

UCH-FC
MAB-BMCN
H. 887
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

“Estudio de la expresión de genes de estrés térmico y la acumulación de proteínas
codificadas por estos genes –hsp70, hsp100 y ubiquitina - en plantas de *Aloe*
barbadensis Miller, sometidas a estrés de temperatura”

Tesis Entregada a la Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
Para optar al Grado de

Magíster en Ciencias Biológicas
Con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias
Facultad de Ciencias

Por

Claudia Mónica Huerta Calderón

Julio, 2012

Directora de Tesis: Dra. Liliana Cardemil Oliva
Co- Directora de Tesis: Dra. Claudia Stange Klein

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

CLAUDIA MÓNICA HUERTA CALDERÓN

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el 18 de abril de 2012.

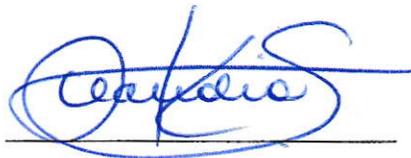
- Director de Tesis:

Dra. Liliana Cardemil



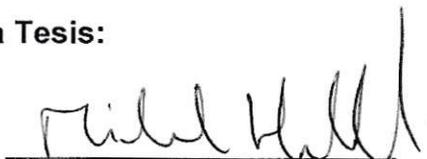
- Co-Director de Tesis

Dra. Claudia Stange

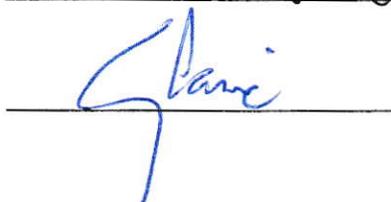


- Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Michael Handford



Dr. Álvaro Glavic





A mis padres, que amo infinitamente...

AGRADECIMIENTOS



Me gustaría agradecer en primer lugar a mi familia, por el apoyo incondicional y la infinita paciencia. A mis padres, hermanos y sobrinos que me llenan la vida, los amo.

Agradezco al Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, y cada una de las personas que lo componen, los profesores, estudiantes y técnicos, porque durante el desarrollo de esta tesis hicieron mi estadía ahí la más agradable, y por ser parte de mi formación profesional. Agradezco a los profesores Mike, Claudia y Lorena por su excelente disposición a ayudar y enseñar. Mención especial se lleva mi directora de tesis, la profe Liliana Cardemil, muchas gracias por sus enseñanzas, por su paciencia, por confiar en mí, y por su cariño.

Agradezco también al Laboratorio de PostCosecha de la UNAB, mi lugar de trabajo actual, y a cada uno de sus integrantes, por su constante apoyo y su buena onda. A mi jefe Reinaldo Campos, por recibirme en su laboratorio, por enseñarme constantemente y por permitirme terminar esta tesis en horarios de trabajo.

Agradezco a mis amigos, de todos lados, aquellos que conservo del colegio, que hice en la universidad, en el laboratorio, por ahí, y por la vida, jejeje me gustaría nombrarlos a todos, pero temo olvidar a alguien de puro despistada. Me han llenado de alegría y ganas de vivir, quiero conservarlos por siempre.

Muchas gracias a todos los que han sido parte de mi vida estos últimos años, de una u otra forma influyeron en mí, en ser quién soy y en quién quiero ser. Un abrazo de corazón.

INDICE DE CONTENIDOS



1. INTRODUCCION	1
1.1. Efectos del estrés térmico en las plantas.....	1
1.2. Mecanismos de respuesta de las plantas frente al estrés térmico.....	3
1.2.1. Respuesta "Estrés térmico"	4
1.2.2. Expresión de los genes de estrés térmico y su regulación por factores de transcripción HSF.....	6
1.3. Aloe vera, una planta de desierto con importancia económica.....	7
1.4. Hipótesis.....	9
1.5. Objetivos.....	9
1.5.1. Objetivo General	9
1.5.2. Objetivos Específicos	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
2.1. Material Vegetal.....	10
2.2. Determinación de la temperatura letal (TL ₅₀) por conductividad eléctrica.....	10
2.3. Experimentos Fisiológicos.....	11
2.4. Análisis de la expresión de los genes de estrés térmico.....	12
2.4.1. Tratamiento previo de las muestras.....	12
2.4.2. Extracción de RNA total.....	12
2.4.3. Electroforesis en geles de agarosa.....	13
2.4.4. Tratamiento con DNAsas y Transcripción Reversa.....	13
2.4.5. Amplificación por PCR.....	14
2.4.6. Diseño de partidores y estandarización de PCR.....	14
2.4.7. Electroforesis en geles de agarosa.....	15
2.4.8. Cuantificación del producto de PCR en geles de agarosa	15

2.5. Clonación del cDNA de los genes de estrés térmico.....	16
2.5.1. Reacción de ligación	16
2.5.2. Preparación de las células competentes	17
2.5.3. Transformación	17
2.5.4. PCR Colonias.....	18
2.5.5. Análisis rápido de colonias	18
2.5.6. Extracción del DNA plasmidial.....	19
2.5.7. Digestiones enzimáticas.....	19
2.5.8. Secuenciación.....	19
2.5.9. Análisis de las secuencias.....	19
2.6. Análisis de la acumulación de proteínas de estrés térmico.....	20
2.6.1. Tratamiento previo de las muestras.....	20
2.6.2. Extracción de proteínas.....	20
2.6.3. Cuantificación y separación de proteínas.....	21
2.6.4. Western Blots.....	21
3. RESULTADOS	23
3.1. Determinación de temperatura letal (TL50) mediante conductividad eléctrica.....	23
3.2. Clonación de los genes de estrés térmico hsp70, hsp100 y ubiquitina.....	24
3.2.1. Secuencia del cDNA del gen de ubiquitina es homóloga a la secuencia del gen en otras especies.....	24
3.3. Análisis de los niveles de expresión de los genes de estrés térmico.....	29
3.3.1. Cuantificación del mRNA de los genes de estrés térmico en plantas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo.....	29
3.3.2. Cuantificación del mRNA de los genes de estrés térmico en plantas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación.....	33
3.4. Análisis de la acumulación de proteínas de estrés térmico.....	36
3.4.1. Acumulación de proteínas de estrés térmico en plantas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo.....	36

3.4.2. Acumulación de proteínas de estrés térmico en plantas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación	39
4. DISCUSION.....	43
4.1. Determinación de temperatura letal	43
4.2. Estandarización de la técnica RT-PCR.....	44
4.3. Expresión de los genes HSP en plantas sometidas a tratamiento térmico directo	47
4.4. Expresión de los genes HSP en plantas sometidas a tratamiento de aclimatación. 49	
4.5. Acumulación de proteínas HSP en plantas sometidas a tratamiento térmico directo 52	
4.6. Acumulación de proteínas HSP en plantas sometidas a tratamientos de aclimatación.....	53
5. CONCLUSIONES	56
6. BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del vector pGEM®-T Easy, que incluye puntos de referencia en la secuencia.....	16
Figura 2. Determinación de TL ₅₀ en Aloe vera.....	23
Figura 3. Digestión enzimática con <i>EcoRI</i> del DNA plasmidial que contiene el fragmento de cDNA que correspondería a ubiquitina.....	25
Figura 4.- Secuencia del fragmento clonado, obtenido por PCR con los partidores ubiqF y ubiqR	26
Figura 5.- Secuencia aminoacídica deducida del fragmento de Ubiquitina en estudio...	26
Figura 6.- Esquema de la proteína Ubiquitina , donde se destaca la región que fue amplificada en búsqueda de dominios conservados en Aloe vera.....	28
Figura 7.- Estandarización del número de ciclos de amplificación para los partidores diseñados.....	30
Figura 8.- Acumulación de mRNA de los genes de estrés térmico hsp70, hsp100 y ubiquitina en plantas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo.	31
Figura 9.- Expresión relativa de los genes de estrés térmico- hsp70, hsp100 y ubiquitina- en hojas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo.....	32
Figura 10.- Acumulación de mRNA de los genes de estrés térmico en plantas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación.....	34
Figura 11.- Expresión relativa de los genes de estrés térmico- hsp70, hsp100 y Ubiquitina- en hojas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación	35
Figura 12.- Proteínas totales obtenidas a partir de hojas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo	36
Figura 13.- Western Blot para HSP70 realizado a partir de extractos de proteínas totales de hojas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo.....	37

Figura 14.- Acumulación de las isoformas de la proteína HSP70 en hojas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo..... 38

Figura 15.- Proteínas totales obtenidas a partir de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación..... 39

Figura 16.- Western Blot para HSP70 de extractos de proteínas totales de hojas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación 40

Figura 17.- Acumulación de las isoformas de la proteína HSP70 en hojas de plantas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación..... 41

Figura 18.- Western Blot para Ubiquitina de extractos de proteínas totales de hojas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación..... 42



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.- Secuencia de los partidores utilizados en esta tesis.....	15
Tabla II. Análisis de BLAST con la secuencia nucleotídica y aminoacídica de Ubiquitina	27

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	: Análisis de varianza
ATP	: Adenosín Trifosfato
BCIP	: 5-bromo 4-cloro-3'-indolifosfato
BiP	: Proteína de unión a inmunoglobulina
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	: DNA complementario
CTAB	: Bromuro de Cetil Trimetil Amonio
DEPC	: Dietilpirocarbonato
DIG	: DNA digerido
DMF	: Dimetil formamida
DMSO	: Dimetil sulfóxido
DNAsa	: Desoxirribonucleasa
dNTP	: Desoxirribonucleótido
EDTA	: Ácido etilendiaminotetracético
HSP	: Heat Shock Protein
HSF	: Heat Shock Factor
kDa	: Kilo Dalton
LB	: Luria Bertani
mRNA	: RNA mensajero
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium
PCR	: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	: Polietilenglicol
RNAsa	: Ribonucleasa
ROS	: Especie reactiva del Oxígeno
rRNA	: RNA ribosómico
RT	: Transcripción Reversa
st PM	: Estándar de Peso Molecular
SE	: Error Estándar
TAE	: Tris- Ácido Acético- EDTA
TL50	: Temperatura letal con 50% de daño
Tm	: Temperatura de melting (fusión)
TSS	: Transformation Storage Solution

RESUMEN

El estrés de alta temperatura es uno de los principales factores que afectan a la agricultura a nivel mundial, debido a que los cultivos de importancia económica son los más susceptibles. Por esta razón, es necesario estudiar los mecanismos de respuesta de las plantas que sí son capaces de tolerar estas condiciones. Entre ellas tenemos a *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera), una planta fisiológicamente adaptada a las condiciones desérticas, que implican altas temperaturas durante el día. Conocer los mecanismos que le permiten a Aloe vera tolerar las altas temperaturas, sería de gran utilidad para el mejoramiento de plantas más susceptibles y que son importantes económicamente.

En este trabajo se estudió la respuesta al estrés térmico en plantas de Aloe vera sometidas a altas temperaturas, de 35, 40 y 45°C. Para ello se determinó la TL₅₀ de la planta a través del daño a membranas celulares, producido por calor, se estudió la expresión de los genes de estrés térmico hsp70, hsp100 y ubiquitina, mediante RT-PCR semi-cuantitativo, y se midió la acumulación de las proteínas codificadas por estos genes, mediante western blot usando anticuerpos específicos. La TL₅₀ fue 52.3°C, comparable con la temperatura letal de otras plantas del desierto. Los transcritos de estos genes se acumularon con el aumento de la temperatura, aunque no todos los genes estudiados comenzaron a transcribirse a la misma temperatura. El gen de ubiquitina comenzó a transcribirse a una temperatura de 35°C, el gen hsp70 a 40°C, y el gen hsp100 lo hizo a 45°C. Además, el experimento de aclimatación en que las plantas son sometidas a las temperaturas sub-letales de 35°C o 40°C antes de una exposición a la temperatura de 45°C indujo una mayor expresión de estos genes con mayor acumulación de transcritos, y sin pérdida de proteínas totales, indicando que las plantas en estas condiciones se hicieron más tolerantes al calor. La acumulación de transcritos en los experimentos de aclimatación, se correlacionó con una mayor acumulación de proteínas de estrés térmico,

tal como lo revelaron los análisis de western blot. Estos análisis permitieron identificar dos isoformas de la proteína HSP70, una inducible por temperatura y otra constitutiva. La proteína ubiquitina fue detectada en sus formas monomérica, dimérica y trimérica.

Los resultados de esta tesis muestran que en Aloe vera se activa la respuesta al estrés térmico tanto a nivel de transcrito como de proteínas. Esto explicaría, en parte, su tolerancia a las altas temperaturas, tal como lo revela su alta temperatura letal. Conocer en profundidad los mecanismos de respuesta en una planta como Aloe vera, naturalmente adaptada a condiciones de desierto, permitirá a futuro desarrollar estrategias de mejoramiento de plantas de gran importancia económica que son susceptibles a este estrés. A futuro podría considerarse al Aloe vera, una planta altamente tolerante al calor, como un modelo de estudio que enseñe a los científicos las modificaciones genéticas a realizar en otras plantas susceptibles para poder sobrevivir en las altas temperaturas y falta de agua que conlleva el cambio global de nuestro planeta.

ABSTRACT

High temperature is an important problem in agricultural production around the world, because most economically important plant species are susceptible to heat damage. For this reason, it is necessary to study plant responses to heat stress, specifically in plants tolerant to high temperatures. *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*) is a succulent plant, physiologically adapted to desert conditions. Research in *Aloe vera* to understand the molecular and physiological strategies to tolerate heat stress would be useful to improve crops of susceptible plants, in a world where the temperature and lack of water are increasing conditions of our planet.

In this research, the heat shock responses were studied in *Aloe vera* plants subjected to temperatures of 35°, 40° and 45°C. The LT_{50} of *Aloe vera*, determined by membrane damage, was estimated to be 53.2°C, similar to others desert plants, and higher than in traditional crops. Gene expression of hsp70, hsp100 and ubiquitin was studied by semi-quantitative RT-PCR, and accumulation of proteins encoded by these genes was determined by Western blot analyses using specific antibodies. Expression of these genes increased with increasing temperature. The threshold temperature for transcription initiation varied depending on the gene: ubiquitin started increasing the transcription at 35°C, hsp70 at 40°C, and hsp100 at 45°C. Temperature acclimation experiments to determine the acquired heat tolerance of *Aloe vera*, were performed in plants subjected to sub-lethal temperatures of 35° or 40°C, prior to exposition at 45°C. Under these conditions, the plant increased the expression of heat shock genes with accumulation of more transcripts. A higher transcript accumulation occurred in these experiments without losses of total proteins, indicating that the *Aloe vera* plants acquired tolerance to heat stress under acclimation conditions. The transcript accumulation in the acclimation experiments correlated with accumulation of heat shock proteins. In western

blot assays, two isoforms of HSP70 were detected, one of them inducible by temperature, and the other constitutive. The ubiquitin antibody identified trimmers, dimmers and the monomer of this protein.

