

UCHI - FC  
Biotecnología  
F 862  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“Evaluación de la tolerancia cruzada adquirida, entre el estrés hídrico y térmico, mediante la cuantificación de los genes *hsp70* y *ubiquitina*, empleando RT-PCR semi-cuantitativo”**

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

**MATÍAS ANDRÉS FREIRE DÍAZ**



Director de Seminario de Título: Dra. Liliana Cardemil Oliva

**Marzo, 2010**

Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN DE SEMINARIO DE TÍTULO

**“Evaluación de la tolerancia cruzada adquirida, entre el estrés hídrico y térmico, mediante la cuantificación de los genes *hsp70* y *ubiquitina*, empleando RT-PCR semi-cuantitativo”**

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

**MATÍAS ANDRÉS FREIRE DÍAZ**

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

**Comisión de Evaluación**  
Dr. Ramiro Bustamante  
*Presidente de comisión*

Alexander Vargas  
Evaluador

Se muestran tres firmas manuscritas sobre líneas horizontales. A la derecha de las firmas se encuentra un sello circular de la biblioteca central de la Universidad de Chile. El sello contiene el texto: "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL" y "U. DE CHILE".

**Santiago de Chile, 5 de Marzo, 2010**

## BIOGRAFÍA



Toda mi vida se ha desarrollado en Santiago, la capital de Chile, en una familia de mucho esfuerzo de la cual me siento profundamente orgulloso. Mi madre –Roxana- y mi padre Elías-, siempre me inculcaron que lo más importante para “salir adelante” era esforzarse por lo que uno quería.

Mis primeros años los pasé en la casa de mi abuela materna a quien cariñosamente llamaba *agüeli*. Ahí fui muy regalado por ella, mis papás y mis tíos. La *agüeli* también me enseñó una de las cosas que más me gusta hacer –cocinar- y creo humildemente que heredé algo de su talento. Después de esa época nos cambiamos junto a Alvaro,- mi hermano- a nuestra casa en la comuna de Maipú, donde viví hasta el año 2008. En esa casa está el espíritu de nuestra familia, ya que conseguirla y cuidarla nos exigió mucho esfuerzo. Un tiempo después de cambiarnos apareció *la pulga* de la

familia: Diego, mi hermano menor. Cada experiencia, alegría y dificultad que hemos pasado juntos a través de los 24 años que actualmente tengo pueden dar fe de ello.

Mis primeros estudios los cursé en Maipú en el colegio Alberto Pérez. Mucho tiempo después este lugar me daría un hermoso regalo: la oportunidad de conocer a la mujer que amo. Luego ingresé al Instituto Nacional, donde me formé y desarrollé como estudiante. Ahí también nació mi interés por la política -estuve en la directiva del curso voluntaria o casi involuntariamente por 5 años- y el servicio público. Sin embargo, lo que más agradezco de mi paso por tan importante colegio es a los amigos que conocí, los cuales han sido parte importante de mi formación como persona. Con varios de ellos -debido a un interés común por ayudar a la gente- quisimos cambiar el mundo y desarrollamos un grupo llamado Acción País, el cual tenía como propósito solucionar con *rigor y virtud* los problemas que aquejan a Chile. Lamentablemente, la falta de experiencia, organización y tiempo terminó por dejar a AP en nada más que un recuerdo, aunque creo que las intenciones de ayudar y los amigos aún existen.

Llegado el momento de mi ingreso a la Universidad había que salir airoso de la Prueba de Selección Universitaria (PSU). Me puse las pilas y logré entrar a la Universidad de Chile a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular, una carrera que excepto mis padres y hermanos -que después de 5 años lograron aprender su nombre- el resto de mi familia ni siquiera recuerda. Mi conocimiento acerca de ésta era que abarcaba el desarrollo de la tecnología aplicada y la modificación de organismos y productos que permiten solucionar problemas para la gente. Ahora puedo decir que aunque aquella descripción es válida, en la realidad uno termina siendo un científico con distintas aplicaciones. Estos fueron 5 años de estudio, de algunas noches en vela, durmiendo poco, pero una vez terminado todos los ramos, llegaría el momento de escoger un laboratorio donde realizar el Seminario de Título, y lo que en realidad más me interesaba a mí: aprender cómo desenvolverme dentro de un laboratorio como Biotecnólogo o más bien como aprendiz de científico. De esta forma llegué al Laboratorio de Biología Molecular Vegetal y comencé el estudio con el Aloe Vera. En este lugar conocí a un grupo humano y científico increíble del cual he tratado de aprender al máximo. Actualmente me encuentro desarrollando un proyecto distinto en una Tesis de Magister que me tiene con muchas ganas de investigar y aprender cosas nuevas!

## Agradecimientos

En primer lugar agradezco a mis padres por apoyarme incondicionalmente, por esforzarse para que yo recibiera la mejor educación que ellos me pudieron dar, por tratar de entenderme, por quererme y preocuparse de mí. Es una buena oportunidad por agradecerles por darme dos singulares hermanos, a los cuales no me queda otra cosa que decirles gracias por apoyarme y ayudarme cada vez se los pedí. Mamá, papá, hermanos, los amo, y estoy muy orgulloso de nuestra familia, a veces con altos y bajos, pero que hasta ahora sigue adelante y en pie. No se me olvidan mis tíos, tías, primos, primas, abuelos que siempre he sentido muy cercanos y preocupados por mi bienestar.

Estoy muy agradecido de todo lo que aprendí en la Universidad de Chile, de la gente que conocí, del grupo de estudio y de los que se transformaron finalmente en mis amigos. Durante los años que pasé por la Universidad, en distintas *instancias* – trabajo en el laboratorio, amigos de amigos, paseos a *Cartagua*, carretes varios, etc - conocí a gente muy valiosa, a los cuales me gustaría nombrar y agradecer por su apoyo y simplemente por ser mis amigos: Dani. M., Ori F., Vale A., Bea G, Sonia V., Yu, Coté, Gabi Z., Pau F., Lore P, Claudia H., Fefi G, Gliss A., Fran A., Pame U., Pato E., Darko C., Cristian G. y Jorge V. Dentro de los recién nombrados, mención especial a dos amigas que al parecer que me conocen mucho, porque siempre saben si estoy bien o mal de ánimo o si algo no anda bien, ahí están ellas para escucharme y ayudarme a entender mejor las cosas, muchas gracias Ori y Pau. Bueno no podría dejar de referirme a putazo-Jorge V.- gracias por escucharme muchas veces, por alojarme en tu casa cada después de los carretes o cuando salía muy tarde del laboratorio, por ser un buen amigo y *partner* cuando ha sido necesario.

Estoy muy agradecido del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal y de su excelente grupo humano con los cuales crecí y aprendí mucho. En especial a Claudia H. que me enseñó cuando entré al laboratorio, a Lore P., siempre dispuesta a prestar ayuda, responder dudas y compartir su experiencia. Finalmente terminamos siendo amigos y nos fuimos a vivir juntos, con Pamelilla. Muy buenas personas, con las cuales he compartido y me han aguantado, gracias! Estoy muy agradecido también de quienes me ayudaron a corregir mi seminario de título.

