

UCH-FC
Biotecnología
E 795
C.1



ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE

Caracterización de la actividad enzimática de Ascorbato Peroxidasa y cuantificación del contenido de Ascorbato en hojas de *Aloe barbadensis* Miller sometidas a estrés hídrico, térmico y combinado.

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

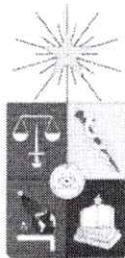
Darío Andrés Estay Ubilla

Director de Seminario de Título: Dra. Liliana Cardemil Oliva

Co-Director de Seminario de Título: Dra. Lorena Norambuena Morales

Mayo, 2015

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr.:

DARÍO ANDRÉS ESTAY UBILLA

“Caracterización de la actividad enzimática de Ascorbato Peroxidasa y cuantificación del contenido de Ascorbato en hojas de *Aloe barbadensis* Miller sometidas a estrés hídrico, térmico y combinado.”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Liliana Cardemil Oliva
Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de la Dra. Liliana Cardemil Oliva.

Dra. Lorena Norambuena Morales
Co-Directora

Firma manuscrita en azul de la Dra. Lorena Norambuena Morales.

Comisión de Evaluación

Dr. Michael Handford
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul del Dr. Michael Handford.

Dr. Ricardo Cabrera
Integrante Comisión

Firma manuscrita en azul del Dr. Ricardo Cabrera.



Santiago de Chile, mayo de 2015

BIOGRAFIA

Mi nombre es Darío Andrés Estay Ubilla. El mayor de tres hermanos, nací en Santiago en 1982 y desde pequeño me interesé en las ciencias.

Cuando terminé la enseñanza media en el Liceo Darío E. Salas aún me debatía entre la Astronomía y la Biotecnología, y fue al entrar en el Programa Académico de Bachillerato de la Universidad de Chile donde al fin pude decidirme por la última opción.

Una vez dentro de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, inmediatamente me atrajo con mayor fuerza el área de biotecnología vegetal, por lo que la elección lógica fue ingresar al Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias. Ahí integré el grupo de trabajo de la Profesora Liliana Cardemil, con quien desarrollé dos unidades de investigación y el seminario de título que se presentará a continuación, como parte de la investigación que la Dra. Cardemil desarrollaba en Aloe vera.

Poco tiempo después de terminados los experimentos que forman parte de este trabajo, tuve la fortuna de pasar a formar parte del Laboratorio de Mejoramiento Molecular Hortícola del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA – La Platina) a las órdenes de la Dra. María Teresa Pino. Tras tres años de trabajo en el área de mejoramiento genético de pimientos y ajies, abandoné el INIA para integrarme al área de Dirección Médica de Laboratorios SAVAL, en donde trabajo en la actualidad.

Varios años pasaron para al fin presentar el trabajo realizado en mi seminario de título. Pero el momento ha llegado y este es el resultado.



A mi madre,

porque no existe lección más duradera que aquella que se da con el ejemplo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a toda la gente que formó parte del (entonces) Laboratorio de Biología Molecular Vegetal: Profesores y miembros de los Teams CS, LNM, MH y LCO, y en especial a Angélica y Sebastián por la ayuda brindada, la disposición y la amistad.

A Claudilla y Carlos, que como parte del grupo LCO, siempre estuvieron para ayudarme cuando lo necesité y para reírnos de cualquier cosa que lo ameritara. Agradecimientos especiales a mi querida padawan Camila, quien se convirtió en una de mis mejores amigas. Tu ayuda y amistad son responsables de varias de estas páginas.

Muchísimas gracias a la Profesora Liliana Cardemil. Sé que no fui el mejor de sus discípulos, pero fue un honor trabajar a su lado y aprender de usted todos esos años.

De mi largo paso por la universidad, mis agradecimientos a Gabriel, Carlitos, Mabel, Vicente, Mauricio, Salvador y tantos otros... Gracias por la amistad, las risas y las conversaciones trascendentales.

Siempre hay un grupo que destaca del resto, y a quienes recuerdo en la mayoría de las historias de esos años. Gracias a Fran por ser parte de muchos buenos momentos que no se olvidan; a Matu por las conversaciones ñoñas y otras no tanto; a Nico por la buena onda y la amistad de entonces y de ahora; y a Fernanda, su hermana Javiera y Nelly Sofía, amigas a toda prueba, siempre impulsándome a ir más allá y en quienes me he podido apoyar en incontables ocasiones. Las quiero un montón.

A mi gran amiga Isabel, por todos estos años de amistad, cariño y apoyo incondicional.

A mis queridas amistades surgidas en el INIA: Andrea, Mari, Pauli, Olga, Caro SP y Carito, por las infinitas sesiones de galletas, pelambres y risas. Mención especial a mi querida amiga Rosana... gracias por la amistad de todos estos años y por ayudar a levantarme en momentos oscuros. Te quiero, amiga.

A mi amor, mi novia Lidia, y su hijito Amaro... Nos encontramos de forma improbable y hoy ya son mi mayor motivación. No imagino mi futuro sin uds. Los amo.

Finalmente, pero no por ello con menos énfasis, a mi familia. Mis hermanos Felipe y Carolina, mi batisobrino Gaspar y mis padres Mónica y Darío. Los amo. Gracias por aguantarme y creer en mí.

A todos... mil gracias.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS.....	2
INDICE DE TABLAS.....	5
INDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCION.....	13
1.1 Aloe vera y metabolismo del ácido crasuláceo.....	13
1.2 Especies Reactivas de Oxígeno y Estrés Oxidativo.....	15
1.2.1 Producción de ROS.....	15
1.2.1.1 Producción de ROS en mitocondrias.....	17
1.2.1.2 Producción de ROS en cloroplastos.....	17
1.2.1.3 Producción de ROS en peroxisomas.....	18
1.2.2 Daño Oxidativo.....	18
1.2.2.1 Daño oxidativo a lípidos.....	19
1.2.2.2 Daño oxidativo a proteínas.....	19
1.2.2.3 Daño oxidativo a DNA.....	20
1.3 Ascorbato y su doble función antioxidante.....	21
1.4 Detoxificación de H ₂ O ₂ por acción de la Ascorbato Peroxidasa.....	24
1.5 Objetivo general.....	33
1.6 Objetivos específicos.....	33
2. MATERIALES Y METODOS.....	34
2.1 Materiales.....	34
2.1.1 Material Biológico.....	34

2.1.2	Reactivos.....	34
2.1.3	Software.....	34
2.2	Métodos.....	35
2.2.1	Tratamientos de estrés hídrico, térmico y combinado.....	35
2.2.2	Proteínas totales solubles.....	37
2.2.2.1	Extracción de proteínas.....	37
2.2.2.2	Cuantificación de proteínas.....	38
2.2.2.3	Visualización de proteínas totales.....	39
2.2.2.3.1	PAGE Nativo.....	39
2.2.2.3.2	Visualización de proteínas, Tinción de Plata...39	
2.2.3	Actividad APX.....	40
2.2.3.1	Actividad Específica.....	40
2.2.3.2	Tinción de actividad APX en gel: Zimografía.....	42
2.2.3.2.1	PAGE Nativo.....	42
2.2.3.2.2	Tinción.....	43
2.2.4	Cuantificación de Ascorbato y Dehidroascorbato.....	44
2.2.4.1	Extracción de ascorbato.....	45
2.2.4.2	Ensayo de detección de ascorbato.....	46
2.2.5	Análisis estadísticos.....	48
3.	RESULTADOS.....	49
3.1	Fenotipo de plantas de Aloe vera sometidas a condiciones de estrés.....	49
3.2	Actividad enzimática específica e isoformas de APX.....	50
3.2.1	Estrés Hídrico.....	50
3.2.2	Estrés Térmico.....	55
3.2.3	Estrés Combinado.....	59
3.3	Determinación de Ascorbato, Dehidroascorbato y Estado Redox.....	64

3.3.1 Contenido total de Ascorbato.....	64
3.3.2 Contenido de Ascorbato (AsA) y Dehidroascorbato (DHA).....	67
3.3.3 Estado Redox de Ascorbato.....	71
4. DISCUSION.....	73
5. CONCLUSIONES.....	85
6. PROYECCIONES.....	87
7. PRESENTACIONES.....	88
8. BIBLIOGRAFIA.....	89

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema para protocolo de cuantificación de AsA y DHA en extractos de Aloe vera.....	46
---	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Generación de las distintas especies reactivas de oxígeno por transferencia de energía o reducción secuencial univalente del estado basal triplete oxígeno.....	16
Figura 2. Ruta de Smirnoff-Wheeler, principal vía de biosíntesis de Ascorbato (AsA) en plantas superiores.....	22
Figura 3. Rutas de detoxificación de Peróxido de Hidrogeno (H ₂ O ₂) en plantas.....	27
Figura 4. Actividad enzimática específica de APX en puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a cuatro tratamiento hídricos.....	52
Figura 5. Zimograma de APX en extractos de puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a cuatro tratamientos de estrés hídrico.....	54
Figura 6. Actividad enzimática específica de APX en puntas y bases de hojas de Aloe vera de plantas sometidas a cuatro tratamientos térmicos.....	56
Figura 7. Zimogramas de APX en extractos de puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a estrés térmico.....	58
Figura 8. Actividad enzimática específica de APX en puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a diferentes condiciones de estrés combinado hídrico y térmico.....	60
Figura 9. Zimogramas de APX en extractos de puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico y térmico combinados.....	62
Figura 10. Contenido total de ascorbato en puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera en las distintas condiciones de estrés analizadas.....	66
Figura 11. Contenido de ascorbato (AsA) y dehidroascorbato (DHA) en las puntas de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico, térmico y combinado.....	68
Figura 12. Contenido de ascorbato y dehidroascorbato en las bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a condiciones de estrés hídrico, térmico y combinado.....	70
Figura 13. Estado Redox de ascorbato en puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera en las distintas condiciones de estrés hídrico, térmico y combinado analizadas.....	72

ABREVIATURAS

ABA	Ácido Abscísico
ANOVA	Análisis de Varianza
APX	Ascorbato Peroxidasa
AsA	Ascorbato
BSA	Seroalbúmina de bovino
CAM	Metabolismo del Ácido Crasuláceo
CC	Capacidad de campo
DHA	Dehidroascorbato
DHAR	Dehidroascorbato Reductasa
DNA	Acido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
Fd	Ferredoxina
GR	Glutación Reductasa
GSH	Glutación
HSF	Factor de transcripción de tipo Heat Shock
HSP	Proteína de tipo Heat Shock
JA	Ácido jasmónico
MDHA	Monodehidroascorbato
MDHAR	Monodehidroascorbato Reductasa
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NBT	Nitroblue Tetrazolium

NEM	N-Etilmaleimida
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PSI	Fotosistema 1
PSII	Fotosistema 2
PVP	Polivinilpirrolidona
RNS	Especie Reactiva de Nitrógeno
ROS	Especie Reactiva de Oxígeno
RUBISCO	Ribulosa 1,5-bisfosfato Carboxilasa
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SOD	Superóxido Dismutasa
SRE	Elemento Regulador de Splicing
TCA	Ácido Tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

RESUMEN

Formados como productos secundarios naturales del metabolismo de todos los organismos vivos, las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden oxidar rápidamente proteínas, lípidos y DNA causando un daño celular irreversible. Las plantas, debido a su estilo de vida sésil, deben contar con diversos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para prevenir el daño oxidativo. Las plantas de metabolismo del ácido crasuláceo (CAM), como es el caso de *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera), se encuentran adaptadas a vivir en ambientes extremos donde el agua escasea y las temperaturas diurnas son muy altas. Ambos estrés, hídrico y térmico, inducen la producción de ROS con formación de radicales de oxígeno y posterior formación de H_2O_2 . Ascorbato peroxidasa (APX) es una enzima clave en la reducción de los niveles de H_2O_2 y el aumento de su actividad es un indicador de estrés oxidativo en células vegetales. El objetivo de este estudio fue investigar los cambios en los niveles de actividad específica de APX en hojas de Aloe vera bajo condiciones de estrés hídrico y térmico. Las plantas de Aloe vera fueron sometidas a distintos tratamientos de riego de acuerdo a la capacidad de campo del suelo, con riegos de: 100%, 75%, 50%, y 25% de la capacidad de campo (CC) denominados T1, T2, T3 y T4 respectivamente. Las plantas fueron luego sometidas a dos horas de tratamiento de temperaturas de 35°, 40° y 45°C, con plantas control mantenidas a 25°C. Se realizaron tratamientos combinados de déficit hídrico y altas temperaturas exponiendo plantas tratadas con los riegos T3 y T4 a dos horas de tratamiento a 40° y 45°C. La actividad específica de APX aumentó en las puntas de las

hojas de plantas bajo los tratamientos hídricos T2 y T3, manteniendo niveles similares al control en T4. La actividad específica de APX fue relativamente estable en la base de las hojas de todos los tratamientos. La actividad no aumenta con el aumento de la temperatura utilizada. En experimentos de deficiencia hídrica y alta temperatura combinados, el nivel más alto de actividad específica fue en plantas T3 sometidas a 40°C, descendiendo en aquellas que se encontraban en T3 y fueron luego expuestas a 45°C. Los zimogramas hechos por electroforesis nativa mostraron una nueva isoforma de APX de migración más lenta solo en las bases de las hojas sujetas a 40° y 45°C, así como también en plantas en tratamiento T3 sometidas a 40°C. Los niveles de ascorbato y dehidroascorbato descendieron en plantas sometidas a los tratamientos de riego y temperatura más severos.

Este estudio indica que los distintos tipos de estrés utilizados en los experimentos descritos generan una respuesta antioxidante en las plantas de Aloe vera, evidenciado por las variaciones en la actividad específica y en las isoenzimas detectables de APX obtenidas a partir de extractos crudos de proteínas, así como también en los cambios en la acumulación del sustrato principal de esta enzima. Ambos parámetros constituyen entonces buenos indicadores de las condiciones de stress y estado redox en Aloe vera.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are formed as natural products of metabolism in all living organisms. The ROS can rapidly oxidize proteins, lipids and DNA causing an irreversibly cellular damage. Plants, due to their sessile life-style, must have diverse enzymatic and non-enzymatic mechanisms to prevent this oxidative damage. CAM plants, like *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera), are adapted to live in extreme environments where the water is scarce and the diurnal temperatures are high. Both, water and high temperature stress induce ROS with production of H_2O_2 . Ascorbate Peroxidase (APX) is a key enzyme in the reduction of H_2O_2 levels and being a signal of oxidative stress in plant cells. The objective of this study was to investigate changes in the levels of the specific activity of APX in Aloe Vera leaves under drought and heat stress conditions. Aloe vera plants were subjected to different water treatment according to the field capacity of the soil: 25%, 50%, 75% and 100% (T1, T2, T3 and T4 respectively). Plants were then subjected for two hours to temperature treatments of 35°, 40° and 45°C, with control plants maintained at 25°C. Combined treatments of water deficit and high temperatures were performed by exposing plants of T3 and T4 to two hours treatments of 40° and 45°C. The APX specific activity increased at the tips of the leaves in plants under water treatments T2 and T3 remaining control levels in T4. The APX specific activity was relatively stable at the leaf bases in all stress treatments. The activity does not increase with increasing temperature. In combined experiments of water stress and high temperature, the highest levels of specific activity was in T3

plants subjected to 40°C, decreasing in T3 plants exposed to 45°C. Native electrophoresis zymography showed a new slow-migrating isoform of APX only in leaf bases of plants subjected to 40° and 45°C, as well as in the T3 plants treated at 40°C. The ascorbate and the dehydroascorbate levels decreased in plants subjected to most severe drought and heat treatments.

This study shows that the different stress treatments used in the experiments already described triggers an antioxidant response in Aloe vera plants, as shown by the variations in the activity and APX detectable isozymes obtained from the crude protein extracts, and the changes in the accumulation of this enzyme's main substrate. Then, both parameters are good indicators of stress and redox state conditions in Aloe vera..

1. INTRODUCCIÓN



1.1 Aloe vera y metabolismo del ácido crasuláceo.

Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) es una planta monocotiledónea suculenta de metabolismo del ácido crasuláceo (CAM) la que está naturalmente adaptada a crecer en regiones climáticas particularmente áridas, en donde se encuentra con una muy baja disponibilidad de agua y altas temperaturas, convirtiéndose en un ambiente particularmente inhóspito para organismos sésiles como las plantas. La adaptación que poseen las plantas CAM, consiste en la separación temporal del proceso de fijación de carbono en el interior de la célula vegetal. La asimilación de CO_2 se realiza durante la noche, momento en el que la planta puede mantener sus estomas completamente abiertos sin arriesgarse a perder agua por evaporación, tal como sucedería durante el día cuando la planta se encuentra expuesta a muy altas temperaturas y una muy baja humedad en el aire. Con este sistema la eficiencia del uso del agua llega a ser 2 a 4 veces mayor en las plantas CAM en comparación a plantas de tipo C_3 y C_4 (Gross y col. 2013). El CO_2 obtenido es incorporado a una molécula de fosfoenolpiruvato, y después de dos reacciones se almacena como ácido málico en la vacuola. Durante el día este ácido málico sale de la vacuola y el CO_2 es liberado en el cloroplasto por descarboxilación mediada por la enzima málica. Además se forma piruvato el que es transformado en fosfoenolpiruvato gracias a la enzima piruvato fosfato diquinasa (Dittrich y col, 1973). Como los estomas permanecen cerrados en el día, la concentración de CO_2 se mantiene

alta y la de O₂ baja dentro de la célula, reduciendo la posibilidad de fotorrespiración asociada a la acción de la Ribulosa 1,5-bisfosfato Carboxilasa, o RUBISCO (Denius & Homann 1972; Christopher y Holtum, 1996; Taiz y Zeiger, 1998; Yamori y col. 2014) Sin embargo, estas condiciones extremas de estrés, hídrico y térmico principalmente, en los que habitan plantas como Aloe vera inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las que pueden dañar gravemente distintas estructuras de la célula vegetal. A pesar de contar con notables adaptaciones como son las raíces y hojas especializadas, la gruesa cutícula que recubre a estas últimas, y la síntesis de polisacáridos y otros azúcares destinados a formar la gruesa y espesa capa de gel que caracteriza a esta planta, el daño oxidativo es posible cuando el estrés por déficit hídrico es severo (Delatorre-Herrera y col. 2010; Gross y col. 2013). Los efectos de este daño oxidativo pueden no poner en riesgo la sobrevivencia de organismos adaptados a estas condiciones como el Aloe vera, pero pueden afectar la calidad y propiedades del gel de Aloe, y con ello provocar importantes pérdidas a quienes cultivan esta planta con fines comerciales. Conocer las condiciones óptimas para el cultivo de esta especie, así como el poder identificar los distintos mecanismos que dan protección contra el estrés abiótico, al que se ven sometidas en su lugar de cultivo, resulta de vital importancia para mejorar la producción de Aloe vera a nivel nacional.

