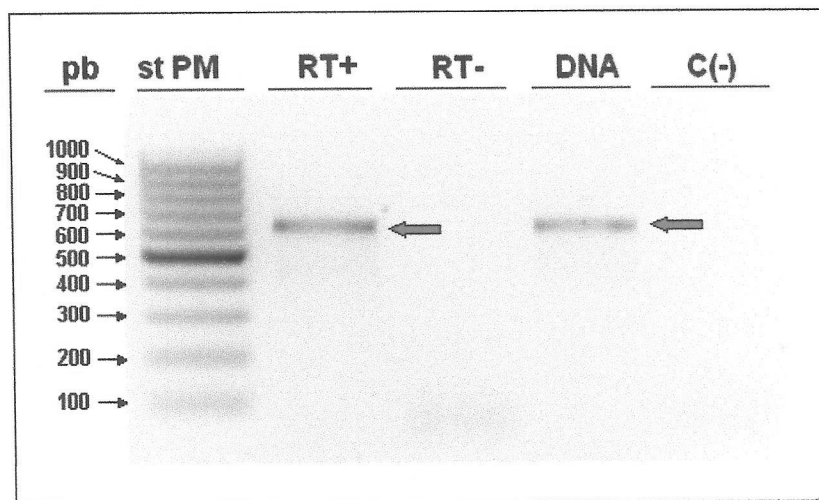
**Tabla 2.- Secuencia de los partidores utilizados en este Seminario de Título. Se muestran los partidores utilizados para sintetizar cDNA desde el mRNA total, para la reacción de secuenciación, y para amplificar los genes de estrés térmico y el rRNA 18S.**

Nombre Partidor	Secuencia	Fragmento amplif. (pb)	T° ann (°C) *
oligoAP	5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA GCT TCG-3'	-	42
pUC/M13F	5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC -3'	-	-
pUC/M13R	5'- AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA -3'	-	-
hsp70F	5'- GGT TTG AGG AGC TCA ACA TGG A -3'	609	50,5
hsp70R	5'- GTG ATG GTG ATC TTG TTC TTC TG -3'		
hsp100F	5'- CTC AAG GAG AAG TAC GAG GG -3'	570	52,5
hsp100R	5'- CCA RCG GCT CAC CAC CTC -3' (R= A/G)		
ubiqF	5'- GGC AAG ACC ATC ACC CTG GA -3'	165	55,5
ubiqR	5'- ACT CCT TCT GGA TGT TGT AGT C -3'		
18SF	5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3	193	50,5
18SR	5'-ACA ATC ATC CTT CCG CAG GT-3		

La síntesis de los partidores fue encargada a *AlphaDNA*<sup>®</sup>, Canadá.

Como este trabajo se centró en evaluar la acumulación del mRNA de hsp70, los posteriores análisis se desarrollaron sólo para este gen.

Con los partidores de hsp70 se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde el cDNA y el DNA de Aloe vera, como se indicó en los Materiales y Métodos. La Figura 3 muestra los resultados obtenidos en las amplificaciones.



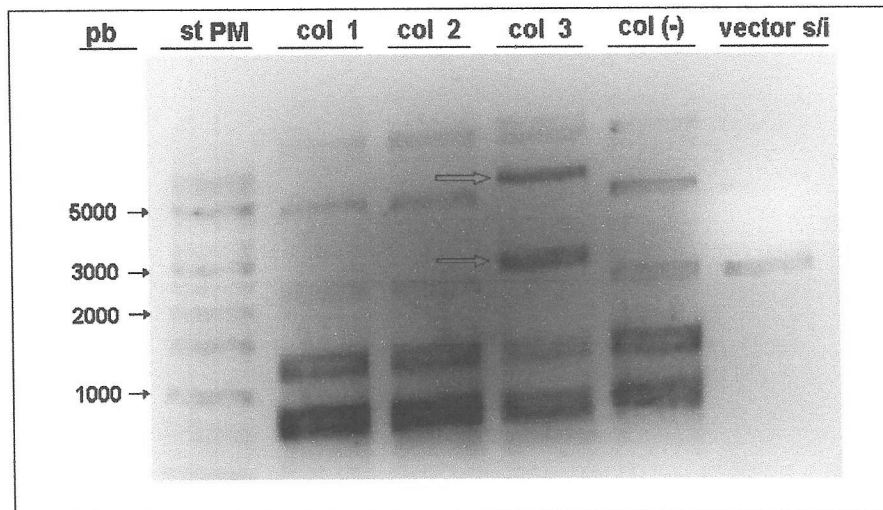
**Figura 3.-** Análisis de electroforesis muestra que los partidores diseñados para hsp70 amplifican la banda esperada desde el cDNA y DNA de Aloe vera. Flechas rojas indican las bandas de 609 de los fragmentos amplificados por PCR, con cDNA y DNA. pb: tamaño en pares de bases; st PM: estándar de peso molecular; RT+: cDNA; RT-: control negativo de transcripción reversa; DNA: DNA genómico de Aloe vera, y C(-): control negativo del PCR.

Este resultado muestra que los partidores diseñados para hsp70 son efectivos ya que tanto a partir del DNA genómico como del cDNA de Aloe vera es posible observar la amplificación de un fragmento del tamaño esperado. Para confirmar la identidad del fragmento, éste se clonó y secuenció.

### 3.2. Clonación del fragmento de cDNA de hsp70 en *E. coli*.

#### 3.2.1. Obtención de las colonias portadoras del vector recombinante.

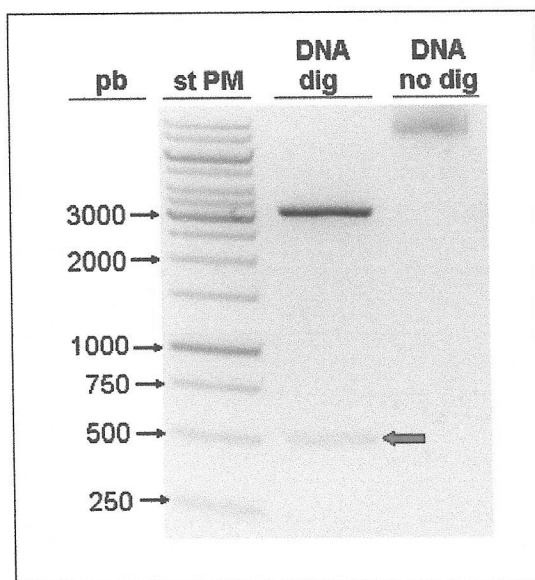
Se transformaron las células competentes de la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* con el fragmento de cDNA de 609 pb ligado a un vector, como se indicó en Materiales y Métodos. La Figura 4 muestra el análisis de las colonias transformadas, en la cual puede verse que la colonia 3 posee una banda de mayor tamaño, con respecto a la banda de la colonia transformada con el vector sin inserto, col(-), pues presenta una menor migración en el gel. Esto sugiere que el vector incorporado es portador de un fragmento heterólogo.



**Figura 4.- Electroforesis de los ácidos nucleicos de las colonias transformadas con el vector ligado al fragmento de 609 pb. La colonia número 3 presenta el vector con inserto, pues la banda correspondiente al vector es de mayor tamaño que en las otras colonias. Flechas roja y azul señalan al vector con inserto en conformación normal y superenrollada, respectivamente. pb: tamaño en pares de bases; st PM: estándar de peso molecular; col1-3: colonias 1 a la 3 analizadas; col(-): colonia portadora del vector sin inserto; vector s/i: vector sin inserto.**

A partir de la colonia 3, se realizó una extracción del DNA plasmidial para realizar una digestión enzimática, con el fin de corroborar el tamaño del fragmento

ligado al vector. Para esto, se utilizó la enzima *EcoRI* que tiene sitios de corte que flanquean el inserto. El sitio de corte se muestra en el mapa del vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy en la Figura 1. El resultado de esta digestión se muestra en la Figura 5. A partir del DNA plasmidial de esta colonia se secuenció el fragmento de interés.



**Figura 5.- Digestión enzimática del DNA plasmidial permite corroborar el tamaño del fragmento clonado.** El DNA plasmidial se digirió con *EcoRI* y el resultado fue analizado por electroforesis. La flecha roja señala el fragmento de ~609 pb. pb: tamaño en pares de bases; st PM: estándar de peso molecular; DNA dig: DNA plasmidial digerido, DNA no dig: DNA plasmidial no digerido.

### 3.2.2. Secuencia del fragmento es homóloga a la secuencia de hsp70 de otras especies.

Para confirmar que el inserto corresponde al cDNA de hsp70 se secuenciaron ambas hebras del DNA plasmidial. Para esto, se utilizaron los partidores M13F y M13R, que amplifican desde regiones del vector que flanquean el fragmento heterólogo, cuyas secuencias se muestran en la Tabla 2. La secuencia del cDNA del fragmento se muestra en la Figura 6. Además, se realizó una traducción *in silico* de la secuencia de cDNA, para analizar la secuencia aminoacídica de la proteína HSP70.