Le agradezco a mis *amigos del colegio* – Javier F., Jorge A., Sebastián U., Pablo J., Daniel F. y Daniel E.- por estar disponibles cada vez que los necesité para conversar de la vida, compartiendo nuestras alegrías y dificultades. Junto con ellos, la persona que en este último tiempo me ha hecho disfrutar la vida y ser más feliz, mi polola, Gabi.



## Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a mi familia, en especial a mis padres que día a día se esforzaron por mí y mi educación.



También se lo dedico a mi abuelita Raquel *-la agüeli-* persona muy especial que marcó mi forma de ser y pensar.



## INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS.....	2
INDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ABREVIACIONES.....	6
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Estrés hídrico y térmico en plantas.....	12
1.2 Mecanismos de tolerancia frente al estrés hídrico y térmico.....	15
1.3 Aloe Vera.....	20
1.4 Hipótesis.....	22
1.5 Hipótesis Alternativa.....	22
1.6 Objetivos.....	23
1.6.1 Objetivo General.....	23
1.6.2 Objetivos específicos.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1 Material biológico.....	24
2.2 Experimentos fisiológicos.....	24
2.2.1 Tratamientos de estrés térmico.....	24
2.2.1 Tratamientos de estrés hídrico.....	25
2.2.3 Tratamientos de estrés combinado.....	26
2.2.3 Estudio del crecimiento de las plantas en estrés hídrico.....	26
2.3 Obtención de mRNA de plantas sometidas a los distintos estreses.....	27



2.3.1 Extracción de RNA .....	27
2.3.2 Cuantificación del RNA obtenido .....	28
2.3.3 Tratamiento con DNAsas.....	29
2.4 Extracción de DNA.....	29
2.5 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) .....	30
2.6 PCR.....	30
2.7 Determinación y cuantificación del producto de PCR.....	33
2.8 Análisis de datos .....	33
2.9 Análisis de secuencias de <i>hsp70</i> y <i>ubiquitina</i> .....	34
RESULTADOS .....	35
3.1 Características fenotípicas de plantas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico. ....	35
3.2 Análisis molecular .....	38
3.2.1 Estandarización del número de ciclos del programa de PCR .....	38
3.2.2 Análisis de las secuencias de <i>hsp70</i> y <i>ubiquitina</i> .....	41
3.2.3 Expresión de los genes <i>ubiquitina</i> , <i>hsp70</i> en A.vera bajo estrés térmico .....	42
3.2.4 Expresión de los genes <i>ubiquitina</i> , <i>hsp70</i> en A.vera bajo estrés hídrico.....	45
3.2.5 Análisis de la expresión de los genes <i>hsp70</i> y <i>ubiquitina</i> de plantas sometidas a estrés hídrico y térmico combinado .....	47
DISCUSIÓN.....	52
4.1 Características fenotípicas de plantas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico. ....	52
4.2 Análisis molecular .....	55
CONCLUSIONES.....	62
REFERENCIAS .....	66



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Porcentajes de CDC, su volumen correspondiente y el volumen real de riego...25	
Tabla 2: Características de los programas de PCR y RT-PCR.....32	
Tabla 3: Determinación del largo y ancho de bases de las hojas de A. vera sometidas a 4 tratamientos hídricos (25%, 50%, 75% y 100% de CDC).....37	
Tabla 4: Determinación de cantidad de gel y de agua almacenada en hojas de A. vera sometidas a 4 tratamientos hídricos (25%, 50%, 75% y 100% de CDC).....37	
Tabla 5: Determinación de la diferencias entre puntas y bases para el gen de <i>hsp70</i> .....50	
Tabla 6: Determinación de la diferencias entre puntas y bases para el gen de <i>ubiquitina</i> .51	



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema que presenta las principales reacciones moleculares frente al estrés abiotico.....	16
Figura 2: Fenotipo de Aloe vera sometidas a 75% y 25% de CDC.....	36
Figura 3: Estandarización del programa de RT-PCR semi-cuantitativo para los genes <i>hsp70</i> , <i>ubiquitina</i> y 18.....	39
Figura 4: Comprobación de la coincidencia del tamaño del amplificado desde cDNA y DNA genómico.....	40
Figura 5: Secuencias de <i>hsp70</i> y <i>ubiquitina</i> .....	41
Figura 6: Homología de Aloe vera y otras especies.....	42
Figura 7: Expresión de <i>ubiquitina</i> y <i>hsp70</i> en plantas con estrés hídrico.....	45
Figura 8: Expresión relativa de los genes <i>hsp70</i> y <i>ubiquitina</i> en plantas sometidas a estrés térmico.....	44
Figura 9: Expresión de los genes <i>ubiquitina</i> y <i>hsp70</i> de plantas sometidas a estrés hídrico y de temperatura.....	47
Figura 10: Expresión relativa de <i>hsp70</i> respecto a la expresión del gen 18S de plantas sometidas a estrés combinado.....	48
Figura 11: Expresión de los genes <i>ubiquitina</i> y <i>hsp70</i> de plantas sometidas a estrés hídrico y de temperatura.....	49
Figura 12: Expresión relativa de <i>hsp70</i> respecto a la expresión del gen 18S de plantas sometidas a estrés combinado.....	41
Figura 13: Expresión relativa de <i>ubiquitina</i> respecto a la expresión del gen 18S de plantas sometidas a estrés combinado.....	42

## ABREVIACIONES



ANOVA	: Análisis de varianza
ATP	: Adenosín Trifosfato
BIP	: Proteína de unión a inmunoglobulina
C -	: Control negativo
CAM	: Metabolismo del Ácido Crasuláceo
CBF/DREB	: C-repeat binding factor/dehydration responsive element binding factor
CDC	: Capacidad De Campo
cDNA	: DNA complementario
CRA	: Contenido Relativo de Agua
CTAB	: Bromuro de Cetil Trimetil Amonio
DEPC	: Dietilpirocarbonato
DNAsa	: Desoxirribonucleasa
dNTP	: Desoxirribonucleótido
EDTA	: Ácido etilendiaminotetracético
FC	:Field Capacity
HDT	: Homochlorophyllous Desiccation Tolerant
HSC	: Heat Shock Cognate
HSF	: Heat Shock Factor
HSP	: Heat Shock Protein
kDa	: Kilo Dalton
LEA	: Late Embryogenic Abundant
LMW	: Low Molecular weight
M	: Estándar de Peso Molecular

MAP : Mitogen-activated protein  
MyC : Factor de transcripción myelocytomatosis oncogene  
mRNA : RNA mensajero  
PCR : Reacción en Cadena de la Polimerasa  
PDT :Poikilochlorophyllous Dessication Tolerant  
pfg : peso fresco del gel  
psg : peso seco del gel  
RNAsa : Ribonucleasa  
EROS : Especie reactiva del Oxígeno  
rRNA : RNA ribosomal  
RT : Transcripción Reversa  
TAE : Tris- Ac. Ácético- EDTA  
UPS :Ubiquitin Proteasome System



## RESUMEN

El déficit hídrico y el estrés térmico producen grandes daños y pérdidas en los cultivos de plantas comerciales. Con el calentamiento global han aumentado cada vez más las zonas desérticas. Por lo tanto surge la necesidad de estudiar plantas capaces de soportar condiciones de aridez. *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera), es una planta fisiológicamente adaptada a las condiciones desérticas, presentando metabolismo CAM. A. vera es de gran importancia económica debido a las cualidades farmacéuticas, alimenticias, cosmetológicas que poseen el gel acumulado en sus hojas. Por sus amplios usos y beneficios económicos el cultivo de Aloe vera ha se ha introducido en el norte de Chile, sin embargo no existe un correcto manejo agronómico, debido a los escasos estudios fisiológicos que se han realizado en esta especie.