1.2 Especies Reactivas de Oxígeno y Estrés Oxidativo.

1.2.1 Producción de ROS

El O_2 es una molécula relativamente estable. No obstante, los procesos de transferencia de energía o electrones para su reducción durante las reacciones metabólicas llevadas a cabo en el interior de las células generan diversas especies reactivas de oxígeno. Las ROS incluyen radicales libres [radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y radical hidroxilo ($\bullet OH$)] y no radicales libres [peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete (1O_2)]. En una primera reacción, el O_2 forma $O_2^{\bullet-}$ o la especie protonada del mismo, el hidropéroxido ($HO_2^{\bullet-}$). El $O_2^{\bullet-}$ puede inactivar distintas enzimas que contienen átomos de Fe o S, mientras que, el $HO_2^{\bullet-}$ se forma a pH ácido y está implicado en la oxidación de lípidos al captar protones de los ácidos grasos poliinsaturados (Van Breusegem y col. 2001). En una siguiente reacción, se origina H_2O_2 que es relativamente estable. El H_2O_2 difunde fácilmente desde el lugar donde se forma dentro de la célula hasta otros compartimentos celulares, incluso a células adyacentes, y puede inactivar enzimas mediante la oxidación de grupos tiol (Halliwell, 2006). El $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 en presencia de algunos metales, como Fe y Cu, dan lugar, mediante la reacción de Haber-Weiss, al radical $\bullet OH$, que presenta una reactividad química elevada y es considerada una de las especies químicas más tóxicas conocidas, ya que es capaz de oxidar prácticamente cualquier tipo de biomolécula y no se conoce enzima capaz de eliminarlo eficientemente, por lo que la planta debe evitar su producción detoxificando rápidamente sus precursores o sintetizar antioxidantes no enzimáticos que eviten el daño a estructuras vitales (Aruoma, 1994; Kehrer, 2000; Rossi y col. 2013). El 1O_2 se forma a partir del O_2

en triple estado ($^3\text{O}_2$) y puede transferir su energía dañando membranas e induciendo la muerte celular (Ryter y Tyrrell, 1998). Todas las reacciones antes descritas se resumen gráficamente en la Figura 1.

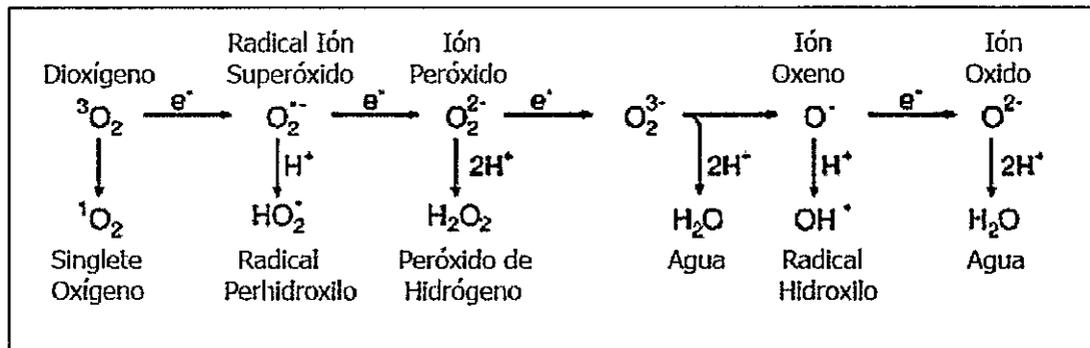


Figura 1. Generación de las distintas especies reactivas de oxígeno por transferencia de energía o reducción secuencial univalente del estado basal triplete oxígeno. Adaptado de Apel y Hirt, 2004.

Tradicionalmente, las ROS han sido consideradas moléculas tóxicas debido a su capacidad para oxidar componentes celulares provocando, en el peor de los casos, la muerte de la célula. Sin embargo, los ROS, a concentraciones estrictamente controladas por los sistemas antioxidantes, tienen una función muy importante como moléculas señalizadoras, interviniendo en procesos importantes como el desarrollo y expansión celular, el cierre estomático, la senescencia y muerte celular, la germinación y dormancia de semillas o la adaptación a distintos tipos de estrés (Mittler y col. 2004; Foyer y Noctor, 2005; Foyer y Noctor, 2013; Lariguet y col. 2013). Los ROS pueden intervenir en la señalización en tres niveles: siendo detectadas por sensores específicos y activando una cascada de señalización que conduce a la modificación de la expresión génica; activando o inactivando algún componente de la cascada de señalización por un

proceso de oxidación; y actuando directamente sobre factores de transcripción y, por consiguiente, modulando la expresión génica (Apel y Hirt, 2004; Mittler y col. 2004; Scandalios, 2005). En plantas, los principales procesos metabólicos donde se generan ROS son la respiración, la fotosíntesis y el metabolismo peroxisomal.

1.2.1.1 Producción de ROS en mitocondrias.

La respiración aeróbica tiene lugar en las mitocondrias de todos los organismos aerobios y es energéticamente más ventajosa que los procesos de fermentación y respiración anaeróbica. Durante este proceso se lleva a cabo la reducción completa del O_2 a una molécula de H_2O mediante la transferencia de cuatro electrones. Sin embargo, esta reducción se produce de manera secuencial, lo que provoca la formación de ROS. De hecho, se estima que aproximadamente el 1-2% del O_2 consumido durante la respiración es reducido a ROS. Los principales sitios de producción de ROS en la membrana interna mitocondrial son los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinol-citocromo-c oxidorreductasa). El radical $O_2^{\cdot-}$ producido en estos complejos es dismutado posteriormente a H_2O_2 por la manganeso-superóxido dismutasa (MnSOD) de la matriz mitocondrial.

1.2.1.2 Producción de ROS en cloroplastos.

En los organismos fotosintetizadores, los cloroplastos son el principal sitio de producción de ROS. Durante la fotosíntesis se pueden generar ROS tanto en el fotosistema I como en el fotosistema II. En el fotosistema I se produce la fotorreducción del O_2 (reacción de Mehler) al radical $O_2^{\cdot-}$. En el fotosistema II, el estado excitado de la

clorofila (P680) puede transferir al O_2 su energía de excitación formando 1O_2 (Apel y Hirt, 2004; Halliwell y Gutteridge, 2007). Tal como en el caso de las mitocondrias la enzima Cu-Zn SOD de cloroplasto transforma el $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 desintoxicando al organelo de este peligroso ROS (Ramírez y col. 2012).

1.2.1.3 Producción de ROS en peroxisomas.

Los peroxisomas son el principal sitio de producción de H_2O_2 en la célula. Esta especie reactiva de oxígeno se produce durante la fotorrespiración, la β -oxidación de los ácidos grasos, la oxidación del ácido úrico por la urato oxidasa y la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ por la acción de las superóxido dismutasas (SOD) peroxisomales. Además de H_2O_2 , en los peroxisomas se produce $O_2^{\bullet-}$ por la acción de la xantina oxidasa en la matriz y por una cadena de transporte de electrones dependiente de NAD(P)H localizada en la membrana peroxisomal (Del Río y col. 2006). En respuesta a algunos tipos de estrés, se ha observado un aumento en el número de peroxisomas de la célula. Esto, junto con la capacidad de este organelo para producir y regular la liberación de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS), determina que los peroxisomas tengan un papel clave en la respuesta al estrés oxidativo en plantas (Corpas y col. 2001).

1.2.2 Daño Oxidativo

Como se ha mencionado anteriormente, los ROS no sólo se producen durante el metabolismo normal de la célula, sino que sus niveles pueden aumentar durante condiciones de estrés. En condiciones fisiológicas, la producción y eliminación de ROS está equilibrada debido a los mecanismos antioxidantes de las células. Sin embargo, en

condiciones de estrés se rompe este balance, lo que puede originar la pérdida de la eficiencia metabólica y funcional de la célula, provocando una situación conocida como estrés oxidativo (Scandalios, 2005). Éste se caracteriza por la acumulación de productos de la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Un estrés oxidativo intenso puede incluso llegar a ocasionar la muerte celular.

1.2.2.1 Daño oxidativo a lípidos.

La peroxidación de lípidos es una reacción en cadena que puede iniciarse por el radical $\bullet\text{OH}$ o el $^1\text{O}_2$ (Bhattacharjee, 2005), o por la acción de las lipooxigenasas en células vegetales. La peroxidación de lípidos se inicia cuando un grupo metileno de un ácido graso poliinsaturado pierde un átomo de H, formando hidroxiperóxidos de lípidos que se descomponen para dar lugar a otras especies reactivas, como los radicales alcoxilos, alcanos, éoxidos de lípidos y aldehídos citotóxicos como el malondialdehído (Sevanian y Hochstein, 1985; Halliwell, 2006). La peroxidación de lípidos ocasiona daños a las membranas celulares alterando su estructura y función por fenómenos de descompartimentación iónica, pérdida del potencial de membrana, inhibición del transporte y modificación de receptores de membrana (Farmer y Mueller, 2013).

1.2.2.2 Daño oxidativo a proteínas.

Los ROS pueden causar modificaciones covalentes en los aminoácidos de manera irreversible. No obstante, en algunos casos, como la cisteína y metionina, las modificaciones son reversibles y constituyen un importante mecanismo de regulación redox permitiendo la activación e inactivación de proteínas. Las modificaciones

oxidativas más comunes son la formación de grupos carbonilos debido a la oxidación de las cadenas laterales de algunos aminoácidos como la lisina (Davies, 1987), formación de sulfóxido de metionina por oxidación del grupo tioéter y la nitración de tirosinas (Jacques y col. 2013).

1.2.2.3 Daño oxidativo a DNA.

El daño oxidativo al DNA ha sido menos estudiado. Los ROS, especialmente el $^1\text{O}_2$, el $\bullet\text{OH}$ y los peróxidos de lípidos, pueden ocasionar daño oxidativo al DNA, produciendo la rotura de la doble hélice, así como la oxidación de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas. Las modificaciones oxidativas del DNA, como la conversión de la guanina en 8-hidroxi guanina, favorecen la ocurrencia de mutaciones derivadas de la replicación de este DNA dañado, fenómeno que puede ser importante en la regulación de la expresión génica (Wiseman y Halliwell, 1996; Evans y col. 1999, Berk y col. 2011).

Si bien todos los organismos vivos deben lidiar con los efectos del estrés oxidativo y necesitan contar con medios eficientes para controlar la concentración de estos ROS en sus células, las plantas se ven aún más expuestas a este tipo de estrés y sus medios de defensa deben ser muy eficientes, principalmente debido a que se trata de organismos sésiles, los que no pueden simplemente escapar de las condiciones ambientales adversas que gatillan la producción excesiva de ROS. Estos sistemas de defensa se clasifican principalmente en antioxidantes de tipo enzimático y no enzimático, y en ambos destaca la importante participación del ascorbato (AsA), una

molécula que, como se verá a continuación, está involucrada en múltiples funciones antioxidantes y fisiológicas.

1.3 Ascorbato y su doble función antioxidante.

La síntesis de ascorbato en plantas se realiza a través de dos vías: a través de intermediarios del ácido urónico, como el ácido D-galacturónico (Isherwood y col. 1954), y, a través de la denominada ruta Smirnof-Wheeler, que sintetiza ascorbato a partir de D-manosa y L-galactosa, siguiendo la ruta descrita en la Figura 2, y que constituiría la principal vía de síntesis de este metabolito en este tipo de organismos (Smirnof y col. 2001; Conklin y col. 2013, Blauer y col. 2013).

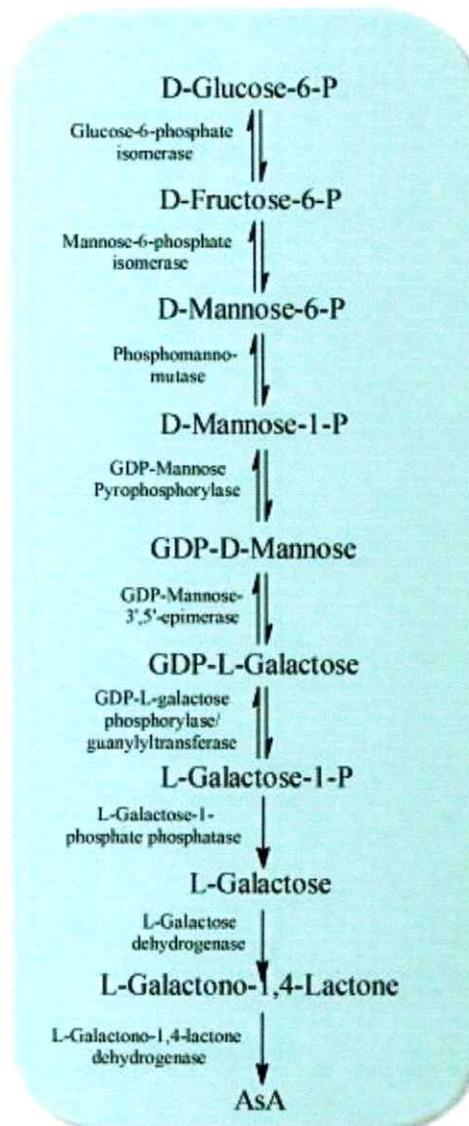


Figura 2. Ruta de Smirnoff-Wheeler, principal vía de biosíntesis de Ascorbato (AsA) en plantas superiores. Adaptado de Blauer y col. 2013.

Dentro de las principales propiedades que caracterizan al ascorbato (AsA) destaca el rol de ser un sustrato reductor muy importante en la detoxificación de diversas especies reactivas de oxígeno en distintos organismos fotosintéticos como plantas, algas y cianobacterias (Shigeoka y col. 2002). En plantas cumple un importante papel en diversos procesos fisiológicos como el crecimiento de la pared y expansión celular, diferenciación, fotosíntesis, síntesis de etileno, giberelinas, antocianinas e hidroxiprolina, y otros variados procesos metabólicos. Ejemplo de esto es el estudio realizado con mutantes de *Arabidopsis thaliana* con una deficiencia moderada (*vtc1*) o severa (*vtc2*) en el contenido de AsA, en donde se observó cambios importantes en la morfología, estructura celular y desarrollo de las plantas (Olmos y col. 2006), así como también en la señalización mediada por hormonas y la respuesta defensiva a estrés (Pastori y col. 2003; Pavet y col. 2005). En su rol antioxidante, AsA destaca por ser el antioxidante soluble de bajo peso molecular más abundante en plantas superiores, siendo en hojas incluso más abundante que la misma clorofila (Noctor y Foyer, 1998; Smirnoff y Wheeler, 2000; Sharma y col. 2012). Esta molécula ubicua es capaz de reaccionar directamente con los ROS evitando que éstas dañen otras estructuras vitales. También es responsable de la regeneración de otros antioxidantes como el α -tocoferol o Vitamina E (Packer y col. 1979) y de los flavonoides oxidados (Pérez y col. 2002), y es además cofactor de la violaxantina de-epoxidasa, que interviene en la síntesis de la zeaxantina (Rockholm y Yamamoto, 1996).

Sin embargo, y a pesar de las muchas funciones que ya cumple esta molécula, tiene una segunda participación en la maquinaria antioxidante presente en organismos

fotosintéticos, al servir como sustrato reductor único de la enzima ascorbato peroxidasa (APX), la cual es también, una pieza clave en la mantención de la homeostasis en este tipo de sistemas al encargarse del control del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un ROS que es probablemente la más versátil de este tipo de especies.

1.4 Detoxificación de H_2O_2 por acción de la Ascorbato Peroxidasa

Dentro de las especies reactivas de oxígeno una de las que más destaca es el peróxido de hidrógeno. Esta molécula es solo moderadamente reactiva y tiene una vida media relativamente larga (1ms), mientras que otros ROS como $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} y 1O_2 tienen una vida media mucho menor (2-4 μ s). Además es una molécula lo suficientemente pequeña como para atravesar membranas y moverse por los distintos compartimentos celulares (Gill y Tuteja, 2010). Las dos propiedades anteriormente señaladas son particularmente importantes en la función que esta especie reactiva de oxígeno cumple como un señalizador multifuncional. En la última década se ha acumulado fuerte evidencia de la participación del peróxido de hidrógeno en la modulación de múltiples procesos biológicos, como la inducción de resistencia, reforzamiento de la pared celular, senescencia, producción de fitoalexina, fotosíntesis, apertura de estomas, ciclo celular y muerte celular programada (Petrov y Van Breusegem, 2012). La producción activa de esta molécula no solo ocurre en el interior de los distintos organelos y citoplasma celular, sino también en el apoplasto, en donde es necesario para gatillar la denominada “ráfaga oxidativa” (*oxidative burst* en inglés), la cual es parte de la respuesta

hipersensible a patógenos, pero también es necesaria para el crecimiento normal, desarrollo y muerte celular programada (Miller y col. 2010).

Ante la importancia de las distintas funciones que cumple esta molécula, resulta vital que los niveles de peróxido de hidrógeno sean finamente regulados en cada uno de los compartimentos, asegurando que pueda cumplir con su función señalizadora sin que la concentración aumente hasta el punto de volverse dañina para las distintas estructuras que componen la célula, y es en esta labor donde la enzima ascorbato peroxidasa cumple un rol fundamental.

Ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) es una enzima que utiliza de forma específica dos moléculas de AsA como dadores de electrones para reducir una molécula de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) a agua con la generación paralela de dos moléculas de monodehidroascorbato (MDHA). Esta reacción inicial es parte de dos ciclos de eliminación de especies reactivas de oxígeno que constituyen la columna vertebral de la respuesta antioxidante enzimática en organismos fotosintéticos. En primer lugar, el **Ciclo Agua-Agua, o Reacción de Mehler** (Figura 3a), canaliza en primera instancia los electrones obtenidos de la disrupción de moléculas de H_2O en el PSII a través del aparato fotosintético en cloroplastos. Estos electrones son transferidos a O_2 en el PSI resultando en la formación de radicales superóxido (O_2^-). Una superóxido dismutasa de cobre/zinc (Cu/Zn SOD) unida a la membrana convierte el radical superóxido en H_2O_2 , para que luego una APX unida a la membrana del tilacoide (tAPX) convierta este H_2O_2 nuevamente en agua. El ascorbato, utilizado en este proceso por APX como agente reductor, es convertido a radical AsA (o monodehidroascorbato, MDHA), el cual es

posteriormente reducido una vez más a AsA por la Ferredoxina (Fd) utilizando para ello electrones provenientes del PSI. Este proceso cíclico mantiene el flujo de electrones a través del aparato fotosintético incluso cuando la fijación de CO₂ es limitada o está inhibida. Mientras esta reacción ocurre tan solo en los cloroplastos, un segundo ciclo de eliminación de ROS iniciado por APX sucede en múltiples compartimentos celulares. En el denominado **Ciclo del Ascorbato-Glutatión, o Ciclo de Halliwell-Asada** (Figura 3b) después de la primera reacción en donde APX convierte H₂O₂ en H₂O con la concomitante oxidación de AsA en MDHA, este radical así originado se convierte espontáneamente a AsA y a dehidroascorbato (DHA), o puede ser reducido directamente a AsA por la acción de la MDHA reductasa (MDHAR). DHA reductasa (DHAR) utiliza glutatión (GSH) para reducir DHA y regenerar con ello AsA. El glutatión oxidado es regenerado luego por la GSH reductasa (GR), utilizando para ello equivalentes reductores de NAD(P)H. Esta cadena de reacciones muy bien enlazadas entre sí permite prevenir la acumulación de niveles dañinos de H₂O₂ en organismos fotosintéticos, regenerando los compuestos antioxidantes iniciales y asegurando la mantención del pool inicial de este grupo de moléculas (Asada, 1992, 1997).