Esto se realizó con una herramienta bioinformática de Expasy (Gasteiger y col., 2003), con el único marco de lectura encontrado. La secuencia se muestra en la Figura 7.

```
5' - GGTTTGAGGAGCTCAACATGGATCTCTTCAGGAAGTGCATGGAACCGGTTGAGAAGTGTTT  
GAGGGATGCCAAGATGGACAAGAGCAGTGTTACGATGTCGTGCTTGTCGGTGGGTCCACC  
AGAATTTCCAAGGTGCAGCAGCTGCTGCAGGACTTCTTCAACGGGAAGGAGCTCTGCAAGA  
GCATCAACCCGGATGAGGCTGTTGCCTATGGTGCTGCTGTGCAGGCTGCTATCTTGAGTGG  
TGAGGGCAATGAGAAGGTGCAGGATCTTCTCTTGTGGATGTTACCCCTCTGTCTCTTGGT  
CTTGAGACTGCTGGAGGTGTGACGACTGTCTTGATCCCGAGGAACACAACACTATCCCAACGA  
AGAAGGAGCAGGTGTTCTCCACATACTCGGACAACCAGCCAGGTGTCTTGATCCAGGTGTA  
CGAGGGTGAGAGGACAAGGACCAAGACAACAACCTTGCTTGGCAAGTTTGAGCTCTCTGGC  
ATCCCACCTGCACCTAGGGGAGTTCCTCAGATTACTGTGTGTTTTGACATTGATGCCAATG  
GATCTTGAATGTCTCTGCTGAGGACAAGACGATGGTCAGAAGAACAAGATCACCATCAC - 3'
```

**Figura 6.- Secuencia del fragmento clonado de hsp70, obtenido por PCR con los partidores hsp70F y hsp70R.** Se muestra la secuencia del fragmento, de 609 pb, delimitada por las secuencias de estos partidores (subrayada).

```
NH2 - FEELNMDLFRKCMPEVKECLRDAKMDKSSVHDVVLVGGSTRIPKVQQLLQDFNKGELCKS  
INPDEAVAYGAAVQAAIILSGEGNEKVQDLLLLDVTPLSLGLETAGGVTTVLI PRNTTIPK  
KEQVFSTYSDNQPGVLIQVYEGERTRTKDNLLGKFEKLSGIPAPRGVPOITVCFDIDANG  
ILNNSAEDKTTGQKNKITI -COOH
```

**Figura 7.- Secuencia aminoacídica del fragmento de HSP70 en estudio.** Se obtuvo una secuencia de 202 aminoácidos.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos fueron analizadas en busca de similitud con otras especies vegetales. Para esto se realizó un alineamiento de secuencias contra la base de datos del NCBI mediante BLAST (Atschul y col. 1990, Atschul y col., 1997), con lo cual se obtuvo una alta similitud con otras secuencias de hsp70 en plantas, la cual fue mayor en el caso de secuencia de proteínas. Un resumen con los resultados más relevantes de este análisis se muestra en la Tabla 3.

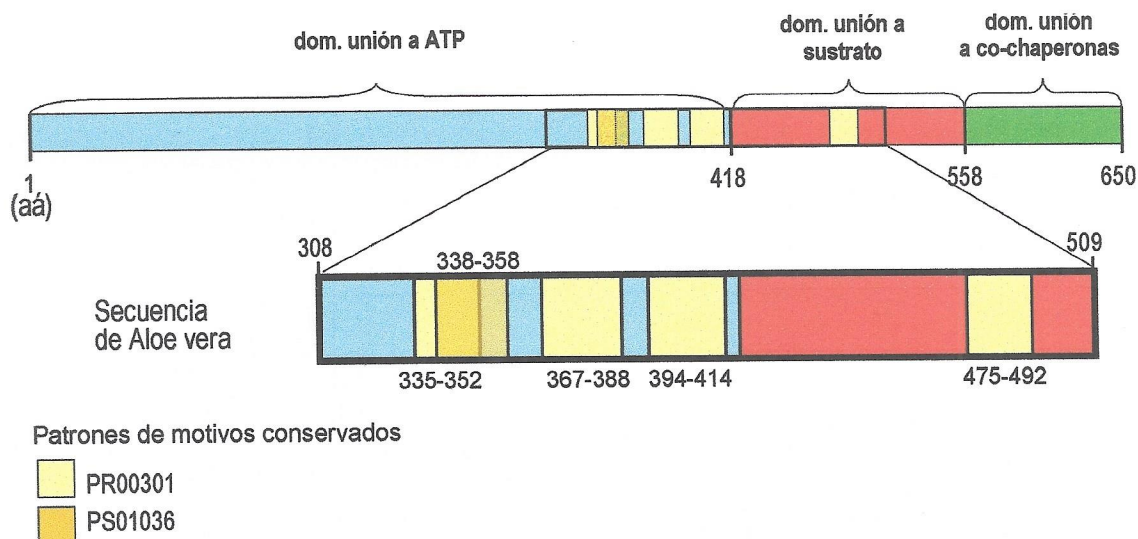
**Tabla 3. Análisis de BLAST con la secuencia nucleotídica y aminoacídica de hsp70.**

Se muestra que la secuencia de Aloe vera comparte gran identidad (Id) con distintas especies vegetales. Secuencia nucleotídica (nt), con e-value igual a 0, y secuencia aminoacídica (aá), con e-value menor a  $3e^{-114}$ . (\*) Secuencias consideradas en el diseño de los partidores.<sup>(m)</sup> plantas monocotiledóneas.

Secuencia (nt)	Especie	% Id	Secuencia (aá)	Especie	% Id
EU714122.1	<i>Camellia sinensis</i> (té)	87	ACM42161.1	<i>Ageratina adenophora</i> (hierba negra)	99
X54030.1	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	86	CAA27330.1	<i>Zea mays</i> <sup>m</sup>	99
X67711.2*	<i>Oryza sativa</i> (arroz) <sup>m</sup>	86	AF509336.1	<i>Saussurea medusa</i> (lotus chino)	98
AY914601.1*	<i>Zea mays</i> (maíz) <sup>m</sup>	85	AF479058_1	<i>Sandersonia aurantiaca</i> (sandersonia) <sup>m</sup>	98
AY059885.1*	<i>Arabidopsis thaliana</i> (arabidopsis)	82	CAA47948.2	<i>Oryza sativa</i> <sup>m</sup>	98
AY054183.1*	<i>Arabidopsis thaliana</i>	82	CAB72130.1	<i>Cucumis sativus</i> (pepino)	98
AY054190.1*	<i>Arabidopsis thaliana</i>	82	AAB97316.1	<i>Spinacia oleracea</i> (espinaca)	98
AF005993.1*	<i>Triticum aestivum</i> (trigo) <sup>m</sup>	82	NP_187864.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	98

La secuencia nucleotídica de Aloe vera fue comparada con las secuencias utilizadas en el diseño de los partidores, mediante ClustalW, en donde se observan las regiones con mayor similitud. Este alineamiento puede verse en el Anexo 1.

Para identificar la región de la proteína en estudio, se realizó un alineamiento múltiple con ClustalW considerando las secuencias aminoacídicas de la Tabla 3. Este análisis permitió comprobar que la secuencia comprende los aminoácidos 308 a 509 de la secuencia completa de 650, aproximadamente. Además, se analizó la secuencia con la herramienta InterProScan (Quevillon y col., 2005), para identificar motivos conservados, atribuidos a patrones específicos en la secuencia. Un esquema de la proteína HSP70 donde se destaca lo encontrado en estos análisis se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Esquema de la proteína HSP70, donde se destaca la región que fue analizada en búsqueda de dominios conservados en Aloe vera. Este esquema se obtuvo a partir del análisis de las secuencias de la Tabla 3 y la secuencia traducida de Aloe vera, mediante ClustalW e InterProScan. En celeste: dominio de unión a ATP; en rojo: dominio de unión a sustrato, y en verde: dominio de unión a co-chaperonas. Se muestran los motivos identificados en la secuencia de Aloe vera, en amarillo: patrones PR00301 (base de datos PRINTS), en naranja: patrón PS01036 (base de datos Prosite)

En el Anexo 2 se muestra el alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de Aloe vera con las otras especies vegetales, en donde se muestra claramente una alta identidad.

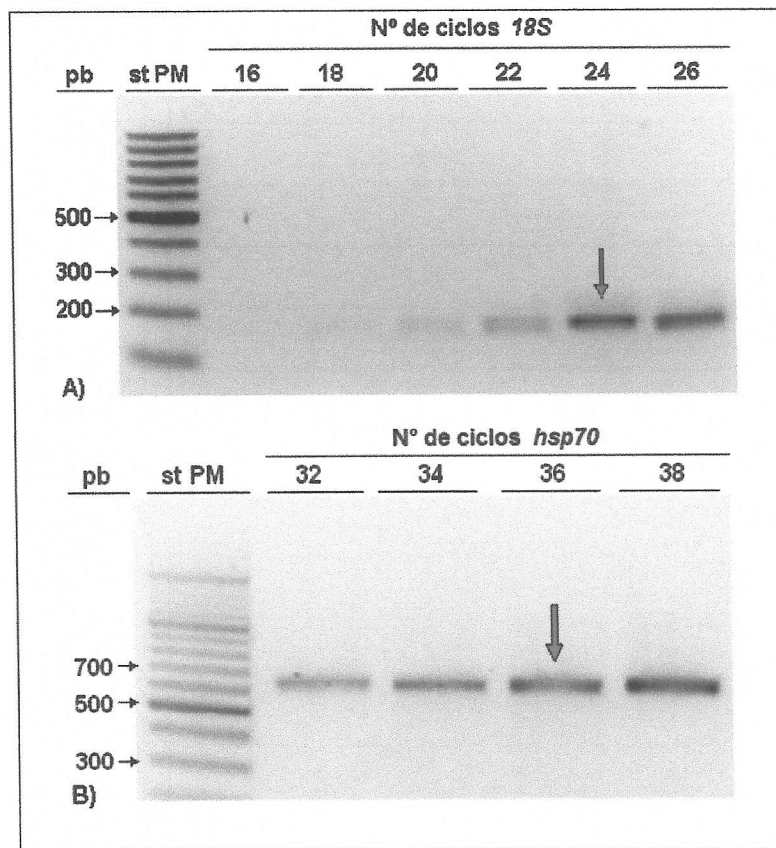
Estos análisis permiten corroborar la efectividad de los partidores diseñados para hsp70 ya que amplifican un fragmento de cDNA del tamaño esperado, las secuencias nucleotídica y aminoacídica poseen alta similitud con la secuencia del gen y la proteína HSP70 de otras especies vegetales, y además, la secuencia aminoacídica traducida posee motivos conservados asociados a la proteína HSP70.