En este seminario de título se estudió la respuesta de las plantas frente al estrés hídrico combinado con estrés térmico, ya que en condiciones de campo las plantas se encuentran simultáneamente sometidas a ambos factores estresantes. La proteína HSP70, es una chaperona molecular cuya función es replegar las proteínas dañadas a su configuración funcional en las células, mientras que UBIQUITINA es una proteína involucrada en la proteólisis y su función es marcar aquellas proteínas dañadas. Se estudió la expresión de los genes *hsp70* y *ubiquitina* mediante RT-PCR semi-cuantitativo, utilizando como control de expresión interna el gen del RNA ribosomal 18S.

Se realizaron experimentos de combinación de diferentes grados de estrés térmico con diferentes grados de estrés hídrico. Para ello también se sometieron plantas sólo a estrés térmico y sólo a estrés hídrico los que se consideraron experimentos controles.

Los resultados de esta tesis, indican que hay una mayor expresión los genes de *hsp70* y *ubiquitina* cuando las plantas son sometidas a estrés hídrico combinado con estrés térmico. En plantas bajo estrés hídrico y térmico combinados se determinó una mayor expresión para el gen de *hsp70* en el tratamiento de 25% de CDC y 40°C. Mientras que para el gen de *ubiquitina*, la expresión es mayor en condiciones de 25% de CDC y 45°C para las puntas y de 25% de CDC y 40°C para las bases. Para el gen *hsp70* la mayor expresión en condiciones de estrés combinado fue 50% superior a la registrada por plantas que estaban bajo estrés hídrico y 40% mayor que cuando las plantas estaban en estrés térmico. Para *ubiquitina* la mayor expresión registrada en condiciones de estrés combinado para las puntas y bases fue más alta (62% y 48% respectivamente) que cuando las plantas estaban bajo estrés hídrico. En tanto, para las puntas y bases también incrementó (30% y 37% respectivamente) respecto a las cuando las plantas estaban en estrés térmico.

Estos resultados indican que la respuesta molecular que desencadena el déficit de agua y el estrés térmico para el gen de *hsp70* de Aloe Vera posee una vía de transducción de señales que es común para ambos estrés, existiendo una tolerancia cruzada entre ambas vías. Mientras que para el gen de *ubiquitina* los resultados indican las vías de transducción molecular pueden tener algunos componentes distintos o ser independientes.

Los antecedentes experimentales reportados por este seminario de títulos aportan valiosa información a un futuro protocolo de manejo agronómico del cultivo de Aloe vera en el norte de Chile.

## ABSTRACT

Water deficit and heat stress produce extensive damage and loss in commercial plant breeding. Additionally, global warming has increased desert zones. Thus, it is essential to study plants able to withstand dry conditions. *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera) is a plant physiologically adapted to desert conditions, with CAM metabolism. *A. vera* has great economic importance because of the pharmaceutical, food and cosmetic qualities of the gel accumulated in the leaves. Due to the multiple applications and health benefits, the cultivation of Aloe vera has increased rapidly in the north of Chile. However there is no proper agronomic management, and few molecular studies have been performed in this species.

In this thesis, we studied the combined response of plants against water deficit and heat stress, since in field conditions the plants are simultaneously subjected to both stress conditions. The HSP70 protein is a molecular chaperone which refolds damaged proteins into their functional configuration in cells, whereas Ubiquitin is a protein involved in proteolysis and its function is to mark damaged proteins. Semi-quantitative RT-PCR was used to determine the expression of *hsp70* and *ubiquitin*, using 18S ribosomal RNA gene as the internal expression control.

Experiments were performed under different degrees of heat stress and different degrees of water deficit. As controls, plants were subjected to either heat or water stress conditions, independently.

The results demonstrate that there was higher expression of *hsp70* and *ubiquitin* under the combined stress condition. In plants under combined water and heat stress, there was a higher expression of *hsp70* in the treatment of 25% of field capacity (FC) and

40 °C. However, for *ubiquitin*, the expression is greater at 25% FC and 45 °C for the tips and 25% of FC and 40 °C for the bases of the leaves. Under combined stress conditions, the expression of *hsp70* was 50% higher than in plants subjected only to water stress and 40% higher than those treated only with heat stress. Expression of *ubiquitin* was 62% and 48% higher in bases and tips, respectively, under combined stress conditions compared to the same samples taken from plants subjected only to water stress. These increases were slightly lower comparing *ubiquitin* expression in combined versus heat stress conditions (tips 30%, bases 37%).

These results indicate that there is a cross tolerance between temperature and water stress for the expression of the *hsp70* gene of Aloe Vera, probably because both stress induce a common transduction signal pathway. However, in the case of *ubiquitin* gene, the findings indicate that some components of the transduction signal pathways might be different or, totally independent.

The experimental results reported in this thesis provide valuable information for the future management of agronomic cultivations of Aloe vera in northern Chile.

## INTRODUCCIÓN

El calentamiento global trae como consecuencias el aumento de las temperaturas promedio de la tierra, el incremento de las zonas desérticas, un exceso de anhídrido carbónico en la atmósfera, etc., afectando a todos los seres vivos (Karl y Trenberth, 2003). Sumado a lo anterior, la población ha crecido explosivamente en los últimos años, lo que se traduce en escasez de recursos alimenticios e hídricos (Bonan, 2008). Así nace la necesidad de investigar y optimizar el cultivo de especies vegetales que estén adaptadas a las condiciones de las zonas áridas y semiáridas, las cuales aumentan en desmedro de las plantas de climas templados, donde éstas, en general, enfrentan menos adversidades. La producción de biomasa de las especies vegetales en ecosistemas áridos y semiáridos depende directamente de la disponibilidad de agua y de las fluctuaciones estacionales de este recurso, este efecto se ve incrementado por la radical oscilación térmica diaria registrada en dichos ecosistemas. Así, las pocas especies resistentes a la falta de agua son las que permiten desarrollar la agricultura de zonas áridas y semiáridas. Por otro lado, las plantas son organismos sésiles, por lo tanto deben desarrollar adaptaciones morfológicas, fisiológicas y moleculares para soportar las condiciones que les impone el medio en que viven. Cuando estas condiciones sobrepasan las adaptaciones recién nombradas se desencadena el estrés. Sin embargo el estrés también puede analizarse desde el punto de vista constructivo, pensándolo como un factor de selección evolutivo.