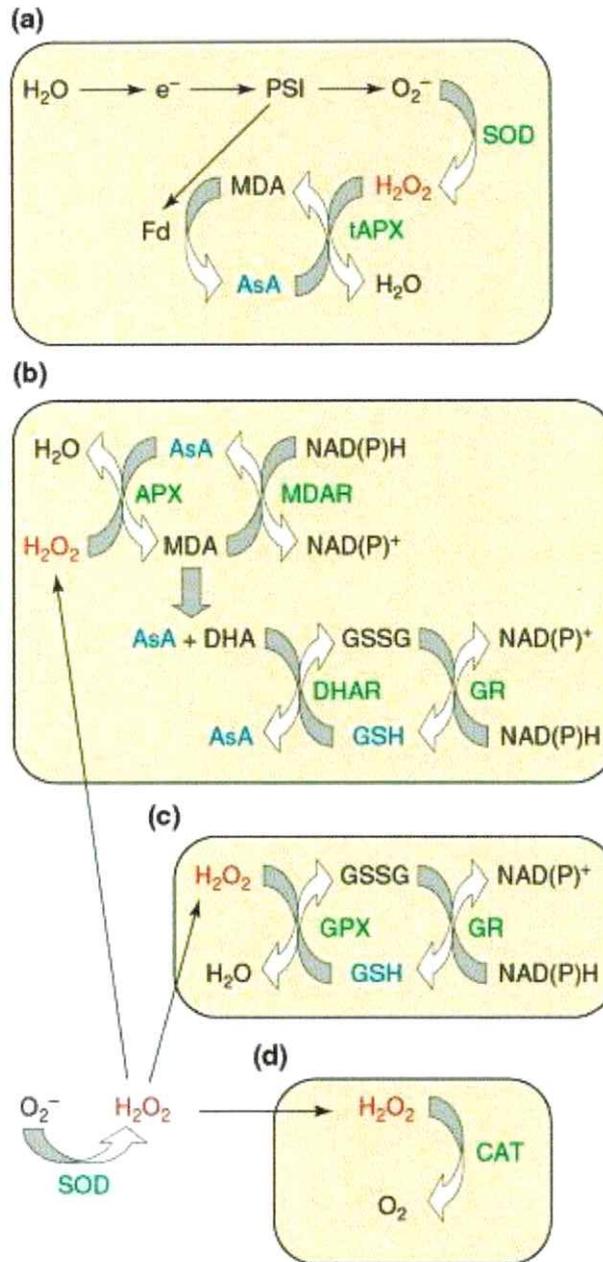


Figura 3. Rutas de detoxificación de Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2) en plantas. (a) El ciclo Agua-Agua. (b) Ciclo Ascorbato-Glutatión. (c) Ciclo de la Glutatión Peroxidasa (GPX) (d) Reacción de la Catalasa (CAT). Extraído de Mittler, 2002.

Acorde con esta importante función, existe evidencia de que APX estaría distribuida en al menos 4 compartimentos intracelulares: en el estroma y tilacoides de los cloroplastos (sAPX y tAPX respectivamente), en microsomas, como glioxisomas y peroxisomas (mAPX) y la forma citosólica (cAPX), mientras que una quinta forma presente en mitocondrias se ha descrito recientemente (mitAPX), hasta ahora únicamente debido a la evidencia de actividad enzimática (Jiménez y col. 1997; De Leonardis y cols. 2000; Teixeira, 2006; Xin y col. 2014), aunque no se ha descrito aún ningún gen, cDNA o secuencia aminoacídica asociada a una isoforma correspondiente a este compartimiento subcelular (Teixeira y cols. 2004). Todas estas enzimas tienen una alta especificidad por AsA como dador de electrones, especialmente para las formas cloroplásticas y de microsomas, mientras que la forma citosólica puede oxidar ciertos dadores de electrones artificiales como pyrogallol o guaiacol (Yoshimura y col. 1998; Asada, 1999). Su inestabilidad en ausencia de ascorbato hace que la actividad se pierda rápidamente cuando AsA alcanza concentraciones menores a 20 μ M. En la mayoría de los organismos estudiados, los tiempos de inactivación media de las formas cloroplásticas y mitocondriales son menores a 30 segundos, mientras que la citoplasmática y microsomal son de aproximadamente 1 hora (Chen y Asada, 1989; Amako y col. 1994; Yoshimura, 1998). Las formas de cloroplasto existen en forma monomérica (sAPX 33,2 kDa y tAPX 47,7 kDa), pero cAPX es un dímero compuesto por subunidades idénticas con una masa molecular de 28kDa cada una (Shigeoka y col. 2002).

Ascorbato peroxidasa es una peroxidasa heme de clase I, similar a la conocida citocromo c peroxidasa, las que catalizan la oxidación del sustrato (L-ascorbato para APX) mediante la oxidación inicial del Fe^{3+} del grupo heme por acción del H_2O_2 , para formar un intermediario oxidado de dos electrones conocido como Compuesto I el que contiene un ion oxiferrilo ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) y un radical catiónico basado en porfirina (Macdonald y col. 2006; Efimov y col. 2007). Este Compuesto I, que es posteriormente reducido por el mismo sustrato (ascorbato) en dos transferencias sucesivas de electrones que dan origen al monodehidroascorbato, es altamente inestable en este tipo de peroxidasas, motivo por el cual la enzima se inactiva rápidamente y fue descrita tan tardíamente, a pesar de haberse observado actividad peroxidasa dependiente de ascorbato con anterioridad (Efimov y col. 2007). Recientes estudios han propuesto que existirían dos sitios de unión a sustrato en APX: uno para ascorbato y otro para sustratos aromáticos, pero aunque esta propuesta no se ha podido sustentar con pruebas definitivas, se ha demostrado que la afinidad por ascorbato de este supuesto segundo sitio de unión sería muy baja, no afectando la cinética de esta enzima en la reacción que cataliza principalmente (Sharp y col. 2003b; Sharp y col. 2004; Efimov y col. 2007). Concentraciones adecuadas de Fe en el medio de cultivo de estas plantas son necesarias para los niveles óptimos de actividad de esta y otras enzimas que contienen fierro, la cual disminuye en condiciones deficientes de fierro y aumenta bajo estrés por alta concentración de este metal, indicando la importancia de este ion en la respuesta a distintos tipos de estrés (Salama y col. 2009).

Por su rol en la protección contra los efectos de la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), tanto las isoenzimas de APX como las enzimas encargadas de eliminar el peróxido de hidrógeno se encuentran preferentemente localizadas cerca de los sitios de producción de O_2^- como cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias (Miyake y Asada, 1992; Faize y col. 2013). Cuando la producción de ROS excede ampliamente la capacidad endógena de eliminarlos, el balance regulado entre los sistemas de generación y eliminación de ROS puede verse alterado, llevando a la inactivación de las enzimas de defensa. Por este motivo, tanto O_2^- como H_2O_2 deben ser constantemente controlados para preservar la actividad fotosintética (Noctor y Foyer, 1998; Shigeoka y col. 2002). Bajo condiciones de estrés ambiental, como por ejemplo estrés hídrico, térmico, altas concentraciones de sales y metales pesados, etc., la actividad de APX aumenta por lo general en conjunto con la actividad de otras enzimas antioxidantes como catalasa, SOD y GSH reductasa en respuesta al estrés sometido, sugiriendo que los componentes de los sistemas de eliminación de ROS estarían co-regulados (Hossain y col. 2009; Wang y Song, 2009; Azooz y col. 2009; Al-Ghamdi, 2009), lo que también se observa al exponer a los organismos a mayores concentraciones de algunas hormonas clave en la regulación sistémica y señalización en condiciones de estrés biótico y abiótico como el ácido abscísico (ABA) y ácido jasmónico (JA) (Zhang y col. 2009; Piotrowska y col. 2009). Sin embargo, en el caso de APX, la evidencia apunta a una expresión constitutiva de las isoformas de cloroplastos y otros organelos para la detoxificación de peróxido de hidrógeno de forma inmediata y

eficiente tanto en condiciones normales como bajo estrés ambiental en aquellos compartimentos donde se encuentran las más altas concentraciones de H₂O₂.

Con respecto a la regulación de la expresión de APX, en las formas citoplasmáticas se ha encontrado en múltiples estudios que la expresión de estas isoformas es gatillada por el aumento en las concentraciones de H₂O₂ y cambios redox en el sistema fotosintético de transporte de electrones. Aunque se desconoce de que forma funciona gran parte de este sistema de señalización para el control de la expresión de cAPX gatillado por H₂O₂, estos pueden explicarse en parte gracias a la regulación mediada por factores de transcripción de tipo Heat Shock (HSFs, o *Heat Shock Factors* en inglés), aunque el funcionamiento de estos factores y la forma en que regulan la expresión de estas isoformas es aún desconocido. Se ha predicho la existencia un elemento en *cis* de unión a HSF en el promotor de cAPX en base a identidad de secuencias, pero no existe evidencia directa de la interacción de estos elementos y los HSFs conocidos. Además, la red de interacciones de los distintos factores descritos y la expresión de cAPX ha mostrado un alto grado de complejidad, ya que algunos factores son capaces de activar la expresión de una de las dos isoformas sin afectar la otra, mientras otros factores actúan a la inversa y otros lo hacen activando ambas isoformas a la vez (Panchuk y cols. 2002; Davletova y cols. 2005; Nishizawa y cols. 2006; Suzuki y Mittler, 2006). En cada caso, la expresión génica de cAPX responde a cambios ambientales, resultando en la protección de estructuras celulares de importancia contra los daños del estrés oxidativo y a la vez modulando los niveles de peróxido de hidrogeno

para su participación en la señalización intracelular (Yoshimura y col. 2000; Shigeoka y col. 2002).

Debido a la evidente regulación de los niveles de actividad de esta enzima bajo distintas condiciones de estrés, es que ha sido utilizada comúnmente para caracterizar la respuesta de la maquinaria sistémica de detoxificación de especies reactivas de oxígeno en distintos organismos fotosintéticos. En el caso de este seminario de título, se analizarán los patrones de actividad total de ascorbato peroxidasa y las concentraciones de ascorbato y dehidroascorbato en extractos obtenidos de hojas de *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera) sometidas a distintas condiciones de estrés hídrico y térmico, con el objetivo de conocer parte de la respuesta de la planta ante estas condiciones adversas que derivan en estrés oxidativo y el consiguiente daño celular que estos organismos sufren. A su vez, este trabajo busca complementar los estudios previos realizados por el mismo grupo de laboratorio, en los cuales se ha descrito la respuesta de la enzima antioxidante Superoxido Dismutasa (Ramírez y col. 2012), así como la de otras proteínas protectoras (HSPs y Ubiquitina) y la síntesis y acumulación de distintos tipos de polisacáridos como respuesta a estas condiciones adversas (Salinas y col. 2007; Delatorre-Herrera y col. 2010; Huerta y col. 2013).

1.5 Objetivo General

Caracterizar los niveles de actividad de la enzima Ascorbato Peroxidasa (APX) en hojas de *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera) en distintas condiciones de estrés hídrico y térmico, correlacionar los valores observados con la aparición de distintas isoformas de esta enzima, y con las variaciones en la concentración de su sustrato ascorbato, en sus formas reducida y oxidada.

1.6 Objetivos específicos

1. Medir la actividad específica y registrar el patrón de las distintas isoformas de la enzima ascorbato peroxidasa obtenidos a partir de extractos proteicos de hojas de Aloe vera en distintas condiciones de estrés hídrico (tratamientos de 100%, 75%, 50% y 25% de la capacidad de campo), térmico (tratamientos de 25°, 35°, 40° y 45°C por dos horas) y combinado (mezclando las dos condiciones estrés hídrico y térmico más severas a la vez).
2. Medir las concentraciones de ascorbato y dehidroascorbato en extractos de hojas de Aloe vera en las distintas condiciones de estrés antes señaladas, y determinar con esto el estado redox de la hoja.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Material Biológico

- *Aloe barbandesis* Miller

El modelo a utilizar son plantas de *Aloe barbadensis* Miller de aproximadamente 3 años de edad, mantenidas en invernadero bajo un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) a una temperatura de 25 °C. Las plantas fueron aclimatadas durante 6 meses a las condiciones de invernadero antes de comenzar los diferentes tratamientos hídricos.

2.1.2 Reactivos

Los reactivos utilizados son de calidad para biología molecular y/o análisis provenientes principalmente de distribuidores como Merck y Sigma-Aldrich y fueron adquiridos con anterioridad en el laboratorio. En el caso de los reactivos N-etilmaleimida (NEM, Sigma-Aldrich SKU E3876) y α - α' -bipyridyl (Sigma-Aldrich SKU D216305) estos fueron obtenidos gracias a la colaboración del Dr. Marco Tulio Núñez,.

2.1.3 Software

Para los análisis estadísticos y construcción de gráficos se utilizó el software Graphpad Prism v5.02. Las mediciones de densitometría se realizaron con el software ImageJ v1.41, mientras que el tratamiento de imágenes fue realizado utilizando el software XnView.

2.2 Métodos

2.2.1 Tratamientos de estrés hídrico, térmico y combinado

Para definir los tratamientos hídricos a usar, se determinó con anterioridad la capacidad de campo en macetas de 13,5L que contienen 4kg de una mezcla compuesta de 1/3 de tierra de hoja y 2/3 de arena fina, la cual fue usada en la macetas donde se cultivaron las plantas de Aloe vera. En aquel análisis se estableció que un 100% de la capacidad de campo (CC) corresponde a un riego de 312mL de agua por semana. Los otros tratamientos de riego comprenderían 234mL para 75% CC, 156mL para 50% CC y 78mL para 25% CC.

Considerando lo anterior, las plantas de Aloe vera fueron regadas cada 7 días, bajo 4 diferentes tratamientos hídricos establecidos: T1: 100% CC (300mL semanales); T2: riego control de 75% CC (200mL semanales); T3: 50% CC (150mL semanales) y T4: 25% CC (80mL semanales), ajustando la cantidad de suelo que contendría cada maceta para maceta para adecuarse a estos volúmenes determinados para una mayor comodidad al momento del riego (Freire 2009). Al cabo de 6 meses transcurridos desde el inicio del tratamiento hídrico se recolectaron muestras de las plantas, las que consistieron en al menos una hoja completa cortada desde la base, las cuales fueron congeladas inmediatamente en N₂ líquido y almacenadas en un refrigerador a -80° C hasta efectuar los diferentes análisis. Los tejidos que finalmente fueron utilizados para tales pruebas correspondían al tejido fotosintético de las bases y puntas de las hojas.

Para la realización de los ensayos de estrés térmico, distintos grupos de plantas sometidas a un tratamiento de riego T2 (definido con anterioridad como riego control) fueron introducidos por completo dentro de un incubador por 2 horas a temperaturas de 25° (temperatura control), 35°, 40° y 45° C, y se recolectó el tejido inmediatamente después de este tratamiento, conservándolo a -80° C hasta su utilización en los distintos análisis.

En el caso de los tratamientos de estrés hídrico y térmico combinados se utilizó el mismo procedimiento detallado anteriormente para la generación de estrés por temperatura, pero utilizando inicialmente plantas en los tratamientos T3 y T4 de riego, y solo incubando a las dos temperaturas más severas, con el fin de generar las combinaciones T3+40°C, T3+45°C, T4+40°C y T4+45°C.

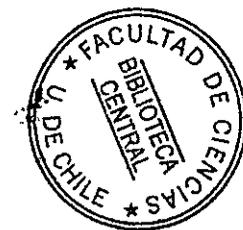
Para todos los análisis detallados a continuación se utilizó el tejido fotosintético de la hoja, separándolo del gel que se encuentra en el centro de ésta. Además se hizo la distinción entre las puntas (mayor cantidad de tejido fotosintético) y las bases de las hojas (mayor cantidad de reservas), colectando y analizando ambos tejidos de forma separada.

2.2.2 Proteínas Totales Solubles

2.2.2.1 Extracción de proteínas

El proceso de extracción que a continuación se detalla se realizó pensando en utilizar un único extracto para las diversas pruebas que debían hacerse (ensayos de actividad específica y geles para análisis electroforéticos) y se basa esencialmente en el protocolo inicialmente descrito por Nakano y Asada (Nakano y Asada, 1981), integrando en esta ocasión algunas modificaciones posteriores incluidas por diversos autores (Panchuk y col., 2002; Yabuta y col., 2002; Wang y col., 2008) con el objetivo de realizar la extracción a menor escala (debido a la limitación de la cantidad de tejido disponible) y a la necesidad de reducir el efecto de la rápida inactivación de la enzima detectada en los extractos.

La extracción, que originalmente se realizaba a partir de 2 gramos de tejido, fue adaptada para utilizar 200mg de este, realizando el resto del proceso de extracción en tubos Eppendorf. El tejido fue congelado rápidamente en N₂ líquido, y luego macerado mediante un mortero previamente congelado a -80°C, aplicando de forma regular N₂ cada vez que fue necesario, con el fin de evitar que la muestra se descongele y ayudar al proceso de pulverización del tejido. Una vez que el tejido se encontró reducido a un polvo fino, 200mg fueron transferidos a un tubo Eppendorf de 1,5mL al cual se añadió 1ml de Buffer de Extracción (Fosfato de Potasio 50mM pH 7.0, Glicerol 10%, PVP 1%, EDTA 1mM, Ascorbato 5mM) agitando la mezcla vigorosamente mediante un vortex a máxima velocidad en varias ocasiones durante un periodo de incubación en hielo de 10 a 15 minutos.



Una vez que el tejido fue homogeneizado completamente, éste fue centrifugado a 18.000 g durante 20 min a 4°C, en una centrífuga refrigerada para tubos de 1,5mL. El sobrenadante fue extraído y alicuotado en tubos Eppendorf, para luego ser almacenado hasta su utilización a -80°C por un periodo no superior a dos semanas.

Al igual que en los objetivos que serán descritos más adelante, se utilizaron 3 réplicas biológicas (tres plantas distintas) para cada uno de los tratamientos de estrés analizados, 3 réplicas técnicas (tres extractos de la misma planta) y 3 réplicas metodológicas (tres mediciones del mismo extracto). Las réplicas técnicas y metodológicas son promediadas entre sí, obteniendo un $n=3$ para todos los experimentos, dado por el número de réplicas biológicas.

2.2.2.2 Cuantificación de proteínas

Las proteínas totales fueron cuantificadas en duplicado utilizando el método de Bradford (Bradford 1976). La solución de Bradford (Coomassie Blue 0.01%, Etanol 5%, H_3PO_4 8,5%) fue preparada con 100mg Coomassie Brilliant Blue G 250, cantidad que fue disuelta en 50ml de etanol 95%. Luego de agitar la solución durante 10 min se agregaron 100ml de ácido fosfórico (H_3PO_4) 85% p/v. Luego se diluyó hasta un volumen final de 1L con H_2O desionizada. Finalmente la mezcla fue filtrada utilizando un filtro Rundfilter MN 617 con calidad de análisis.

Se preparó una curva de calibración utilizando seroalbúmina de bovino (BSA), con concentraciones que iban desde 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$. La medición de proteínas se realizó utilizando 15 μL de cada extracto de proteínas, en un volumen final de 4 ml. La

absorbancia fue leída a 595nm en un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda EZ201 (UV/Vis).

2.2.2.3 Visualización de proteínas totales

2.2.2.3.1 PAGE Nativo

Se construyeron geles de acrilamida, a partir de una solución de acrilamida:bis-acrilamida 30:0,8. EL gel separador fue preparado al 12% (Tris 0,375M pH 8,8) mientras el gel concentrador tenía una concentración de 4% (Tris 0,125M pH 6,8). Para la preparación del gel se utilizó como polimerizador TEMED, catalizador Persulfato de Amonio 10%, Buffer Tris-HCl 0,5M pH 8,8 para el caso del gel separador y Buffer Tris-HCl 0,5M pH 6,8 para el gel concentrador. El buffer de corrida correspondió a un buffer Tris 0,025M pH 8,3, Glicina 0,19M.

La migración de las proteínas en el gel fue de cátodo a ánodo, lo que fue efectuado en una cámara de electroforesis de proteínas (Bio-Rad MiniProtean[®] TetraCell) sometido a una diferencia de potencial de 100V durante 3 horas.