Results of this thesis show that in Aloe vera, heat shock response is activated at transcriptional and protein levels. These might explain the adaptation of Aloe vera to high temperature environments, adaptation made evident through its high lethal temperature. To study the molecular mechanisms of the heat shock responses of Aloe vera, naturally adapted to desert conditions, will allow to develop genetic strategies to improve the heat adaptation of economically important plants which otherwise are susceptible to this stress. In a near future, Aloe vera should be considered as a model plant to investigate genetic modifications in susceptible plants to survive the high temperature and water deficit, conditions which are implied in the global warming.

1. INTRODUCCION

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. Específicamente, las altas temperaturas corresponden a uno de los factores más importantes, provocando en los últimos 30 años una disminución del rendimiento en importantes cultivos para el consumo humano, como el maíz y trigo, que presentaron una baja del 3,8 y 5,5%, respectivamente, en la producción mundial (Lobell y col., 2011). Si agregamos que la población mundial está en constante crecimiento, esto implica un aumento en la demanda de alimentos, por lo cual surge 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 en las plantas

Se puede considerar el estrés térmico como un aumento en la temperatura que logra ejercer una influencia desventajosa sobre la planta (Taiz y Zeiger, 2002). Cabe señalar además, 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 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). Como consecuencia de esto, el estrés térmico 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 resultado, 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 (Añón y col., 2004; Wahid y Close, 2007; Morales y col., 2003), 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 térmico 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 abscísico 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.

En primer lugar, cabe señalar cómo las plantas perciben el calor, y cuáles son los mecanismos que activan una respuesta inmediata para contrarrestar sus efectos dañinos. Recientemente, se han revisado los cuatro potenciales sensores del calor que estarían gatillando la respuesta al estrés térmico descritos hasta ahora (Mittler y col., 2012). Entre ellos se cuenta un sensor de histonas en el núcleo, un canal de la membrana plasmática que iniciaría un flujo de entrada de iones calcio, y dos sensores de proteínas desplegadas, uno en el retículo endoplásmico y otro en el citosol. Si bien no se sabe con certeza la relación entre cada uno de ellos, se sabe que activarían un set similar de genes logrando una termotolerancia mejorada.

Entre los mecanismos que las plantas activan para paliar los efectos del estrés térmico, 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 ácido gama-aminobutírico, que actúan como osmorreguladores. Esta respuesta se activa tanto en el estrés de altas temperaturas, como en el déficit hídrico y la alta salinidad, características propias del desierto (Wahid y col., 2007).

Por otro lado, para contrarrestar el estrés oxidativo que se gatilla, las plantas activan una serie de sistemas de detoxificación enzimática, tales como la sobreexpresión de las enzimas ascorbato peroxidasa y superóxido dismutasa (Delatorre y col., 2010; Ramírez y col., 2011; Sairam y Tyagi, 2004; Tang y col., 2006), enzimas que remueven las especies reactivas de oxígeno.

1.2.1. Respuesta “Estrés térmico”

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). 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). A nivel molecular, es una reprogramación transitoria de las actividades celulares, caracterizada por la síntesis de proteínas de estrés térmico (*heat shock proteins*, o HSP), en conjunto con un cese general de la síntesis de proteínas.

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 muy

dañadas por desnaturalización, para que sean recicladas, debido a que se vuelven potencialmente peligrosas. El efecto protector de estas proteínas puede ser atribuido, en parte, a que actúan concertadamente, ya se ha descrito una interacción estrecha entre HSP70 y HSP100 (Liberek y col., 2008) por eso es interesante conocer de qué manera se expresan frente a condiciones estresantes. La importancia de esta respuesta radica en que, al devolver a las proteínas su estructura, y por ende su función, se corrigen los efectos adversos en el resto de las actividades celulares (Wang y col., 2004, Bayer y Bakau, 2005).

Arabidopsis posee genes que codifican para 14 HSP70s: cinco proteínas citoplasmáticas, tres proteínas del retículo endoplásmico (llamadas BiP, homólogas a HSP70), dos proteínas plastidiales y dos mitocondriales (Sung y col., 2001). Las secuencias completas de estos genes están disponibles en las bases de datos, junto a la secuencia truncada de otras dos proteínas HSP70, cuya localización subcelular aún no se ha descrito. A partir del número calculado de aminoácidos que tendría cada secuencia, podemos estimar el tamaño de las proteínas, el cual varía desde 71,5 kDa en el caso de una proteína citoplasmática, a 79 kDa, para el caso de las dos proteínas localizadas en los plastidios. Por su parte, la familia génica de ubiquitina en *Arabidopsis* cuenta con 14 miembros, ocho de los cuales contienen repetidos en tándem de la región codificante de 228 pb. Otros cuatro miembros de esta familia poseen la secuencia de un monómero de ubiquitina fusionada a una o dos proteínas ribosómicas no relacionadas. Considerando la extensión de la región codificante del monómero, la proteína Ubiquitina consta de 76 aminoácidos y un tamaño aproximado de 8,4 kDa (Callis y col, 1995, Huerta y col., 2012). En arroz hay seis copias repetidas en tándem (Sivamani y Qu, 2006) y en levadura hay 4 genes caracterizados como genes de poliubiquitina (Ozkaynak et al. 1987).

1.2.2. Expresión de los genes de estrés térmico y su regulación por factores de transcripción HSF.

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 radiación (Lin y col., 2001; Sung y col., 2001; Guy y Li, 1998). En el caso de hsp100, se ha observado un aumento de los transcritos por estrés térmico, en plantas como *Arabidopsis*, soya, arroz, tabaco y trigo (Agarwal y col., 2001; Singla y Grover, 1994). Ubiquitina aumenta sus transcritos durante el estrés térmico e hídrico, tanto en *Arabidopsis* como en tabaco (Rizhsky y col., 2002, Rizhsky y col., 2004). 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, como también frente a estos factores en forma combinada (Rizhsky y col., 2002, Rizhsky y col., 2004).

Los genes de estrés térmico son regulados por los factores de transcripción HSF (HSF, heat shock factor), los cuales se unen a elementos reguladores río arriba de cada gen para promover la transcripción. En *Arabidopsis*, es posible identificar 21 HSF, a diferencia de los vertebrados que tienen 3, y levadura y *Drosophila* que tienen sólo uno (Koskull-Döring y col., 2007). Esta gran diversidad, más que una redundancia en la función, es considerada una manera de diversificar la respuesta, ya que la interacción de distintos HSF para formar hetero-oligómeros permite coactivar, potenciar y suprimir la transcripción. Cabe señalar además, que muchos HSF de plantas son proteínas inducibles por temperatura, por ejemplo, HSFA en tomate, el factor de transcripción crítico cuando sobreviene un estrés, es expresado constitutivamente, mientras que HSFA2 y HSFB1 son inducidos por temperatura y regulan la transcripción del primero. Este factor es inhibido por las chaperonas HSP70 y HSP90, y sólo cuando

éstas se despegan del HSF éste puede en forma de trimero, activar la transcripción uniéndose a la región promotora del gen (Richter y col., 2010).

El investigar la respuesta al estrés térmico es de suma importancia, pues permite conocer la tolerancia de la planta no sólo frente a este tipo de estrés, sino que también al de salinidad, baja disponibilidad hídrica, 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.

1.3. Aloe vera, una planta de desierto con importancia económica

El interés comercial por la planta de Aloe vera es debido a las propiedades curativas que se le atribuyen a sus hojas, en especial al gel que contienen. Estas propiedades 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. Originaria del norte y este de África, región desértica de altas temperaturas, en nuestro país se ha incrementado la superficie plantada, específicamente en las Regiones de Atacama y Coquimbo. En esta área predomina el clima árido y semiárido, con temperaturas que fluctúan entre los 25 y 30°C, y con baja pluviosidad (Araneda y col., 2010)

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 *Asphodalaceae*, Aloe vera es una planta de hojas suculentas que permiten retener agua en condiciones de escasez, y al desarrollar el metabolismo del ácido crasuláceo, o CAM, cierra sus estomas durante el día, 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, como *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. El presente trabajo permitirá conocer mejor la respuesta de esta planta al estrés abiótico, y generar conocimientos aplicables al mejoramiento vegetal, lo que permitiría obtener nuevas variedades de plantas, tolerantes a las condiciones desfavorables producidas por el fenómeno del calentamiento global.

1.4. Hipótesis

El estrés de temperatura induce la expresión de genes y la acumulación de proteínas de estrés térmico -HSP70, HSP100 y Ubiquitina- en *Aloe barbadensis* Miller.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

Estudiar la expresión de los genes hsp70, hsp100 y ubiquitina, y la acumulación de las proteínas codificadas por estos genes en *Aloe barbadensis* Miller en condiciones de estrés de temperatura.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Analizar cuantitativamente la acumulación de los RNA mensajeros de los genes hsp70, hsp100 y ubiquitina, en plantas sometidas a directo estrés térmico.
- Analizar cuantitativamente la acumulación de los RNA mensajeros de los genes hsp70, hsp100 y ubiquitina, en plantas en condiciones de aclimatación.
- Analizar cuantitativamente la acumulación de las proteínas HSP70 y Ubiquitina, en plantas sometidas a estrés térmico.
- Analizar cuantitativamente la acumulación de las proteínas HSP70 y Ubiquitina, en plantas en condiciones de aclimatación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material Vegetal.

Para los experimentos de estrés térmico, se utilizaron plantas de Aloe vera de 3 años, cultivadas en el laboratorio, en una cámara de crecimiento a una temperatura constante de 25°C, con fotoperíodo de 16 h luz, y regadas una vez por semana con 200 mL de agua, lo cual corresponde al 75% de la capacidad de campo. La capacidad de campo se define como la facultad que tiene el suelo de retener agua, lo cual es dado principalmente por su porosidad (Arya y col., 2008). El laboratorio AGROLAB determinó que el suelo con el que se trabajó posee un 7,8% p/p de retención de humedad, es decir, retiene 7,8 g de agua por cada 100 g de suelo. Como cada macetero donde se cultivaron las plantas posee aproximadamente 4 kg de tierra, para este formato de cultivo un 100% de capacidad de campo corresponde a 312 g de agua, pero el riego óptimo es a un 75%, por lo cual se regó con 200 mL, volumen aproximado debido a las leves diferencias entre los distintos volúmenes de tierra en los maceteros.

2.2. Determinación de la temperatura letal (TL₅₀) por conductividad eléctrica.

Para determinar la temperatura letal de Aloe vera, se consideró el método basado en la determinación de conductividad, descrito por Sullivan (1967). La TL₅₀ se refiere a la temperatura a la cual se produce el 50% de la conductividad por salida de electrolitos del tejido por daño de las membranas, con respecto al tejido muerto. Para la medición, se tomaron puntas de hojas de Aloe vera, de aproximadamente 100 mg, las cuales fueron colocadas en tubos con 2 mL de agua desionizada y se incubaron en un baño húmedo a distintas temperaturas (25°, 35°, 45°, 55°, 65° y 75°C) durante 2 h. Luego las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente y se agregaron 30 mL de

agua desionizada. Estas muestras fueron mantenidas en agitación por 1 hora a temperatura ambiente para promover la difusión de electrolitos desde los tejidos a la solución externa. Después de este período se determinó la conductividad inicial de las soluciones con el conductivímetro PWT modelo HI 98308 (HANNA Instruments, USA). Luego, las muestras fueron autoclavadas durante 20 minutos a 121°C y 1,2 Kg/cm², para matar el tejido. Las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente y se registró la conductividad máxima. El porcentaje de daño producido por los distintos tratamientos térmicos fue calculado según la siguiente relación:

$$\% .de .daño = \left\{ 1 - \frac{1 - \left(\frac{T_1}{T_2} \right)}{1 - \left(\frac{C_1}{C_2} \right)} \right\} \times 100$$

donde los subíndices 1 y 2 se refieren a las conductividades antes y después de autoclavar las muestras sometidas a tratamientos térmicos (T) y los controles (C) (sin tratamiento térmico). La temperatura letal fue determinada a partir de la curva de % de daño, versus temperatura, en donde la curva se comporta linealmente en el rango a analizar. Para ello se obtuvo la ecuación de la recta entre los puntos que flanquean el 50% de daño, obteniendo la siguiente relación $y = 4,2432x - 175,66$; con un $R^2 = 1$)

2.3. Experimentos Fisiológicos.

Se realizaron dos experimentos de estrés: tratamiento de estrés térmico directo y tratamiento de aclimatación. Para el tratamiento de estrés térmico directo, se utilizaron las puntas de las hojas, las cuales fueron incubadas dentro de un tubo plástico con un poco de agua, en un baño húmedo durante 2 h, que de acuerdo a trabajos anteriores es tiempo suficiente para funcionar como estrés (Ortiz y Cardemil,

2001), a las temperaturas de 25°, 35°, 40° y 45°C. Para los experimentos de aclimatación, se incubaron plantas de Aloe vera a 35° y 40° por 2 h y luego las mismas plantas a 45° por 2 h más. Para comparar estas muestras, se incubaron otras plantas de Aloe vera a las temperaturas 25°, 35°, 40° y 45°C durante el mismo período de tiempo, 4 h. Luego de este tiempo, se tomaron muestras de las puntas de la hojas, las cuales se almacenaron rápidamente en N₂ líquido, y se guardaron a -80°C hasta su utilización. 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.

2.4. Análisis de la expresión de los genes de estrés térmico.

2.4.1. Tratamiento previo de las muestras

Para la extracción de RNA y proteínas, se maceró el tejido en molinillo eléctrico enfriado con N₂ líquido, sin dejar descongelar la muestra, hasta la formación de un fino polvo. Este polvo se reservó a -80°C hasta su utilización.

2.4.2. Extracción de RNA total

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, y adicionando una solución de NaCl para llegar a una concentración de éste de 1M, para reducir la viscosidad de la muestra. Se utilizó como material inicial aproximadamente 150 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%.

2.4.3. Electroforesis en geles de agarosa

Se verificó la integridad del RNA en geles de 1% agarosa en búffer TAE (40 mM Tris, 19 mM ácido acético glacial y 1 mM EDTA pH 8), con 0,5 µg/mL bromuro de etidio. Se cargaron 200 ng de RNA en el gel con un búffer que posee los colorantes azul de bromofenol y xylencyanol para visualizar el frente de corrida (Sambrook y col., 1989), la cual se desarrolló aplicando una diferencia de potencial de 70 V y 300 mA durante 20 min. La visualización de los geles se realizó en el transiluminador Syngene, modelo MultiGenius.

2.4.4. Tratamiento con DNAsas y Transcripción Reversa

El extracto de RNA fue tratado con DNAsas, para eliminar el DNA que pudo ser co-extraído con el RNA y que constituye un contaminante para las reacciones posteriores. Para esto se utilizaron 200 ng de RNA, 1U DNAsa I (Fermentas) más su búffer correspondiente y 10U inhibidor de RNAsas Ribolock™, (Fermentas). El volumen fue ajustado con agua nanopura tratada con 0,1% DEPC. 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.

La mezcla de reacción de transcripción reversa incluyó 100 ng del RNA tratado con DNAsas y el partidor oligoAP 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 1U de la enzima transcriptasa reversa RT-Improm II (Promega), búffer de la enzima, 6,5 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTPs, y 20U del inhibidor de RNAsas Ribolock™ (Fermentas), en un volumen final de 20 µL. 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 oligoAP 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 I.

2.4.5. 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.