### **3.3. Acumulación de mRNA en condiciones de estrés.**

Se estudió la acumulación del mRNA de hsp70 a distintas temperaturas y condiciones de riego mediante RT-PCR semi-cuantitativo. Para ello, se comparó la



expresión del gen *hsp70* con la del gen del RNA ribosómico 18S, el cual fue utilizado como control interno (Goidin y col., 2001, Stürzenbaum y Kille, 2001), debido a su expresión invariable en estas condiciones de estrés. Para que las mediciones fueran cuantitativas y para que con ellas fuera posible observar diferencia en los tratamientos, se determinó el número de ciclos óptimo para cada par de partidores. Esto se realizó considerando el número de ciclos mínimo necesario para observar una banda discreta en el gel, y a la vez, que no corresponda a una fase saturada de la amplificación, es decir, se consideró un ciclo en la etapa exponencial. Esto se realizó para cada par de partidores. El resultado de esta estandarización se muestra en la Figura 9.



**Figura 9.- Estandarización del número de ciclos de amplificación para cada par de partidores.** A) para los partidores de 18S el número de ciclos óptimo es 24. B) para los partidores de *hsp70* el número de ciclos óptimo es 36. Flecha roja señala ciclo óptimo de amplificación. pb: tamaño en pares de bases, st PM: estándar de peso molecular.

Para el caso de 18S, fue particularmente importante esta determinación, pues presenta una gran estabilidad, por lo cual se encuentra mucho más representado en el RNA total. Por otro lado, se igualaron las cantidades de RNA utilizadas en cada tratamiento, con el fin de obtener resultados comparativos y confiables. Por esto, para realizar el tratamiento con DNAsas se utilizaron 90 ng de RNA de las muestras tanto para estrés hídrico como térmico. La cantidad de RNA utilizado dependió del extracto de RNA más diluido, y se corroboró la integridad de cada uno mediante electroforesis en geles de agarosa.

### 3.3.1. Cuantificación del mRNA de hsp70 en plantas bajo estrés térmico.

Se analizaron 6 mediciones de RT-PCR (3 réplicas biológicas x 2 réplicas técnicas), a partir de muestras sometidas a estrés térmico. La Figura 10 muestra un resultado representativo.

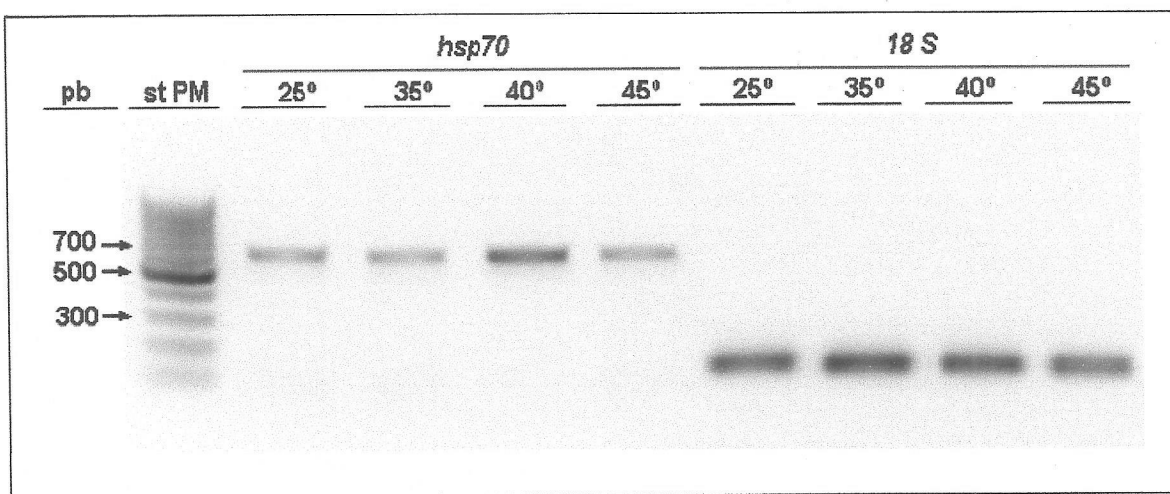


Figura 10.- Aumento en la expresión de hsp70 correlacionada con un aumento en la temperatura. Electroforesis en gel de agarosa del RT-PCR realizado a partir de hojas de Aloe vera sometidas a estrés de temperatura. Puede observarse un aumento gradual de la intensidad de las bandas de hsp70, alcanzando un máximo a 40°C.

Se realizó una normalización de los resultados, en primer lugar, con respecto a los niveles de 18S, que fueron prácticamente invariables en todas las condiciones,

obteniendo una razón hsp70/18S para cada tratamiento, y luego, una segunda normalización para saber cuánto aumenta la expresión con respecto a la condición control a 25°C; se asume, por tanto, que la expresión de hsp70/18S a 25°C es 100%. Se utilizó el programa computacional *GraphPad Prism* v5.00 (Motulsky, H., 2007) para realizar un análisis de los datos, mediante un análisis de varianza o ANOVA, de una vía, y luego un test *a posteriori* de Tukey (Tukey, 1951). El promedio de los valores de expresión de cada réplica, junto con el error estándar se muestra en la Figura 11, y el análisis estadístico en la Tabla 4.

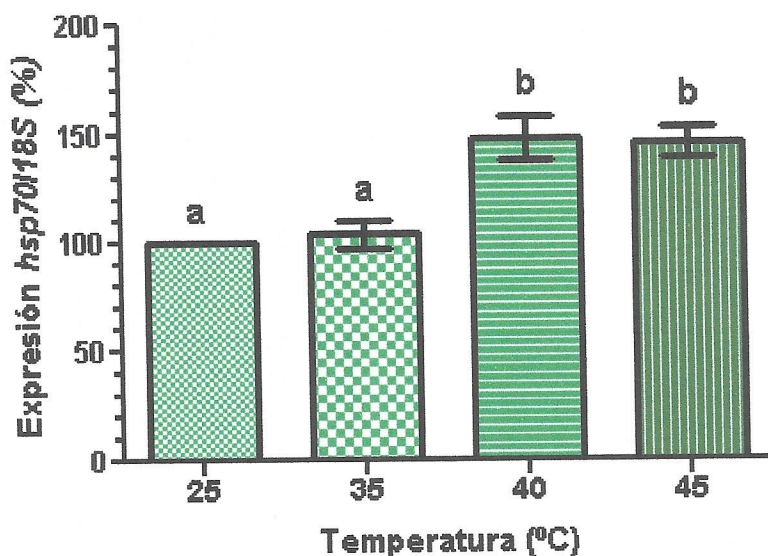


Figura 11.- Incremento relativo en la expresión del gen hsp70 con respecto al control interno 18S, en hojas de Aloe vera sometidas a estrés de temperatura. Se observa que a mayor temperatura, mayor es la razón hsp70/18S, especialmente a 40° y 45°C, donde existe un incremento con respecto a 25°, de 48% y 46% respectivamente. Las líneas sobre las barras representan el error estándar (Test de Student). Las barras con distinta letra son estadísticamente diferentes (Test de Tukey).

**Tabla 4.- ANOVA y Test de Tukey para mediciones de cuantificación de mRNA de hsp70 con respecto a 18S en hojas de Aloe vera sometidas a estrés de temperatura. En negrita se destacan los tratamientos que presentaron diferencias significativas en la expresión del gen.**

<i>Análisis de Varianza de una vía</i>				
Valor P	P<0.0001			
Resumen Valor P	***			
Son los promedios significativamente distintos? (P < 0.05)	Sí			
Número de grupos	4			
F	14,15			
R cuadrado	0,6798			
<i>Tabla ANOVA</i>				
	Suma Cuadrados	Grados libertad	Cuadrado medio	
Tratamiento (entre columnas)	12270	3	4091	
Residual (dentro de columnas)	5781	20	289,1	
Total	18050	23		
<i>Test de Comparación Múltiple de Tukey</i>				
	Dif prom.	q	Significativo? P < 0.05?	Resumen 95% IC de dif.
25 vs 35	-3,871	0,5576	No	No signif. -31.34 a 23.60
25 vs 40	-47,72	6,876	Sí	*** -75.20 a -20.25
25 vs 45	-46,41	6,687	Sí	*** -73.88 a -18.94
35 vs 40	-43,85	6,318	Sí	** -71.33 a -16.38
35 vs 45	-42,54	6,129	Sí	** -70.01 a -15.07
40 vs 45	1,312	0,1890	No	No signif. -26.16 a 28.78

El ANOVA permitió determinar que existen diferencias significativas entre los tratamientos de temperatura. El Test de Tukey muestra cuáles son los tratamientos que arrojaron diferencias significativas en la expresión, representado con letras distintas en el gráfico. Vemos que 25° y 35° no difieren significativamente, como tampoco 40° y 45°C. Sí se observan diferencias significativas entre 25° y 35° contra los 40° y 45°, pues estos últimos muestran un aumento en la expresión de un 48 y 46%, respectivamente, en relación a la expresión a 25°C. Esto puede significar que la planta comenzaría a percibir las altas temperaturas como un estrés a partir de los 40°C, lo cual induciría la expresión de los genes que codifican para proteínas protectoras, como

las chaperonas HSP. La transcripción de este gen se mantendría constante a 45°C, quizás, porque constituyen niveles de estrés similares. Del mismo modo, 25° y 35° poseen similares niveles de expresión, porque probablemente un aumento desde 25° a 35° no significa un estrés para una planta suculenta originaria de regiones desérticas, como es Aloe vera, por lo cual los niveles basales serían suficientes para paliar este aumento de temperatura.