### ***1.1 Estrés hídrico y térmico en plantas***

Para las plantas se considera estrés abiótico, la escasez de agua, la alta salinidad, las temperaturas extremas, la anaerobiosis, agentes químicos tóxicos o en concentraciones nocivas. Todos estos estreses desencadenan el estrés oxidativo. Se estima que el estrés abiótico es la mayor causa de pérdida de cultivos a nivel mundial, reduciendo los rendimientos para la mayoría de las plantas de cultivo en más del 50% (Boyer, 1982 y Wang y cols., 2003). Resulta natural pensar entonces, que las plantas no se encuentran sometidas sólo a un estrés a la vez, sino a varios en condiciones normales de cultivo. El déficit de agua y el estrés térmico representan un excelente ejemplo de condiciones estresantes que ocurren simultáneamente en el campo, especialmente en áreas semi-áridas o con agua restringida (Mittler y cols., 2006, Rizhsky y cols., 2002, Kotak y cols., 2007).

Cuando las plantas están sometidas a estrés hídrico no cuentan con un riego adecuado para mantener una biomasa normal, por lo que la baja disponibilidad de agua induce cambios en la fisiología de la planta.

El déficit de agua puede afectar a las plantas en diferentes intensidades, una sequía leve induce una regulación de la pérdida de agua permitiendo la absorción y la mantención (regulación) del contenido relativo de agua en las hojas (CRA) dentro de los límites donde la capacidad fotosintética se considera como normal (Hoekstra y cols, 2001). La forma más severa del déficit de agua es la desecación, cuando gran parte del agua de las vacuolas se ha perdido y sólo una pequeña cantidad de agua permanece remanentemente en las células. Después de la pérdida de agua y por ende la disminución en el volumen celular, ocurre una aglomeración de los componentes citoplasmáticos, y el contenido celular comienza a hacerse más viscoso, incrementándose la oportunidad de las interacciones moleculares que pueden causar la denaturación de las proteínas (Hoekstra y cols, 2001).

El estrés térmico se define como una elevación o baja transitoria de la temperatura, en un corto período de tiempo, por sobre o bajo la temperatura en que el organismo vive habitualmente. Si este aumento de temperatura supera el umbral térmico normal de cada planta, por un tiempo suficiente, podría causar daños en el desarrollo de la planta e incluso la muerte (Wahid y Close, 2007 y Allakhverdiev y cols., 2008). Entre los daños se pueden mencionar, la perturbación de la homeostasis celular causando severos retardos en el crecimiento y desarrollo de la planta (Kotak y cols., 2007). De esta forma, el estrés térmico puede ocurrir en un amplio rango de temperaturas, dependiendo del organismo.

Las altas temperaturas pueden afectar procesos vitales para la planta, tales como, la fotosíntesis, ya que, las enzimas del Ciclo de Calvin son sensibles. (Law y Crafts-Brandner, 1999). Un efecto temprano del estrés térmico es la inactivación enzimática del complejo de proteínas que sostienen a la clorofila a en los centros de reacción de los fotosistemas. En plantas de arroz (*Oryza sativa*) y de arveja (*Pisum sativum*) se ha visto que las estructuras mayores también resultan dañadas, como la integridad de la membrana tilacoidal, disminuyendo el apilamiento de las granas (Vani y cols 2001, Semenova, 2004 y Allakhverdiev y cols., 2008). En general, una respuesta que se ve en ambos estreses, tanto hídrico como térmico es una denaturación y agregación de proteínas además de un aumento en la fluidez de las membranas celulares. Siendo la denaturación y agregación de proteínas las causantes de mayores daños en las plantas que están recibiendo ambos tipos de estrés. Todo esto desencadena una inhibición del crecimiento y en el caso de la fotosíntesis, una inhibición del transporte de electrones lo que conlleva a la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS) y posiblemente la muerte de la planta (Wahid y cols., 2007), Sin embargo los organismos y en particular las plantas, poseen mecanismos de adaptación que les permite soportar estos estreses.

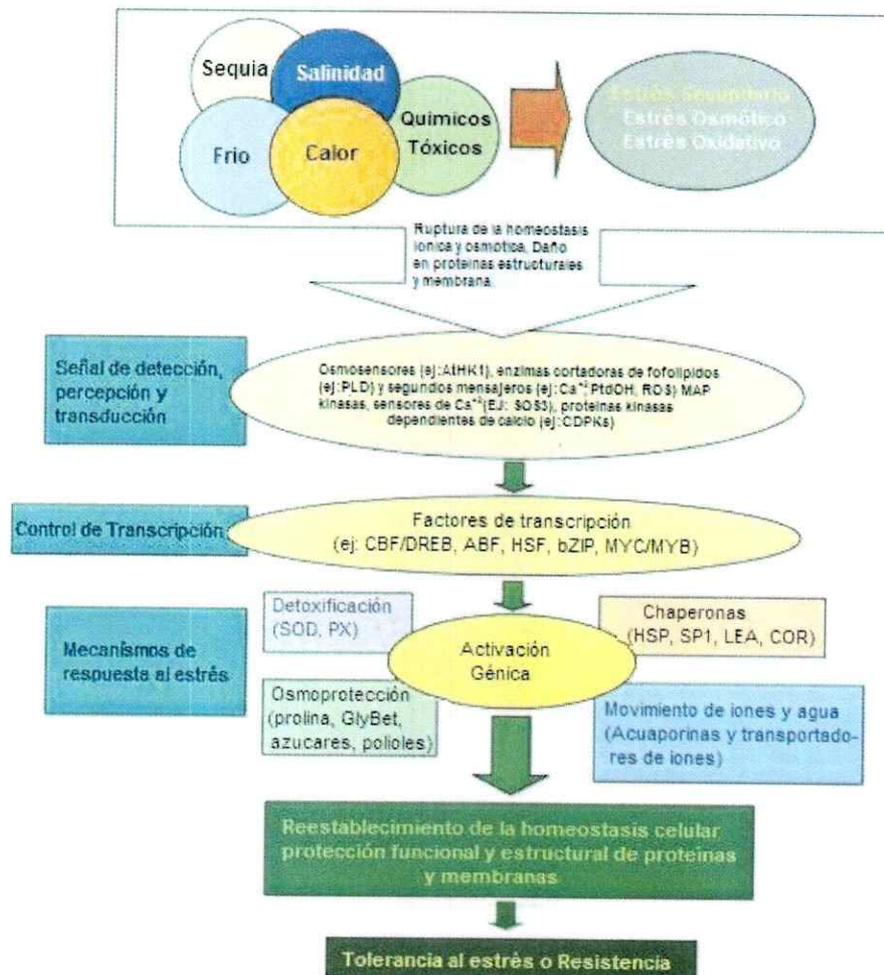
## **1.2 Mecanismos de tolerancia frente al estrés hídrico y térmico**

Las plantas poseen distintos mecanismos de defensa frente al déficit de agua y las altas temperaturas, las cuales se podrían separar en adaptaciones fisiológicas y moleculares. Dentro de las primeras se cuentan, por ejemplo, las adaptaciones de las plantas CAM, tales como, una gruesa cutícula en sus hojas, inversión estomática y asimilación nocturna de anhídrido carbónico, además algunas plantas presentan tricomas que proveen a la planta de una epidermis más resistente a la transpiración ya que retienen una cierta cantidad de agua (Buchanan, 2000).