Se utilizó el programa optimizado que consta de los siguientes ciclos: una etapa de incubación a 94°C por 5 min, 36 ciclos que incluyen intervalos de temperatura de 95°C por 40 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 µL cDNA, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 mM cada partidador, 1U enzima *Taq* polimerasa (Favorgen) y su búffer respectivo, en un volumen final de 25 µL. La técnica de RT-PCR se desarrolló en el termociclador MyCycler™ (BIO-RAD).

Para el caso del gen 18S, se utilizaron 0,5 µL de cDNA y 24 ciclos de amplificación.

2.4.6. Diseño de partidores y estandarización de PCR

Los partidores utilizados para el estudio de la expresión de los genes hsp70, hsp100 y ubiquitina, fueron diseñados previamente (Huerta, 2009) a partir de secuencias homólogas de otras plantas cercanas filogenéticamente al Aloe vera. La secuencia de los partidores utilizados se muestra en la Tabla I.

Tabla I.- Secuencia de los partidores utilizados en esta tesis. Partidores utilizados para sintetizar cDNA desde el RNA 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	197	50,5
18SR	5'-ACA ATC ATC CTT CCG CAG GT-3		

2.4.7. Electroforesis en geles de agarosa

La visualización de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de 1% agarosa tal como se describe en 2.4.3, pero aplicando un campo eléctrico de 100 V. Para estimar los tamaños de las bandas, se utilizaron dos estándares de peso molecular, Ladder GeneRuler™ de 100pb y 1kb (Fermentas).

2.4.8. Cuantificación del producto de PCR en geles de agarosa

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 Software ImageJ (Abramoff y col., 2004). En el caso de ubiquitina, donde los partidores ubiF y ubiR amplificaron múltiples bandas correspondientes a ubiquitina y poliubiquitina, se consideraron las 3 de menor tamaño debido a su mayor resolución en el gel.

2.5. Clonación del cDNA de los genes de estrés térmico

2.5.1. Reacción de ligación

Para clonar y secuenciar el cDNA de los genes de estrés térmico, se transformaron bacterias con un vector portador del fragmento de cada gen amplificado por PCR. Este fragmento se ligó al vector pGEM[®]-T Easy (Promega), de 3 Kb, cuyo mapa se muestra en la Figura 1.

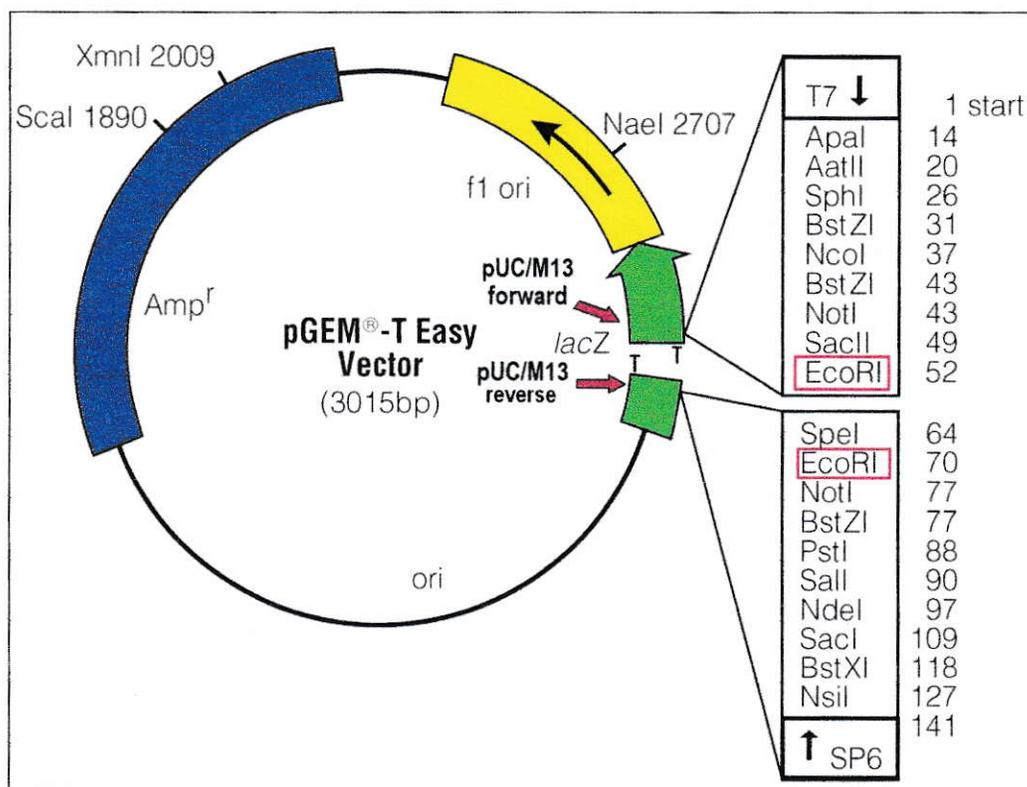


Figura 1. Mapa del vector pGEM[®]-T Easy, que incluye puntos de referencia en la secuencia. Se indica con flechas rojas la ubicación de los partidores pUC/M13F y pUC/M13R

utilizados en la secuenciación. En recuadro rojo se destaca la enzima *EcoRI*, la cual fue utilizada para los análisis de las colonias, cuyos sitios de corte flanquean el sitio de clonamiento.

Para realizar la reacción de ligación, se incubaron el producto de PCR (inserto) 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:

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

La mezcla de reacción consistió en: 2U de T4 DNA Ligasa (Fermentas) y su búffer correspondiente, 50 ng de vector pGEM[®]-T Easy, y la cantidad necesaria de producto de PCR para cada gen. Esta mezcla se incubó a 4°C toda la noche.

2.5.2. Preparación de las células competentes

Las células de *Escherichia coli* de la cepa DH5 α 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.O₆₀₀= 0,3-0,4. Las células se centrifugaron a 1.000 x g por 10 min a 4°C, y luego se resuspendieron en búffer TSS (10% PEG, 5% DMSO y 50 mM MgCl₂ en medio LB), utilizando 1/10 del volumen de cultivo inicial. Las células competentes se guardaron en 30% glicerol a -80°C hasta su utilización.

2.5.3. Transformación

La transformación fue realizada incubando toda la reacción de ligación con 200 μ L de las células competentes de la cepa DH5 α , 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 µg/mL Ampicilina, en medio LB). Las placas se incubaron a 37°C por 16 h o toda la noche. La eficiencia de la transformación obtenida fue de 3%.

2.5.4. PCR Colonias

Para identificar aquellas colonias que incorporaron el vector ligado al fragmento, se realizó un PCR colonia. Para ello, se prepararon tubos de PCR de la forma ya descrita, para cada par de partidores y se tomó una pequeña muestra de las colonias crecidas en cada placa y se agregó al tubo de reacción. A partir de las colonias que dieron resultado positivo, se realizaron los experimentos posteriores.

2.5.5. 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 se pasaron a medio LB líquido con 100 µg/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 µL y se centrifugaron a 7.500 x g por 3 min. El precipitado celular formado se resuspendió en 40 µL de solución de extracción (6% sacarosa y 0,1% azul de bromofenol). Luego, se agregaron 14 µL 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 de 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.

2.5.6. Extracción del DNA plasmidial

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

2.5.7. 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 y agua destilada hasta un volumen final de 20 μ L. Esta mezcla fue incubada a 37 °C por 90 min. La digestión se analizó mediante electroforesis en geles de 1% agarosa.

2.5.8. Secuenciación

El fragmento insertado en el vector pGEM[®]-T Easy fue secuenciado a partir de 500 ng de DNA plasmidial. La secuenciación fue encargado al Centro de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en donde se utilizó el equipo ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), el kit de secuenciación DYEnamicTM ET terminator (Amersham, Inglaterra), y los partidores universales pUC/M13F y pUC/M13R, directo y reverso respectivamente. Las secuencias se muestran en la Tabla I, y los sitios de hibridización al vector pGEM[®]-T Easy se indican en la Figura 1.

2.5.9. Análisis de las secuencias.

La secuencia nucleotídica del cDNA fue traducida a proteína con Expsy (Gasteiger y col., 2003), y luego ambas fueron comparadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante BLAST (Altschul y col., 1990, Altschul 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).

2.6. Análisis de la acumulación de proteínas de estrés térmico.

2.6.1. Tratamiento previo de las muestras

Para descartar contaminantes debido al alto contenido de azúcares en las hojas de Aloe vera, se realizó un tratamiento previo de las muestras, a partir de modificaciones del protocolo indicado por Wang (Wang y col., 2003). Aproximadamente 150 mg de tejido molido con N₂ líquido fue resuspendido en acetona fría, se agitó vigorosamente por 30 s y se centrifugó a 10.000 x g por 3 min a 4°C. Se repitió este procedimiento una vez. Luego, el pellet fue secado a temperatura ambiente y fue lavado 3 veces de la manera ya descrita con 10% ácido tricloroacético (TCA) en acetona fría, dos veces con 10% TCA en agua fría, y luego 2 veces en 80% acetona fría. El pellet final fue secado a temperatura ambiente.

2.6.2. Extracción de proteínas.

La extracción de proteínas fue realizada en base al método de Meyer (Meyer y col., 1988) pero en presencia de SDS, como fue descrito por Wang (Wang y col., 2003). El pellet obtenido del tratamiento anterior fue resuspendido en volúmenes equivalentes de fenol saturado en Tris pH 8, y de búffer SDS (30% sacarosa, 2% SDS, 0,1 M Tris-HCl pH 8 y 5% 2-mercaptoetanol), se agitó vigorosamente por 30 s y se centrifugó a 10.000 x g por 3 min. La fase fenólica fue transferida a un nuevo tubo, la cual fue diluida en 5 volúmenes de 0,1M acetato de amonio en metanol frío, y almacenada a -20°C por 30 min como mínimo. Luego, se centrifugó a 10.000 x g por 5

min, y el pellet fue lavado 2 veces con 0,1M acetato de amonio en metanol frío y dos veces con 80% acetona fría. El pellet final fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 400 μ L de búffer, descrito por O'Farrell (O'Farrell ,1975), con modificaciones, consistente en 9,5 M urea, 2% NP-40 y 0,1 M DTT.

2.6.3. Cuantificación y separación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976) a partir de una curva de calibración utilizando BSA como proteína estándar.

Para la separación de proteínas se realizaron geles de 12% poliacrilamida denaturantes (SDS-PAGE), de acuerdo a Laemmli (Laemmli, 1970) en una cámara Mini-PROTEAN® II Cell (Bio-Rad, USA) aplicando una diferencia de potencial de 100 V por 2,5 h. Las proteínas fueron visualizadas por tinción de plata (Morrisey, 1981), y su tamaño fue estimado considerando el estándar de peso molecular PageRuler™ Fermentas.

El contenido de proteínas fue expresado en μ g de proteínas/mg de peso seco. Para obtener el peso seco de las hojas se determinó el contenido de agua, como porcentaje del peso total, para lo cual se tomó una muestra de hoja de Aloe vera y se dejó secando en una estufa hasta observar completa deshidratación. La diferencia en el peso antes y después de secar corresponde al agua evaporada.

2.6.4. Western Blots

Luego de resolver 30 μ g de proteínas en un gel de 12% poliacrilamida, de acuerdo a lo descrito en el punto 2.6.3, éste fue incubado junto a una membrana de nitrocelulosa y papeles filtro de igual tamaño, en un búffer de transferencia (25mM Tris, 192mM glicina y 20% metanol). Se realizó la transferencia en una celda de

transferencia semi-seca Trans-Blot® SD (Bio-Rad, USA) por 30 min a 15 V. Al cabo de este tiempo, la membrana fue lavada en búffer TBST (20mM Tris-HCl, 137mM NaCl, 0,1% Tween 20 pH 7,6). Se verificó la eficiencia de la transferencia mediante tinción con Rojo Ponceau (0,1% Rojo Ponceau, 7% ácido tricloroacético). Una vez desteñida la membrana, ésta se dejó bloqueando en búffer de bloqueo (5% BSA en búffer TBST) toda la noche. Luego de bloquear, la membrana se lavó 3 veces durante 10 min en búffer TBST. Luego se incubó con el anticuerpo primario diluido en búffer de bloqueo durante 3 h. Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo policlonal que reconoce formas citoplasmáticas constitutivas e inducibles por calor de la proteína HSP70 de *Arabidopsis thaliana* (Agrisera, UK) a una dilución 1:5.000, y el anticuerpo policlonal que reconoce ubiquitina recombinante de *Arabidopsis thaliana* (Agrisera, UK), a una dilución 1:10.000. Luego de incubar, la membrana fue lavada 3 veces en búffer TBST por 10 min y fue incubada posteriormente en el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG fusionado a fosfatasa alcalina (Sigma, Alemania) durante 1 h, a una dilución 1:10.000 en búffer de bloqueo. Se lavó la membrana 3 veces en búffer TBST por 10 min, y luego se incubó 15 min en búffer de detección (0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, pH 9,5). Para revelar, se incubó la membrana en búffer de reacción (4mM MgCl₂, 0,1% NBT en búffer de detección, adicionando 150 µL de BCIP 5 mg/DMF 1mL por cada 10 mL de búffer de reacción) hasta la aparición de bandas.

La intensidad de las bandas fue cuantificada con el software ImageJ (Abramoff y col., 2004) y los análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism v5.00 (Motulsky, H., 2007).

3. RESULTADOS

3.1. Determinación de temperatura letal (TL₅₀) mediante conductividad eléctrica

La TL₅₀ se refiere a la temperatura a la cual se produce el 50% de la fuga de electrolitos con respecto al tejido muerto, lo cual puede ser correlacionado con el daño foliar. A partir de las determinaciones de conductividad en muestras incubadas a distintas temperaturas, fue posible calcular la temperatura letal de Aloe vera. Los datos de daño foliar muestran una tendencia lineal en la región cercana a 50% como se muestra en la Figura 2.

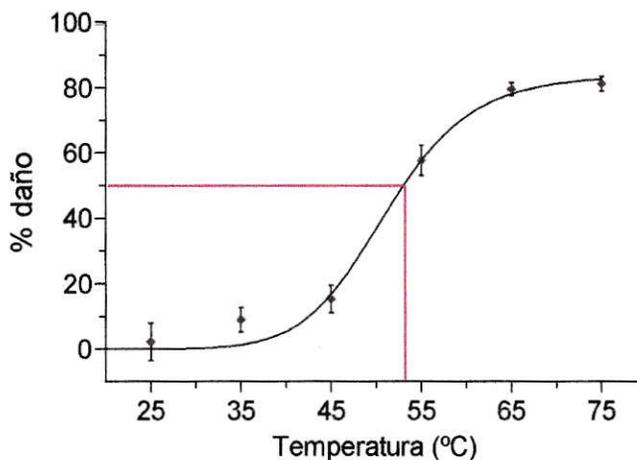


Figura 2. Determinación de TL₅₀ en Aloe vera. La TL₅₀ se determinó como % del daño foliar inducido por la temperatura. El daño foliar se evaluó midiendo la conductividad de la solución que bañaban las hojas cuando fueron sometidas a distintas temperaturas. Esta conductividad se comparó con la conductividad de la solución que rodea a un tejido muerto. El TL₅₀ nos permitió determinar la temperatura letal de Aloe vera, es decir la temperatura a la cual se produce el 50% de daño foliar, dando como resultado que esta temperatura letal es 53,2 °C.