### 3.3.2. Cuantificación del mRNA de hsp70 en plantas bajo estrés hídrico.

En este análisis se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación del mRNA en plantas sometidas a estrés hídrico. Se realizaron 3 réplicas técnicas, a partir de una muestra biológica. La Figura 12 muestra un resultado representativo de las mediciones.

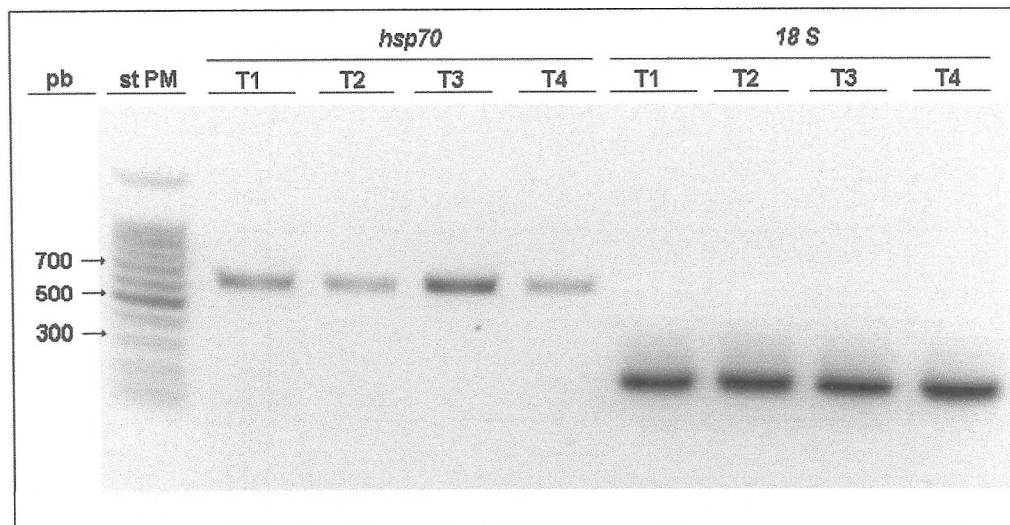


Figura 12.- Aumento en la expresión de hsp70 correlacionada con una menor disponibilidad de agua. Electroforesis en gel de agarosa del RT-PCR realizado a partir de hojas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico. Puede observarse un aumento de la intensidad de las bandas de hsp70, a menor disponibilidad de agua. T1: 1600 mL; T2: 1200 mL; T3: 800, y T4: 400 mL de agua cada 15 días.

Para el análisis de datos se consideró la expresión de hsp70 con respecto a 18S, tomando en cuenta el tratamiento T1 como el control. Se realizó un análisis estadístico de los datos, similar al caso de estrés térmico, en donde se puede observar una correlación entre la baja disponibilidad de agua y la acumulación de mRNAs de hsp70. Esta tendencia se demuestra en la Figura 13

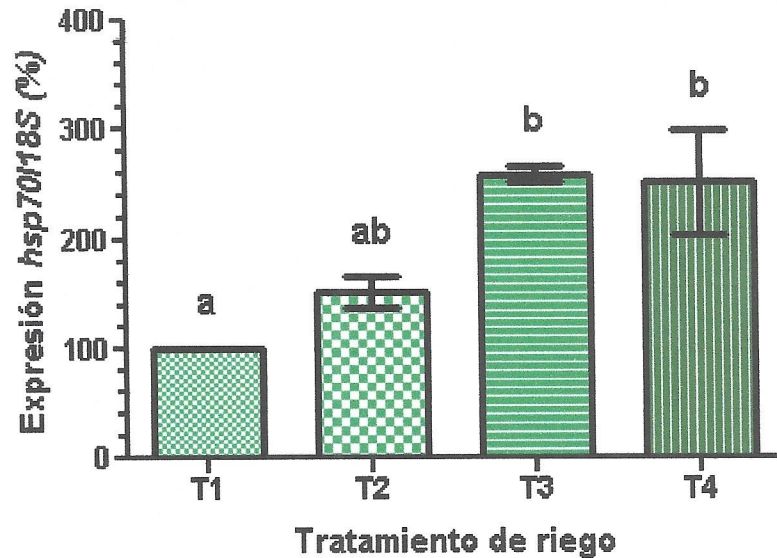


Figura 13.- Incremento relativo en la expresión del gen hsp70 con respecto al control interno 18S, en hojas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico. Se observa que mientras el estrés hídrico es más severo, mayor es la razón hsp70/18S, observando un aumento en los transcritos de 159% y 152% en T3 y T4, respectivamente. Análisis realizado considerando el tratamiento T1 como el control. T1: 1600 mL; T2: 1200 mL; T3: 800 mL, y T4: 400 mL, cada 15 días. Las líneas sobre las barras representan el error estándar (Test de Student). Test de Tukey: las barras con distinta letra son estadísticamente diferentes.

### 3.3.3. Características fenotípicas de plantas de Aloe vera bajo estrés.

No se observó el efecto del estrés de temperatura sobre el aspecto físico de las plantas de Aloe vera, debido a que éstas crecían en condiciones normales en el laboratorio, hasta que se les aplicó el shock de temperatura.

Con respecto al estrés hídrico, se puede observar una gran diferencia entre las plantas crecidas bajo un régimen favorable, T1 y las que experimentaron un notorio déficit de agua, T4, como se muestra en la Figura 14. Éstas últimas poseen hojas muy delgadas y con una coloración rojiza, especialmente en la punta, a diferencia de las plantas control, las cuales muestran la coloración verde característica, hojas de mayor turgor y mayor contenido de gel. La intensidad del estrés hídrico se relaciona directamente con los efectos que provocó en las plantas, ya que las plantas de los tratamientos T2 y T3 presentan fenotipos intermedios de T1 y T4 (no mostrado)



**Figura 14. Fotografía de plantas de Aloe vera cultivadas en el Centro Experimental de las Cardas, sometidas a estrés hídrico. A: planta con régimen T1 (1600 mL/15días), B: plantas con régimen T4 (400 mL/15días). Las plantas sometidas a estrés hídrico (T4) presentan hojas delgadas y de tonalidad rojiza, a diferencia de las plantas más irrigadas (T1), que tienen hojas de coloración verde y de gran turgor.**

### 3.4. Amplificación de otros genes de estrés térmico: *hsp100* y *ubiquitina*.

En forma paralela se estandarizó la técnica de RT-PCR para los partidores diseñados de *hsp100* y *ubiquitina*, del mismo modo indicado para *hsp70*. Para evaluar la expresión de estos genes, se sintetizó el cDNA utilizando como partidor *hsp100R* y *ubiqR*, respectivamente. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando los partidores *hsp100F* y *hsp100R*, para *hsp100*, y los partidores *ubiqF* y *ubiqR*, para *ubiquitina*, cuya secuencia se muestra en la Tabla 2. El resultado de la amplificación por RT-PCR con estos partidores se muestra en la Figura 15. Con estos partidores será posible estudiar la expresión de estos genes mediante RT-PCR, al igual que *hsp70*, pero se debe eliminar la amplificación de la banda secundaria para *hsp100* y *ubiquitina*.

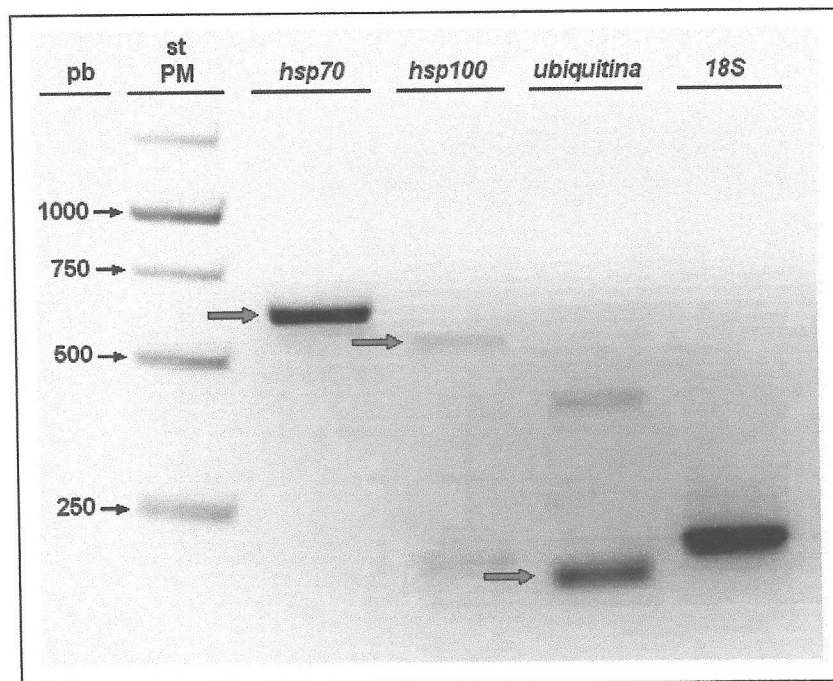


Figura 15.- Partidores diseñados para *hsp100* y *ubiquitina* amplifican banda del tamaño esperado en cDNA de *Aloe vera*. Señaladas con flecha roja, podemos ver las bandas del tamaño esperado para *hsp70* de 609 pb, para *hsp100* de ~570 pb, y para *ubiquitina* la banda de ~193 pb.