2.2.2.3.2 Visualización de proteínas, Tinción de Plata

La visualización de la totalidad de las proteínas en el gel de acrilamida se realizó mediante tinción de plata (Nielsen y Brown, 1984). Primero el gel fue fijado con una solución de Ácido Acético 10% v/v con Metanol 30% v/v, siendo incubado en ésta durante 1 hora o por toda la noche. Después el lavado se realizó utilizando Etanol 30%

v/v 3 veces, durante 15 minutos cada vez con agitación continua; finalmente, se realizaron dos lavados con H₂O desionizada durante 10 minutos. La sensibilización se realizó incubando los geles en 100 ml de Ditionito de Sodio (Na₂O₄S₂) 1,4mM durante 1 minuto. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con agua desionizada durante 20 segundos. La tinción se realizó incubando el gel con 100 ml de una solución de Nitrato de Plata (AgNO₃) 11,8mM con formaldehído 8,1% v/v durante 20 minutos. Luego se lavó una vez durante 1 minuto con agua desionizada, y se procedió al revelado con 100 ml de una solución de Carbonato de Sodio (Na₂CO₃) 0,57M con formaldehído 48,4% v/v; una vez que se revelaron las bandas, se realizó la fijación adicionando 100 ml de una solución de Ácido Acético 3,5% v/v y se incubó durante al menos 1 hora. Finalmente se lavó con H₂O desionizada 4 veces durante 30 minutos cada una y el gel fue almacenado en Etanol 20% v/v a 4°C.

2.2.3 Actividad APX

2.2.3.1 Actividad Específica

La actividad fue medida determinando el consumo de ascorbato presente en el medio de reacción por miligramo de proteína del extracto crudo total agregado durante un minuto de monitoreo de la absorbancia, utilizando el método descrito inicialmente por Nakano y Asada (Nakano y Asada, 1981), con algunas modificaciones. El método se sustenta en el seguimiento de la desaparición del ascorbato, el cual es utilizado como dador de electrones en la reacción que convierte el peróxido de hidrogeno en agua y que

es catalizada por la enzima ascorbato peroxidasa; esta disminución en la concentración del sustrato fue monitoreada mediante la medición de la absorbancia de la solución de reacción a una longitud de onda de 300nm (coeficiente de extinción molar para el ascorbato, ϵ : $0,49 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), durante un minuto desde la adición de peróxido de hidrogeno a la solución. Los resultados fueron expresados en términos de actividad específica, lo que en este caso es definido como nmoles de ascorbato consumidos por miligramo de proteína agregada por minuto de reacción.

Para la medición de actividad de APX se debió preparar la solución de reacción: Buffer Fosfato de Potasio 50mM pH 7,0, EDTA 0,1mM, AsA 0,5mM. 975 μ L de esta solución fueron transferidos a una cubeta de cuarzo de 1mL y en ella se disolvió una alícuota del extracto de proteínas (15 μ L) y posteriormente se agregaron 10 μ L de una solución de H₂O₂ 10mM (preparada en el mismo buffer fosfato) para alcanzar una concentración final de 0,1mM en la solución de reacción. Luego de mezclar hasta conseguir una solución homogénea, la muestra fue incubada durante 30 s antes de comenzar el monitoreo de la absorbancia a 300nm por 90 s con lecturas cada 1s considerando para el cálculo de actividad un lapso de tiempo de al menos 30 s durante el cual la caída de la absorbancia mostrara un comportamiento lineal. Para esto se utilizó el espectrofotómetro PerkinElmer Lambda EZ201 (UV/Vis) registrando los valores de absorbancia medidos cada 1 segundo.

2.2.3.2 Tinción de actividad APX en gel: Zimografía

Para ver las distintas isoenzimas de ascorbato peroxidasa de fase soluble se utilizó el protocolo descrito por Mittler y Zilinskas (Mittler y Zilinskas, 1993) con algunas modificaciones.

2.2.3.2.1 PAGE nativo

La preparación del gel nativo destinado a visualizar las distintas isoformas presentes en la fase soluble por la actividad de estas, se realizó de la misma forma que se detalla en la sección 1.6.2.3.1, con la salvedad de que ambos geles fueron preparados esta vez con glicerol al 10% para asegurar la mantención de la actividad enzimática durante el largo proceso de electroforesis y tinción. Se preparan geles de acrilamida, sin SDS, con un gel separador al 12% (Tris 0,375M pH 8,8) y un gel concentrador al 4% (Tris 0,125M pH 6,8).

Los extractos de proteínas previamente almacenados a -80°C fueron descongelados en hielo y, considerando la concentración calculada para cada uno de ellos, se cargaron $4\mu\text{g}$ de proteínas totales en cada columna, mezclando cada alícuota con buffer de carga nativo 2x (Tris-HCl 100mM pH 6,8; azul de bromofenol 0,2% p/v; glicerol 20% v/v). El gel fue corrido en una cámara de electroforesis de proteínas (Bio-Rad MiniProtean[®] TetraCell) durante 6 horas a 80V a 4°C , con una dirección de migración de cátodo a ánodo y un Buffer de Corrida correspondiente a un buffer Tris 0,025M, Glicina 0,19M, pH 8,3, suplementado en esta ocasión con ascorbato a concentración final 2mM con el

fin de evitar la inactivación de APX. Por lo que fue necesario también realizar una “pre-corrida”, en donde se indujo la diferencia de potencial sobre el sistema, permitiendo que el buffer de corrida circulara a través del gel antes de cargar los extractos de proteína, impregnándolo de ascorbato y ayudando a conservar la enzima en estado activo durante su migración a través de la matriz de poliacrilamida.

2.2.3.2.2 Tinción

Este ensayo se basa en el protocolo descrito por Mittler y Zilinskas en el año 1993 (Mittler y Zilinskas 1993), y que aprovecha la capacidad del ascorbato de reducir al nitroblue tetrazolium (NBT), en presencia de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED), a Formazán, un derivado muy poco soluble y de color azul intenso. En presencia de peróxido de hidrogeno, APX es capaz de prevenir la acumulación de Formazán debido a la rápida oxidación del ascorbato en una reacción dependiente de H₂O₂ y, por lo tanto, la actividad de APX se observa como una banda acromática en un fondo de color azul-violeta.

Inmediatamente terminada la electroforesis, el gel fue incubado con 50ml de un buffer fosfato de potasio 50mM pH 7,0 suplementado con ascorbato 2mM durante 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación continua, en oscuridad y cambiando el buffer cada 10 minutos. Luego el gel fue transferido a un buffer fosfato de potasio 50mM con ascorbato 4mM y H₂O₂ 2mM (este último fue agregado a la solución justo antes de la incubación del gel para evitar su degradación), manteniendo una agitación

continúa durante 20 minutos en oscuridad. Posteriormente, el gel fue lavado por un minuto en buffer fosfato de potasio 50mM pH 7,0, para luego ser incubado en una solución de buffer fosfato de potasio 50mM, pH 7,8, TEMED 28mM y NBT 1mM, manteniendo una suave agitación durante al menos 10 minutos en oscuridad. Pasados los 10 minutos el gel fue monitoreado visualmente hasta obtener el grado de tinción adecuado, ya que con tiempos de incubación superiores se observó una tinción en extremo intensa, lo que dificultaba la visualización de las bandas acromáticas. Una vez obtenida la tinción deseada, los geles fueron lavados brevemente con agua desionizada y almacenados en una solución de ácido acético al 10% a una temperatura de 4°C, en donde podían permanecer durante varios días sin perder su coloración hasta el momento de fotografiarles.

Se realizaron zimografías para cada repetición (1 muestra por cada planta), obteniéndose resultados similares entre las repeticiones de un mismo grupo de estrés. Las imágenes presentadas son representativas de los geles obtenidos en cada caso.

2.2.4 Cuantificación Ascorbato y Dehidroascorbato

El método de cuantificación se basa en el protocolo diseñado por Kaempfenkel y colaboradores para el análisis de estos metabolitos en plantas (Kaempfenkel y col., 1995), considerando las modificaciones propuestas años más tarde por Gillespie y Ainsworth (Gillespie y Ainsworth, 2007), en donde el ensayo es escalado para su utilización con menores cantidades de tejido. Adicionalmente, se realizaron algunas

modificaciones para facilitar su implementación en nuestro laboratorio, utilizando un espectrofotómetro en lugar de un lector de placas.

Este método permite la cuantificación indirecta del ascorbato presente en el extracto de tejido, así como la cuantificación del dehidroascorbato mediante la estimación del contenido total de ascorbato en sus formas reducida y oxidada. La prueba se basa en la capacidad que tiene el ascorbato de reducir Fe^{+3} a Fe^{+2} , y la posibilidad de determinar la concentración del complejo que forma este Fe^{+2} con el compuesto α - α' -bipyridyl mediante espectrofotometría a 525nm. En un análisis en paralelo, es posible reducir todo el dehidroascorbato presente en un extracto a ascorbato incubando la muestra con ditioneitol (DTT), y posteriormente tratando con N-etilmaleimida (NEM) para eliminar el exceso de DTT restante, pudiendo en ese instante determinar el contenido total de ascorbato (en sus formas reducida y oxidada) con el mismo método del α - α' -bipyridyl. La concentración de dehidroascorbato es obtenida entonces al calcular la diferencia entre los valores de ascorbato total y ascorbato reducido (sin tratamiento con DTT).

2.2.4.1 Extracción de ascorbato

Para efectuar la extracción del ascorbato presente en las hojas de Aloe vera se utilizaron 150mg de tejido de cada muestra, congelando rápidamente con N_2 en un mortero previamente congelado a -80°C y se maceró con la ayuda de un pistilo hasta obtener un polvo fino. Se agregó al mortero 900 μL de ácido tricloroacético al 6% sobre la muestra pulverizada y se continuó homogeneizando con el pistilo congelado por al menos un minuto más. El producto obtenido fue transferido a un tubo Eppendorf de

2mL, mientras el mortero fue lavado con una nueva alícuota de 900µL de ácido tricloroacético 6%, el que fue luego transferido al mismo tubo. Posteriormente los tubos de cada muestra, los que fueron conservados siempre en hielo, fueron centrifugados por 5 minutos a 13.000g a una temperatura de 4°C, para luego transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 2mL y mantenerlos en hielo hasta la realización del ensayo descrito en el siguiente paso.

2.2.4.2 Ensayo de detección de ascorbato

La prueba fue diseñada con el fin de realizar la cuantificación de ascorbato (AsA) y dehidroascorbato (DHA + AsA) de las muestras, por duplicado, de dos sets distintos destinados a ensayos independientes, además de la construcción de un set de blancos para cada ensayo y una curva de calibración con concentraciones conocidas de AsA.

	AsA		AsA Total (AsA + DHA)	
	Prueba	Blanco	Prueba	Blanco
Estándar/Extracto	50µL		50µL	
DTT 10mM			25µL	25µL
TCA 6%		50µL		50µL
Buffer Fosfato 75mM pH 7,0	25µL	25µL	25µL	25µL
NEM 0,5%			25µL	25µL
H ₂ O	50µL	50µL		
TCA 10%	125µL	125µL	125µL	125µL
H ₃ PO ₄ 43%	100µL	100µL	100µL	100µL
α-α'-bipyridyl 4%	100µL	100µL	100µL	100µL
FeCl ₃ 3%	50µL	50µL	50µL	50µL
TOTAL	500µL	500µL	500µL	500µL

Tabla 1. Esquema para protocolo de cuantificación de AsA y DHA en extractos de Aloe vera. Adaptado de Gillespie y Ainsworth (2007).

Los blancos, estándares y muestras para los ensayos de AsA reducido y AsA total (cuatro tubos por cada extracto de tejido en total) fueron preparados en duplicado tal como se exhibe en la tabla 1. Se agregó 25 μ L de buffer fosfato 75mM pH 7,0 y, según corresponda, 50 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 6% (a los blancos), estándares de ascorbato (0,15 – 10mM) o extracto a un tubo Eppendorf de 1,5mL según corresponda.

Luego se agregaron 25 μ L de DTT 10mM a los tubos destinados al ensayo de AsA total y fueron incubados a temperatura ambiente por 10 minutos, con lo que se redujo el contenido de AsA oxidado (DHA) formando AsA en su forma reducida. Luego a estos mismos tubos se les agregó 25 μ L de NEM 0,5% con el fin de remover el exceso de DTT y las muestras fueron incubadas por al menos 30 segundos.

Posteriormente se agregaron 50 μ L de agua a los tubos de AsA reducido con el fin de nivelar los volúmenes de DTT y NEM agregados a los tubos de AsA total. Finalmente se agregó 375 μ L de una solución 5:4:4:2 de 10% TCA : 43% H₃PO₄ : 4% α - α' -bipyridyl : 3% FeCl₃. Esta solución debió prepararse con anterioridad, agitando vigorosamente después de añadir el FeCl₃ para prevenir la formación de un precipitado blanco que afecta la medición espectrofotométrica posterior. Luego de mezclar la solución con cada extracto los tubos fueron incubados a 37°C por 1 hora. Posteriormente se transfirieron los 500 μ L de cada muestra a una cubeta de 0,5mL y la absorbancia de la solución fue medida a 525nm.

Se construyó una curva de calibración a partir de las absorbancias obtenidas para los tubos del estándar y restándoles el valor de la absorbancia obtenida para los blancos a 525nm. Con esta curva se calcularon las concentraciones de AsA total y AsA reducido.

El contenido de ascorbato en cada caso fue expresado en μmol de ascorbato por gramo de peso fresco de tejido ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW), lo cual se calculó, en los casos de ascorbato reducido y ascorbato total, según la siguiente fórmula:

$$\mu\text{mol AsA g}^{-1} \text{ PF} = \frac{A_{525}}{m} * \frac{V_t}{V_a} * \frac{1}{PF}$$

m : pendiente curva calibración (0,0453)

V_t : volumen total de extracto obtenido (1800 μL)

V_a : volumen extracto agregado (25 μL)

PF : peso fresco de tejido (0,15g)

El valor de AsA oxidado fue calculado como la diferencia entre el contenido total de este metabolito (AsA total) y el valor obtenido de AsA reducido.

2.2.5 Análisis estadísticos

Los análisis fueron realizados mediante ANOVA de 1 vía. Para comparar diferencias entre los distintos grupos de tratamientos se utilizó Test de Tukey. Las comparaciones de estos análisis fueron consideradas significativas cuando se obtiene un valor de probabilidad igual o menor a 0,05. Se utilizó para estos análisis el software Graphpad Prism v5.00 y Microsoft Excel de la suite Microsoft Office 2010.

3. RESULTADOS

3.1 Fenotipo de plantas de Aloe vera sometidas a condiciones de estrés

En congruencia con lo descrito en otros trabajos realizados por el mismo grupo de laboratorio (Salinas y col, 2007; Freire 2009; Ramírez y col, 2012), las plantas de Aloe vera sometidas a las distintas condiciones de estrés hídrico presentan claras diferencias visuales a causa de los tratamientos aplicados. Mientras las plantas regadas con los tratamientos T1 y T2 se ven prácticamente igual, con el color verde claro característico de esta especie vegetal, aquellas que se encuentran en el tratamiento T4 presenta un evidente cambio en su coloración, en donde el color verde ha dado paso a una coloración más rojiza-café en la superficie de la hoja, intensificándose este cambio de tonalidad en los tejidos más cercanos a la punta de la hoja.

Así como se observan cambios en el color de las hojas, también es posible detectar una clara diferencia en el grosor y turgencia de las mismas, marcado por la disminución en la cantidad de gel presente en plantas en tratamiento T4 en comparación con los demás tratamientos, llegando incluso a presentar una completa deshidratación del tejido ubicado en la punta de algunas hojas de plantas sometidas a este tratamiento.

En cuanto a los tratamientos de estrés térmico, estos no generan ningún tipo de cambio fenotípico detectable en las plantas que se someten a cualquiera de los tratamientos utilizados, principalmente debido a la corta duración de estas pruebas.

3.2 Actividad enzimática específica e isoformas de APX

Con el objetivo de observar los posibles cambios en los niveles de la enzima Ascorbato Peroxidasa en los distintos tratamientos de estrés estudiados, se hicieron extractos de proteínas totales de las hojas de Aloe vera, tanto en la punta de las hojas como en las bases de estas, lo que permitiría observar diferencias entre tejidos que tienen diferentes funciones respecto a las tasa fotosintética y almacenamiento de agua. El análisis de la actividad enzimática de APX en estos extractos crudos en condiciones nativas comprendió la determinación de la actividad específica de estos extractos y la identificación de distintas isoformas de esta enzima mediante zimogramas en geles de poliacrilamida en condiciones nativas y suplementados con glicerol y ascorbato para la mantención de la actividad durante el ensayo.

3.2.1 Estrés Hídrico.

El ensayo de estrés hídrico se efectuó siguiendo las condiciones señaladas en la sección de Materiales y Métodos, generando los cuatro regímenes de riego distintos ahí mencionados. A partir de estudios previos realizados por nuestro equipo de trabajo, se determinó que la condición control de riego sería la correspondiente a un 75% de la capacidad de campo (Tratamiento T2), ya que es en esta condición donde la planta alcanza el mayor incremento en peso fresco de sus hojas y, por consiguiente, mejor eficiencia en el uso del agua al cabo de tres meses de recibir el tratamiento de riego correspondiente (Delatorre-Herrera y col. 2010; Silva y col. 2010).

En este experimento, cuyos resultados se exhiben graficados en la Figura 4, fue posible observar que en los ápices de las hojas los niveles de actividad específica total de APX son significativamente mayores en los tratamientos T2 y T3, los cuales aproximadamente triplican a lo observados en los tratamientos T1 y T4, mientras que estos tratamientos extremos no muestran diferencia significativa entre sí. Por otra parte, el cambio observado en los niveles de actividad específica es bastante menos pronunciado en las bases de las hojas, donde tan solo el tratamiento T3 es estadísticamente distinto al resto de las condiciones analizadas.

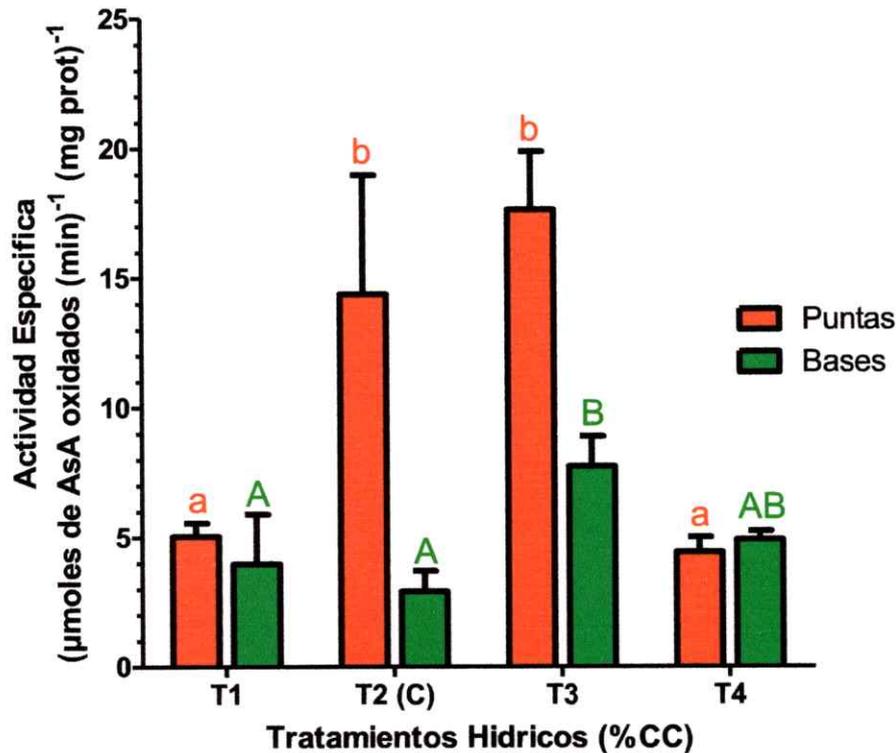


Figura 4. Actividad enzimática específica de APX en puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a cuatro tratamiento hídricos [T1, 100% Capacidad de Campo (%CC); T2(C), 75% CC (control de riego); T3, 50% CC; T4, 25% CC]. Las barras son el promedio de tres réplicas biológicas y se muestran con sus desviaciones estándar. Análisis estadísticos fueron realizados por una ANOVA de una vía. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos determinadas por el Test de Tukey (para puntas, $P=0,005$; para bases, $P=0,0062$).