Considerando esto, se tomaron los puntos de la curva que flanquean esa zona (correspondientes a los puntos 45° y 55°C) y se calculó la ecuación que representa esta tendencia, con lo cual se extrapoló el valor de temperatura a la cual se produce un 50% de daño de membrana. Este análisis permitió determinar que la temperatura letal de *Aloe vera* es de 53,2 °C.

Aloe vera presenta una alta temperatura letal, la cual es similar a otras plantas de desierto como *Prosopis chilensis*, que es de 53,3°C (Ortiz y Cardemil 2001), y *Agave tequilana*, cuya temperatura letal es de 55°C (Luján y col., 2009). *Agave tequilana* es una planta bastante cercana filogenéticamente al *Aloe vera*, pues ambas pertenecen al orden *Asparagales*, y además desarrollan el metabolismo del ácido crasuláceo, o CAM. Esta es otra característica que le permite a estas plantas adaptarse a zonas desérticas.

Esta determinación de la TL50 nos permite establecer las condiciones experimentales de este trabajo, seleccionando un rango de temperatura adecuado, que implique un estrés para la planta pero no su muerte. Por esta razón se seleccionó el rango de 25°- 45°C.

3.2. Clonación de los genes de estrés térmico hsp70, hsp100 y ubiquitina.

3.2.1. Secuencia del cDNA del gen de ubiquitina es homóloga a la secuencia del gen en otras especies.

La secuencia del fragmento amplificado para el gen hsp70 fue obtenida en el trabajo de Seminario de Título (Huerta 2009), y cuya secuencia nucleotídica presentó un 87% de identidad con *Camellia sinensis* (té) y 86% con *Solanum lycopersicum* (tomate), *Oryza sativa* (arroz) y *Zea mays* (maíz). En el caso de la secuencia

aminoacídica deducida, ésta presentó un 99% de identidad con *Ageratina adenophora* (hierba negra) y *Zea mays*, y un 98% con *Oryza sativa* y *Arabidopsis thaliana*.

En el caso de la secuencia amplificada con ubiqF y ubiqR, el fragmento de 165 pb fue clonado y secuenciado tal como se explica en materiales y métodos. En la Figura 3 se muestra una digestión enzimática del vector que contiene el fragmento de interés, con *EcoRI*, enzima que tiene dos sitios de corte en el vector, que flanquean el inserto (Figura 1). Aquí observamos la liberación de un fragmento del tamaño esperado, aproximadamente 165 pb, lo que indica que se tuvo éxito en la transformación.

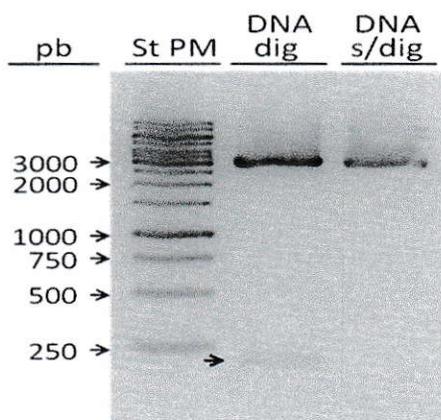


Figura 3. Digestión enzimática con *EcoRI* de pGEMT-Easy que contiene el fragmento de cDNA que correspondería a ubiquitina. La digestión muestra la liberación de un fragmento de tamaño cercano al esperado (165 pb). pb: tamaño en pares de bases de las bandas, St PM: estándar de peso molecular, DNA dig: DNA plasmidial digerido con la enzima, DNA s/ dig: DNA plasmidial sin digerir.

Para comprobar que este fragmento de cDNA corresponde a una secuencia del gen de ubiquitina, fue secuenciado, en ambos sentidos, utilizando los partidores

universales pUC/M13. Se secuenciaron 3 clones y la secuencia obtenida se muestra en la Figura 4.

```
5'-GGCAAGACCATCACCTGGGGTGGAGAGCTCTGACACGATTGACAATGTCATAGCTAA
GATTCAGGATAATGAGGGCATCCCCCTGACCAGCAGAGGCTCATCTTCGCTGGCAAG
CAGCTCGAGGACGGGCGGACTCTGGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGT -3'
```

Figura 4.- Secuencia del fragmento clonado en pGEMT-ubiquitina, obtenido por PCR con los partidores ubiqF y ubiqR. Se muestra la secuencia del fragmento, de 165 pb, y la región que reconocen los partidores utilizados se muestra subrayada.

Además, se realizó una traducción *in silico* de la secuencia de cDNA, para analizar la secuencia aminoacídica de la proteína Ubiquitina. 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 5.

```
NH2- QDHHPGVSSDTIDNVIAKIQDNEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLADYNIQKE -COOH
```

Figura 5.- Secuencia aminoacídica deducida del fragmento de Ubiquitina en estudio. Esta secuencia se dedujo a partir de la secuencia nucleotídica obtenida del fragmento. Se obtuvo una secuencia de 54 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

ubiquitina 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 II.

Tabla II. Análisis de BLAST con la secuencia nucleotídica y aminoacídica de ubiquitina. 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 $3e-114$.(m) plantas monocotiledóneas.

Secuencia (nt)	Especie	% Id	Secuencia (aá)	Especie	% Id
HM209468.1	<i>Panicum virgatum</i> (leguminosa)	90	AAL33551.1	<i>Cucumis melo</i> (melón)	100
DQ056362.1	<i>Populus alba</i> (álamo)	89	ADB85771.1	<i>Wolffia arriza</i> (lenteja de agua)	100
AF502575.1	<i>Musa acuminata</i> (plátano malayo)	88	ABD61727.1	<i>Lupinus albus</i> (lupino blanco)	100
X67957.1	<i>Antirrhinum majus</i> (boca de dragón)	88	AAC08400.1	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> (planta ornamental)	100
AF184279.1	<i>Oryza sativa</i> (arroz)(m)	87	AAC39466.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	100
U29162.1	<i>Zea mays</i> (maíz)(m)	87	AAQ08322.1	<i>Triticum aestivum</i> (trigo) (m)	96

Para el caso de la secuencia de hsp100, no fue posible obtener su secuencia debido a problemas con la purificación del vector desde las colonias. De forma alternativa, se diseñó un mapa de restricción de la secuencia hsp100 de distintas plantas (maíz, trigo, arroz, *Arabidopsis*), para obtener un patrón de los fragmentos que se deberían obtener al digerir el producto de PCR con enzimas de restricción (datos no mostrados). La alta variabilidad en el mapa de restricción obtenido en las distintas plantas, no nos permitió corroborar la identidad del fragmento con este método, ya que se obtuvo un patrón diferente. Sin embargo, cabe destacar que al diseñar los partidores se realizó un análisis de BLAST, lo cual corroboró la mayor identidad de los

partidores con secuencias de hsp100 con respecto a otros genes. Sin embargo, el tamaño del fragmento amplificado es igual al esperado de acuerdo al diseño de los partidores, por lo cual se espera que el único fragmento amplificado corresponda efectivamente, al gen hsp100. Además la banda obtenida corresponde a la amplificación de un fragmento cuya expresión aumenta con la temperatura tanto con experimentos de estrés térmico directo como en experimentos de aclimatación.

Para identificar la región en estudio de la proteína Ubiquitina, se realizó un alineamiento múltiple con ClustalW considerando las secuencias aminoacídicas de la Tabla II. Este análisis permitió comprobar que la secuencia comprende los aminoácidos 11 a 64 de la secuencia completa de 76, aproximadamente. Además, se comparó la secuencia con la base de de datos CDD (Conserved Domain Database) del NCBI (Marchler-Bauer y col., 2011), para identificar motivos conservados, atribuidos a patrones específicos en la secuencia. Un esquema de la proteína Ubiquitina donde se destaca lo encontrado en estos análisis se muestra en la Figura 6.

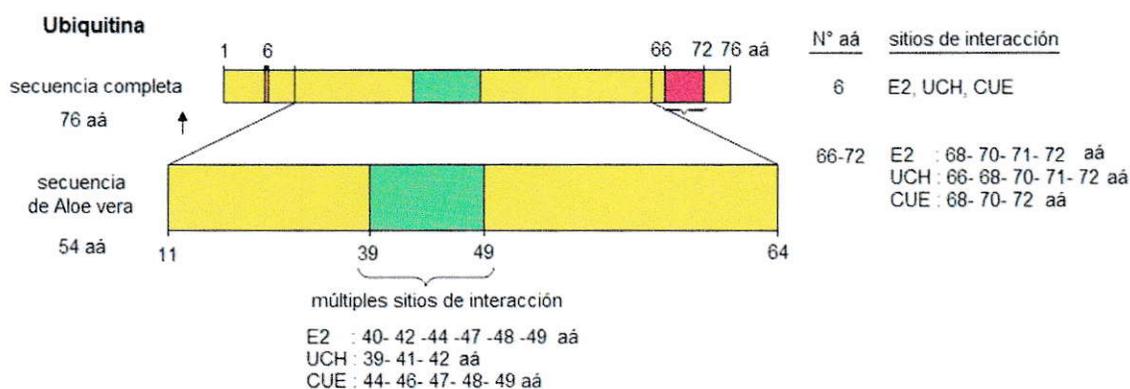


Figura 6.- Esquema modelo de la proteína Ubiquitina, y de la región amplificada de esta proteína de Aloe vera, mostrando los dominos conservados. Se muestra un esquema de Ubiquitina, que corresponde a un consenso de lo observado en los 14

miembros de esta familia en *Arabidopsis*, que muestra la cantidad de residuos aminoacídicos y ubicación de los dominios. En base a esto, el fragmento estudiado comprende los residuos 11 al 64, y en él se identificaron sitios de interacción con la enzima E2, con UCH (ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa) y CUE (conjugación de ubiquitina a degradación en el retículo endoplásmico), destacados en verde, y sitios conservados fuera de este fragmento destacados en rojo (Marchler-Bauer y col., 2011).

El fragmento que se amplifica por PCR abarca 165 pb de 228 pb totales del gen de ubiquitina, lo que corresponde a un 72% de cobertura si consideramos el gen de *Arabidopsis* como modelo. En el fragmento amplificado se encuentran múltiples sitios de interacción conservados, que corresponden a determinados residuos aminoacídicos que interactúan con la enzima E2, con ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa, y otros que facilitan su destinación para degradación en el retículo endoplásmico.

3.3. Análisis de los niveles de expresión de los genes de estrés térmico.

3.3.1. Cuantificación del mRNA de los genes de estrés térmico en plantas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo.

Se estudió la acumulación del mRNA de los genes de estrés térmico hsp70, hsp100 y ubiquitina a distintas temperaturas mediante RT-PCR semi-cuantitativo. Para ello, se comparó la expresión de cada uno de estos genes con los niveles del RNA ribosómico 18S, el cual fue utilizado como control interno (Goidin y col., 2001, Stürzenbaum y Kille, 2001), ya que son invariables en estas condiciones de estrés.

Para que las mediciones fueran cuantitativas y para que con ellas fuera posible observar diferencia en los tratamientos, se estandarizaron las condiciones de uso de los partidores. Se determinó el número de ciclos óptimo para cada par de partidores, 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 7.

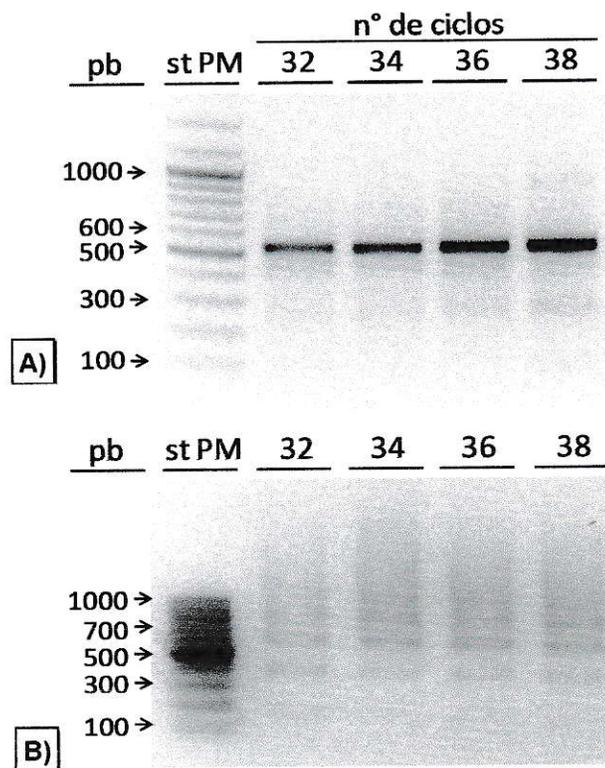


Figura 7.- Estandarización del número de ciclos de amplificación para los partidores diseñados. A) para los partidores de hsp100 el número de ciclos óptimo es 36. B) para los partidores de ubiquitina el número de ciclos óptimo es 36. pb: tamaño en pares de bases, st PM: estándar de peso molecular. Las flechas a la derecha de la figura indican los distintos transcritos de poliubiquitina, pero sólo se consideraron los 3 fragmentos más pequeños, como se describe en materiales y métodos.

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. Esto ya fue realizado previamente y el número de ciclos óptimo para 18S es de 24 (Huerta, 2009). 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 200 ng de RNA de las muestras sometidas a estrés 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.

De manera similar, se estandarizó la temperatura óptima de amplificación y el tiempo de elongación adecuado, para cada par de partidores, lo cual se muestra en la Tabla 1, en Materiales y Métodos.

Se analizaron 6 mediciones de RT-PCR (3 réplicas biológicas x 2 réplicas técnicas), a partir de muestras sometidas a estrés térmico. La Figura 8 muestra un resultado representativo.