#### 4. DISCUSION Y PROYECCIONES

La tolerancia al estrés abiótico se presenta como el nuevo desafío en las investigaciones de mejoramiento en plantas, debido al fenómeno del cambio climático, que ha puesto en peligro a muchas especies vegetales. En este escenario, las altas temperaturas y el déficit hídrico son los factores abióticos más importantes involucrados en las pérdidas en el cultivo de especies que no toleran estas adversas condiciones (Hall, 2001). Para contrarrestar sus efectos, las plantas expresan la respuesta “Estrés Térmico”, la cual consta de proteínas chaperonas que protegen a las proteínas del estrés. Sin embargo, no todas las plantas despliegan este mecanismo de protección de la misma manera, lo cual marca la diferencia entre las plantas tolerantes y las susceptibles al estrés abiótico.

En este Seminario de Título, se estudió la Respuesta “Estrés Térmico” con respecto a la expresión del gen hsp70, en plantas de *Aloe barbadensis* Miller sometidas a altas temperaturas y a estrés hídrico. Como metodología de estudio, se utilizó la técnica de RT-PCR, la cual presenta muchas ventajas para la cuantificación de la expresión génica que otras metodologías como Northern blot. Entre ellas, podemos mencionar que la técnica de RT-PCR no requiere grandes cantidades de RNA, lo cual permite detectar pequeñas diferencias en la concentración. Es una técnica más específica, requiere menos tiempo y es menos costosa (Dean y col, 2002).

Un factor a considerar en la cuantificación mediante RT-PCR, es que este análisis debe realizarse en la fase exponencial de amplificación, donde existe una relación lineal entre la cantidad de cDNA molde y el producto final, antes de que la amplificación alcance la fase de saturación (Dean y col., 2002). Esto es particularmente importante para el caso del control interno rRNA 18S, el cual es muy abundante; por

esta razón fue necesario estandarizar el número de ciclos de amplificación, seleccionando el número de ciclos mínimo para observar diferencias en los distintos tratamientos, y así obtener un producto de PCR de la fase exponencial. Con esta corrección se determinó que el número de ciclos óptimo para 18S es de 24, mientras que para el gen en estudio, hsp70, es de 36 ciclos.

Con respecto al control interno, se estudiaron distintos genes de expresión invariable en las condiciones estudiadas, como rubisco, tubulina, actina y 18S (datos no mostrados), pero se lograron mejores resultados con 18S, pues se obtuvo un producto de PCR en mayor cantidad y de mejor calidad (banda discreta en el gel). Esto puede deberse a que la secuencia del gen 18S es más conservada, por eso funciona mejor en Aloe vera, de la cual no se cuenta con partidores específicos. Además, no se observaron cambios en la expresión de 18S en plantas sometidas a estrés térmico e hídrico. Debido a que 18S no altera su expresión en éstas y otras condiciones estresantes, es ampliamente utilizado como control interno (Goidin y col., 2001, Stürzenbaum y Kille, 2001).

Se estudió el gen de HSP70 porque codifica para la principal proteína inducida por estrés, encargada de evitar la desnaturalización y la agregación de proteínas en estas condiciones. Por lo tanto, al aplicar distintos niveles de estrés a las plantas, se esperaba observar una correlación con los niveles de transcritos del o los genes de esta familia.

Con respecto a los partidores diseñados para hsp70, éstos amplificaron por PCR un fragmento del tamaño esperado, 609 pb. Cabe señalar que es probable que exista más de un gen hsp70 en Aloe vera, pues se sabe que es una familia génica que, al menos en Arabidopsis, cuenta con 18 miembros, que pueden ser de expresión

constitutiva o inducible (Fietto y col, 2007) y por ende se puede estar amplificando más de un gen con estos partidores. Sin embargo, esto no afecta el propósito de este trabajo, al contrario, enriquece los resultados ya que se estaría considerando la totalidad de los genes lo cual permite obtener una visión más completa de su expresión.

La secuenciación del fragmento amplificado y su traducción *in silico* desde la secuencia nucleotídica a la aminoacídica, permitió analizar su similitud con otras secuencias mediante BLAST, lo cual mostró altos porcentajes de identidad con secuencias del gen y la proteína HSP70 en otras plantas cercanas filogenéticamente al Aloe vera. Estos análisis nos permiten asegurar que el fragmento amplificado corresponde al gen hsp70 de Aloe vera, lo cual queda confirmado además, con la identificación de patrones conservados de HSP70 en la secuencia aminoacídica. Además, la alta identidad con plantas monocotiledóneas concuerda con la clasificación taxonómica del Aloe vera. Este trabajo corresponde al primer reporte de la presencia del o los genes hsp70 en Aloe vera. Con estos resultados podemos decir que los objetivos específicos 1 y 2 fueron cumplidos satisfactoriamente.

Gracias a la efectividad de los partidores diseñados para hsp70, fue posible realizar ensayos de RT-PCR y cuantificar la expresión de éste con respecto a un gen de *housekeeping* y de expresión invariable en las condiciones estudiadas, como el del rRNA 18S. Se analizó la razón de la expresión de estos genes, hsp70/18S, para normalizar la expresión de hsp70 con respecto a una expresión control, y además se consideró como un control de carga del RNA utilizado, pues es probable que el RNA no estuviera totalmente íntegro y produjera una disminución del cDNA del gen que no tendría relación con el efecto del estrés estudiado. Además, se realizó una normalización de los niveles de expresión de estos genes, con respecto a la condición

control que se fijó a 25°C, para analizar el aumento en la expresión, más que una expresión absoluta.

La abundancia relativa de los transcritos de hsp70 frente a los del RNA ribosómico 18S, mostró un aumento con la temperatura, lo que se hizo notorio a los 40° y 45°C, donde se registró un aumento del 47%, aproximadamente, con respecto a la condición control 25°C. Los datos de cada tratamiento fueron analizados mediante un análisis de varianza ANOVA, con lo cual se determinó que sí existen diferencias significativas entre los tratamientos, y luego, la aplicación del Test de Tukey permitió identificar entre qué par de tratamientos se encontraba la diferencia. De esta manera, con los datos obtenidos experimentalmente, se puede afirmar que las condiciones 25° y 35°C no presentan diferencias significativas, por lo cual se podría decir que este cambio en la temperatura puede ser sobrellevado con los niveles basales de la proteína, y la planta no necesitaría sobreexpresarla. Del mismo modo, los tratamientos a 40° y 45°C tampoco presentan diferencias entre ellos, pero sí con el tratamiento control 25°. Esto indicaría que 40° y 45°C son temperaturas estresantes para la planta, puesto que inducen una expresión mayor del gen, con respecto a la condición control, y el que la expresión no sea significativamente distinta entre ellas, puede deberse a que, para Aloe vera representan un nivel de estrés similar. Esto se deduce de que en ambas condiciones hubo un aumento en la relación hsp70/18S cercano al 47%. Considerando lo anterior, se puede decir que este incremento se correlaciona con el rol de HSP70 descrito en la literatura, consistente en la protección de la degradación de proteínas frente al estrés térmico. Para condiciones menos estresantes, 25° y 35°C, se podría decir que sus niveles basales de proteína serían suficientes para sobrellevar estas temperaturas y no significarían un estrés, pues la planta ya estaría protegida. Estos resultados se condicen con experimentos realizados en tabaco y Arabidopsis, en

los cuales se ha demostrado que aumentan los transcritos de hsp70 a altas temperaturas (Rizhsky y col., 2002, Rizhsky y col., 2004). Además, se ha visto en *Prosopis chilensis* (tamarugo), que la proteína HSP70 aumenta sus niveles en plantas sometidas a estrés térmico (Ortiz y Cardemil, 2001), alcanzando un máximo a 40°C, por lo que los resultados obtenidos en Aloe vera están en concordancia con esto, pero a nivel de mRNA. Además, se ha observado un aumento en los transcritos de hsp70 con la temperatura, utilizando técnicas de hibridación en *Arabidopsis thaliana* (Wu y col., 1988).

Bajo condiciones de campo, el estrés a altas temperaturas es frecuentemente asociado a una reducida disponibilidad de agua (Simoës-Araujo y col., 2003). Por esta razón, se estudió también, la acumulación de los transcritos de hsp70 en plantas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico. A partir de los datos obtenidos, se puede decir que existe un aumento en los niveles del transcrito, el cual se correlaciona con la disminución del recurso hídrico proporcionado. Esto se puede apreciar en la Figura 13. Para el estrés hídrico, se observó un incremento mayor de la expresión, ya que para los tratamientos más restrictivos, T3 y T4, se observó un gran aumento en los niveles de transcrito, acumulando más del doble que en la condición control, T1. Se puede decir que las condiciones de riego más estrictas, T3 y T4 sí constituyen condiciones estresantes para Aloe vera, por lo cual ésta aumentaría la expresión del gen hsp70, pues la proteína que codifica sería necesaria para proteger a las proteínas de la desnaturalización. Por su parte, el tratamiento T2 no sería estresante pues no es significativamente distinto del tratamiento control, por lo que se esperaría que los niveles basales de la proteína serían suficientes para que Aloe vera pueda sobrellevar esa condición. La acumulación del mRNA de hsp70 debido a una baja disponibilidad de

agua, ya se ha reportado en tabaco (Rizhsky y col., 2002), maíz (Heikkila y col., 1984) y *Arabidopsis* (Rizhsky y col., 2004), entre otros.