Con los extractos con que se determinaron proteínas totales se realizó un zimograma para detectar actividad de APX en geles de poliacrilamida. La Figura 5-A muestra los resultados de este ensayo, en donde se transformó la imagen a escala de grises y fue posteriormente negativizada para observar de mejor forma el patrón de bandas obtenido. En esta imagen puede observarse la aparición de una banda muy nítida (señalada con una flecha de color azul) que se repite en todas las columnas. De forma más tenue se presentan al menos otras dos bandas correspondientes a isoformas de menor peso molecular, las que se indican con flechas de color negro. Si bien la magnitud de las bandas en este tipo de ensayos no necesariamente se relacionan con lo observado en pruebas de actividad total, ya que solo provee un registro cualitativo del patrón de bandas correspondientes a distintas isoformas detectables de esta enzima, la intensidad de la banda principal observada en las bases se muestra homogénea en los cuatro tratamientos, mientras que en las puntas el aparente aumento de intensidad en T2 y T3 parece relacionarse con lo observado en el gráfico de la Figura 4 para la actividad específica total.

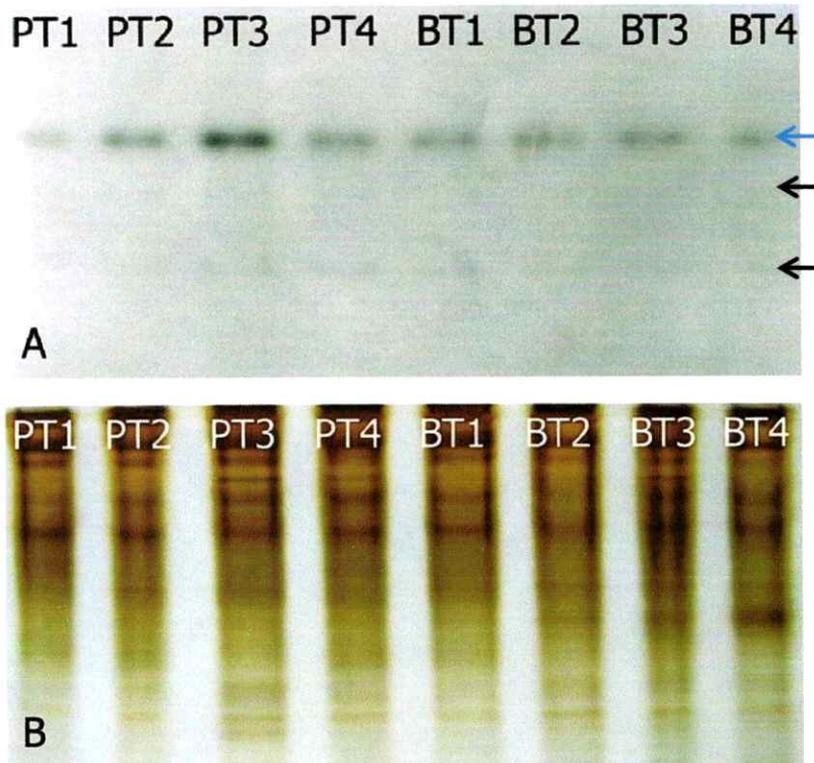


Figura 5. Zimograma de APX en extractos de puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a cuatro tratamientos de estrés hídrico. Con flecha azul se señala la isoforma predominante en todos los extractos. La nomenclatura en cada carril se refiere al tejido utilizado (P: puntas, B: bases), al tratamiento hídrico al que fue sometido la planta [T1, 100% Capacidad de Campo (CC); T2, 75% CC (control de riego); T3, 50% CC; T4, 25% CC]. A, análisis electroforético por PAGE nativo (bandas teñidas por actividad enzimática) de extractos de puntas y bases de hojas de plantas sometidas a los 4 tratamientos hídricos; B, control de carga obtenido por PAGE nativo con tinción de plata, se observa la totalidad de las proteínas

3.2.2 Estrés Térmico.

Como se puede apreciar en la Figura 6, los ensayos de actividad específica de APX en condiciones de estrés térmico mostraron diferencias mucho menos pronunciadas entre los distintos tratamientos aplicados que lo observado en el ensayo de estrés hídrico, mostrándose incluso estadísticamente iguales en el caso de las bases de las hojas. En las puntas, sin embargo, fue posible observar que la actividad específica detectada disminuyó a aproximadamente a la mitad al someter las plantas a temperaturas de 35° y 40°C, mientras que en el tratamiento de estrés más severo (45°C) la actividad enzimática detectada aumentó hasta volverse estadísticamente igual a todos los demás tratamientos.

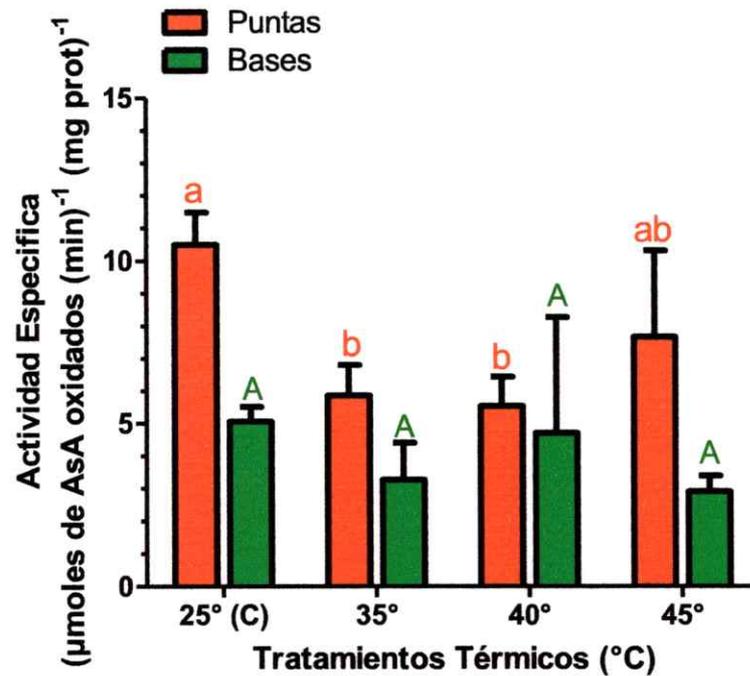


Figura 6. Actividad enzimática específica de APX en puntas y bases de hojas de Aloe vera de plantas sometidas a cuatro tratamientos térmicos [25°C (Control de Temperatura), 35°C, 40° y 45°C por dos horas]. Las barras son el promedio de tres réplicas biológicas y se muestran con las desviaciones estándar. Análisis estadísticos fueron realizados por una ANOVA de una vía. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, las que fueron determinadas por el Test de Tukey (para puntas, $P=0,0162$).

En el análisis de las isoformas de APX detectadas a través del zimograma en geles de poliacrilamida presentado en la Figura 7 fue posible identificar nuevamente las tres bandas señaladas anteriormente en el ensayo de estrés hídrico. Una vez más destaca una banda muy notoria (señalada con flecha de color azul) que se puede observar en todas las columnas, y las otras dos bandas de migración más rápida (señaladas con flechas negras) aparecen igualmente tenues. Sin embargo, en esta ocasión fue posible observar una cuarta banda (identificada con flecha de color rojo) que se sitúa por sobre la banda predominante, y que tan solo aparece de manera detectable en las bases de las hojas en los dos tratamientos de temperatura más severos (40° y 45°C).

A diferencia de lo observado en la zimografía del tratamiento de estrés hídrico, la relación entre lo observado en el gel de actividad para tratamientos de estrés térmico y la medición de la actividad específica en los mismos es menos evidente, aunque al comparar únicamente las mediciones de puntas entre sí y bases entre sí puede existir una correlación entre ambos tipos de ensayos.

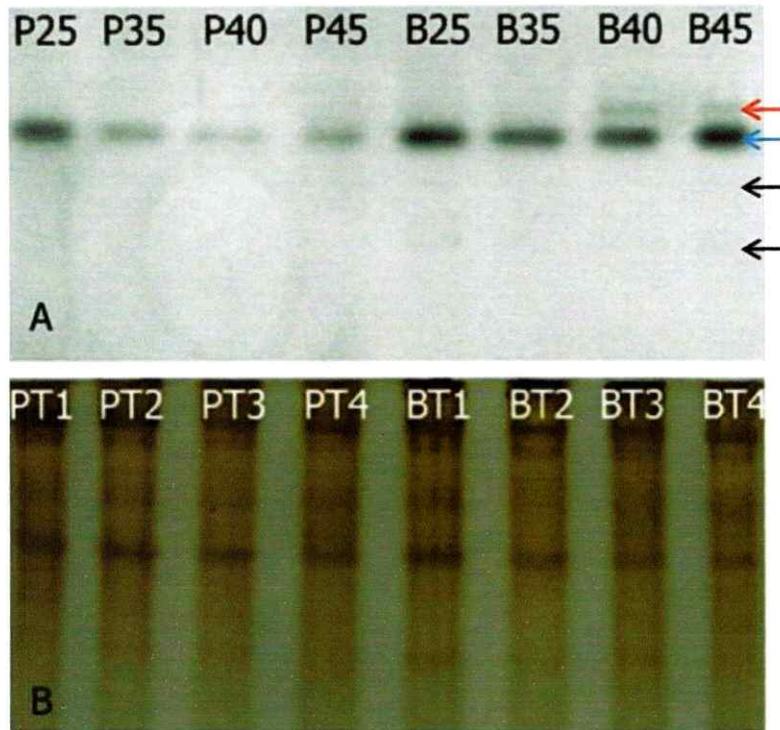


Figura 7. Zimogramas de APX en extractos de puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a estrés térmico. Con flecha azul se señala la isoforma predominante en todos los extractos; con flechas negras se muestran las isoformas que se presentan de manera muy tenue en cada columna; con flecha roja se señala la isoforma solo presente en condición de estrés térmico de 40° y 45°C. La nomenclatura en cada carril se refiere al tejido utilizado (P: puntas, B: bases), al tratamiento térmico al que fue sometido la planta [25°C (Control de Temperatura), 35°C, 40° y 45°C por dos horas]. A, análisis electroforético por PAGE nativo (bandas teñidas por actividad enzimática) de extractos de puntas y bases de hojas de plantas sometidas a los 4 tratamientos de temperatura; B, es un control de carga y se obtuvo por PAGE nativo con tinción de plata, se observa la totalidad de las proteínas

3.2.3 Estrés Combinado.

Finalizando con el análisis de la enzima Ascorbato Peroxidasa, se realizó un ensayo de estrés combinado con el fin de observar si existe interacción entre los regímenes de déficit hídrico y de exceso de temperatura al mezclarlos en distintas combinaciones, y si esta interacción es detectable en la forma de un alza o baja en los niveles de actividad enzimática o en la aparición de las distintas isoformas de APX. Tal como puede observarse en la Figura 8, en donde se muestra un gráfico que integra los principales valores encontrados en los tratamientos de estrés hídrico y térmico realizados de forma individual, así como los obtenidos de la combinación de estos, se puede observar que la actividad específica de APX no muestra una gran variación en los extractos crudos obtenidos de las bases de las hojas, siendo todos éstos estadísticamente iguales a cada uno de los tratamientos anteriores, incluyendo lo obtenido en la condición de control de riego y temperatura (T2+25°C, control doble). Por otro lado, la actividad específica detectada en las puntas de las hojas experimenta una disminución significativa en prácticamente todos los tratamientos combinados de estrés, con la única excepción del tratamiento menos severo (T3+40°), en donde los valores obtenidos son estadísticamente iguales a lo observado en el control doble en el mismo tipo de tejido.

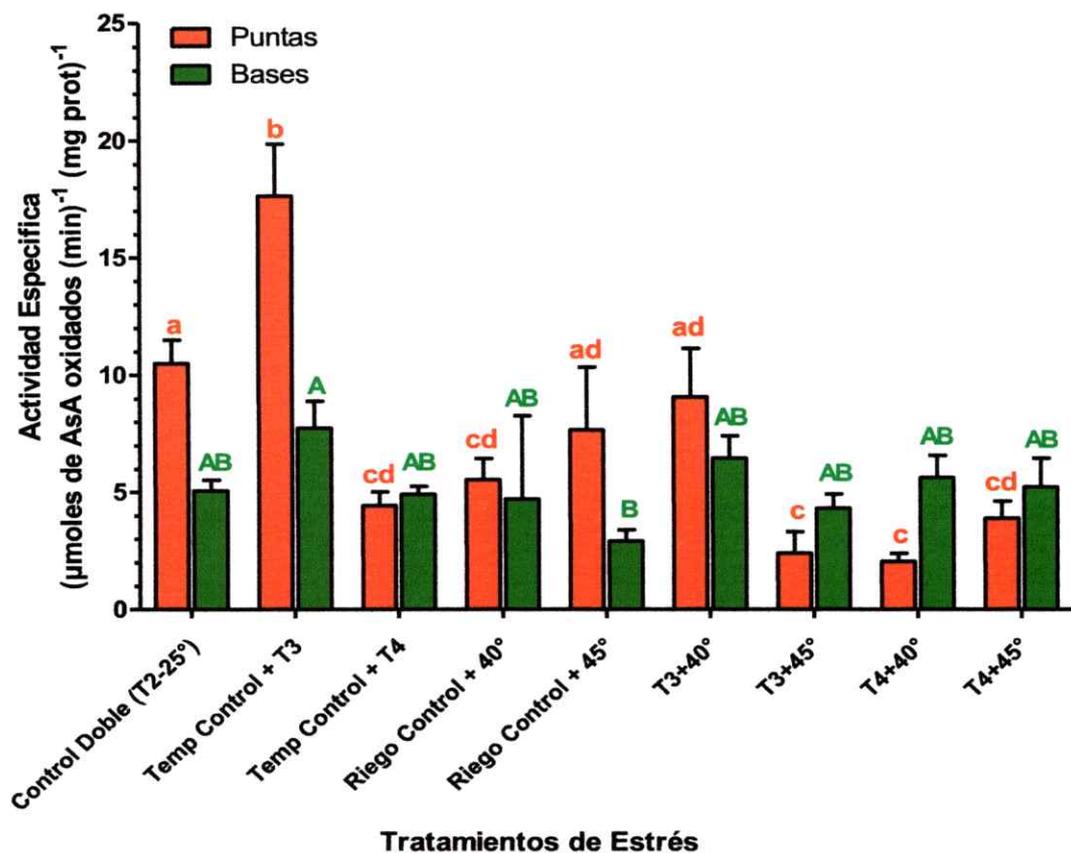


Figura 8. Actividad enzimática específica de APX en puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a diferentes condiciones de estrés combinado hídrico y térmico. La nomenclatura en cada grupo se refiere al tratamiento hídrico al que fue sometido la planta (T2: 75% Capacidad de Campo (CC), T3: 50% CC y T4: 25% CC) o al tratamiento térmico (25°C, 40°C y 45°C) y las correspondientes combinaciones de estos. Las barras son el promedio de tres réplicas biológicas y se muestran con sus desviaciones estándar. Análisis estadísticos fueron realizados por una ANOVA de una vía. Letras diferentes significan diferencias significativas entre tratamientos determinadas por el Test de Tukey (para las puntas, $P < 0,0001$; para las bases, $P = 0,0367$).

Los zimogramas construidos para las condiciones de estrés combinado muestran un patrón similar a lo observado en el resto de los tratamientos anteriores en el caso de las puntas de las hojas, aunque en esta ocasión no fue posible detectar ninguna banda adicional ubicada por debajo de la banda principal señalada con la flecha azul, tal como se observa en la Figura 9. En el caso de las bases de las hojas destaca nuevamente la aparición de la banda de migración más lenta (señalada con flecha roja) apreciable sobre la isoforma de APX más característica, aunque en esta ocasión la banda aparece tan solo en el tratamiento T3+40°C, siendo imposible de detectar en el resto de las columnas correspondientes a los tratamientos más severos.

La correlación entre ambos tipos de ensayos de medición de actividad parece ser menos clara bajo estas condiciones, al no poder relacionarse tan fácilmente la intensidad de las bandas observadas con la medición de actividad específica de los extractos crudos. Sin embargo, la zimografía cumple su función en la demostración cualitativa de la aparición y atenuación de isoformas de APX como aquella indicada por la flecha roja en la Figura 9.

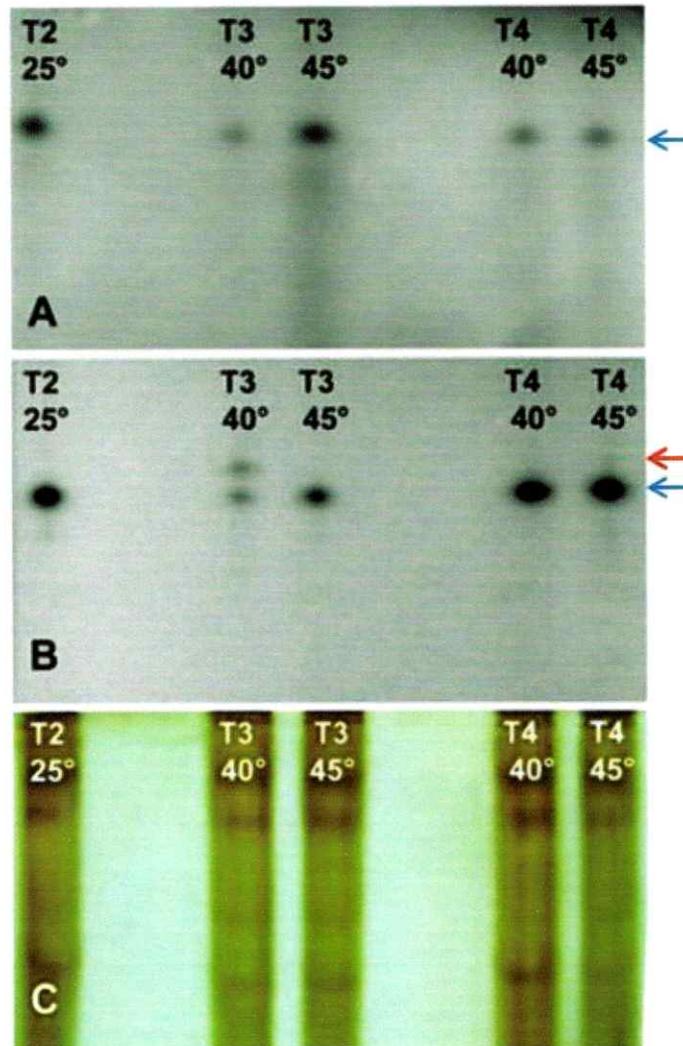


Figura 9. Zimografías de APX en extractos de puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico y térmico combinados. Con flecha azul se señala isoforma predominante en todos los extractos (presumiblemente APX1); con flecha roja se señala la isoforma solo presente en condición de estrés térmico (presumiblemente APX2). La nomenclatura en cada carril se refiere al tratamiento hídrico al que fue sometido la planta (T2: 75% Capacidad de Campo (CC), T3: 50% CC y T4: 25% CC) o al tratamiento térmico (25°C, 40°C y 45°C). A, análisis electroforético por PAGE nativo de extractos de puntas de hojas de plantas sometidas a estrés combinado (bandas detectadas por actividad enzimática); B, análisis

electroforético por PAGE nativo de extractos de bases de hojas de plantas sometidas a estrés combinado (bandas detectadas por actividad enzimática); C, PAGE nativo en que las bandas de proteínas fueron detectadas con tinción de plata.