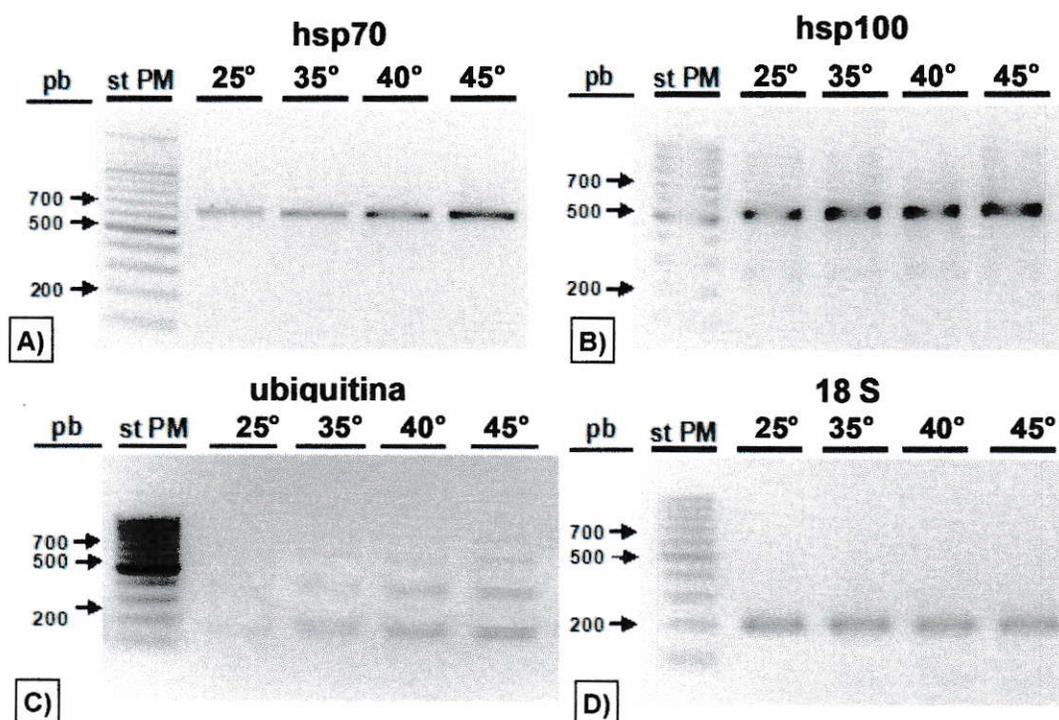


Figura 8.- Acumulación de mRNA de los genes de estrés térmico hsp70, hsp100 y ubiquitina en plantas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo. Electroforesis

en gel de agarosa del RT-PCR realizado a partir de hojas de Aloe vera sometidas a estrés de temperatura, donde se observa la acumulación de transcrito de los genes A) hsp70, B) hsp100, y C) ubiquitina, con respecto a la acumulación del D) RNA ribosómico 18S. Puede observarse un aumento gradual de la intensidad de las bandas de los genes estudiados correlacionado con la temperatura, no así en el caso de 18S que se mantiene constante. pb: tamaño en pares de bases, st PM: estándar de peso molecular.

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 gen/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 gen/18S a 25°C es 100%.

Se utilizó el software *GraphPad Prism* v5.00 (Motulsky, H., 2007) para realizar el análisis estadístico de los datos (ANOVA, de una vía y test *a posteriori* de Tukey, $p < 0,005$ (Tukey, 1951). Con este análisis, el perfil de expresión de estos genes se muestra en la Figura 9.

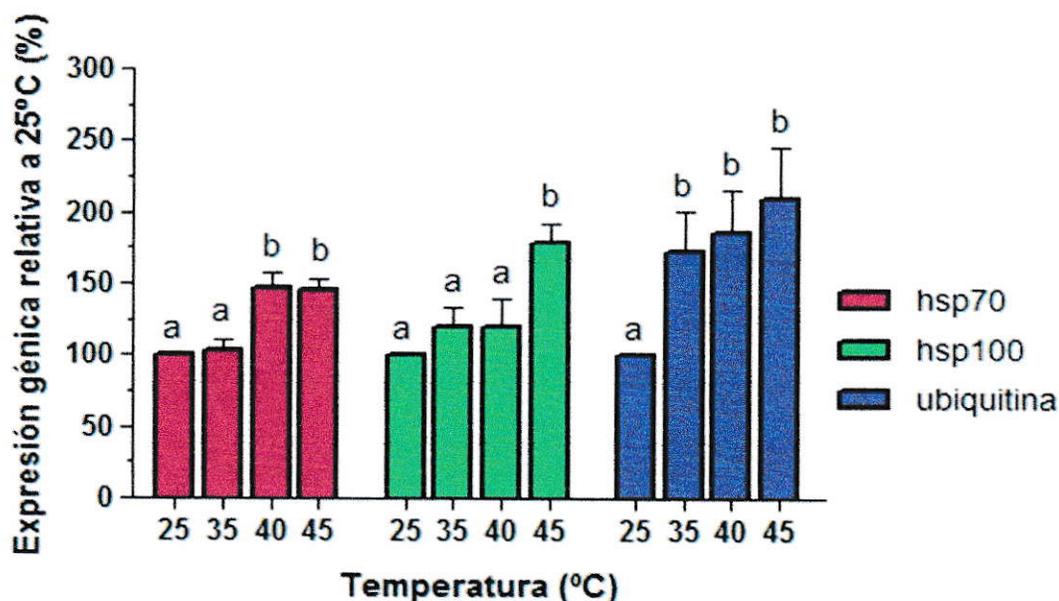


Figura 9.- Expresión relativa de los genes de estrés térmico- hsp70, hsp100 y ubiquitina- en hojas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo. Se observa que a mayor temperatura, mayor es la razón gen/18S, especialmente a 40° y 45°C. Las líneas sobre las barras representan el error estándar (Test de Student) $p < 0,005$. Las barras con distinta letra son estadísticamente diferentes (Test de Tukey).

Los resultados muestran que en todos los genes la expresión aumenta con la temperatura. A 40° y 45 °C aumenta significativamente la expresión para hsp70 en un 50 %. Para hsp100 la expresión aumenta en un 80% a 45 °C. La expresión del gen de ubiquitina aumenta significativamente a partir de 35°C, siendo mayor la expresión en un 75, 90 y 110% a 35°, 40° y 45 °C respectivamente.

3.3.2. Cuantificación del mRNA de los genes de estrés térmico en plantas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación.

Se estudió además, la acumulación de mRNA de estos genes en plantas sometidas a estrés térmico, pero que previamente fueron tratadas a temperaturas sub-letales, a modo de aclimatación. Para ello, se incubaron plantas de Aloe vera por 2 h a 35°C y otras plantas a 40 °C y luego todas ellas se incubaron a 45 °C por otras 2 h. La aclimatación permitiría responder de manera más rápida y eficiente frente a un estrés debido a que la planta ya estaría expresando los genes necesarios para su adaptación y por ende con altos niveles de las proteínas correspondientes, como las HSP. La Figura 10 muestra unos resultados representativos del RT-PCR semi-cuantitativo para cada uno de los genes analizados.

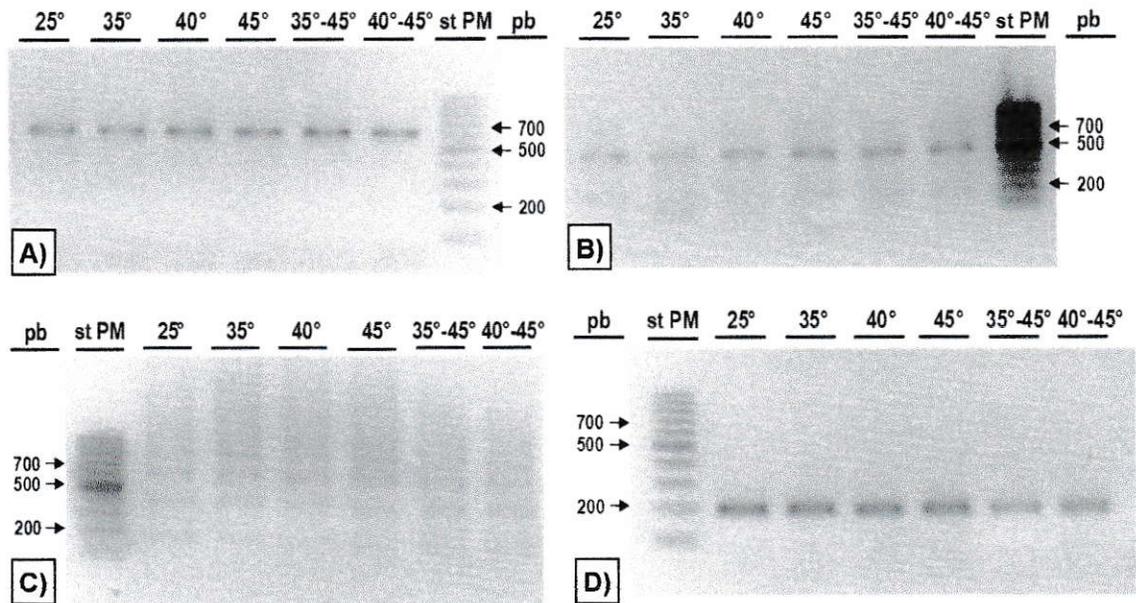


Figura 10.- Acumulación de mRNA de los genes de estrés térmico en plantas de *Aloe vera* sometidas a tratamientos de aclimatación. Análisis de los genes A) hsp70, B) hsp100, C) ubiquitina, y D) 18S. La electroforesis en gel de agarosa muestra un aumento gradual de la intensidad de las bandas de los genes de estrés térmico correlacionado con la temperatura, con una mayor acumulación en las condiciones de aclimatación. En el gen control, 18S se observa un nivel constante, pero que en plantas sometidas a aclimatación, disminuye. pb: tamaño en pares de bases, st PM: estándar de peso molecular.

En la Figura 10 se muestra la expresión de los genes cuando la planta es sometida directamente a un estrés de 35, 40 o 45 °C por 4 horas, y cuando es aclimatada previamente. Un análisis preliminar nos permitiría decir que existe poca variación en los transcritos, por lo cual se analizaron estadísticamente las 3 réplicas biológicas y dos réplicas técnicas de cada una, con lo cual se obtuvo el resultado mostrado en la Figura 11.

Estadísticamente, podemos ver que la aclimatación de las muestras durante dos horas a 35°C y luego una incubación a la temperatura subletal de 45°C generó un aumento significativo de la transcripción de estos genes de estrés térmico con respecto a los otras temperaturas estudiadas, mayor al 200% en cada gen.

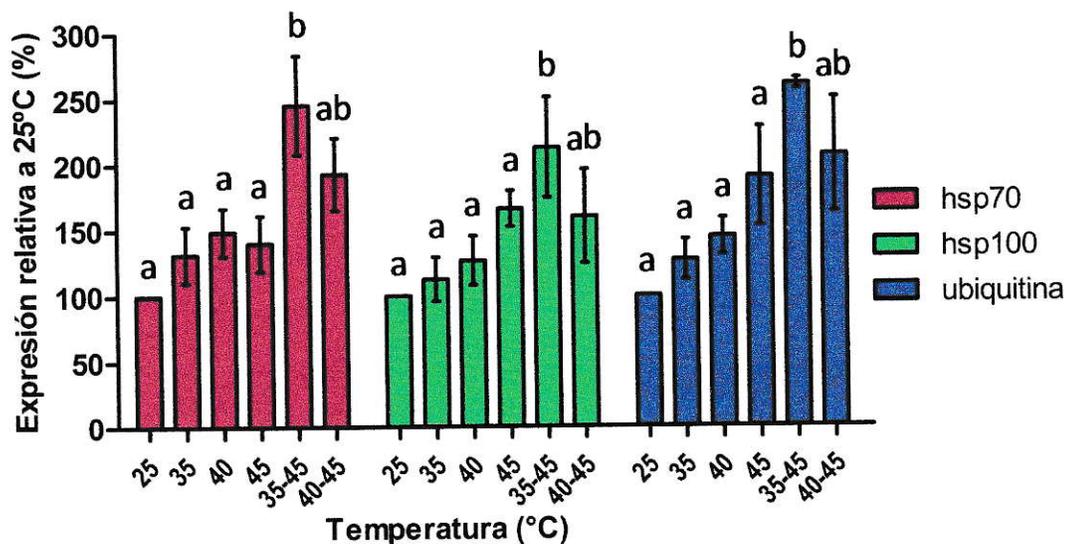


Figura 11.- Expresión relativa de los genes de estrés térmico- hsp70, hsp100 y ubiquitina- en hojas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación. Se observa que en los tratamientos de aclimatación se acumula mayor cantidad de transcrito que en los tratamientos de igual temperatura por separado, especialmente en el tratamiento 35°- 45°C. Las líneas sobre las barras representan el error estándar (Test de Student) $p < 0,005$.. Las barras con distinta letra son estadísticamente diferentes (Test de Tukey).

3.4. Análisis de la acumulación de proteínas de estrés térmico.

3.4.1. Acumulación de proteínas de estrés térmico en plantas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo.

Se estudió la acumulación de las proteínas de estrés térmico HSP70, HSP100 y Ubiquitina en tratamientos de estrés térmico directo, para verificar que efectivamente existe una mayor producción de estas proteínas en Aloe vera cuando se encuentra sometida a altas temperaturas.

Para ello, se determinó en primer lugar, el contenido de proteínas totales mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976) en muestras de Aloe vera sometidas a los distintos tratamientos térmicos. El contenido de proteínas totales disminuyó gradualmente con el aumento de la temperatura, como se muestra en la Figura 12.

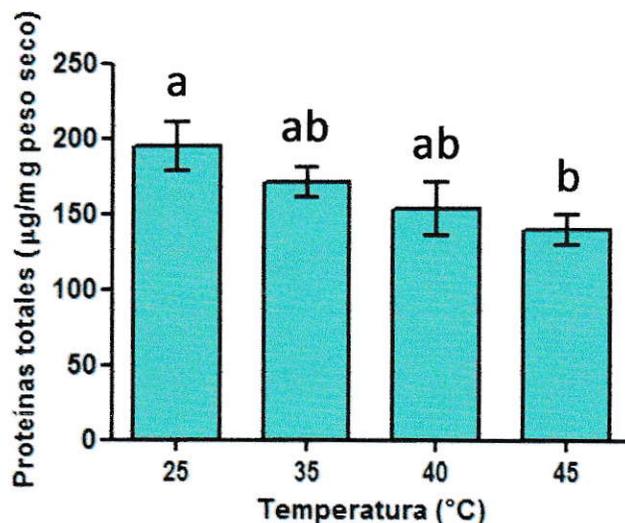


Figura 12.- Proteínas totales obtenidas a partir de hojas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo. Se observa que el contenido total de proteínas disminuye con la temperatura. Las líneas sobre las barras representan el error estándar (Test de Student). Las barras con distinta letra son estadísticamente diferentes (Test de Tukey). $p < 0,005$.

A partir de estos extractos de proteínas totales, se identificó la proteína HSP70 mediante ensayos de Western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal contra la proteína de *Arabidopsis thaliana*. Como se aprecia en la Figura 13, aparecen dos bandas, una correspondiente a una proteína de 84 kDa y otra de 69 kDa, aproximadamente. La de mayor tamaño muestra una acumulación con las altas temperaturas, a diferencia de la otra banda, que al parecer corresponde a una proteína no inducible por temperatura.