Junto con lo anterior, las plantas sintetizan algunos compuestos que ayudan a prevenir las interacciones moleculares, actuando como osmorreguladores, manteniendo hidratadas las proteínas, entre ellos están la prolina, el glutamato, glicina-betaina, carnitina, manitol, sorbitol, fructanos, polioles, trehalosa, sacarosa y oligosacáridos (Hoekstra y cols, 2001).

La respuesta molecular está determinada por distintos tipos de genes, estos se pueden dividir en tres categorías: (1) aquellos envueltos en las cascadas de señalización y en el control transcripcional, tales como MyC, MAP kinasas y (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki 1997, Munnik y cols., 1999 y Zhu, 2001), fosfolipasas (Frank y cols. 2000) y factores de transcripción tales como HSF y las familias CBF/DREB y ABF/ABAE (Schöffl y cols. 1998; Choi, 2000, Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000). (2) aquellos cuya función está directamente relacionada con la protección de membranas y proteínas, tales como los que codifican para proteínas de estrés térmico (Hsps) y otras chaperonas como las de bajo peso molecular (LMW), las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA) (Vierling 1991, Ingram and Bartels 1996, Tomashow 1998, 1999; Bray y cols. 2000)

y los osmoprotectores (Bohnert y Sheveleva 1998). Algunas de estas moléculas actúan también como señales induciendo genes que codifican para proteínas que facilitan la absorción y transporte de iones y agua. Como es el caso de las acuaporinas y los canales iónicos (Maurel 1997, Serrano y cols. 1999, Tyerman et al. 1999, Zimmermann y Sentenac 1999, Blumwald 2000) que corresponderían a la tercera categoría. En la Figura 1 se explica mediante un diagrama la participación de los genes más importantes y su efecto en la tolerancia al estrés.



**Figura 1: Esquema que presenta las principales reacciones moleculares frente al estrés abiótico.** Adaptado de Wang y cols., 2003.

Una de las maquinarias de respuesta fisiológica sincronizada más importantes es la respuesta heat shock, que ha sido altamente conservada a través de la evolución, no sólo como un fenómeno fisiológico, sino a través de las mismas secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de cada proteína (Parsell y Lindquist, 1993). Evidenciándose acumulación de estas proteínas en procariontes como *Escherichia coli*, en hongos como *Saccharomyces cerevisiae*, y en todo el Reino Vegetal y Animal desde insectos a mamíferos (Vierling 1991, Parsell y Lindquist, 1993, Yang y Tower, 2009 y Colinet y cols, 2010).

Las proteínas de estrés térmico (HSPs) se han clasificado de acuerdo a su peso molecular en kDa como HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y las LMW entre 15 y 30 kDa. Ubiquitina también se considera como HSP. Esta es una pequeña proteína involucrada en la proteólisis dependiente de ATP (Vierling, 1991). Las chaperonas moleculares son componentes claves para la homeostasis celular bajo condiciones de crecimiento óptimas o adversas. Ellas son responsables del plegamiento y ensamblaje de proteínas, además tienen una función en la estabilización de proteínas y membranas. La característica que más interesa de las chaperonas y que distingue a las HSPs, es que algunas se expresan especialmente en procesos de re-plegamiento de proteínas bajo condiciones estresantes (Wang, 2004). Aquellas expresadas constitutivamente se conocen como HSP cognate, o HSC y dependiendo del tipo de chaperona es la función que realizan (Vierling 1991).

HSP70 asiste a un amplio rango de plegamientos proteicos en casi todos organismos y en los compartimentos celulares, si es que los organismos los poseen. *E. coli* presenta un homólogo, DnaK, esta proteína se encuentra en condiciones normales y se induce una mayor expresión del gen que la codifica frente a un aumento de las temperaturas (Baniwal y cols, 2004). En el citoplasma se encuentra normalmente la forma

HSC70, y cuando el organismo es sometido a altas temperaturas, HSP70 (Nover, 1989). En el retículo endoplásmico de células de mamífero, se describió un homólogo de la proteína HSP70, que se conoce como BiP (Binding protein), mientras que en levadura se ha descrito un ortólogo de HSP70 perteneciente a mitocondrias, el cual presenta homología con proteínas mitocondriales de células de mamífero y *Euglena* (Amir-Shapira, 1990). La función principal de HSP70 es prevenir la agregación y asistir en el replegamiento de proteínas denaturadas bajo condiciones estresantes y durante la síntesis de proteínas (Vierling, 1991 y James, 1997). Los miembros HSC de la familia HSP70 se encargan de ayudar en el plegamiento de los péptidos sintetizados *de novo* y la importación/traslocación de precursores proteicos (Wang, 2004).

El estrés térmico incrementa la transcripción de Ubiquitina en muchos eucariontes (Vierling, 1991), esta es una proteína de 76 aminoácidos, altamente conservada, que forma parte del sistema ubiquitina/proteosoma (UPS), el cual se encarga de la degradación de proteínas deterioradas o que normalmente deban ser eliminadas. Este pequeño péptido actúa como una marca molecular covalente para las proteínas dañadas, siendo posteriormente destinadas al proteosoma (Ortiz y Cardemil 2001, Yang y col. 2004 y Dreher y Callis, 2007).

Utilizando microarreglos (microarrays) para plantas de *N.tabacum* y *A. thaliana* se ha visto que los mensajeros que se acumulan en condición de bajo riego, son aquellos relacionados con la respiración, mientras que los relacionados con la fotosíntesis se suprimen (Rizhsky, 2002). Además, en el estrés térmico aumentan los transcritos correspondientes HSPs, dentro de los cuales destacan Hsp70, Hsp90 y Ubiquitina (Rizhsky, 2002 y Rizhsky, 2004).

En investigaciones recientes en el laboratorio, se encontró que ante el estrés hídrico o térmico aumenta la acumulación de mRNA de *hsp70* (Huerta, 2008).

### *Estrés combinado*

En la mayoría de los experimentos donde se estudia la respuesta de las plantas a cambios de las condiciones ambientales se enfocan en un sólo tipo de estrés, aplicado a las plantas bajo condiciones controladas (Rizhsky,2004). Sin embargo en condiciones de campo, diferentes estreses pueden estar afectando a las plantas simultáneamente. La sequía y las altas temperaturas usualmente ocurren paralelamente en zonas áridas y semi-áridas, pero los efectos que tienen estos dos estreses en el desarrollo de las plantas son generalmente estudiados por separado, mientras que es muy probable que la respuesta de los cultivos a un estrés pueda ser alterada por el otro estrés (Machado, 2001).

Machado, en el año 2001 demostró, que la temperatura claramente afecta en como influye la cantidad de agua de riego con el crecimiento en plantas de trigo y sorgum. Además que la severidad del efecto combinado está directamente relacionado con la temperatura estresante.