3.3 Determinación de Ascorbato, Dehidroascorbato y Estado Redox.

Para complementar el análisis iniciado con la caracterización de la enzima ascorbato peroxidasa ante las distintas condiciones de estrés utilizadas, se propuso continuar con una caracterización del contenido de ascorbato y de las variaciones que presenta este metabolito en el tejido de las hojas de Aloe vera sometidas a déficit hídrico y aumento de temperatura. Con el fin de obtener un perfil completo de la concentración de esta importante molécula antioxidante, se determinó tanto el contenido total de ascorbato, como las concentraciones de su forma reducida y oxidada, lo que permitirá a su vez conocer el índice conocido como Estado Redox de Ascorbato, lo cual permite hacer una comparación objetiva entre los efectos producidos en la planta a consecuencia del estrés oxidativo gatillado por las dos condiciones de estrés abiótico antes señaladas.

3.3.1 Contenido total de ascorbato.

A partir del ensayo descrito en la sección 1.6.4 del capítulo de Materiales y Métodos fue posible obtener como primer resultado relevante el contenido total de ascorbato en el tejido de Aloe vera analizado, lo que comprende la suma de sus formas reducida y oxidada, y que permite observar las variaciones en la reserva total de este antioxidante no enzimático en las distintas condiciones de estrés abiótico estudiadas. Como se puede observar en la Figura 10, las condiciones de estrés correspondientes a déficit hídrico y alta temperatura por si solos no son capaces de provocar diferencias significativas en el contenido total de AsA con respecto a la condición control doble, con

la única excepción de las puntas de las hojas en la condición T4 de riego que muestran una leve, aunque significativa disminución del contenido de este compuesto. Destaca sin embargo en este grafico el evidente efecto de la interacción de ambas condiciones de estrés en la mayoría de los tratamientos combinados analizados. Tan solo la condición T3+40° mostró niveles similares al control doble, mientras que en los otros tratamientos combinados la disminución fue muy significativa en cada caso, tanto en la punta de las hojas como en la base de estas.

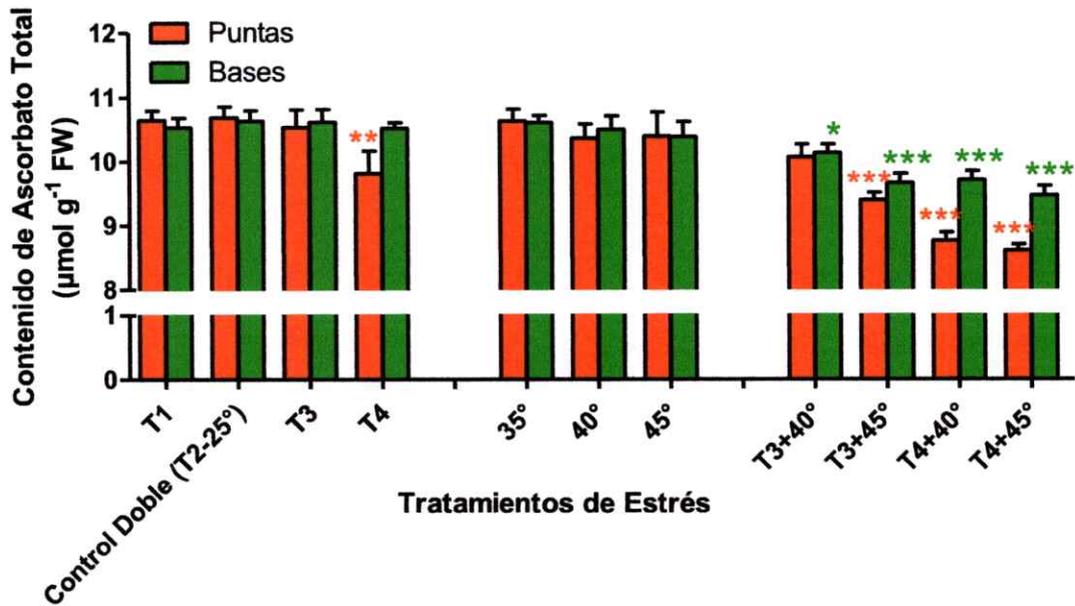


Figura 10. Contenido total de ascorbato en puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera en las distintas condiciones de estrés analizadas. La nomenclatura en cada grupo se refiere al tratamiento hídrico al que fue sometido la planta (T1: 100% Capacidad de Campo (CC), T2: 75% CC, T3: 50% CC y T4: 25% CC) o al tratamiento térmico (25°C, 40°C y 45°C) y las correspondientes combinaciones de estos. Las barras son el promedio de 3 réplicas biológicas y se muestran con las desviaciones estándar. Análisis estadísticos fueron realizados por una ANOVA de una vía. Letras diferentes significan diferencias significativas entre tratamientos determinadas por el Test de Tukey (* = P entre 0,01 y 0,05; ** = P entre 0,001 y 0,01; *** = P<0,001)..

3.3.2 Contenido de ascorbato (AsA) y dehidroascorbato (DHA).

Para conocer en que condición antioxidante se encuentra este compuesto en los distintos tejidos sometidos a estrés abiótico se cuantificó ascorbato y dehidroascorbato en cada caso, permitiendo generar los gráficos que se muestran a continuación. En la Figura 11 se muestra las concentraciones obtenidas para AsA y DHA en las puntas de las hojas de Aloe vera para cada tratamiento. En prácticamente todos los tratamientos es posible observar la disminución significativa de los niveles de ascorbato reducido (AsA) hasta alcanzar en el tratamiento combinado más severo un descenso de aproximadamente un 50% respecto al contenido presente en la condición control, punto en el cual la concentración de la forma reducida alcanza en promedio niveles similares a las de la forma oxidada. El comportamiento de DHA se muestra inversamente proporcional a lo exhibido por su contraparte reducida, aumentando al doble en la condición de estrés combinado T4+45° con respecto al tratamiento control doble.

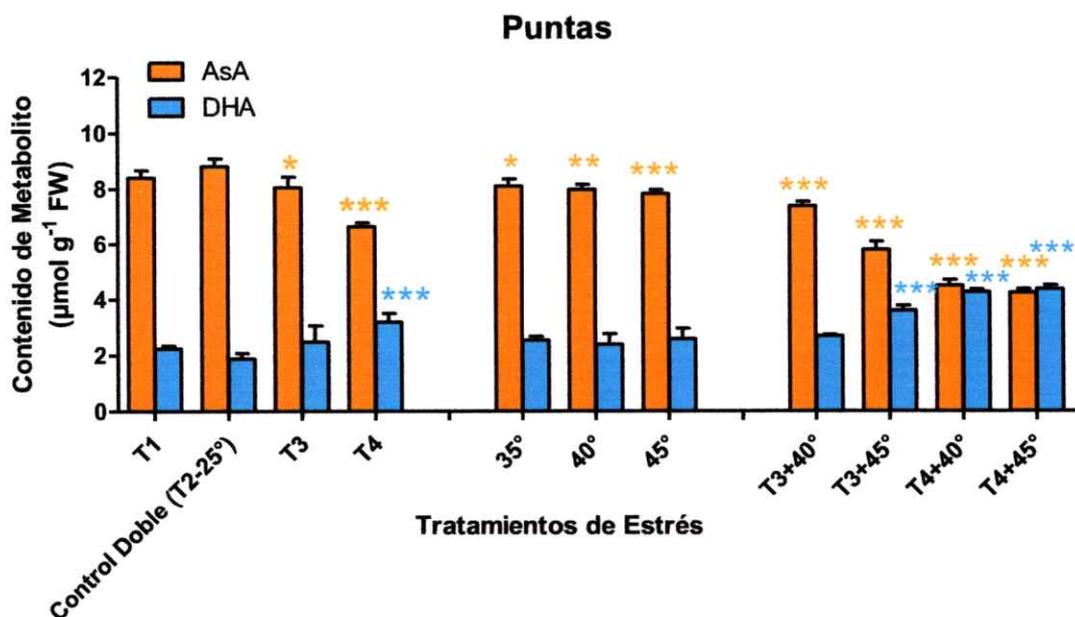
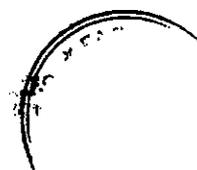


Figura 11. Contenido de ascorbato (AsA) y dehidroascorbato (DHA) en las puntas de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico, térmico y combinado. La nomenclatura en cada grupo se refiere al tratamiento hídrico al que fue sometido la planta (T1: 100% Capacidad de Campo (CC), T2: 75% CC, T3: 50% CC y T4: 25% CC) o al tratamiento térmico (25°C, 40°C y 45°C) y las correspondientes combinaciones de estos. Las barras son el promedio de tres réplicas biológicas y se muestran con sus desviaciones estándar. Análisis estadísticos fueron realizados por una ANOVA de una vía. Letras diferentes significan diferencias significativas entre tratamientos determinadas por el Test de Tukey (* = P entre 0,01 y 0,05; ** = P entre 0,001 y 0,01; *** = P<0,001)..

La Figura 12 por otra parte muestra el comportamiento de estos dos metabolitos en la base de las hojas de Aloe vera, evidenciando esta vez variaciones mucho menos pronunciadas que lo observado en las puntas de las mismas hojas. Mientras que ninguno de los tratamientos térmicos por si solo exhibe cambios significativos en el contenido de ambas formas de ascorbato en el tejido, tan solo el tratamiento T4 de riego fue capaz de provocar este tipo de cambios. Sin embargo, resulta claro que una vez más fue la interacción de ambos tipos de estrés abiótico lo que desencadenó fluctuaciones más pronunciadas en las concentraciones de AsA y DHA detectables, mostrando una disminución muy significativa de la forma reducida en cada una de estas condiciones, y los consiguientes aumentos de la forma oxidada, aunque solo en los tratamientos de estrés que involucraron la condición de riego T4 fue posible detectar un alza significativa de sus niveles.



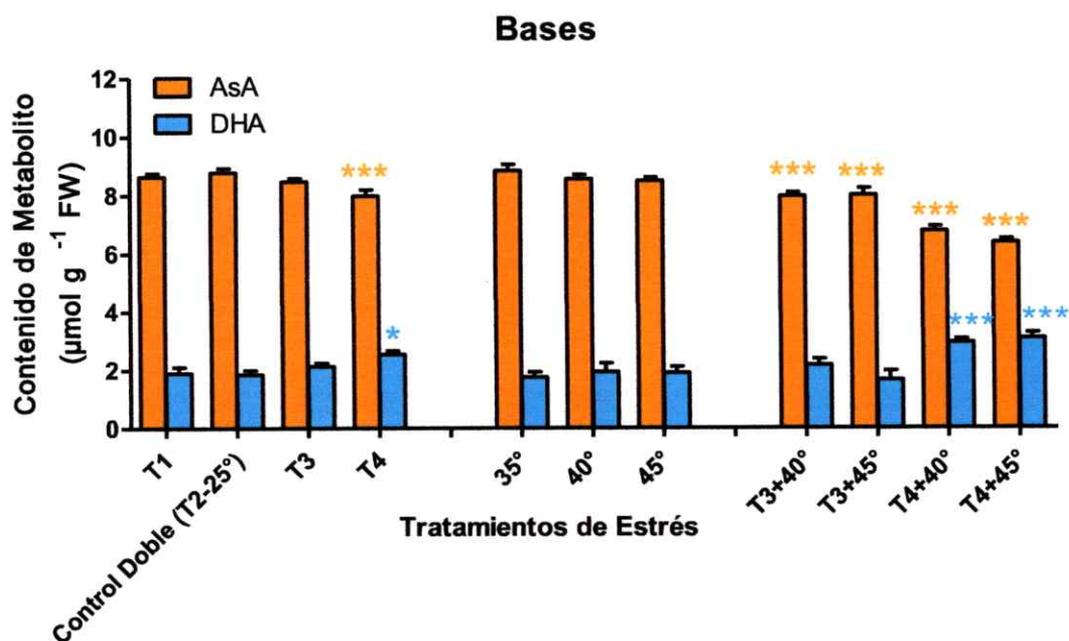


Figura 12. Contenido de ascorbato y dehidroascorbato en las bases de hojas de plantas de Aloe vera sometidas a condiciones de estrés hídrico, térmico y combinado. La nomenclatura en cada grupo se refiere al tratamiento hídrico al que fue sometido la planta (T1: 100% Capacidad de Campo (CC), T2: 75% CC, T3: 50% CC y T4: 25% CC) o al tratamiento térmico (25°C, 40°C y 45°C) y las correspondientes combinaciones de estos. Las barras son el promedio de tres réplicas biológicas y se muestran con sus desviaciones estándar. Análisis estadísticos fueron realizados por una ANOVA de una vía. Letras diferentes significan diferencias significativas entre tratamientos determinadas por el Test de Tukey (* = P entre 0,01 y 0,05; ** = P entre 0,001 y 0,01; *** = P<0,001)..

3.3.3 Estado Redox de Ascorbato.

Por último se presenta un arreglo de los datos anteriormente exhibidos que da cuenta de un índice conocido como Estado Redox de ascorbato, el cual se utiliza comúnmente para describir la carga reductora de este par antioxidante y proveer una estimación del grado de estrés oxidativo en el tejido con relación al par AsA/DHA.

En la Figura 13 se muestra la gráfica que presenta las variaciones de este índice en todas las condiciones de estrés abiótico analizadas. Como la mayoría de los datos observados en este estudio, en las bases de las hojas las variaciones son solo estadísticamente significativas en aquellas que involucran la condición de riego T4, con una mayor significancia en aquellas de estrés combinado. En las puntas esta tendencia es aún más pronunciada, con una disminución de aproximadamente un 35% del estado redox en las condiciones de estrés combinado que integran la condición de riego más severa con respecto a la condición de control hídrico y térmico.

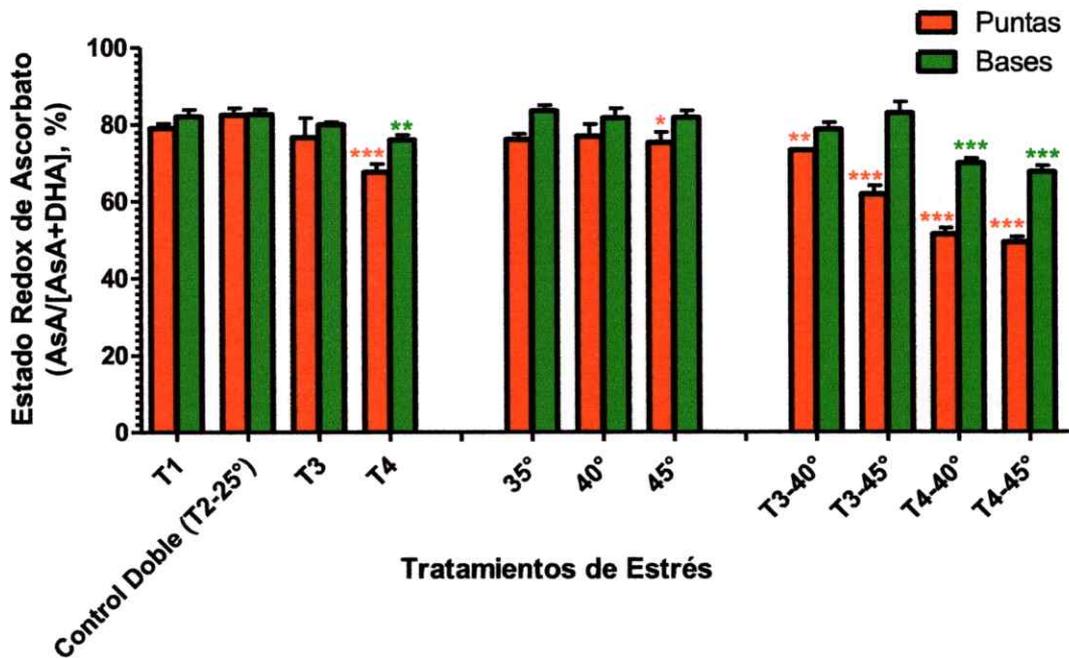


Figura 13. Estado Redox de ascorbato en puntas y bases de hojas de plantas de Aloe vera en las distintas condiciones de estrés hídrico, térmico y combinado analizadas. La nomenclatura en cada grupo se refiere al tratamiento hídrico al que fue sometido la planta (T1: 100% Capacidad de Campo (CC), T2: 75% CC, T3: 50% CC y T4: 25% CC) o al tratamiento térmico (25°C, 40°C y 45°C) y las correspondientes combinaciones de estos. El estado redox se presenta como el porcentaje correspondiente al contenido de ascorbato en su forma reducida (AsA) dividido por el contenido total de ascorbato en las muestras (AsA + DHA). Las barras son el promedio de tres réplicas biológicas y se muestran con sus desviaciones estándar. Análisis estadísticos fueron realizados por una ANOVA de una vía. Letras diferentes significan diferencias significativas entre tratamientos determinadas por el Test de Tukey (* = P entre 0,01 y 0,05; ** = P entre 0,001 y 0,01; *** = P<0,001)..

4. DISCUSIÓN

Ante las condiciones climáticas cambiantes que hoy presenta el planeta, donde destacan el aumento de las temperaturas extremas, la menor disponibilidad de agua para riego y las crecientes pérdidas del sector agrícola debido a estos cambios (Teixeira y col. 2013), en los últimos años se ha incrementado el esfuerzo por conocer en profundidad la respuesta metabólica de las diversas especies tolerantes a estas condiciones adversas de estrés abiótico. Este conocimiento resulta de vital importancia, tanto para el impulso de programas de mejoramiento genético destinados a obtener nuevas variedades resistentes a estas condiciones, como para poder impulsar el cultivo y desarrollo de aquellas variedades de potencial interés comercial que estén naturalmente adaptadas a climas extremos (Gross y col. 2013; Kang y Banga, 2013). Esto último puede permitir el desarrollo de actividad agrícola incluso en sectores donde antes no era posible por las distintas limitaciones ambientales, especialmente en el caso de las plantas CAM como *Aloe vera*, las que gracias a sus bajos requerimientos hídricos y alta capacidad de tolerar ambientes áridos, pueden ser cultivadas en las regiones de nuestro país que presenten clima desértico (Borland y col. 2009; Delatorre-Herrera y col. 2010, Silva y col. 2010).

En este Seminario de Título se buscó poner énfasis en la caracterización de dos componentes de la maquinaria antioxidante destinada a la eliminación del peróxido de hidrogeno en la célula vegetal en tejido de *Aloe barbadensis* Miller: la enzima ascorbato peroxidasa, parte esencial del sistema de antioxidantes enzimáticos; y el ascorbato,

correspondiente al grupo de antioxidantes no enzimáticos. Sin embargo, a pesar de tener una naturaleza completamente distinta, ambas participan en la respuesta antioxidante de forma estrechamente relacionada, ya que en ausencia de ascorbato la enzima ascorbato peroxidasa no solo carece del exclusivo sustrato reductor necesario para catalizar la eliminación de H_2O_2 y transformarlo en H_2O , sino que además se inactiva rápida e irreversiblemente. Por ello la caracterización de estos dos elementos permite realizar un análisis comprensivo de este sistema antioxidante en particular, así como arrojar luces sobre el estado del resto del sistema que AsA y APX componen como integrantes de su etapa inicial.