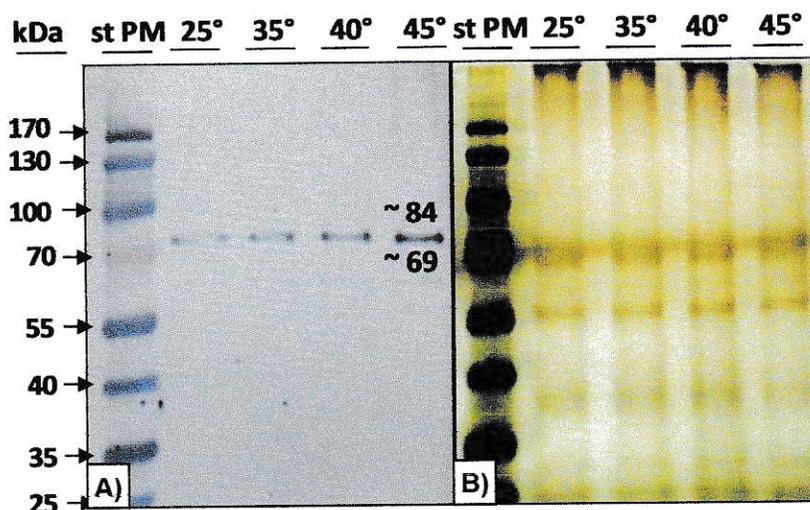


Figura 13.- Western Blot para HSP70 realizado a partir de extractos de proteínas totales de hojas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo. A) membrana de nitrocelulosa que muestra el Western blot, donde se reconocen dos bandas. B) Tinción de plata, de un gel de poliacrilamida, para la visualización de las proteínas. En el western blot se utilizó el anticuerpo monoclonal desarrollado en bovino anti-HSP70, que reconoce las formas constitutivas e inducibles de la proteína. Se observan dos isoformas de la proteína cuyo tamaño es aproximadamente de 84 y 69 kDa. La banda correspondiente a la isoforma de 84 kDa muestra una mayor intensidad, la cual aumenta considerablemente con la temperatura. kDa: tamaño en kiloDalton, stPM: estándar de peso molecular PageRuler™ Fermentas.

Se analizaron estadísticamente 3 réplicas biológicas y 2 réplicas técnicas, para mostrar este resultado de forma cuantitativa, y el resultado se muestra en la Figura 14.

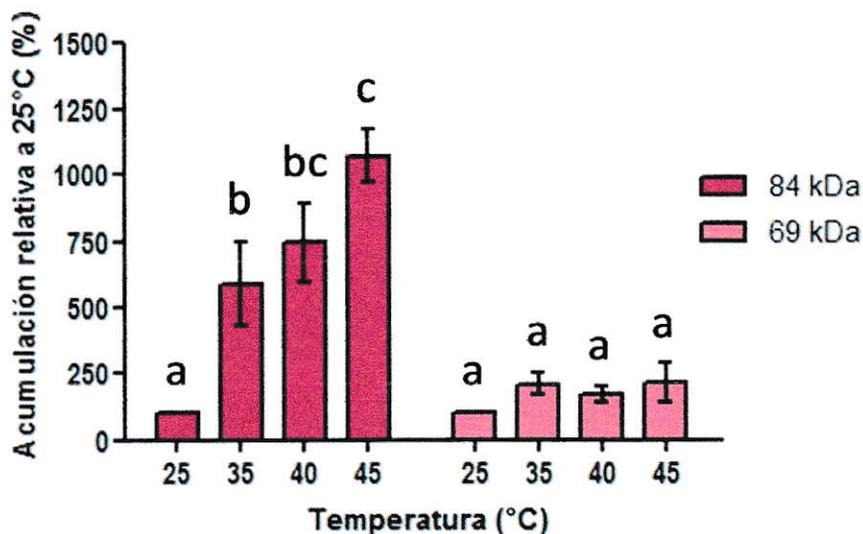


Figura 14.- Acumulación de las isoformas de la proteína HSP70 en hojas de Aloe vera sometidas a estrés térmico directo. Se observa que la proteína de 84 kDa se acumula con la temperatura (isoforma inducible por temperatura), mientras que la proteína de 69 kDa mantiene sus niveles constantes a las temperaturas analizadas (isoforma no inducible por temperatura). Las líneas sobre las barras representan el error estándar (Test de Student) $p < 0,005$. Las barras con distinta letra son estadísticamente diferentes (Test de Tukey).

El análisis de Tukey nos permite establecer que la proteína de 84 kDa muestra un aumento sostenido con la temperatura, a 35°C aumenta en un 500%, a 40°C aumenta a 750% y a 45° alcanza un aumento del 1100%. En cuanto a la isoforma de 69 kDa no se observan diferencias estadísticamente significativas a las temperaturas estudiadas, por lo cual podemos decir que es una isoforma de HSP70 no inducible por temperatura.

3.4.2. Acumulación de proteínas de estrés térmico en plantas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación.

Se estudió además, la acumulación de las proteínas de estrés térmico bajo tratamientos de aclimatación, es decir, con un tratamiento térmico de 35°o 40°C de 2 h, previo a la incubación de 45°C durante 2 h más. Este tratamiento previo de las muestras fue realizado para evaluar si existe una aclimatación de la planta cuando es sometida al estrés de alta temperatura de forma gradual. Para este análisis, se determinó el contenido de proteínas totales, lo cual se muestra en la Figura 15.

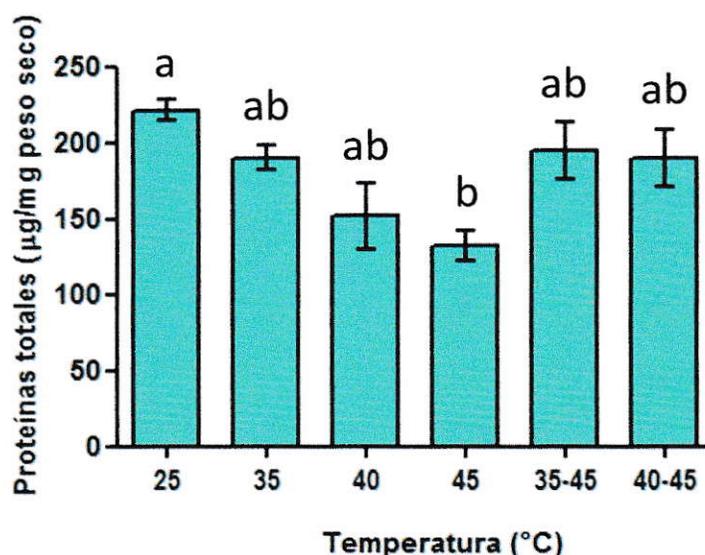


Figura 15.- Proteínas totales obtenidas a partir de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación. Se observó que el contenido total de proteínas disminuye con la temperatura, pero en las plantas aclimatadas, el contenido de proteínas no disminuye con respecto al control de 25°C. Las líneas sobre las barras representan el error estándar (Test de Student) $p < 0,005$. Las barras con distinta letra son estadísticamente diferentes (Test de Tukey).

En la Figura 15 se observa una disminución del contenido de proteínas con la temperatura. Sin embargo, las muestras con tratamiento previo, no presentan

diferencias significativas con el control a 25°C. Esto indicaría que la aclimatación fue efectiva en la adquisición de termotolerancia, ya que se logró alcanzar los niveles de proteínas totales similar a una condición que no fue expuesta a altas temperaturas

A partir de estos extractos totales de proteínas se realizaron los ensayos de western blot con el anticuerpo HSP70. Un resultado representativo se muestra en la Figura 16.

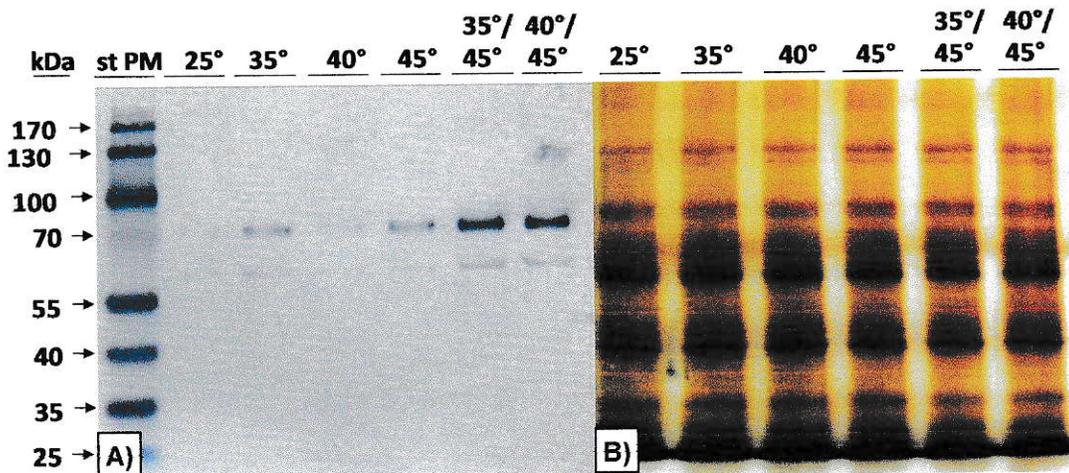


Figura 16.- Western Blot para HSP70 de extractos de proteínas totales de hojas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación. A) membrana de nitrocelulosa que muestra el Western blot, donde se reconocen dos bandas. B) Tinción de plata, de un gel de poliacrilamida, para la visualización de las proteínas. Mientras en el gel teñido con plata se observa que el contenido de proteínas es el mismo en cada carril, en el western blot se observa una mayor acumulación de la isoforma de 84 kDa al incubar las plantas a altas temperaturas (35° o 40°C) antes de incubar a una temperatura mayor, y la isoforma de menor tamaño no muestra grandes variaciones. (45°C). kDa: tamaño en kiloDalton, stPM: estándar de peso molecular PageRuler™ Fermentas.

A las réplicas biológicas y técnicas se les realizó un análisis estadístico para corroborar lo que sugiere el western blot. El resultado de este análisis se muestra en la Figura 17.

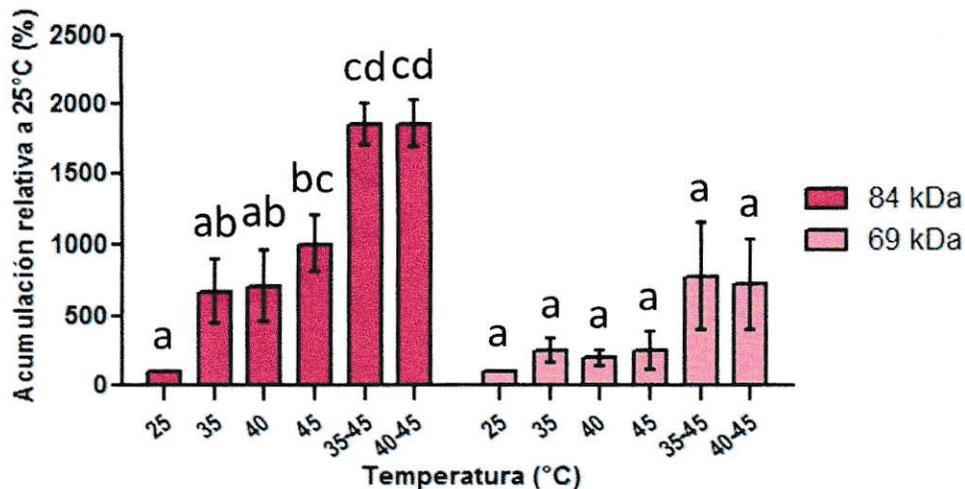


Figura 17.- Acumulación de las isoformas de la proteína HSP70 en hojas de plantas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación. Se observa que la isoforma de 84 kDa se acumula con la temperatura, y más aún cuando es tratada previamente a condiciones subletales. La isoforma de 69 kDa mantiene sus niveles constantes a las temperaturas analizadas, con un leve aumento cuando es sometida a tolerancia inducida, pero las diferencias no son significativas estadísticamente. Las líneas sobre las barras representan el error estándar (Test de Student). $p < 0,005$. Las barras con distinta letra son estadísticamente diferentes (Test de Tukey).

Se observa una mayor acumulación de HSP70 en hojas de Aloe vera bajo termotolerancia inducida, lo cual puede correlacionarse con la aclimatación adquirida por la planta al ser incubada durante 2 h a 35° o 40°C, previo a la incubación a 45°C. Esto indica que la planta tiene la capacidad de adquirir tolerancia a altas temperaturas cuando es sometida a un estrés previo.

Tomando en cuenta los datos de acumulación de mRNA y proteínas, podemos decir que existe una correlación entre la expresión génica y el contenido de proteínas de HSP70, pues se observa una correlación entre el nivel de transcrito y el nivel de proteínas, los cuales aumentan con la temperatura.

Para el caso de ubiquitina, se analizó la acumulación de proteína en estrés térmico pero no se observaron bandas a ninguna de las 4 temperaturas en estudio. Sin embargo, al realizar el western blot a partir de proteínas de plantas bajo tratamiento de aclimatación, se observó la aparición de bandas correspondientes a proteínas de bajo peso molecular, como se observa en la Figura 18.

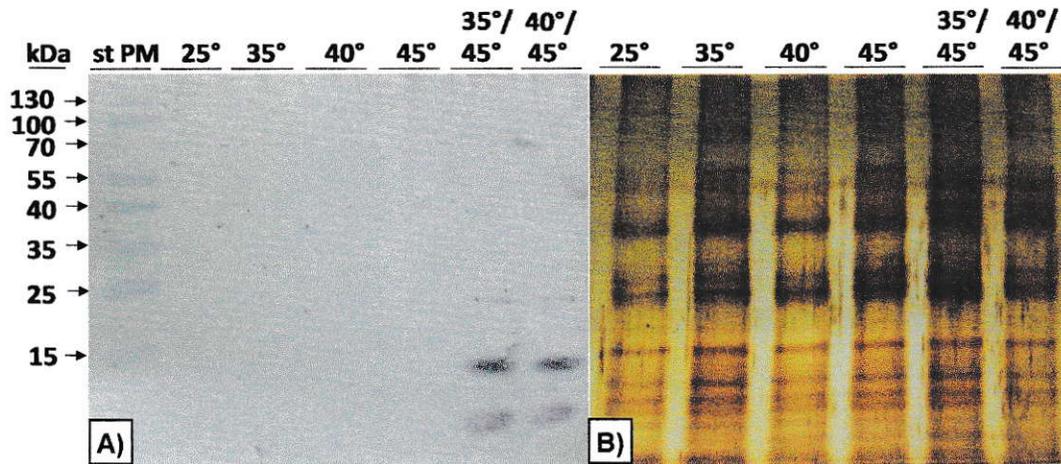


Figura 18.- Western Blot para Ubiquitina de extractos de proteínas totales de hojas de Aloe vera sometidas a tratamientos de aclimatación. A) membrana de nitrocelulosa que muestra el Western blot, donde se reconocen varias bandas, que corresponderían a proteínas unidas a ubiquitina. B) Tinción de plata, de un gel de poliacrilamida, para la visualización de las proteínas. La aparición de estas bandas se observa sólo en los tratamientos de termotolerancia inducida.

Se determinó el tamaño de las bandas detectadas con este anticuerpo, considerando que existe una relación lineal entre la migración relativa de las bandas o R_f , y el logaritmo del peso molecular. De esta manera, se determinó el tamaño de las bandas que aproximadamente son de 22.9, 13.5 y 8.6 kDa, las cuales podrían corresponder a ubiquitina en su forma monomérica, dimérica y trimérica, si consideramos que el monómero tiene un tamaño aproximado de 8,4 kDa en *Arabidopsis* (Callis y col., 1994)

4. DISCUSION

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 agricultura. Sin embargo, sabemos que no todas las plantas responden de la misma manera frente a un estímulo, y esto es lo que marca la diferencia entre plantas tolerantes y susceptibles. Por esta razón se ha propuesto estudiar una planta de desierto como *Aloe vera*, que estaría naturalmente adaptada a estas condiciones adversas.