En relación al aspecto mostrado por las plantas sometidas a restricciones de agua, vemos que sus hojas muestran un notable daño, ya que están mucho más delgadas, pues su contenido de gel disminuyó drásticamente, y presentan una coloración rojiza, dada por los pigmentos antociánicos, producto del estrés oxidativo al que derivó la planta (Figura 14B). Esto no sucede en las plantas regadas con tratamiento T1, las cuales se mostraron de color verde y con hojas suculentas, de gran turgor (Figura 14A). Por lo tanto, en base a esta inspección visual, el tratamiento T1 representó la mejor condición de riego, ya que las otras presentaban un daño que aumentaba gradualmente hasta T4 (no mostrado). Con estos resultados, se tiene el tercer objetivo específico cumplido.

Para estudiar de manera más completa la respuesta “Estrés Térmico”, se diseñaron partidores para los genes *hsp100* y ubiquitina. El efecto protector de las proteínas que codifican puede ser atribuido, en parte, a que actúan concertadamente, por eso es interesante conocer de qué manera se expresan frente a condiciones estresantes. Durante el estrés, muchas enzimas y proteínas experimentan cambios estructurales y funcionales deletéreos. Por lo tanto, mantener las proteínas en su conformación funcional es particularmente importante para la sobrevivencia celular bajo el estrés (Wang y col., 2004). Para este proceso HSP70 participa previniendo la desnaturalización de proteínas y su agregación, HSP100 resolubiliza los agregados proteicos, y Ubiquitina remueve polipéptidos potencialmente dañinos provenientes del mal plegamiento, desnaturalización o agregación. De estas proteínas también se ha reportado incremento en su expresión frente al estrés abiótico: en tabaco se ha registrado un aumento del mRNA de *hsp70* y *hsp100* en estrés térmico e hídrico

(Rizhsky y col., 2002). Además, se ha reportado un aumento de HSP100 durante el estrés térmico en arroz (Singla y Grover, 1994), en Arabidopsis (Schirmer y col., 1994), en soya (Lee y col., 1994) y maíz (Nieto-Sotelo y col., 1999), desempeñando un importante rol en la tolerancia al estrés abiótico. Por esta razón se desea estudiar la expresión de estas chaperonas, para saber de qué manera interactúan en la protección contra el estrés térmico e hídrico, en Aloe vera. Los partidores diseñados para estos genes amplifican la banda del tamaño esperado, por lo cual sería factible cuantificar con ellos la expresión de los genes respectivos, una vez que se haya comprobado mediante secuenciación la identidad de esos fragmentos y se haya optimizado la técnica de RT-PCR para cada par de partidores (Figura 15). En hsp100 se observa una banda cercana a los 200 pb, inespecífica, mientras que en ubiquitina, se observa una banda de mayor tamaño ya que corresponde a la amplificación de un transcrito proveniente de un locus de poliubiquitina, de secuencias repetidas en tándem (Sharp y Li, 1987). Se puede decir, entonces, que el cuarto objetivo específico se ha cumplido.

A modo de proyección, este trabajo podría ser complementado con estudios a nivel proteico, identificando la proteína en las mismas condiciones de estrés, para estudiar la correlación existente entre la acumulación del transcrito de hsp70 y los niveles de la proteína, lo que permitiría corroborar si efectivamente, el aumento de transcrito implica un aumento de la proteína que codifica, y además, identificar si existen mecanismos de regulación post-transcripcional para el gen, tanto para estrés térmico como hídrico. Por otro lado, continuar con la investigación de la expresión de los genes hsp100 y ubiquitina, permitirá conocer de qué manera las proteínas que codifican interactúan para brindar protección a las proteínas frente el estrés térmico e hídrico, que son condiciones que suelen presentarse simultáneamente en los campos de cultivo.

Esta primera aproximación al estudio de hsp70 en *Aloe barbadensis* Miller, da cuenta de un aumento en la expresión de sus transcritos, como parte de su mecanismo de respuesta al estrés abiótico, lo cual contribuye a su tolerancia a estas condiciones. Por lo tanto, estos resultados apoyan la hipótesis planteada.

Esta alta tolerancia frente al estrés hídrico y térmico, hacen del Aloe vera una planta ideal como modelo de estudio para el mejoramiento de plantas sensibles, y complementando estos resultados con otros estudios a nivel bioquímico, fisiológico y pruebas de campo, será posible conocer mejor el mecanismo de respuesta del Aloe vera frente al estrés, y generar herramientas para el mejoramiento de plantas, capaces de tolerar las condiciones desfavorables producidas por el cambio climático, problema que ha afectado a gran parte de los cultivos alrededor del mundo.



## 5. CONCLUSIONES

- Se identificó y secuenció un fragmento de 609 pb en *Aloe barbadensis* Miller. El análisis de su secuencia nucleotídica y aminoacídica permitió corroborar que el fragmento corresponde al gen hsp70, lo cual constituye el primer reporte de la presencia de este gen en Aloe vera.
- El análisis de expresión del gen hsp70 en plantas sometidas a estrés térmico e hídrico revela que Aloe vera percibe sólo las condiciones más extremas como estresantes, frente a las cuales presenta un aumento significativo de los transcritos del gen, con respecto a 18S.
- De lo anterior se deduce que las condiciones menos estrictas no alteran la expresión de hsp70, probablemente porque los niveles basales del mRNA y/o de la proteína serían suficientes para soportar el estrés y prevenir el daño que éste causa.
- La acumulación de los transcritos de hsp70 sólo a las más altas temperaturas y más estrictos regímenes de riego indica que Aloe vera es una planta muy bien adaptada a ambientes áridos, y por lo tanto puede ser cultivada en el desierto chileno.
- Su tolerancia al estrés hídrico y térmico permite utilizar al Aloe vera como modelo de estudio, y utilizar sus genes para el mejoramiento de plantas más sensibles al estrés ambiental.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo-Duncan, M., Russell, C., Patel, S., y Patel, R. 2004. Aloe-emodin modulates PKC isozymes, inhibits proliferation, and induces apoptosis in U-373MG glioma cells. *Int Immunopharmacol* 4: 1775-1784.
2. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
3. Altschul, S.F., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
4. Alvim, F.C., Carolino, S., Cascardo, J., Nunes, C., Martinez, C., Otoni, W., y Fontes, E. 2001. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol.* 126: 1042-1054
5. Añon, S., Fernández, J.A., Franco, J.A., Torrecillas, A., Alarcón, J.J. y Sánchez-Blanco, M.J. 2004. Effects of water stress and night temperature preconditioning on water relations and morphological and anatomical changes of *Lotus creticus* plants. *Sci. Hortic.* 101: 333-342.
6. Chow, J.T.N., Williamson, D.A., Yates, K.M. y Goux, W.J. 2005. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L. *Carbohydr Res* 340: 1131-1142.
7. Dean, J.D., Goodwin, P.H. y Hsiang, T. 2002. Comparison of relative RT-PCR and Northern blot analyses to measure expression of  $\beta$ -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colltotrichum destructivum*. *Plant Mol Biol Reporter* 20: 347-356.
8. Erbse, A., Mayer, M.P. y Bukau, B. 2004. Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones. *Biochem Soc Trans* 32: 617-621.
9. Eshun, K., He, Q. 2004. Aloe Vera: A Valuable Ingredient for the Food, Pharmaceutical and Cosmetic Industries - A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44: 91-96
10. Fietto L.G., Costa M.D.L., Cruz C.D., Souza A.A., Machado M.A., Fontes E.P.B. 2007. Identification and *in silico* analysis of the Citrus HSP70 molecular chaperone gene family. *Genet. Mol. Biol.* 30(3): 881-887.
11. Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. and Bairoch, A. 2003. ExpPASy—the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, 3784-3788.
12. Giaveno, C. y Ferrero, J., 2003. Introduction of tropical maize genotypes to increase silage production in the central area of Santa Fe, Argentina. *Crop Breed. Appl. Biotechnol* 3: 89-94.
13. Goidin, D., Mammessier, A., Staquet, M.J., Schmitt, D. y Berthier-Vergnes, O. 2001. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and  $\beta$ -actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem* 295: 17-21.