En la naturaleza, las plantas no se encuentran sometidas a tan solo un tipo de estrés a la vez. En el caso de una planta como Aloe vera creciendo en el desierto, además de enfrentarse a la baja disponibilidad de agua y alta temperatura, ésta debe enfrentar otros tipos de estrés como el inducido por la salinidad del suelo, la alta incidencia de luz sobre el aparato fotosintético en las hojas, estrés por congelamiento en las mañanas, altas concentraciones de metales pesados, etc., por lo que este ensayo es solo una muestra de cómo estas respuestas van generando condiciones cada vez más restrictivas a medida que se van agregando. Si bien las plantas CAM están adaptadas a las condiciones que pueden encontrar en ambientes desérticos, no quiere decir que no sufran los efectos de la baja disponibilidad de agua y el consiguiente daño oxidativo. La adaptación principal, correspondiente a la captación de CO_2 durante la noche para evitar la pérdida de H_2O , puede verse alterada cuando la deficiencia de agua y las altas temperaturas son extremas. Para evitar al máximo la pérdida de agua, la planta puede entrar en un estado conocido

como CAM-idling (CAM inactivo), donde mantiene los estomas cerrados incluso durante la noche (Rayder y Ting, 1983; He y col. 2013) Este estado permite la mantención de los niveles internos de agua y del funcionamiento de la maquinaria fotosintética, pero la planta se ve forzada a alimentar el ciclo de ácido orgánico a través del reciclaje interno de CO₂ que es re-fijado en la noche, con lo que sacrifica su tasa de crecimiento, debe consumir los carbohidratos almacenados en el hidrénquima y disminuye su eficiencia fotoquímica, produciendo fotoinhibición (de Mattos y col. 1999; Lüttge, 2004; Matiz y col. 2013; Rodríguez y col. 2014). Si bien estos organismos pueden mantener este CAM-idling incluso por años y volver a restablecer el metabolismo al percibir un aumento en la disponibilidad de agua, las plantas se encuentran prácticamente “momificadas” durante tal periodo, y lejos del ideal que la industria busca en este tipo de especies de cultivo.

Los ensayos de estrés abiótico diseñados y las distintas condiciones de estrés hídrico y térmico fueron previamente validados por otros integrantes del grupo de trabajo, y forman parte de una caracterización global de la respuesta metabólica de Aloe vera a las condiciones sometidas (Delatorre-Herrera y col. 2010; Silva y col. 2010; Ramírez y col. 2012; Huerta y col. 2013).

En la mayoría de los ensayos realizados destaca en primer lugar las diferencias detectadas en las puntas y en las bases, tanto en la medición de la actividad específica como en las concentraciones de ascorbato. Mientras que en las puntas es posible observar fluctuaciones positivas y negativas en los índices de actividad específica y una disminución significativa de la reserva de ascorbato reductor con respecto al grupo

control, en las bases de las hojas se presentan variaciones mucho menos pronunciadas, sin evidenciar diferencias significativas con los controles en la mayoría de los casos. Esto está probablemente relacionado con la mayor disponibilidad de agua y reservas en la base de las hojas en comparación a las puntas de estas, debido a que el gel es más abundante en las bases que en las puntas. La gran concentración de azúcares y polisacáridos presentes en el gel que caracteriza a las hojas de Aloe vera son los responsables del ajuste osmótico requerido en condiciones de aridez, permitiendo a la planta acumular una gran cantidad de agua en este gel y contar con ella incluso cuando se encuentra sometida a condiciones de riego deficitario durante varios meses (Delatorre-Herrera y col. 2010). La baja disponibilidad de agua es un factor crítico en la aparición de especies reactivas de oxígeno, y la mantención de la homeostasis celular en condiciones de estrés oxidativo. Bajo condiciones de estrés hídrico, la producción de especies reactivas de oxígeno es fuertemente impulsada, tanto por la fuga de electrones provenientes de la cadena fotosintética hacia la reacción de Mehler en donde se da origen a radical superóxido, así como también por efecto de la producción de peróxido de hidrogeno a consecuencia de la fotorrespiración en diversos organelos. (Bartoli y col. 1999; Cruz de Carvalho, 2008; Zhang y col. 2013). Por todo lo anterior, la variación en los distintos parámetros medidos en las puntas de las hojas tendría una conexión con la menor disponibilidad de agua en estos tejidos, los que además están más expuestos a verse afectados por aumento de la temperatura ambiental, la cual puede provocar una elevación de la carga de ROS debido al efecto sobre la estabilidad de las membranas de cloroplastos y mitocondrias, y afectando reacciones bioquímicas como la actividad de la Ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa, causando un aumento en la fotorrespiración en la

fotosíntesis (Sekmen y col. 2014), actividad que se mantenía reducida al mínimo gracias al metabolismo CAM (Ramírez y col. 2012).

Respecto a la actividad específica de APX en estrés hídrico, llama la atención los altos niveles observados en las puntas de las hojas de plantas sometidas a los tratamientos T2 y T3 en comparación a lo observado en T1 y T4, aunque el comportamiento de esta enzima muestra una estrecha relación con lo observado para la actividad específica de superóxido dismutasa (SOD) previamente analizada por nuestro grupo de trabajo en estas mismas condiciones de riego (Ramírez y col. 2012). La disminución de la actividad de esta enzima en el tratamiento más severo puede guardar relación con la alteración del equilibrio oxidativo en esta condición y la mayor concentración de las diversas especies reactivas de oxígeno, las que al sobrepasar ciertas concentraciones pueden afectar diversas estructuras celulares, pudiendo incluso inhibir la acción de enzimas detoxificantes como la misma ascorbato peroxidasa de forma directa al dañar su estructura o por la eliminación de ascorbato del medio circundante (Hossain y Asada, 1984; Ishikawa y Shigeoka, 2008).

En la condición de estrés térmico aplicado individualmente se observó niveles de actividad algo menores a los observados en la condición de control a temperatura ambiente en las puntas, condición que resultó más crítica aun cuando se combinaron estos aumentos en la temperatura con la condición de riego más restrictiva, llegando a niveles incluso inferiores al 25% con respecto a la condición de control doble. Esto indicaría que las condiciones de temperatura utilizadas son suficientemente significativas como para causar un efecto negativo en la actividad de esta enzima, y que

el efecto causado por la interacción de los dos tipos de estrés podría configurar un escenario con condiciones letales para la planta (al menos en esta región de la hoja). Tal inferencia es en parte corroborada con los experimentos descritos más adelante.

En las bases, por otra parte, casi no se observan variaciones significativas en los niveles de la actividad de esta peroxidasa. Y esto no solo es cierto para este ensayo de estrés hídrico, sino que para prácticamente todas las condiciones de estrés analizadas, indicando que en esta región de la hoja las distintas características adaptativas que posee esta planta, en especial la gran acumulación de polisacáridos capaces de retener el agua constituyendo un gel, realmente le son de gran utilidad para aliviar los efectos del estrés oxidativo inducido por las condiciones de estrés abiótico a la que es sometida. En las bases existe además una acumulación de fructanos, polisacáridos que protegen las membranas celulares cuando hay falta de agua (Salinas 2012).

Complementando estas observaciones, los zimogramas revelan la presencia de varias isoformas de APX detectables en la fase soluble de los extractos crudos de proteínas realizados a estos tejidos. Los patrones aquí observados muestran la aparición de una banda principal en todas las muestras obtenidas, la que de acuerdo a la literatura se trataría de APX1, la isoforma citoplásmica más claramente detectable en este tipo de extractos en todo tipo de especies, y responsable de la mayor parte de la actividad específica cuantificable en base a los ensayos anteriormente descritos (Yoshimura y col. 2000; Panchuck y col. 2002; Shigeoka y col. 2002; Davletova y col. 2005; Koussevitzky y col. 2008). Estos estudios muestran que, aunque los niveles de expresión génica de esta enzima son regulados por múltiples condiciones de estrés

biótico y abiótico (así como otras condiciones fisiológicas), los niveles de esta isoforma siempre permanecen altos y corresponderían a una de las principales barreras de contención con las que cuenta la célula para mantener los niveles de H_2O_2 bajo control. Sin embargo, en esta investigación no es posible concluir que esta banda corresponde efectivamente a la isoforma citoplasmática APX1, ya que no se realizaron ensayos inmunológicos (Western blot), con anticuerpos específicos que identifiquen a esta isoforma.

Además de esta forma tan claramente reconocible, llama la atención la aparición de otra banda de intensidad intermedia que presenta una velocidad de migración levemente menor, y que solo es posible de detectar en condiciones de estrés térmico en la base de las hojas (Figura 7 y 9, flecha roja). Ésta correspondería a APX2, una segunda isoforma citoplásmica de esta enzima la cual se ha descrito con anterioridad que es expresada y cuya actividad es detectable solo en algunas condiciones de estrés abiótico, como son el estrés por exceso de luz, salinidad y temperatura (Panchuck y col. 2002; Suzuki y col. 2013). Igual que en el caso de APX1, no podemos confirmar que esta isoforma corresponde a la denominada APX2, ya que solo anticuerpos específicos generados contra APX2 pueden identificar esta banda como tal. Sin embargo, cabe destacar que aparece tan solo en las bases de las hojas en las dos temperaturas más altas del ensayo de térmico individual y solo en el tratamiento menos agresivo del estrés combinado ($T3+40^\circ$), para luego no mostrar actividad detectable en las combinaciones más restrictivas. Esta característica puede relacionarse con lo observado en la literatura, donde es posible observar que en condiciones de estrés térmico se induce la expresión

del gen responsable de la síntesis de APX2 y su actividad es detectable en zimogramas, pero cuando las temperaturas sobrepasan cierto umbral la expresión es nuevamente inhibida hasta niveles prácticamente indetectables como sucede a temperatura control, y cuyo descenso se correlaciona también con lo observado cuando se aplican concentraciones elevadas de H_2O_2 (Panchuck y col. 2002; Volkov y col. 2006). Considerando que estudios como el de Volkov y col. (2006) muestran que concentraciones elevadas de AsA y otros antioxidantes mantienen inhibida la expresión de APX2 (y no la de APX1), se podría inferir que la aparición de esta isoforma en las bases de las hojas solo fue impulsada por condiciones de mayor concentración de peróxido que solo se dieron cuando la temperatura aplicada excedió los $35^\circ C$, y que condiciones oxidativas mucho más severas, como las presentes en los tratamientos combinados T3+ 45° , T4+ 40° y T4+ 45° , fueron suficientemente elevadas como para inhibir la expresión y síntesis de estas isoformas y volverlas indetectables en el resto de las muestras.

En cuanto a la comparación de resultados en medición de actividad específica y lo observado en los zimogramas, cabe destacar que esta última prueba fue utilizada únicamente para detectar cualitativamente las distintas isoformas que podían ser detectadas en los extractos obtenidos. Esto ya que las condiciones en las que cada ensayo se realiza son muy dispares y la rápida inactivación de la enzima se ve reflejada con distinta intensidad en cada ensayo. Por ejemplo, en zimogramas realizados con los extractos obtenidos en las puntas de las hojas se espera una inactivación más rápida de la enzima, debido a la menor cantidad de ascorbato presente en la muestra original. A pesar

de complementar el PAGE nativo con glicerol y AsA para extender la funcionalidad de la enzima, las condiciones iniciales de la muestra son muy dispares y probablemente afectan de distinta forma a la enzima en un ensayo tan extenso como la elaboración de la zimografía (6 horas de corrida).

La realización del ensayo que permitió la cuantificación del par AsA/DHA en los distintos tratamientos sirvió como complemento para los análisis de APX iniciales. Conocer tanto el contenido total de la reserva de ascorbato en la célula como las concentraciones individuales de las forma reducida y oxidada de este antioxidante muestra de que forma está viéndose afectada la homeostasis celular a consecuencia del estrés oxidativo gatillado en las distintas condiciones analizadas.

En primer lugar, fue posible observar una disminución de la reserva total de ascorbato en los tratamientos de estrés hídrico y térmico combinados, aunque las condiciones de estrés aplicadas de forma individual no presentaron variaciones considerables. Esto muestra de forma clara como la interacción de estos dos tipos de estrés dan origen a una condición mucho más severa, especialmente en la punta de las hojas, donde una vez más se aprecia una mayor sensibilidad a los cambios ambientales que producen estrés a consecuencia de su menor disponibilidad de agua y el rápido aumento de la temperatura. En estas condiciones, probablemente las enzimas responsables de la síntesis de ascorbato son insuficientes para recuperar el ascorbato y, posiblemente la reserva total de ascorbato comienza a agotarse. Sin embargo, aunque los niveles de ascorbato no alcanzan valores muchísimo menores a lo observado en la condición control, ya que la disminución más pronunciada alcanzó un descenso de

aproximadamente un 10% respecto al tratamiento T2+25°, no se conoce cuáles son los niveles requeridos para mantener el sistema sustentable por mayor tiempo. Pero más importante que este indicador del contenido total de ascorbato es conocer el equilibrio entre las dos formas del par ascorbato/dehidroascorbato, ya que es un indicador de la capacidad actual del sistema para enfrentar la condición oxidativa que enfrenta (Noctor y Foyer, 1998; Gallie, 2013).

En condiciones control, tanto en puntas como en bases de las hojas, el nivel de ascorbato en su forma reducida (AsA) se mantiene aproximadamente 4 veces mayor que el dehidroascorbato (DHA), su contraparte oxidada, y aunque es posible observar diferencias significativas en los distintos tratamientos de estrés abiótico aplicados separadamente, es solo en aquellos donde el tratamiento hídrico y el térmico se combinan donde se pueden observar las diferencias más marcadas. Especialmente en las puntas de las hojas, donde los niveles de ambos compuestos del par AsA/DHA se encuentran en concentraciones casi iguales, lo que explica las observaciones señaladas en puntos anteriores: en estas condiciones de estrés combinado intenso la capacidad antioxidante de la célula se ve gravemente comprometida, ya que la pérdida crítica de la proporción existente entre las dos formas de este compuesto antioxidante da luces del compromiso que el resto de la maquinaria antioxidante enzimática debe estar sufriendo. Particularmente, es posible que la actividad de las enzimas pertenecientes al ciclo de Ascorbato-Glutatión haya disminuido de forma similar a lo observable con la actividad de la APX en las distintas condiciones analizadas. Esto debido a que en el estado actual son incapaces de restaurar las moléculas de AsA que han resultado oxidadas, ya sea por

su utilización como sustrato de APX en la vía enzimática o bien por reacción directa con los ROS. La concentración de estas especies reactivas de oxígeno da señales de haber aumentado fuertemente dentro de la célula, mucho más allá de la capacidad que tiene ésta de poder controlarlos, lo que induciría la pérdida del equilibrio en la maquinaria antioxidante.

El estado redox de ascorbato, que permite entender de mejor forma la capacidad reductora de este compuesto en relación al total de la reserva presente en determinada condición (Munné-Bocsh y Alegre, 2003), permiten observar los descensos netos en la competencia antioxidante del ascorbato presente a nivel celular, bajando desde la condición control donde se encontraba cercana al 80% hasta aproximadamente un 50% en las puntas de la condición de estrés T4-45°C. La disminución de este índice no solo indica la deficiencia de estos tejidos para poder tolerar condiciones adversas de este tipo, sino que probablemente muestra una condición potencialmente letal, ya que no solo se muestra que la protección enzimática de APX y otras enzimas del ciclo ascorbato-glutatión se encuentran comprometidas, sino que el contenido de antioxidantes no enzimáticos también disminuye a niveles críticos. Suponiendo que la integridad de diversas estructuras subcelulares de importancia podrían estar viéndose afectadas por las evidentes alzas en los niveles de ROS, es posible que el tejido se encuentre seriamente comprometido en una condición de muerte celular, la que como sabemos, se encuentra mediada por H₂O₂ entre otros (Petrov y Van Breusegem, 2012). Estas conjeturas se podrían relacionar a observaciones hechas al material vegetal con el que se trabajó, en el cual fue posible apreciar en aquellas plantas sometidas a las condiciones más restrictivas

la pérdida de tejido en la punta de las hojas, el cual en primera instancia abandonaba su color verde y era reemplazado por una tonalidad marrón, para luego continuar con la pérdida de succulencia y la posterior muerte del tejido. En las bases sin embargo este daño era mucho menor, causando rara vez la muerte de la hoja completa, lo que se podría explicar en parte por la mantención del equilibrio que se evidencia en todos los ensayos anteriormente señalados.

A la luz de todo lo anterior, resulta evidente que el tratamiento de riego aplicado a las plantas de Aloe vera constituye el factor de manejo agronómico más importante que debe ser controlado con el fin de asegurar la integridad de la planta ante las condiciones de estrés oxidativo que podrían poner en riesgo la producción de gel. El riego adecuado no solo asegura una mayor eficiencia en el uso del agua y un mayor crecimiento de la planta, sino que también le permite al organismo una mayor flexibilidad para afrontar las condiciones de estrés biótico y abiótico en el medio, ya que como fue posible apreciar en este trabajo, en condiciones muy restrictivas de riego las consecuencias de un segundo tipo de estrés aplicado pueden ser fatales para la planta, incluso cuando este otro tipo de estrés no fuera potencialmente dañino por sí solo.

5. CONCLUSIONES

La actividad en las puntas de las hojas exhibió una respuesta más dinámica a las distintas condiciones de estrés analizadas, mientras que los extractos de proteína obtenidos de las bases de las mismas hojas mantuvieron niveles relativamente estables de actividad enzimática en todas las condiciones de estrés. Estas diferencias entre puntas y bases estarían relacionadas con las diferencias en disponibilidad de agua, recepción de luz, niveles fotosintéticos y otras características fisiológicas que diferencian a ambos tejidos, tal como lo soportan estudios anteriores realizados por este grupo de trabajo.

Los niveles de actividad específica de APX aumentaron a medida que el tratamiento de riego se hacía cada vez más restrictivo. Sin embargo, las condiciones de estrés hídrico más severas indujeron un descenso en los niveles de actividad de esta enzima, lo que sugiere que niveles muy altos de estrés oxidativo podrían estar afectando la funcionalidad de las enzimas antioxidantes. Comportamientos menos pronunciados se observaron en los tratamientos térmicos, aunque fue posible detectar una disminución significativa en la mayoría de los extractos obtenidos de plantas sometidas a estrés por temperatura. Esta disminución fue mucho más pronunciada al someter a las plantas a condiciones de estrés combinado.

Se pudieron detectar al menos cuatro isoformas de APX en las zimografías realizadas. Una de estas isoformas mostró una respuesta asociada a estrés térmico,

apareciendo solo bajo estas condiciones en las bases de las hojas, pero siendo indetectable cuando la condición oxidativa aumentaba en estos tejidos.

Los niveles de ascorbato disminuyeron en relación a su forma oxidada en las condiciones más restrictivas de riego y temperatura analizadas, en especial en el tratamiento hídrico correspondiente al 25% CC y a los tratamientos de estrés combinado.

A pesar de presentar diferencias significativas respecto a la condición control, el contenido total de ascorbato permaneció prácticamente estable en todas las condiciones estudiadas, aunque la capacidad reductora de esta reserva sufrió una disminución cercana al 25% en los tratamientos más severos, tal como lo indica el índice redox de ascorbato, clara señal del estado oxidativo alterado que presentan las plantas en tales condiciones.