En este trabajo, se estudió la Respuesta “Estrés Térmico” en plantas de *Aloe barbadensis* Miller sometidas a altas temperaturas, con enfoque en la expresión de los genes y acumulación de proteínas de estrés térmico, HSP70, HSP100 y Ubiquitina.

4.1. Determinación de temperatura letal

Para diseñar los tratamientos térmicos, fue necesario determinar las temperaturas sobre 25°C que *Aloe vera* es capaz de tolerar. Para ello se calculó la LT50, que indica la temperatura a la cual se produce la muerte del 50% del tejido, y por ende es considerada letal. Se obtuvo una alta TL50, de 53.2°C, similar a la que presentan otras plantas de desierto, como la leguminosa *Prosopis chilensis* que tiene una TL50 de 53.3°C, y *Agave tequilana* de 55°C. Esta tolerancia a tan altas temperaturas, indica que *Aloe vera* está capacitada para enfrentar condiciones estresantes de temperatura, por lo cual es de esperar que active eficientemente la

Respuesta "Estrés Térmico". Una vez determinada la temperatura letal, se obtienen las temperaturas subletales que son todas las inferiores a 53.2° C.

4.2. Estandarización de la técnica RT-PCR

Como metodología de estudio, se utilizó la técnica de RT-PCR semi cuantitativo, la cual presenta ventajas para la cuantificación de la expresión génica comparado con 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 óptimo 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 el control interno 18S es de 24, mientras que para los genes en estudio, hsp70, hsp100 y ubiquitina es de 36 ciclos.

Con respecto al control interno, se estudiaron distintos genes que comúnmente son utilizados para ello, como rubisco, tubulina, actina y 18S. Si bien la expresión de estos genes no presentó variaciones con la temperatura, 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 y por eso funciona mejor en Aloe vera, ya que ninguno de los partidores utilizados fue diseñado específicamente para esta planta, pues no se cuenta con secuencias de sus genes en las bases de datos. 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; Al-Bader y Al-Sarraf, 2005).

Con respecto al diseño de partidores, se buscaron secuencias codificantes de cada gen en la base de datos y se realizó un alineamiento de éstas para determinar cuáles son las regiones menos variables y diseñar los partidores en ellas. Para disminuir esa variabilidad, se consideraron las plantas más cercanas filogenéticamente al Aloe vera, es decir, plantas monocotiledóneas principalmente, como maíz, arroz y trigo.

Los partidores para hsp100 fueron diseñados de tal forma que sólo amplifican desde cDNA, pues el partidor hsp100F reconoce una región del gen que es interrumpida por un intrón en el DNA genómico de las especies analizadas: *Zea mays*, *Oryza sativa* y *Triticum aestivum*. El tamaño del fragmento que amplifica es de aproximadamente 570 pb, lo cual concuerda con lo esperado. Si bien se puede ver en los geles la amplificación de otra banda, la abundancia de ésta es muy pequeña comparada con la del producto principal, por lo que esta amplificación inespecífica no afectaría la interpretación de los resultados. En esta tesis no se pudo obtener la secuencia del fragmento de cDNA amplificado. Sin embargo el tamaño del producto de PCR y la acumulación del transcrito cuando aumenta la temperatura indican que la amplificación corresponde a hsp100. Intentos de cortar el fragmento con enzimas de restricción como *XhoI* y *PstI*, para comparar con el mapa de restricción de otras

especies, no fueron fructíferos pues el fragmento amplificado de hsp100 de Aloe vera, no fue digerido por ninguna de estas enzimas. El solo análisis *in silico* de la digestión nos da indicios de lo poco conservado de la secuencia, ya que eran pocos los sitios de corte conservados en las especies, de hecho, se escogieron estas enzimas porque al menos en maíz y trigo producen un sitio de corte conservado.

Los partidores diseñados para hsp70 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 14 miembros, que pueden ser de expresión constitutiva o inducible (Sung y col., 2001; 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, de existir más de un gen en Aloe vera, se estaría considerando la totalidad de los genes lo cual permite obtener una visión más completa de su expresión. El fragmento amplificado por este par de partidores ya fue secuenciado con anterioridad, mostrando aproximadamente un 90% de identidad con varias especies, por lo cual efectivamente corresponde al gen hsp70 (Huerta, 2009)

En el caso de ubiquitina, el fragmento amplificado también tiene un tamaño aproximado al esperado por el diseño de partidores, y es de 165 pb. Si bien el patrón observado en la electroforesis da cuenta de muchas bandas, éstas corresponderían a secuencias de poliubiquitina, debido a que en el genoma, el gen de ubiquitina se encuentra organizado en repetidos en tándem (Sharp y Li, 1987; Callis y col., 1995), y pueden transcribirse de esta forma, generando este patrón de bandas de distinto tamaño, dependiendo de cuantas copias tenga de ubiquitina. Por otro lado, la secuenciación del fragmento más pequeño nos permitió corroborar que los partidores

efectivamente, amplifican ubiquitina, ya que en la comparación de la base de datos del NCBI, su porcentaje más alto de identidad fue cercano al 86%, con secuencias del gen de ubiquitina en maíz, trigo, entre otras. Además, al traducir la secuencia nucleotídica a aminoacídica y realizar una nueva comparación contra la base de datos, se observan porcentajes de identidad de 100% con muchas especies, incluso dicotiledóneas, grupo al cual Aloe vera no pertenece. Estos análisis nos confirman que el fragmento amplificado corresponde al gen ubiquitina de Aloe vera, y nos dice que la secuencia de ubiquitina es muy conservada entre plantas. Esta información valida además, la utilización en Aloe vera de un anticuerpo anti-ubiquitina desarrollado contra la proteína de *Arabidopsis*, ya que hemos observado un 100% de identidad en la secuencia aminoacídica predicha de Aloe vera y esta planta.

4.3. Expresión de los genes HSP en plantas sometidas a tratamiento térmico directo

Gracias a la efectividad de los partidores diseñados para los genes de estrés térmico, fue posible realizar ensayos de RT-PCR y cuantificar la expresión de éstos con respecto a un gen de *housekeeping* y de expresión invariable en las condiciones estudiadas, como el del RNA ribosómico 18S. Se analizó la razón de la expresión de los genes con respecto a 18S, para normalizar los resultados con respecto a una expresión control, invariable, 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.

En los experimentos de estrés térmico directo, la abundancia relativa de los transcritos de hsp70, hsp100 y ubiquitina presentó un aumento con la temperatura. Los transcritos de hsp70 comienzan a acumularse desde los 40°C, los de hsp100 se acumulan significativamente a los 45°C, y los transcritos de ubiquitina comienzan a acumularse ya a los 35°C. Vemos que cada gen tiene distinto umbral de activación de la transcripción, lo cual estaría determinado por el mecanismo de acción de cada uno. Si se analiza de forma coordinada, en primer lugar, hsp70 previene la desnaturalización de proteínas y renaturaliza las que fueron recién dañadas; luego actúa hsp100 disolviendo los agregados de proteínas ya desnaturalizadas, y en tercer lugar ubiquitina se encarga de la degradación de las proteínas que ya no pueden ser reparadas. Considerando esto, podemos decir entonces, que la desnaturalización de proteínas en Aloe vera ocurre desde los 40°C, temperatura a la cual se indujo la transcripción del gen de hsp70. Además, a 45°C estaría ocurriendo la formación de agregados proteicos, lo cual se deduce por la acumulación de transcritos para el gen hsp100, y por último, desde los 35°C comienza un eficiente reciclaje de proteínas dañadas por desnaturalización, lo cual está dado por la acumulación de transcritos de ubiquitina. La rápida degradación es importante ya que las proteínas desnaturalizadas constituyen un serio peligro, ya que se pueden volver tóxicas para la célula.

Previamente en tabaco se ha reportado un aumento en los transcritos de hsp70, hsp100 y ubiquitina con altas temperaturas. En ensayos de microarreglos (Rizhsky y col., 2002) se observó un leve aumento, del 30%, de los transcritos de hsp70 y hsp100, y un gran aumento de los transcritos de ubiquitina, cercano a 300% en plantas sometidas a 44°C con respecto al control a 23°C. Sin embargo, la acumulación de transcritos observada en Aloe vera es mayor a la de tabaco. Esto puede estar relacionado a la tolerancia que tiene Aloe vera a las altas temperaturas ya que en esta

planta hay una correlación entre los transcritos sintetizados y las proteínas HSP acumuladas. Ambos, transcritos y proteínas, aumentan con la temperatura. En tabaco hay menos transcritos sintetizados para los genes HSP sugiriendo que la acumulación de las proteínas que codifican estos genes sería menor que en Aloe vera. Esto induce a pensar que en tabaco hay menor reparación de proteínas por acción de las chaperonas. Sin embargo, la alta acumulación de transcritos de ubiquitina en tabaco, implicarían una mayor tolerancia al estrés térmico por la vía de degradación de proteínas más que por reparación de ellas.

4.4. Expresión de los genes HSP en plantas sometidas a tratamiento de aclimatación.

Estos resultados nos entregan una primera aproximación a la respuesta que despliega Aloe vera frente al estrés térmico. Sin embargo, otro aspecto importante a considerar es si las plantas pueden desarrollar una tolerancia al estrés térmico una vez que han sido expuestas a temperaturas subletales. Para ello, sometimos a plantas de Aloe vera a tratamientos de aclimatación, para lo cual las plantas completas se incubaron a altas temperaturas – 35° y 40°C – y luego de 2 h, se incubaron a 45°C por 2 h más. En este caso, podemos ver que en el tratamiento de una sola temperatura, no se produjo un aumento en los transcritos de los genes de estrés térmico, pero esto puede deberse a que esta vez el estrés se mantuvo por 4 h en lugar de 2 h para que fuera un tiempo equivalente al de las plantas con tratamientos de aclimatación (Figura 1). Probablemente sí se produjo un aumento en los transcritos, pero al cabo de 4 horas los niveles se normalizaron porque la planta ya ha reparado el daño molecular causado por el aumento de la temperatura. En las plantas aclimatadas se observa una acumulación de transcritos mayor que en las no aclimatadas. Por otro lado, esta

diferencia puede deberse, además, a que en los tratamientos de estrés directo, se incubó sólo la punta de las hojas a las temperaturas establecidas, a diferencia de los experimentos de aclimatación, donde las plantas completas fueron sometidas a estrés. Estas diferencias no nos permiten comparar ambos experimentos, pero sí podemos tener en consideración los resultados de forma independiente, ya que cada uno de ellos, fue realizado con un control adecuado. En el caso de los experimentos de aclimatación los controles fueron plantas sometidas todo el período a 25°C como también plantas sometidas todo el período a 35°, 40° y 45° C obteniéndose de todos modos una mayor expresión de los genes y mayor acumulación de proteínas en las plantas aclimatadas previo a ser sometidas a 45°C. La aclimatación que fue más efectiva en la acumulación de transcritos fue la realizada a 35°C antes de someter las plantas a 45°C. Esto posiblemente se debe a que 40 °C ya es un estrés considerable para la planta no permitiendo una acumulación efectiva de los transcritos para sobrellevar una temperatura de 45°C. Si consideramos que en la naturaleza el aumento de temperatura es gradual, podemos decir que Aloe vera en el medio ambiente en que naturalmente vive, ya presenta acumulación de transcritos por aclimatación cuando la temperatura comienza a aumentar durante el día.

No se analizaron los factores de transcripción de estrés térmico, HSF, en esta tesis. En plantas, a diferencia de otros reinos, los HSF se caracterizan por su alto número y gran diversidad. La presencia de 21 HSF en *Arabidopsis* da cuenta de la enorme plasticidad en la respuesta que la planta puede presentar frente a un estímulo de temperatura y otros estreses ambientales. Distintos HSF pueden oligomerizar y de esta manera coactivar, potenciar, o suprimir la transcripción de otros genes. Algunos HSF son proteínas inducidas por temperatura lo que permite a la planta dar una respuesta más rápida frente a un shock de alta temperatura. Estas características

resultan muy beneficiosas para un organismo sésil como es la planta, que no puede desplazarse a lugares más favorables, por lo cual necesita desarrollar mecanismos que le permitan enfrentar las condiciones adversas con una eficiente respuesta de protección frente al estrés. Esta respuesta de protección mediada por los factores HSF puede explicar la adquisición de termotolerancia durante la aclimatación a temperaturas subletales. El estrés moderado que la planta sufre a 35° C induce la liberación de los HSF que están inactivos por unión a las proteínas HSP. Estas HSP liberan a los factores de transcripción porque van a reparar a proteínas que se desnaturalizan a estas temperaturas moderadas. Los factores HSF liberados emigran al núcleo y activan la transcripción de los genes HSP que comienzan a transcribirse. Cuando viene un estrés mayor, como es la temperatura de 45° C posterior a la de 35° C, ya hay un cantidad de transcritos de HSP acumulados y por ende, factores de transcripción libres y activos en el núcleo, por lo cual, el organismo puede tolerar mejor la temperatura más estresante, incluso tolerar la temperatura letal (Ortiz y Cardemil, 2001).

Todos estos análisis están dirigidos al nivel de expresión génica. Sin embargo, el nivel de expresión génica debe corroborarse con los niveles de acumulación de las respectivas proteínas, ya que no necesariamente el nivel de transcritos se correlaciona con la acumulación de las proteínas correspondientes. Por lo tanto, discrepancias en los niveles de mRNA y proteína estarían dando información de una regulación post-transcripcional.

4.5. Acumulación de proteínas HSP en plantas sometidas a tratamiento térmico directo

En esta tesis se estudió la acumulación de proteínas de estrés térmico mediante western blot, usando anticuerpos específicos para su detección y cuantificación. Para esto, se obtuvieron extractos de proteínas totales desde plantas sometidas a estrés térmico y bajo aclimatación. Dada la naturaleza mucilaginosa del gel de Aloe vera, fue necesario buscar el protocolo más adecuado que permitiera descartar el gran contenido de azúcares y fenoles presentes, ya que éstos interfieren con los experimentos posteriores. Fue necesario realizar un tratamiento previo al tejido muestreado, consistente en lavar el tejido pulverizado en nitrógeno líquido repetidas veces con acetona y ácido tricloroacético para precipitar las proteínas. Este tratamiento es una buena opción para descartar los contaminantes de este tipo que abundan en los tejidos recalcitrantes, como los vegetales, en los cuales es posible encontrar alto contenido de azúcares y polifenoles. Luego de eso, una extracción basada en fenol y SDS permitió obtener proteínas de buena calidad y en cantidades adecuadas. Las cantidades fueron expresadas como μg proteína/mg peso seco, y se decidió expresarlo de esta forma para que el valor sea más comparable a lo obtenido en otras especies, debido al alto contenido de agua de las hojas de Aloe vera.

En el caso de los tratamientos de estrés directo, el contenido total de proteínas de las plantas disminuye a medida que aumenta la temperatura del tratamiento, siendo la diferencia estadísticamente significativa entre 25°C y 45°C. Esta disminución de las proteínas totales con el aumento de temperatura ocurre siempre en todos los organismos (Taiz y Zeiger, 1998; Howarth, 2005; Ramírez y col., 2011) ya que bajo

condiciones de estrés disminuye la síntesis de proteínas junto con un aumento en la degradación de proteínas vía ubiquitina.