14. Govindarajan, R., Vijayakumar, M., y Pushpangadan, P. 2005. Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda. *J Ethnopharmacol* 99: 165-178.
15. Guy, C.L. y Li, Q.B. 1998. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. *Plant Cell* 10: 539–556.
16. Hall, A.E., 2001. *Crop Responses to Environment*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
17. Hare, P.D., Cress, W.A. y Staden, J.V., 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ* 21: 535–553.
18. Heggie, S., Bryant, G.P., Tripcony, L., Keller, J., Rose, P., Glendenning, M., y Health, J. 2002. A phase III study on the efficacy of topical aloe vera gel on irradiated breast tissue. *Cancer Nurs* 25: 442-451.
19. Heikkila, J.J., Papp, J.E.T., Schultz, G.A., y Bewley, J.D. 1984. Induction of heat shock protein messenger RNA in maize mesocotyls by water stress, abscisic acid, and wounding. *Plant Physiol.* 76, 270-274.
20. Howarth, C.J., 2005. Genetic improvements of tolerance to high temperature. En: Ashraf, M., Harris, P.J.C. (Eds.), *Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches*. Howarth Press Inc., New York.
21. Iba, K. 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol* 53: 225-245.
22. Im, S.A., Oh, S.T., Song, S., Kim, M.R., Kim, D.S., Woo, S.S., Jo, T.H., Park, Y.I. y Lee C.K. 2005. Identification of optimal molecular size of modified Aloe polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. *Int Immunopharmacol* 5: 271-279.
23. Krishnan, P. 2006. The scientific study of herbal wound healing therapies: Current state of play. *Current Anaesthesia & Critical Care* 17: 21-27
24. Labarga, A., Valentin, F., Andersson, M. y Lopez R. 2007. Servicios Web en el European Bioinformatics Institute: ClustalW. *Nucleic Acids Research Web Services Issue* 2007.
25. Langmead, L., Makins, R.J. y Rampton, D.S. 2004. Anti-inflammatory effects of aloe vera gel in human colorectal mucosa in vitro. *Aliment Pharmacol Ther* 19: 521-527.
26. Lee, Y.J., Nagao, R.T. y Key, J.L. 1994. A soybean 101-kD heat stress protein complements yeast HSP104 deletion mutant in acquiring thermotolerance. *Plant Cell* 6: 1889–1897.
27. Lin, B.L., Wang, J.S., Liu, H.C., Chen, R.W. y Meyer, Y. 2001. Genomic analysis of the hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* 6: 201–208.
28. Maestri, E., Klueva, N., Perrotta, C., Gulli, M., Nguyen, H.T. y Marmiroli, N., 2002. Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Mol. Biol.* 48: 667–681.

29. Mayer, M.P. y Bakau, B. 2005. Review Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *CMLS*. 62: 670–684.
30. Mazorra, L.M., Nunez, M., Echerarria, E., Coll, F. y Sánchez-Blanco, M.J. 2002. Influence of brassinosteroids and antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. *Plant Biol*. 45: 593–596.
31. Morales, D., Rodríguez, P., Dell'amico, J., Nicolás, E., Torrecillas, A. y Sánchez-Blanco, M.J., 2003. High-temperature preconditioning and thermal shock imposition affects water relations, gas exchange and root hydraulic conductivity in tomato. *Biologia Plantarum* 47: 203–208.
32. Motulsky, H. 2007. GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA.
33. Murray, M.G. y Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8: 4321-4326.
34. Nieto-Sotelo, J., Kannan, K.B. y Segal, M.C. 1999. Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, *HSP101*, encoding a ClpB/Hsp100 protein homologue. *Gene* 230: 187–195.
35. Ortiz, C., y Cardemil, L. 2001. Heat shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *J Exp Botany* 52: 1711-1719.
36. Pugh N., Ross S. A., Elsohly M. A., Y Pasco D. S. 2001. Characterization of aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from Aloe vera with potent immunostimulatory activity. *J Agric Food Chem* 49: 1030-1034.
37. Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R. y Lopez, R. 2005. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res*. 33 (Web Server issue): W116-W120
38. Ramírez, I., Salinas, C., Huerta, C., Sagardía, S., Vega, A., Silva, H. y Cardemil, L. 2007. "Actividad de la superóxido dismutasa y síntesis de azúcares y fructanos como mecanismos de protección al estrés hídrico y a altas temperaturas en *Aloe barbandesii* Miller (*Aloe vera*)". *Biological Research* 40: R-122, 50ª Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Pucón, 21-24 de Noviembre
39. Reyes, M.A., Corcuera, L.J., y Cardemil, L. 2003. Accumulation of HSP70 in *Deschampsia antarctica* Desv. leaves under thermal stress. *Antarctic Science* 15: 345-352.
40. Rizhsky, L., Liang, H. y Mittler, R. 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol* 130: 1143–1151.
41. Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S. and Mittler R. 2004. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* 134: 1683–1696.
42. Sairam, R.K. y Tyagi, A., 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci*. 86: 407–421.

43. Salinas, C., Ramírez, I., Huerta, C., Sagardía, S., Vega, A., Silva, H., Stange, C., Handford, M. y Cardemil, L. 2007. "Sugar and fructan synthesis and superoxide dismutase activity as protection mechanisms for water deficit and heat shock stress in *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*)". II Reunión de Biología Vegetal. Santiago, 5 y 6 de Noviembre.
44. Sambrook, J., Fritsch, E. F. Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor , NY .
45. Schirmer, E.C., Lindquist, S. y Vierling, E. 1994. An *Arabidopsis* heat stress protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell* 6: 1899–1909.
46. Schöffl F., Prändl R., Y Reindl A. 1998. Regulation of the heat shock response. *Plant Physiol* 117: 1135-1141.
47. Schweitzer M. 1994. *Aloe vera*, la planta que cura. Apothegme, Paris, France ISBN 2-9508531-2-9. p 63.
48. Sharp, P.M. y Li, W.H. 1987. Ubiquitin genes as a paradigm of concerted evolution of tandem repeats. *J. Mol. Evol.* 25: 58-64.
49. Simoes-Araujo, J.L., Rumjanek, N.G., Margis-Pinheiro, M. 2003. Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean. *Braz J Plant Physiol* 15:33-41
50. Singla, S.L. y Grover, A. 1994. Detection and quantification of a rapidly accumulating and predominant 104 kDa heat stress polypeptide in rice. *Plant Science* 97: 23-30.
51. Smertenko, A., Draber, P., Viklicky, V. y Opatrny, Z. 1997. Heat stress affects the organization of microtubules and cell division in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Cell Environ* 20: 1534-1542.
52. Stürzenbaum, S. y Kille, P. 2001, Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariante. *Comp Biochem Physiol Part B.* 130: 281-289.
53. Su, C.K., Mehta, V., Ravikumar, L., Shah, R., Pinto, H., Halpern, J., Koong, A., Goffinet D., y Le Q.T. 2004. Phase II double-blind randomized study comparing oral aloe vera versus placebo to prevent radiation-related mucositis in patients with head-and-neck neoplasms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60:171-177.
54. Sung, D.Y., Vierling, E. y Guy, C.L. 2001. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* hsp70 gene family. *Plant Physiol* 126: 789-800.
55. Taiz, L. y Zeiger, E. 1998. *Plant physiology*. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, 792 p. (1998).
56. Tang, L., Kwon, S.Y., Kim, S.H., Kim, J.S., Choi, J.S., Cho, K.Y., Sung, C.K., Kwak, S.S., Lee, H.S. 2006. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Rep* 25: 1380-1386.

57. Tukey, J.W. 1951. Quick and dirty methods in statistics, part II, Simple analyses for standard designs. En Sokal and Rohlf: Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. Ediciones H Blume pp 382.
58. Vierling, E., 1991. The role of heat shock proteins in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 579–620.
59. Wahid, A. y Close, T.J., 2007. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum* 51: 104-109.
60. Wahid, A., Gelani, S., Ashraf M. y M.R. Foolad 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ Exp Bot* 61: 199-223.
61. Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. y Altman, A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci*, 9: 244-252.
62. Wickline, M.M. 2004. Prevention and treatment of acute radiation dermatitis: A literature review. *Oncol Nurs Forum* 31: 237-247
63. Wise, R.R., Olson, A.J., Schrader, S.M. y Sharkey, T.D., 2004. Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. *Plant Cell Environ* 27: 717–724.
64. Wollenweber, B., Porter, J.R. y Schellberg, J., 2003. Lack of interaction between extreme high temperature events at vegetative and reproductive growth stages in wheat. *J. Agron. Crop Sci.* 189: 142–150.
65. Wu C.H., Casper T., Browse J., Lindquist S., Somerville C. 1988. Characterization of an HSP70 cognate gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 88: 731-740.
66. Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H., Cui, L., 2006. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. *Environ. Exp. Bot.* 56: 274–285.
67. Yagi, A. y Takeo, S. 2003. Anti-inflammatory constituents, aloesin and aloemannan in Aloe species and effects of tanshinon VI in *Salvia miltiorrhiza* on heart. *Yakugaku Zasshi* 123: 517-532.
68. Yongchaiyudha, S., Rungpitarangsi, N., Bunyapraphatsara, I., y Chokechai-Jaroenporn, O. 1996. Antidiabetic activity of Aloe vera L. juice. Clinical trial in new cases of diabetes mellitus. *Phytomedicine* 3: 241-243.
69. Zhu J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247-273.



Z\_mays CCGAGGAACACCACCATCCCCACCAAGAAGGAGCAGGTGTTCTCCACCTACTCGGACAAC 493  
T\_aestivum CCGAGGAACACCACCATCCCCACCAAGAAGGAGCAGGTCTTCTCCACCTACTCGGACAAC 1317  
O\_sativa CCAAGGAACACCACCATTTCCACCAAGAAGGAGCAGGTCTTCTCCACCTACTCTGACAAC 1317  
A\_thaliana1 CCGAGGAACACCACAATTCGACCAAGAAGGAGCAGATATTCTCTACCTATTCTGACAAC 1320  
A\_thaliana2 CCGAGGAACACCACAATTCGACCAAGAAGGAGCAGATATTCTCTACCTATTCTGACAAC 1320  
A\_thaliana3 CCGAGGAACACCACAATTCGACCAAGAAGGAGCAGATATTCTCTACCTATTCTGACAAC 1320  
A\_vera CCGAGGAACACAACCTATCCCAACGAAGAAGGAGCAGGTGTTCTCCACATACTCGGACAAC 401  
\*\* \* \* \* \* \*