Rizhsky, en el 2002 comprobó para *N. tabacum* y en el 2004 para *A. thaliana*, utilizando microarreglos, que al someter la planta a un déficit de agua y a altas temperaturas, aumenta la expresión de los mismos genes. Esto permite postular la activación de las mismas cascadas génicas para proteger a la planta, lo que implicaría que los mecanismos moleculares podrían ser similares y en el estrés combinado se obtendría una expresión cercana al doble de la que se registra en plantas sometidas a un sólo tipo de estrés. Sin embargo también es probable es que la acumulación de mRNAs (RNAs mensajeros) en estrés combinado sea en algún grado mayor, indicando que cierta parte de los mecanismos moleculares son compartidos (tolerancia cruzada) y los restantes se activan al combinar ambos estrés en forma particular.

## ***Aloe Vera***

*Aloe barbadensis* Miller, también conocida como Aloe vera es una planta monocotiledónea, de la clase Asparagales, introducida desde África cultivándose más de 50.000 plantas sólo en la IV región de Chile. Además, también se cultiva en la III Región, en ambos sectores con un régimen de riego arbitrario y seguramente excesivo, tomando en cuenta que Aloe vera está naturalmente adaptada a las condiciones desérticas, dado que posee metabolismo CAM. Aloe vera es de gran importancia económica por sus atractivas propiedades, dentro de las que se cuenta en general sus características cicatrizantes, antiinflamatorias y estimulante regeneradora de tejidos, inhibitoria del cáncer (Su y col. 2004 y Im y col. 2005,) y de la diabetes mellitus (Yongchaiyudha y col. 1996), además de ser estimuladora del sistema inmune, se le recomienda en el tratamiento de SIDA ( Chow y col. 2005, Govindarajan 2005). Tiene reconocidas propiedades cicatrizantes, por lo que se usa en el tratamiento de cortes y heridas, disminuyendo la inflamación y el dolor (Hutter y col. 1996, Yagi y Takeo 2003,Choi y col. 2001, Krishnan 2006). Por lo anterior es que se utiliza en la industria farmacológica cosmetológica y alimenticia. Aloe vera retiene gran cantidad de agua, debido a las moléculas de manano que posee, gracias a esta propiedad se usa en la industria de pañales y de absorbentes de agua.

Fenotípicamente, Aloe vera es una planta perenne que cuenta con hojas suculentas recubiertas de una gruesa cutícula fotosintética dispuestas en forma de roseta. Sus hojas son triangulares y alargadas, en forma de lanza, las cuales nacen de un corto tallo, esto hace parecer que las hojas salen directamente de la tierra orientadas diagonalmente. Lo anterior genera una diferencia en el potencial hídrico ( $\psi$ ) entre la punta de la hoja y su base. Este potencial da cuenta de la disponibilidad de agua que tiene cada

parte de las plantas y se relaciona con el crecimiento. La disponibilidad de agua es clave cuando las plantas reaccionan al estrés hídrico y térmico. Debido a la forma de las hojas y su disposición, las puntas de estas mismas están más expuestas a la luz que las bases, pudiendo ser un factor determinante en la fotosíntesis, la producción de energía y defensa ante el estrés. Junto con lo anterior, en las puntas se encuentran la mayor concentración de cloroplastos en comparación con los tejidos de las hojas.

En el desierto chileno, donde se cultiva Aloe vera, existen especies endémicas como los árboles del género *Prosopis*, *Prosopis chilensis* y *Prosopis tamarugo* en los que se ha demostrado niveles basales altos de expresión de *HSP70* y Ubiquitina, los que aumentan a medida que la planta se somete a mayores temperaturas (Ortiz y Cardemil, 2001), dejando entrever la necesidad de una investigación a nivel molecular de estas proteínas para Aloe vera.

Uno de los problemas que enfrenta el cultivo de Aloe vera en las regiones señaladas (III y IV) es que se mantiene con riego no regulado, lo que indica un manejo agrícola inadecuado de esta planta (Cardemil, 2007) generando un gasto innecesario de recursos hídricos poco abundantes en estas zonas y muy caros, lo que se traduce en una fuerte limitante económica para los agricultores locales.

Por todos los antecedentes antes planteados, es interesante estudiar, si en plantas de Aloe vera, está presente el fenómeno de protección cruzada de las respuestas fisiológicas y moleculares causadas por la falta de agua y el estrés térmico. Esto quiere decir, averiguar si las proteínas que protegen a la planta contra uno de estos estreses la protegen también contra el otro estrés. De ser así, podrían existir también en Aloe vera vías comunes de expresión molecular para ambas condiciones estresantes.

Con el objetivo de manejar datos cuantitativos que relacionen algún grado de estrés (diferentes temperaturas en el caso de estrés térmico y diferentes volúmenes de

riego en el caso de estrés hídrico) con la respuesta molecular real e inmediata de la planta, es que se presentan estudios de *semi-cuantificación* de expresión del gen *hsp70* y *ubiquitina* en plantas de Aloe vera.

El análisis de datos se realizará a través de RT-PCR semi-cuantitativo, técnica que ha demostrado ser altamente sensible y específica para la cuantificación de mRNA mensajeros y la variación en sus niveles de expresión bajo diferentes condiciones experimentales (Marone y cols. 2001).

Para identificar y cuantificar RNA también se utilizan otras técnicas, como el Northern blotting (entrega una información similar al RT-PCR, pero es más lento y menos cuantitativo), el ensayo de corte con nucleasas (que implica la fabricación de sondas que permitan diferenciar los mRNAs estudiados), RT-PCR tiempo real (mucho más específico y cuantitativo, pero de más alto costo). Sin embargo para los alcances de esta investigación, el RT-PCR semi-cuantitativo resulta ser un método adecuado, debido a que necesita pequeñas cantidades de RNA, detectándolo a bajas concentraciones (Dean y cols, 2002 ).

### ***Hipótesis***

En plantas sometidas a estrés combinado se induce una respuesta molecular similar a la inducida en estrés hídrico.

#### ***1.5 Hipótesis Alternativa***

Las plantas sometidas a estrés hídrico inducen una respuesta molecular distinta, seguramente menor a la inducida por el estrés combinado.

## **1.6 Objetivos**

### **1.6.1 Objetivo General**

Evaluar la respuesta de *Aloe barbadensis* Miller al ser sometida a estrés hídrico y térmico combinados frente a la respuesta mostrada ante sólo uno de estos, a través de la expresión de los genes *hsp70* y *ubiquitina*.