HSP70 es una proteína de 70 kDa, pero dentro de la familia de proteínas, es posible encontrar isoformas de mayor y menor tamaño, como en *Arabidopsis* donde el rango de tamaño es de 71 y 79 kDa aproximadamente (Sung y col., 2001). Se realizó un ensayo de western blot utilizando un anticuerpo monoclonal para la proteína HSP70, con el cual fue posible identificar dos isoformas, de aproximadamente 84 kDa, y otra de cerca de 69 kDa siendo la forma más pequeña una isoforma no inducible por temperatura. Estos resultados obtenidos en *Aloe vera* concuerdan con lo descrito en la literatura, pues se ha reportado en *Prosopis chilensis* un aumento en los niveles de la proteína HSP70 en plantas sometidas a estrés térmico (Ortiz y Cardemil, 2001), alcanzando un máximo a 40°C.

4.6. Acumulación de proteínas HSP en plantas sometidas a tratamientos de aclimatación.

En el ensayo de aclimatación, el contenido de proteínas en las plantas incubadas a distintas temperaturas se conserva igual que en aquellas mantenidas a 25°C. Esto corrobora que las plantas se han aclimatado cuando son expuestas a las temperaturas sub-letales, y por lo tanto los mecanismos de respuesta al estrés térmico se han activado eficientemente. Esto implica que ha habido una acumulación de proteínas chaperonas que permiten la estabilización de las proteínas y prevención del daño. Para verificar si esto es lo que está ocurriendo en *Aloe vera*, se analizó el contenido de proteínas de estrés térmico mediante western blot.

La acumulación de la isoforma de 84 kDa de HSP70 aumentó gradualmente con la temperatura siendo 45°C la temperatura en la cual hubo mayor acumulación. Sin

embargo, el contenido de esta isoforma fue mucho mayor cuando las plantas fueron aclimatadas a 35° ó 40°C previo a una exposición a 45°C, lo que nuevamente apoya que Aloe vera a 35 °C tiene una eficiente respuesta de aclimatación. La isoforma de 69 kDa permanece sin cambios en sus niveles confirmando que es una isoforma no inducible por temperatura. Si correlacionamos el mayor contenido de proteínas totales y de HSP70 en plantas aclimatadas, versus las no aclimatadas, podemos decir que, efectivamente, la mayor acumulación de la chaperona permite estabilizar las proteínas más eficientemente, y de este modo evitar el daño y degradación de las proteínas. Esto permite además, que al someter a la planta a una temperatura mayor, la planta aclimatada, ya tendrá activado el mecanismo que le permite proteger las proteínas.

Se analizó la acumulación de Ubiquitina en plantas sometidas a estrés térmico. Sin embargo, estas formas de ubiquitina sólo pudieron ser detectadas en experimentos de aclimatación, posiblemente porque los niveles de acumulación de ellas fueron suficientemente altos para ser reconocidos por el anticuerpo que es un anticuerpo policlonal dirigido contra la ubiquitina de *Arabidopsis thaliana*.

Se ha demostrado además, que Aloe vera activa una respuesta para detoxificar la planta de las especies reactivas del oxígeno, cuando es sometida a déficit hídrico (Ramírez y col., 2011) lo cual complementa su respuesta frente a una condición de desierto. Por estas razones, el Aloe vera podría considerarse como modelo de estudio para el mejoramiento de plantas sensibles a las altas temperaturas. El fenómeno del cambio climático, trae consigo un aumento sostenido de la temperatura global, y las especies mejor preparadas podrán resistir los nuevos escenarios que se avecinan. Por los datos aquí presentados, esperamos que Aloe vera despliegue una buena respuesta frente a las altas temperaturas, la cual sería interesante de estudiar más a fondo, identificar los genes clave en la termotolerancia, para poder desarrollar mecanismos de

mejoramiento genético en plantas de importancia económica, pero que son sensibles a las altas temperaturas.

5. CONCLUSIONES

- *Aloe barbadensis* Miller presenta un alto valor de temperatura letal, lo que explicaría su alta termotolerancia como planta de desierto.
- El fragmento amplificado de Aloe vera de 165 pb corresponde a un segmento del gen de ubiquitina, lo cual fue demostrado por los análisis de la secuencia nucleotídica y aminoacídica. Es un fragmento que comprende cerca del 72% de la secuencia completa, en el cual se identificaron residuos conservados involucrados en su función degradadora.
- El anticuerpo anti-ubiquitina detectó por western blot a la proteína Ubiquitina en su forma monomérica, dimérica y trimérica, no conjugada.
- El anticuerpo anti-HSP70 utilizado permitió identificar dos isoformas de la proteína HSP70, una de 84 kDa, inducible por temperatura, y otra de menor tamaño, de 69 kDa, correspondiente a una isoforma no inducible por temperatura.
- Los genes hsp70, hsp100 y ubiquitina aumentaron su expresión en condiciones de estrés térmico, pero no todos lo hicieron a la misma temperatura. Los primeros transcritos en acumularse fueron los de ubiquitina, a 35°C, luego los de hsp70, a 40°C, y finalmente hsp100 a 45°C. Estas diferencias pueden estar dadas por la función que desempeña la proteína en la respuesta al estrés térmico.

- La aclimatación a 35° y 40°C, previo a la incubación a una temperatura subletal como 45°C no produjo una disminución en el contenido de proteínas totales en las plantas tratadas, a diferencia de aquéllas que fueron incubadas directamente a altas temperaturas. Esto demuestra que las plantas aclimatadas adquirieron termotolerancia.
- La aclimatación a altas temperaturas fue más eficiente a 35° que a 40°C. Esto sucede porque 40°C es una temperatura que resulta ser estresante y posiblemente no le permitiría a Aloe vera activar la transcripción de los genes de estrés térmico, cuando es expuesta a una temperatura mayor.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo-Duncan, M., Russell, C., Patel, S., and Patel, R. 2004. Aloe-emodin modulates PKC isozymes, inhibits proliferation, and induces apoptosis in U-373MG glioma cells. *Int Immunopharmacol* 4: 1775-1784.
2. Agarwal, M., Katiyar-Agarwal S., Sahi, C., Gallie, D.R. and Grover, A. 2001. Arabidopsis thaliana Hsp100 proteins: kith and kin. *Cell Stress Chaperon* 6: 219–224.
3. Al-Bader M.D. and Al-Sarraf H.A. 2005. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat—validation by semi-quantitative RT-PCR *Dev. Brain Res* 156: 38–45.
4. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
5. Altschul, S.F., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
6. Alvim, F.C., Carolino, S., Cascardo, J., Nunes, C., Martinez, C., Otoni, W. and Fontes, E. 2001. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol.* 126: 1042–1054.
7. Añon, S., Fernández, J.A., Franco, J.A., Torrecillas, A., Alarcón, J.J. and 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.
8. Araneda, M. y col. 2010. Anuario Climatológico 2010 de la Dirección Meteorológica de Chile, en <http://www.meteochile.gob.cl/climatologia.html>, consultado el 15 de mayo de 2012.
9. Arya, L.M., Bowman, D.C., Thapa, B.B. and D.K. Cassel. 2008. Scaling soil water characteristics of golf course and athletic field sands from particle size distribution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 72:25-32.
10. Callis, J., Carpenter, T., Sun, C.W. and Vierstrat, R.D. 1995. Structure and Evolution of Genes Encoding Polyubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in Arabidopsis thaliana Ecotype Columbia. *Genetics* 139: 921-939.
11. Chow, J.T.N., Williamson, D.A., Yates, K.M. and Goux, W.J. 2005. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L. *Carbohydr Res* 340: 1131-1142.

12. Dean, J.D., Goodwin, P.H. and Hsiang, T. 2002. Comparison of relative RT-PCR and Northern blot analyses to measure expression of α -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colltotrichum destructivum*. *Plant Mol Biol Reporter* 20: 347-356.
13. Delatorre-Herrera, J., Delfino, I., Salinas, C., Silva, H. and Cardemil, L. 2010. Irrigation restriction effects on water use efficiency and osmotic adjustment in Aloe vera plants (*Aloe barbadensis* Miller). *Agr Water Manage* 97: 1564-1570.
14. Eshun, K. and 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.
15. Fietto L.G., Costa M.D.L., Cruz C.D., Souza A.A., Machado M.A. and 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.
16. Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. and Bairoch, A. 2003. ExPASy—the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31: 3784–3788.
17. Giaveno, C. and 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.
18. Goidin, D., Mammessier, A., Staquet, M.J., Schmitt, D. and Berthier-Vergnes, O. 2001. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and b-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem* 295: 17-21.
19. Govindarajan, R., Vijayakumar, M., and Pushpangadan, P. 2005. Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda. *J Ethnopharmacol* 99: 165-178.
20. Guy, C.L. and Li, Q.B. 1998. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. *Plant Cell* 10: 539–556.
21. Hall, A.E., 2001. *Crop Responses to Environment*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
22. Hare, P.D., Cress, W.A. and Staden, J.V., 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ* 21: 535–553.
23. Heggie, S., Bryant, G.P., Tripcony, L., Keller, J., Rose, P., Glendenning, M., and Health, J. 2002. A phase III study on the efficacy of topical Aloe vera gel on irradiated breast tissue. *Cancer Nurs* 25: 442-451.

24. 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.
25. 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.
26. Im, S.A., Oh, S.T., Song, S., Kim, M.R., Kim, D.S., Woo, S.S., Jo, T.H., Park, Y.I. and Lee C.K. 2005. Identification of optimal molecular size of modified Aloe polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. *Int Immunopharmacol* 5: 271-279.
27. Koskull-Döring, P., Scharf, K.D. and Nover, L. 2007. The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends Plant Sci* 12:452-457.
28. Krishnan, P. 2006. The scientific study of herbal wound healing therapies: Current state of play. *Current Anaesthesia & Critical Care* 17: 21-27
29. Labarga, A., Valentin, F., Andersson, M. and Lopez R. 2007. Servicios Web en el European Bioinformatics Institute: ClustaW. *Nucleic Acids Research Web Services Issue* 2007.
30. Langmead, L., Makins, R.J. and Rampton, D.S. 2004. Anti-inflammatory effects of Aloe vera gel in human colorectal mucosa in vitro. *Aliment Pharmacol Ther* 19: 521-527.
31. Liberek, K., Lewandowska, A. and Zietkiewicz, S. 2008. Chaperones in control of protein disaggregation. *The EMBO Journal* 27: 328-335.
32. Lin, B.L., Wang, J.S., Liu, H.C., Chen, R.W. and Meyer, Y. 2001. Genomic analysis of the hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperon* 6: 201-208.
33. Maestri, E., Klueva, N., Perrotta, C., Gulli, M., Nguyen, H.T. and Marmioli, N., 2002. Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Mol Biol* 48: 667-681.
34. Marchler-Bauer A and cols. 2011, CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* 39(D) 225-229.
35. Mayer, M.P. and Bakau, B. 2005. Review Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *CMLS.* 62: 670-684.
36. Mazorra, L.M., Nunez, M., Echerarria, E., Coll, F. and Sánchez-Blanco, M.J. 2002. Influence of brassinosteroids and antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. *Plant Biol.* 45: 593-596.
37. Mittler, R., Finka, A. and Goloubinoff, P. 2012. How do plants feel the heat? *Trends BiochemSci* 37: 118- 125.

38. Motulsky, H. 2007. GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA.
39. Nieto-Sotelo, J., Kannan, K.B. and Segal, M.C. 1999. Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, *HSP101*, encoding a ClpB/Hsp100 protein homologue. *Gene* 230: 187–195.
40. Ortiz, C., and Cardemil, L. 2001. Heat shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *J Exp Botany* 52: 1711-1719.
41. Pugh N., Ross S. A., Elsohly M. A., and 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.
42. Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R. and Lopez, R. 2005. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.* 33 (Web Server issue): W116-W120
43. Ramírez, I., Estay, D., Stange, C. and Cardemil, L. 2011. Superoxide dismutase is a critical enzyme to alleviate oxidative stress in Aloe vera (L.) Burm. plants subjected to water déficit. *Plant Ecology & Diversity* 13: 1755-1874.
44. Reyes, M.A., Corcuera, L.J., and Cardemil, L. 2003. Accumulation of HSP70 in *Deschampsia antarctica* Desv. leaves under thermal stress. *Antarct Sci* 15: 345-352.
45. Richter, K., Haslbeck, M. and Buchner, J. 2010. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol Cell* 40: 253–266.
46. Rizhsky, L., Liang, H. and Mittler, R. 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol* 130: 1143–1151.
47. 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.
48. Sairam, R.K. and Tyagi, A., 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr Sci* 86: 407–421.
49. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
50. Schöffl F., Prändl R., and Reindl A. 1998. Regulation of the heat shock response. *Plant Physiol* 117: 1135-1141.
51. Schweitzer M. 1994. Aloe vera, la planta que cura. Apothegme, Paris, France ISBN 2-9508531-2-9. p 63.

52. Sharp, P.M. and Li, W.H. 1987. Ubiquitin genes as a paradigm of concerted evolution of tandem repeats. *J Mol Evol* 25: 58-64.
53. Singla, S.L. and Grover, A. 1994. Detection and quantification of a rapidly accumulating and predominant 104 kDa heat stress polypeptide in rice. *Plant Science* 97: 23-30.
54. Smertenko, A., Draber, P., Viklicky, V. and Opatrny, Z. 1997. Heat stress affects the organization of microtubules and cell division in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Cell Environ* 20: 1534-1542.
55. Stürzenbaum, S. and Kille, P. 2001. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariante. *Comp Biochem Physiol Part B*. 130: 281-289.
56. Su, C.K., Mehta, V., Ravikumar, L., Shah, R., Pinto, H., Halpern, J., Koong, A., Goffinet D., and 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.
57. Sung, D.Y., Vierling, E. and Guy, C.L. 2001. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* hsp70 gene family. *Plant Physiol* 126: 789-800.
58. Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant physiology*. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, p792.
59. Tang, L., Kwon, S.Y., Kim, S.H., Kim, J.S., Choi, J.S., Cho, K.Y., Sung, C.K., Kwak, S.S. and 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.
60. 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.
61. Vierling, E., 1991. The role of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579-620.
62. Wahid, A. and Close, T.J., 2007. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum* 51: 104-109.
63. Wahid, A., Gelani, S., Ashraf M. and Foolad, M.R. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ Exp Bot* 61: 199-223.
64. Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci*, 9: 244-252.

65. Wickline, M.M. 2004. Prevention and treatment of acute radiation dermatitis: A literature review. *Oncol Nurs Forum* 31: 237-247
66. Wise, R.R., Olson, A.J., Schrader, S.M. and 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.
67. Wollenweber, B., Porter, J.R. and 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.
68. Xu, S., Li, J., Zhang, X., Wei, H. and 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.
69. Yagi, A. and 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.
70. Yongchaiyudha, S., Rungpitarangsi, N., Bunyaphatsara, I. and Chokechai-Jaroenporn, O. 1996. Antidiabetic activity of Aloe vera L. juice. Clinical trial in new cases of diabetes mellitus. *Phytomedicine* 3: 241-243.
71. Zhu J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247-273.