Z\_mays CAGCCTGGTGTGTTGATCCAGGTGTACGAGGGTGAGAGGACCCGGACCCGCGACAACAAC 553  
T\_aestivum CAGCCGGGCGTCTGATCCAGGTGTACGAGGGCGAGCGCCAGGACCAAGGACAACAAC 1377  
O\_sativa CAGCCTGGTGTGCTCATCCAGGTTTATGAGGGTGAGAGGACCGGACCGTGAACAACAAC 1377  
A\_thaliana1 CAGCCCGGTGTACTGATCCAGGTCTACGAAGGAGAGAGGGCACGAACAAGGACAACAAC 1380  
A\_thaliana2 CAGCCCGGTGTACTGATCCAGGTCTACGAAGGAGAGAGGGCACGAACAAGGACAACAAC 1380  
A\_thaliana3 CAGCCCGGTGTACTGATCCAGGTCTACGAAGGAGAGAGGGCACGAACAAGGACAACAAC 1380  
A\_vera CAGCCAGGTGTCTTGTATCCAGGTGTACGAGGGTGAGAGGACAAGGACCAAGGACAACAAC 461  
\*\*\*\*\*

Z\_mays CTGCTTGGGAAGTTCGAGCTCTCCGGCATCCCACCGCTCCTCGTGGTGTCCCCAGATC 613  
T\_aestivum CTCTGGGCAAGTTCGAGCTCTCCGGCATCCCACCGCGCCCGCGGTGTGCCCCAGATC 1437  
O\_sativa CTGCTGGGCAAGTTTGAGCTCTCTGGAATCCCTCCTGCTCCAGGGGTGTTCCACAGATC 1437  
A\_thaliana1 CTTTTGGGAAAGTTCGAGCTCAGTGGTATACCACCTGCTCCACGAGGTGTACCGCAGATT 1440  
A\_thaliana2 CTTTTGGGAAAGTTCGAGCTCAGTGGTATACCACCTGCTCCACGAGGTGTACCGCAGATT 1440  
A\_thaliana3 CTTTTGGGAAAGTTCGAGCTCAGTGGTATACCACCTGCTCCACGAGGTGTACCGCAGATT 1440  
A\_vera TTGCTTGGCAAGTTTGAGCTCTCTGGCATCCCACCTGCACCTAGGGGAGTTTCTCAGATT 521  
\* \* \* \* \*

Z\_mays ACGGTCTGCTTCGACATCGACGCCAACGGCATCCTGAACGTGTCTGCCGAGGACAAGACG 673  
T\_aestivum ACGGTGTGCTTCGACATCGACGCCAACGGCATCCTGAACGTGTCTGCGGAGGACAAGACG 1497  
O\_sativa ACTGTTTGCTTCGACATTGATGCCAATGGTATCCTGAACGTGTCTGCTGAGGACAAGACC 1497  
A\_thaliana1 ACTGTCTGTTTCGACATCGACGCCAATGGTATCCTGAATGTGTCTGGCTGAGGACAAGACC 1500  
A\_thaliana2 ACTGTCTGTTTCGACATCGACGCCAATGGTATCCTGAATGTGTCTGGCTGAGGACAAGACC 1500  
A\_thaliana3 ACTGTCTGTTTCGACATCGACGCCAATGGTATCCTGAATGTGTCTGGCTGAGGACAAGACC 1500  
A\_vera ACTGTGTGTTTTCGACATTGATGCCAATGGTATCCTGAATGTCTGCTGAGGACAAGACC 581  
\*\* \* \* \* \* \*

Z\_mays ACGGGGCAGAAGAACAAGATCACAATCACCAACGACAAGGGCCGTCTGTCCAAGGAGGAG 733  
T\_aestivum ACGGGGCAGAAGAACAAGATCACCATCACCAACGACAAGGGCCGTGAGCAAGGAGGAG 1557  
O\_sativa ACCGGGCAGAAGAACAAGATCACCATCACCAACGACAAGGGCAGGCTCAGCAAGGAGGAG 1557  
A\_thaliana1 ACTGGTCAGAAGAACAAGATCACAATCACAAACGACAAGGGAAGGTTATCAAAGGAAGAG 1560  
A\_thaliana2 ACTGGTCAGAAGAACAAGATCACAATCACAAACGACAAGGGAAGGTTATCAAAGGAAGAG 1560  
A\_thaliana3 ACTGGTCAGAAGAACAAGATCACAATCACAAACGACAAGGGAAGGTTATCAAAGGAAGAG 1560  
A\_vera AT-GGTCAGAAGAACAAGATCACCATCAC----- 609  
\* \* \* \* \*



**ANEXO 2.** Alineamiento múltiple de secuencias de la proteína HSP70 de las especies indicadas en la Tabla 3, y la secuencia traducida del gen de *Aloe barbadensis* Miller. Se destacan en gris y en recuadro los motivos conservados de la proteína. (\*)aminoácidos idénticos, (:) sustitución conservada de aminoácidos, (.) sustitución semi-conservada.

Ageratina	STVTRARFEELNMDLFRKCMEPVEKCLRDAKMDKSSVHD	VVLVGGSTRIPKVQQLLQD	FF	360
Saussurea	STITRARFEELNMDLFRKCMEPVEKCLRDAKMDKSSIHD	VVLVGGSTRIPKVQQLLQD	FF	140
Sandersonia	-----MDLFRKCMEPVEKCLRDAKMDKSTVHD	VVLVGGSTRIPKVQQLLQD	FF	48
Oryza	STITRARFEELNMDLFRKCMEPVEKCLRDAKMDKSSVHD	VVLVGGSTRIPRVQQLLQD	FF	359
Cucumis	STITRARFEELNMDLFRKCMEPVEKCLRDAKMDKSTVHD	VVLVGGSTRIPKVQQLLQD	FF	360
Spinacia	TTITRARFEELNMDLFRKCMEPVEKCLRDAKMDKSTVHD	VVLVGGSTRIPKVQQLLQD	FF	360
Arabidopsis	TTITRARFEELNMDLFRKCMEPVEKCLRDAKMDKSSVHD	VVLVGGSTRIPKVQQLLQD	FF	360
Zea	PRSSRARFEELNMDLFRKCMEPVEKCLRDAKMDKSSVHD	VVLVGGSTRIPKVQQ-LQD	FF	286
Aloe	-----FEELNMDLFRKCMEPVEKCLRDAKMDKSSVHD	VVLVGGSTRIPKVQQLLQD	FF	53
	*****.:*****:*** **			
Ageratina	NGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGEGNEKVQDLLLLDVTPLSLGLETAGGVMTVLI			420
Saussurea	NGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGEGNEKVQDLLLLDVTPLSLGLETAGGVMTVLI			200
Sandersonia	NGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGEGNEKVQDLLLLDVTPLSQLETAGGVMTVLI			108
Oryza	NGKELCKNINPDEAVAYGAAVQAAILSGEGNEKVQDLLLLDVTPLSLGLETAGGVMTVLI			419
Cucumis	NGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGEGNEKVQDLLLLDVTPLSLGLETAGGVMTVLI			420
Spinacia	NGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGEGNEKVQDLLLLDVTPLSLGLETAGGVMTVLI			420
Arabidopsis	NGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGEGNEKVQDLLLLDVTPLSLGLETAGGVMTVLI			420
Zea	NGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGEGNE-RSDLLLDVTPLSLGLETAGGVMTVLI			345
Aloe	NGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAILSGEGNEKVQDLLLLDVTPLSLGLETAGGVTTVLI			113
	*****.*****.***** **			
Ageratina	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYEGERTRTRDNLLGKFELSGIPPAPRGVPQI			480
Saussurea	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYEGERTRTRDNLLGKFELSGIPPAPRGVPQI			260
Sandersonia	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYEGERTRTRDNLLGKFELSGIPPAPRGVPQI			168
Oryza	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYEGERTRTRDNLLGKFELSGIPPAPRGVPQI			479
Cucumis	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYEGERTRTRDNLLGKFELSGIPPAPRGVPQI			480
Spinacia	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYEGERTRTRDNLLGKFELSGIPPAPRGVPQI			480
Arabidopsis	PRNTTIPTKKEQIFSTYSDNQPGVLIQVYEGERTRTRDNLLGKFELSGIPPAPRGVPQI			480
Zea	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYEGERTRTRDNLLGKFELSGIPPAPRGVPQI			405
Aloe	PRNTTIPTKKEQVFSTYSDNQPGVLIQVYEGERTRTRDNLLGKFELSGIPPAPRGVPQI			173
	*****.:*****:*.***** **			
Ageratina	TVCFDIDANGILNLSAEDKTTGQKNKITTITNDKGRLSKEEIEKMQEAEKYKADEEHHK			540
Saussurea	TVCFDIDANGILNLSAEDKTTGQKNKITTITNDKGRLSKEEIEKMQEAEKYKSEDEEHHK			320
Sandersonia	TVCFDIDANGILNLSAEDKTTGQKNKITTITNDKGRLSKEDIKMQEAEKYKSEDEEHHK			228
Oryza	TVCFDIDANGILNLSAEDKTTGQKNKITTITNDKGRLSKEEIEKMQEAEKYKSEDEEHHK			539
Cucumis	TVCFDIDANGILNLSAEDKTTGQKNKITTITNDKGRLSKEEIEKMQEAEKYKSEDEEHHK			540
Spinacia	TVCFDIDANGILNLSAEDKTTGQKNKITTITNDKGRLSKEEIEKMQEAEKYKSEDEEHHK			540
Arabidopsis	TVCFDIDANGILNLSAEDKTTGQKNKITTITNDKGRLSKEEIEKMQEAEKYKADEEHHK			540
Zea	FVTFDIDVNNILNLSAEDKTTGQKNKITTITNDKGRLSKEEIEKMQEAEKYKADEEVEKK			465
Aloe	TVCFDIDANGILNLSAEDKTTGQKNKITI-----			202
	** ***.***** **			