### **1.6.2 Objetivos específicos**

- Determinar los efectos del déficit hídrico en plantas de Aloe vera, mediante el crecimiento de la planta.
- Determinar la expresión génica de HSP70 y UBIQUITINA en plantas de A. vera sometidas a estrés térmico por RT-PCR semicuantitativo.
- Determinar la expresión génica de HSP70 y UBIQUITINA en plantas de A. vera sometidas a estrés hídrico por RT-PCR semicuantitativo.
- Determinar la expresión génica de HSP70 y UBIQUITINA en plantas de A. vera sometidas a un estrés hídrico previo a un estrés térmico (estrés combinado) mediante RT-PCR semicuantitativo.
- Determinar si existe una expresión diferencial de los genes *hsp70* y *ubiquitina* entre muestras de puntas y bases.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **2.1 Material biológico**

Se utilizaron plantas adultas de *Aloe barbadensis* Miller (Aloe vera) de 3 años de edad. Las plantas se encuentran en una cámara donde se controla la humedad y la temperatura (25°C). Con un régimen de luz de días largos, que consiste en 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Estas plantas son regadas normalmente una vez por semana con 200 mL de agua. Considerándose estas plantas como controles (200 mL de riego y 25°C de temperatura). Se tomó tejido de las hojas posterior al tratamiento de estrés térmico, hídrico y el tratamiento combinado (detallados más adelante). Este tejido se congeló con nitrógeno líquido para después ser triturado en un molinillo, obteniéndose el tejido pulverizado, agregando permanentemente nitrógeno líquido. Al moler, se tomó el tejido verde de la planta, descartándose la mayor cantidad posible de gel, debido a que este está altamente enriquecido en azúcares, los que merman el proceso de extracción de RNA. Todo el tejido conseguido, posteriormente se almacenó en un refrigerador a - 80°C hasta ser utilizado.

### **2.2 Experimentos fisiológicos**

#### **2.2.1 Tratamientos de estrés térmico**

Las plantas completas, incluyendo su respectiva maceta, se sometieron a cuatro temperaturas distintas (25°C, 35°C, 40°C y 45°C) durante 3 hrs. en una cámara incubadora (PRECISION MODEL 815 REFRIGERATED INCUBATOR) que alcanza en forma constante hasta 45°C, una vez establecida la temperatura, posterior a la incubación se tomaron las muestras. Dentro de la cámara se dispuso una fuente de luz y humedad,

para conservar las condiciones lo más constantes posibles. Para cada temperatura se emplearon 3 plantas distintas (3 réplicas biológicas), a estas se le tomaron muestras de bases y puntas de las hojas de cada planta. Por lo tanto, para cada temperatura, hay 6 muestras.

### 2.2.1 Tratamientos de estrés hídrico

Las plantas completas, se sometieron a un determinado volumen de riego durante 3 meses, posterior a esto, se recolectaron las muestras. Se usaron cuatro volúmenes de agua, correspondiendo al 100%, 75%, 50% y 25% de la capacidad de campo (CDC) del suelo. El análisis de la retención de humedad del suelo empleado para cultivar los Aloes fue encargado al laboratorio de análisis agrícola y forestal AGROLAB. Este laboratorio determinó que el suelo retenía un 7,8% p/p, es decir 7,8 g de agua en 100 g de suelo. Cada macetero donde se cultivan las plantas posee aproximadamente 4 kg de tierra, por lo tanto un 100% de CDC para este formato de cultivo corresponde a 312 g de agua. En la Tabla 1 se muestra el volumen que corresponde a cada porcentaje de CDC y el volumen con el cual se regó. Se aproximaron los volúmenes para mayor comodidad en el riego. Las plantas estresadas, al igual que las controles, se regaron una vez por semana con el volumen correspondiente a cada tratamiento.

**Tabla 1: Porcentajes de CDC, su volumen correspondiente y el volumen real de riego.**

Porcentaje CDC (%)	CDC(mL)	Volumen de riego (mL)
100	312	300
75	234	200
50	156	150
25	78	80

El suelo donde se cultivan las plantas corresponde a una mezcla de tierra de hoja y arena fina en una proporción 1:3, esta mezcla es semejante a las condiciones al terreno

donde crecen en el campo las plantas que se caracterizan por su aridez, entregada por la arena.

Para cada tratamiento hídrico también se emplearon 3 réplicas biológicas, donde, al igual que para el estrés térmico se extrajeron muestras desde la base y punta de las hojas en cada planta. Por lo tanto, para cada volumen de riego, se analizaron 6 muestras.

### **2.2.3 Tratamientos de estrés combinado**

Para el tratamiento combinado las plantas de Aloe vera fueron sometidas primero a estrés hídrico y luego a estrés térmico. Las plantas estuvieron por 3 meses en restricción acuosa controlada y posteriormente se les aplicó por 3 h una temperatura estresante. Se emplearon las condiciones más extremas, es decir 80 mL y 150 mL en el caso del riego y 40°C y 45°C para el estrés térmico. También se tomaron muestras de puntas y bases para cada una de las 3 réplicas biológicas.

### **2.2.3 Estudio del crecimiento de las plantas en estrés hídrico**

Se evaluó el crecimiento de las hojas plantas sometidas a los diferentes volúmenes de riego. Esto se realizó midiendo el largo de las hojas y el ancho de la base de las mismas. Por otra parte también se cuantificó el peso fresco del gel (pfg) y el peso seco del gel (psg) de las hojas correspondientes a plantas sometidas a los distintos tratamientos hídricos. Para cada parámetro medido se emplearon 3 réplicas biológicas (3 hojas de plantas distintas) de cada tratamiento. Los valores de psg se obtuvieron a partir de la razón del peso seco del gel de la hoja (g) en relación al peso de la hoja fresca completa(g), mientras que los valores de pfg se obtuvieron dividiendo el peso fresco del gel (g) en el peso de la hoja fresca (g).

## **2.3 Obtención de RNA de plantas sometidas a los distintos estreses**

### **2.3.1 Extracción de RNA**

La extracción de RNA se realizó de aproximadamente 100 mg de cada muestra mediante el kit Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit (Invitek), el cual esta especialmente diseñado para la extracción de RNA en tejidos que poseen una alta concentración de azúcares o fenoles. Algunas de las características que posee este kit es un primer paso donde se debe mantener el material biológico siempre en nitrógeno líquido para evitar la degradación de los ácidos nucleicos por las nucleasas, sin embargo, el primer tampón que se emplea en el protocolo (solución de lisis DCT, indicado para plantas con altas concentraciones de polisacáridos) contiene tiocianato de guanidinio, este compuesto químico produce la inactivación de todas las proteínas RNAsas para asegurar la purificación intacta del RNA. Por lo tanto, el resto del protocolo se realizó a temperatura ambiente, hasta cuando se eluye el RNA, donde es imprescindible mantenerlo en hielo y conservarlo a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La modificación que se incluyó en el protocolo señalado por la empresa proveedora del kit, corresponde a que en el momento de la lisis celular, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M, para estimular la precipitación de azucars mediante desplazamiento iónico en la solución. Este paso fue necesario debido a la alta cantidad de azucars presente en la planta estudiada. Además, en una parte del protocolo indican el uso de etanol 99% a temperatura ambiente, sin embargo se determinó que al usar el etanol frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) se obtenía un mejor rendimiento.

### **2.3.2 Cuantificación y evaluación de la integridad y calidad del RNA obtenido**

Para cuantificar el RNA total extraído se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 V3.3, este instrumento mide ácidos nucleicos ( $\lambda=260$  nm) con un 2% de error. Además, el programa de este espectrofotómetro, entrega las razones 260/280 y 260/230 que permiten evaluar la pureza de las extracciones de RNA. Un valor de la relación 260/280 cercano a 1.8 indica extracciones puras de DNA, mientras que, valores cercanos a 2.0 indican extracciones puras de RNA, valores más bajos que estos, señalan la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorban a 280 nm. Para la relación 260/230 los valores para muestras puras de RNA o DNA son ligeramente mayores, comúnmente en el rango de 1.8 y 2.2. Valores más bajos revelan la presencia de solventes orgánicos, algunas sales y proteínas.