6. PROYECCIONES

Entre las proyecciones que se pueden proponer para este trabajo resalta inmediatamente la necesidad de identificar las distintas isoformas de APX que dan cuenta de lo observado en los ensayos realizados.

Identificar mediante Western blot la correspondencia de las bandas observadas en los zimogramas a las isoformas APX1 y APX2 tal como se ha propuesto, generando (en primera instancia) anticuerpos dirigidos a secuencias consenso de estas isoformas, las que pueden ser diseñadas comparando secuencias de esta enzima obtenidas de la base de datos y que correspondan a otras plantas monocotiledóneas que puedan servir como referencia para esta tarea.

Es posible también realizar pruebas como las descritas por el grupo de Amako (Amako y col. 1994) en el cual es posible realizar ensayos de determinación de actividad específica de APX que permiten identificar el aporte de cada tipo de isoenzimas a la actividad específica total de los extractos, lo cual permitiría una caracterización mucho más completa y detallada de este parámetro.

Asimismo, resultaría interesante realizar una aproximación a la expresión génica de estas enzimas, diseñando partidores para las isoenzimas detectadas mediante Western blot y relacionando la acumulación de estas isoformas, la actividad de ellas y la expresión de los genes que dan origen a ellas.

7. PRESENTACIONES

- Estay, D., Rosales, C., Cardemil, L. (2010). "Characterization of the ascorbate peroxidase enzymatic activity in Aloe Barbadensis miller (Aloe vera) leaves during drought and heat stress". IV Reunión de Biología Vegetal. Olmué, Chile. 1 – 3 Diciembre,

8. BIBLIOGRAFIA

- Al-Ghamdi, A. A.** (2009). Evaluation of oxidative stress tolerance in two wheat (*Triticum aestivum*) cultivars in response to drought. *Int J Agric Biol*, 11, 7-12.
- Amako, K., Chen, G. X., & Asada, K.** (1994). Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology*, 35(3), 497-504.
- Apel, K., & Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Aruoma, O. I.** (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 32(7), 671-683.
- Asada, K.** (1992). Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(2), 235-241.
- Asada, K.** (1997). The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 34, 715-735.
- Asada, K.** (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology*, 50(1), 601-639.
- Azooz, M. M., Ismail, A. M., & Abou Elhamd, M. F.** (2009). Growth, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities as a selection criterion for the salt tolerance of maize cultivars grown under salinity stress. *Int. J. Agric. Biol*, 11, 21-26.
- Bartoli, C. G., Simontacchi, M., Tambussi, E., Beltrano, J., Montaldi, E., & Puntarulo, S.** (1999). Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. *Journal of Experimental Botany*, 50(332), 375-383.
- Berk, S., Tepe, B., Arslan, S., & Sarikurkcu, C.** (2011). Screening of the antioxidant, antimicrobial and DNA damage protection potentials of the aqueous extract of *Asplenium ceterach* DC. *African Journal of Biotechnology*, 10(44), 8902-8908.
- Bhattacharjee, S.** (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: Rolés in stress, senescence and signal. *Current Science*, 89(7), 1113-1121.
- Blauer, J. M., Kumar, G. N., Knowles, L. O., Dhingra, A., & Knowles, N. R.** (2013). Changes in ascorbate and associated gene expression during development and storage of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 78, 76-91.

- Borland, A. M., Griffiths, H., Hartwell, J., & Smith, J. A. C. (2009).** Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands. *Journal of Experimental Botany*, 60(10), 2879-2896.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Chen, G. X., & Asada, K. (1989).** Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant and Cell Physiology*, 30(7), 987-998.
- Christopher, J. T., & Holtum, J. A. (1996).** Patterns of carbon partitioning in leaves of crassulacean acid metabolism species during deacidification. *Plant Physiology*, 112(1), 393-399.
- Conklin, P. L., DePaolo, D., Wintle, B., Schatz, C., & Buckenmeyer, G. (2013).** Identification of Arabidopsis VTC3 as a putative and unique dual function protein kinase:: protein phosphatase involved in the regulation of the ascorbic acid pool in plants. *Journal of experimental botany*, 64(10), 2793-2804.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., & del Río, L. A. (2001).** Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in plant science*, 6(4), 145-150.
- Cruz de Carvalho, M. H. (2008).** Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signal Behav*, 3(3), 156-165.
- Davies, K. J. (1987).** Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9895-9901.
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D. J., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K., & Mittler, R. (2005).** Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 17(1), 268-281.
- De Leonardis, S., Dipierro, N., & Dipierro, S. (2000).** Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(10), 773-779.
- de Mattos, E. A., Herzog, B., & Lüttge, U. (1999).** Chlorophyll fluorescence during CAM-phases in *Clusia minor* L. under drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 50(331), 253-561.
- Del Rio, L., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M., & Barroso, J. B. (2006).** Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant physiology*, 141(2), 330-335.

- Delatorre-Herrera, J., Delfino, I., Salinas, C., Silva, H., & Cardemil, L. (2010).** Irrigation restriction effects on water use efficiency and osmotic adjustment in Aloe Vera plants (*Aloe barbadensis* Miller). *Agricultural water management*, 97(10), 1564-1570.
- Denius, H. R., & Homann, P. H. (1972).** The Relation between photosynthesis, respiration, and crassulacean acid metabolism in leaf slices of *Aloe Arborescens* Mill. *Plant physiology*, 49(6), 873-880.
- Dittrich, P., Campbell, W. H., & Black, C. C. (1973).** Phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants exhibiting crassulacean acid metabolism. *Plant Physiology*, 52(4), 357-361.
- Efimov, I., Papadopoulou, N. D., McLean, K. J., Badyal, S. K., Macdonald, I. K., Munro, A. W., Moody, P. C. E. & Raven, E. L. (2007).** The redox properties of ascorbate peroxidase. *Biochemistry*, 46(27), 8017-8023.
- Evans, P. J., Gallesi, D., Mathieu, C., Hernandez, M. J., de Felipe, M., Halliwell, B., & Puppo, A. (1999).** Oxidative stress occurs during soybean nodule senescence. *Planta*, 208(1), 73-79.
- Faize, M., Faize, L., Petri, C., Barba-Espin, G., Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M. J., Koussa, T., Rifai, L. A., Burgos, L., & Hernandez, J. A. (2013).** Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase enhance *in vitro* shoot multiplication in transgenic plum. *Journal of plant physiology*, 170(7), 625-632.
- Farmer, E. E., & Mueller, M. J. (2013).** ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual review of plant biology*, 64, 429-450.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005).** Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell Online*, 17(7), 1866-1875.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2013).** Redox signaling in plants. *Antioxidants & redox signaling*, 18(16), 2087-2090.
- Freire, M. (2009).** Evaluación de la tolerancia cruzada adquirida, entre el estrés hídrico y térmico, mediante la cuantificación de los genes hsp70 y ubiquitina, empleando RT-PCR semicuantitativo. Seminario de Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Gallie, D. R. (2013).** The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of experimental botany*, 64(2), 433-443.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010).** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.

- Gillespie, K. M., & Ainsworth, E. A. (2007).** Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. *Nature Protocols*, 2(4), 871-874.
- Gross, S. M., Martin, J. A., Simpson, J., Abraham-Juarez, M. J., Wang, Z., & Visel, A. (2013).** De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC genomics*, 14(1), 563.
- Halliwell, B. (2006).** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007).** Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, UK.
- He, J., Norhafis, H., & Qin, L. (2013).** Responses of green leaves and green pseudobulbs of CAM orchid *Cattleya laeliocattleya* Aloha Case to drought stress. *Journal of Botany*, Vol 2013.
- Herrera, A. (2009).** Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for?. *Annals of botany*, 103(4), 645-653.
- Hossain, M. A., & Asada, K. (1984).** Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. *Plant and cell physiology*, 25(7), 1285-1295.
- Hossain, Z., López-Climent, M. F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R. M., & Gómez-Cadenas, A. (2009).** Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage. *Journal of plant physiology*, 166(13), 1391-1404.
- Huerta, C., Freire, M., & Cardemil, L. (2013).** Expression of hsp70, hsp100 and ubiquitin in *Aloe barbadensis* Miller under direct heat stress and under temperature acclimation conditions. *Plant cell reports*, 32(2), 293-307.
- Isherwood, F. A., Chen, Y. T., & Mapson, L. W. (1954).** Synthesis of L-ascorbic acid in plants and animals. *Biochemical Journal*, 56(1), 1.
- Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2008).** Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(5), 1143-1154.
- Jacques, S., Ghesquière, B., Van Breusegem, F., & Gevaert, K. (2013).** Plant proteins under oxidative attack. *Proteomics*, 13(6), 932-940.
- Jiménez, A., Hernandez, J. A., del Rio, L. A., & Sevilla, F. (1997).** Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant physiology*, 114(1), 275-284.

- Kampfenkel, K., Van Montagu, M., & Inze, D. (1995).** Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical biochemistry*, 225(1), 165-167.
- Kang, M. S., & Banga, S. S. (Eds.). (2013).** *Combating Climate Change: An Agricultural Perspective*. CRC Press.
- Kehrer, J. P. (2000).** The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50.
- Kerbauy, G. B., Takahashi, C. A., Lopez, A. M., Matsumura, A. T., Hamachi, L., Félix, L. M., Pereira, P.N., Freschi, L. & Mercier, H. (2012).** Crassulacean acid metabolism in epiphytic orchids: current knowledge, future perspectives. *Applied photosynthesis*, 81-104.
- Koussevitzky, S., Suzuki, N., Huntington, S., Armijo, L., Sha, W., Cortes, D., Shulaev, V., & Mittler, R. (2008).** Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), 34197-34203.
- Lariguet, P., Ranocha, P., De Meyer, M., Barbier, O., Penel, C., & Dunand, C. (2013).** Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in *Arabidopsis*. *Planta*, 238(2), 381-395.
- Lüttge, U. (2004).** Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany*, 93(6), 629-652.
- Macdonald, I. K., Badyal, S. K., Ghamsari, L., Moody, P. C., & Raven, E. L. (2006).** Interaction of ascorbate peroxidase with substrates: a mechanistic and structural analysis. *Biochemistry*, 45(25), 7808-7817.
- Matiz, A., Mito, P. T., Mayorga, A. Y., Freschi, L., & Mercier, H. (2013).** CAM Photosynthesis in Bromeliads and Agaves: What Can We Learn from These Plants?. , *Photosynthesis*, Prof. Zvy Dubinsky (Ed.), ISBN: 978-953-51-1161-0, InTech, DOI: 10.5772/56219.
- Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. (2010).** Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment*, 33(4), 453-467.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004).** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.
- Mittler, R., & Zilinskas, B. A. (1993).** Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical biochemistry*, 212(2), 540-546.

- Miyake, C., & Asada, K.** (1992). Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant and Cell Physiology*, 33(5), 541-553.
- Munné-Bosch, S., & Alegre, L.** (2003). Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents. *Plant Physiology*, 131(4), 1816-1825.
- Nakano, Y., & Asada, K.** (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880.
- Nielsen, B. L., & Brown, L. R.** (1984). The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 141(2), 311-315.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., Yoshida, E., Maruta, T., Yoshimura, K., & Shigeoka, S.** (2006). Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *The Plant Journal*, 48(4), 535-547.
- Noctor, G., & Foyer, C. H.** (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279.
- Olmos, E., Kiddle, G., Pellny, T. K., Kumar, S., & Foyer, C. H.** (2006). Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 57(8), 1645-1655.
- Packer, J. E., Slater, T., & Willson, R. L.** (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278, 737-738.
- Panchuk, I. I., Volkov, R. A., & Schöffl, F.** (2002). Heat stress-and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 129(2), 838-853.
- Pastori, G. M., Kiddle, G., Antoniw, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P. J., Noctor, G. & Foyer, C. H.** (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell Online*, 15(4), 939-951.
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniw, J., Alvarez, M.E., & Foyer, C. H.** (2005). Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(3), 1291-1303.
- Pérez, F. J., Villegas, D., & Mejía, N.** (2002). Ascorbic acid and flavonoid-peroxidase reaction as a detoxifying system of H₂O₂ in grapevine leaves. *Phytochemistry*, 60(6), 573-580.
- Petrov, V. D., & Van Breusegem, F.** (2012). Hydrogen peroxide—a central hub for information flow in plant cells. *AoB plants*, 2012, pls014.

- Piotrowska, A., Bajguz, A., Godlewska-Żyłkiewicz, B., Czerpak, R., & Kamińska, M.** (2009). Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). *Environmental and experimental botany*, 66(3), 507-513.
- Ramírez, I., Estay, D., Stange, C., & Cardemil, L.** (2012). Superoxide dismutase is a critical enzyme to alleviate oxidative stress in *Aloe vera* (L.) Burm. plants subjected to water deficit. *Plant Ecology & Diversity*, 5(2), 183-195.
- Rayder, L., & Ting, I. P.** (1983). CAM-idling in *Hoya carnosa* (Asclepiadaceae). *Photosynthesis research*, 4(3), 203-211.
- Rockholm, D. C., & Yamamoto, H. Y.** (1996). Violaxanthin de-epoxidase (purification of a 43-kilodalton lumenal protein from lettuce by lipid-affinity precipitation with monogalactosyldiacylglyceride). *Plant physiology*, 110(2), 697-703.
- Rodrigues, M. A., Freschi, L., Pereira, P. N., & Mercier, H.** (2014). Interactions Between Nutrients and Crassulacean Acid Metabolism. *Progress in Botany*, 167-186.
- Rossi, M., Caruso, F., Antonioletti, R., Viglianti, A., Traversi, G., Leone, S., Basso, E. & Cozzi, R.** (2013). Scavenging of hydroxyl radical by resveratrol and related natural stilbenes after hydrogen peroxide attack on DNA. *Chemico-biological interactions*, 206(2), 175-185.
- Ryter, S. W., & Tyrrell, R. M.** (1998). Singlet Molecular Oxygen ($^1\text{O}_2$): A Possible Effector of Eukaryotic Gene Expression. *Free radical biology and medicine*, 24(9), 1520-1534.
- Sagi, M., & Fluhr, R.** (2001). Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology*, 126(3), 1281-1290.
- Sagi, M., & Fluhr, R.** (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant physiology*, 141(2), 336-340.
- Salama, Z., El-Beltagi, H. S., & El-Hariri, D. M.** (2009). Effect of Fe Deficiency on Antioxidant System in Leaves of Three Flax Cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(1).
- Salinas C., Ramírez, I., Huerta C., Sagardía S., Vega A., Silva H., Stange C., Handford M., & Cardemil L.** (2007). Sugar and fructan synthesis and superoxide dismutase activity as protection mechanisms for water deficit and heat shock stress in *Aloe barbadensis* (Miller, *Aloe vera*). *Libro de resúmenes de la II Reunión de Biología Vegetal*, p: 68.
- Salinas, C.** (2012). Caracterización de Fructanos en hojas de *Aloe barbadensis* Miller sometidos a estrés hídrico. Seminario de Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7), 995-1014.

Sekmen, A. H., Ozgur, R., Uzilday, B., & Turkan, I. (2014). Reactive oxygen species scavenging capacities of cotton *Gossypium hirsutum* cultivars under combined drought and heat induced oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany*, 99, 141-149.

Sevanian, A., & Hochstein, P. (1985). Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annual review of nutrition*, 5(1), 365-390.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, Vol 2012.

Sharp, K. H., Mewies, M., Moody, P. C., & Raven, E. L. (2003). Crystal structure of the ascorbate peroxidase-ascorbate complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(4), 303-307.

Sharp, K. H., Moody, P. C., Brown, K. A., & Raven, E. L. (2004). Crystal structure of the ascorbate peroxidase-salicylhydroxamic acid complex. *Biochemistry*, 43(27), 8644-8651.

Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., & Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1305-1319.

Silva, H., Sagardía, S., Seguel, O., Torres, C., Tapia, C., Franck, N., & Cardemil, L. (2010). Effect of water availability on growth and water use efficiency for biomass and gel production in Aloe Vera (*Aloe barbadensis* M.). *Industrial crops and products*, 31(1), 20-27.

Smirnoff, N., Conklin, P. L., & Loewus, F. A. (2001). Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual review of plant biology*, 52(1), 437-467.

Smirnoff, N., & Wheeler, G. L. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4), 291-314.

Suzuki, N., Miller, G., Sejima, H., Harper, J., & Mittler, R. (2013). Enhanced seed production under prolonged heat stress conditions in *Arabidopsis thaliana* plants deficient in cytosolic ascorbate peroxidase 2. *Journal of experimental botany*, 64(1), 253-263.

Suzuki, N., & Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum*, 126(1), 45-51.

- Taiz, L. & Zeiger, E.** (1998). *Plant physiology*. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Teixeira, E. I., Fischer, G., van Velthuisen, H., Walter, C., & Ewert, F.** (2013). Global hot-spots of heat stress on agricultural crops due to climate change. *Agricultural and Forest Meteorology*, 170, 206-215.
- Teixeira, F. K., Menezes-Benavente, L., Galvão, V. C., Margis, R., & Margis-Pinheiro, M.** (2006). Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta*, 224(2), 300-314.
- Teixeira, F. K., Menezes-Benavente, L., Margis, R., & Margis-Pinheiro, M.** (2004). Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. *Journal of molecular evolution*, 59(6), 761-770.
- Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J. F., & Inzé, D.** (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, 161(3), 405-414.
- Volkov, R. A., Panchuk, I. I., Mullineaux, P. M., & Schöfl, F.** (2006). Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 61(4-5), 733-746.
- Wang, C. Q., & Song, H.** (2009). Calcium protects *Trifolium repens* L. seedlings against cadmium stress. *Plant cell reports*, 28(9), 1341-1349.
- Wang, C., Zhang, S. H., Wang, P. F., Hou, J., Li, W., & Zhang, W. J.** (2008). Metabolic adaptations to ammonia-induced oxidative stress in leaves of the submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* L. *Hara. Aquatic toxicology*, 87(2), 88-98.
- Wiseman, H., & Halliwell, B.** (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, 313, 17-29.
- Xin, X., Tian, Q., Yin, G., Chen, X., Zhang, J., Ng, S., & Lu, X.** (2014). Reduced mitochondrial and ascorbate-glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. *Journal of plant physiology*, 171(2), 140-147.
- Yabuta, Y., Motoki, T., Yoshimura, K., Takeda, T., Ishikawa, T., & Shigeoka, S.** (2002). Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *The Plant Journal*, 32(6), 915-925.
- Yamori, W., Hikosaka, K., & Way, D. A.** (2014). Temperature response of photosynthesis in C₃, C₄, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynthesis research*, 119(1-2), 101-117.
- Yoshimura, K., Ishikawa, T., Nakamura, Y., Tamoi, M., Takeda, T., Tada, T., Nishimura, K., & Shigeoka, S.** (1998). Comparative study on recombinant

chloroplastic and cytosolic ascorbate peroxidase isozymes of spinach. Archives of biochemistry and biophysics, 353(1), 55-63.

Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2000). Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant physiology, 123(1), 223-234.

Zhang, W., Tian, Z., Pan, X., Zhao, X., & Wang, F. (2013). Oxidative stress and non-enzymatic antioxidants in leaves of three edible canna cultivars under drought stress. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 54(1), 1-8.

Zhang, Y., Tan, J., Guo, Z., Lu, S., He, S., Shu, W., & Zhou, B. (2009). Increased abscisic acid levels in transgenic tobacco over-expressing 9 cis-epoxycarotenoid dioxygenase influence H₂O₂ and NO production and antioxidant defences. Plant, cell & environment, 32(5), 509-519.