Finalmente, para evaluar la integridad del RNA total extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, el cual fue preparado con buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) y Bromuro de etidio 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En el gel se cargaron 3  $\mu\text{L}$  de cada muestra junto a 1  $\mu\text{L}$  de buffer de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xylene cyanol 0.25% y glicerol 80%). El gel se colocó en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X a una diferencia de potencial de 50 V durante 20 minutos. Los geles fueron observados y fotografiados bajo luz UV en un transiluminador con cámara fotográfica incorporada (GeneGenius Classic de SynGene®). Para determinar la integridad del RNA total, se verificó la presencia de las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S. De esta forma, sólo las muestras de RNA que presentaron las razones 260/280 y 260/230 óptimas así como el bandeo característico en el gel, fueron seleccionadas para sintetizar posteriormente los cDNA.

### **2.3.3 Tratamiento con DNAsas**

Para asegurar que al realizar el PCR posterior a la transcripción reversa se amplifique el cDNA obtenido y no algún fragmento de DNA genómico que no se haya eliminado en la extracción, se realizó un tratamiento con la enzima DNAsa I (Fermentas). Donde se tomaron en 7,5  $\mu$ L (90ng/ $\mu$ L) de RNA, 1 $\mu$ L de enzima (1U de DNAsa I) y 1 $\mu$ L del tampón 10X de la DNAsa I con MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), además de 0,25  $\mu$ L de inhibidor de RNAsas Ribolock™, (10U, de Fermentas). La mezcla se incubó por 20 minutos a 37°C para que se llevara a cabo la reacción, posteriormente se inactiva la DNAsa adicionando a cada tubo de reacción 1 $\mu$ L de EDTA-DEPC 25mM. Para finalizar la inactivación de las nucleasas, el protocolo de Fermentas contempla un paso final de 15 min a 65°C, con el objetivo de conseguir mayor eficiencia en el trabajo, este paso se reemplaza por la primera etapa del protocolo de RT-Imprint II (Promega), enzima utilizada para la transcripción reversa, que contempla un periodo inicial de 5 min a 70°C, paso con el cual se suplen los 15 min a 65°C originales.

### **2.4 Extracción de DNA**

Se extrajo DNA con el método del tampón CTAB (Bromuro de Cetil Trimetil Amonio: CTAB 2%, NaCl 1,4 mM, EDTA 20 mM, Tris 8 100 mM), con este amortiguador se puede extraer DNA eficientemente, adaptado del procedimiento descrito por Murray y Thompson, 1980. Se tomaron 100 mg de tejido congelado previamente molido, se agregaron 4  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol y 600  $\mu$ L del amortiguador CTAB, posteriormente se homogenizó. Esta mezcla se calentó a 60°C por 30 min. Luego se añadieron 400  $\mu$ L adicionales de CTAB y se incubó por 15 min a 70°C. Posteriormente, se adicionó 400  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, invirtiendo enérgica y repetidas veces los tubos con el objetivo de separar las proteínas y polisacáridos. La mezcla se centrifugó a 13.000

rpm durante 10 min, luego de esto, se tomó el sobrenadante, que posee el DNA. Para lograr la precipitación del DNA, se agregaron 600 µL de isopropanol y se incubó a -20°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min, el pellet formado se lavó con 700 µL de etanol al 70% frío, se vortexeó y se centrifugó a 13.000 rpm por 5 min. El etanol fue retirado y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente. Este pellet, que contiene el DNA, fue resuspendido en 25 µL de agua nanopura.

### **2.5 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)**

Para llevar a cabo el RT-PCR se empleó el termociclador MyCycler™ (BIO-RAD). En la Tabla 2 se detallan las etapas programadas en el termociclador. En cada reacción se mezclaron 5,5 µL del mRNA tratado con DNAsas con 1µL del partidor "oligo AP" (5' CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'), este fue puesto en el termociclador, para dar un golpe de calor de 70°C por 5 min, luego de esto, se retiró y se puso en hielo por otros 5 min. Pasado este tiempo, a cada tubo se le agrega la mezcla que permite la reacción. Esta mezcla se preparó con 1µL de la enzima transcriptasa reversa RT-Improm II (Promega), 4 µL de búffer 5X de enzima RT (proporcionado por Promega), 5,2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1µL de dNTPs (preparados en agua DEPC) 10 mM y 0,5 µL (20U) de inhibidor de RNAsas Ribolock™ (Fermentas).

### **2.6 PCR**

Para amplificar el fragmento de interés de *hsp70* (609 pb) se empleó como partidor directo 5'GGTTTGAGGAGCTCAACATGGA3' y el reverso 5'GTCTTCTTGTCTAGTGGTAGTG3', estos partidores se diseñaron previamente usando secuencias del gen *hsp70* de *Arabidopsis thaliana* (AY059885.1, AY054183.1, AY054190.1), *Zea mays* (AY914601.1), *Oryza sativa* (X67711.2) y *Triticum* (AF005993.1).

Para amplificar el gen de *ubiquitina* (196 pb) se usó el partidor directo 5'GGCAAGACCATCACCCCTGGA3' y el reverso 5'ACTCCTTCTGGATGTTGTAGTC3', disponibles en el laboratorio, para realizarlos se utilizaron las secuencias de ortólogas de *ubiquitina* disponibles (*Triticum aestivum* (AY297059 y X56803), *Zea mays* (S94464), *Oryza sativa* (XM\_464194), *Arabidopsis thaliana* (NM\_104380), *Glycine max* (X13251) y *Gladiolus grandiflorus* (DQ445914)). En el caso del gen del RNA ribosomal 18S (llamado en adelante como 18S) el partidor directo corresponde a 5'TTGATTACGTCCCTGCCCTTT3', mientras el reverso es 5'ACAATCATCCTTCCGCAGGT3', estos últimos son partidores de uso estándar en el laboratorio que se emplean para chequear la integridad del cDNA y DNA. Las especificaciones de los programas de PCR se muestran en la Tabla 2.

Para cada reacción de PCR se realizó una mezcla que contenía 0,2 mM de dNTPs, 0,2 mM de cada partidor, 1U de enzima *Paq* polimerasa (Favorgen) y tampón 1X (Favogen) y agua nanopura.

**Tabla 2: Características de los programas de PCR y RT-PCR.** En esta Tabla se muestran los detalles (los segmentos y pasos, además del tiempo, temperatura y ciclos de cada uno de los pasos) de los programas utilizados para amplificar los fragmentos de hsp70, ubiquitina y 18S. Además, en la última parte se señala el programa con el cual se llevó a cabo la transcripción reversa (Impront II).

Hsp70	Segmentos	Paso	Tiempo	Temperatura (°C)	Ciclos
	1	1	5 min	94	1
		1	30 s	94	
	2	2	30 s	50,5	36
		3	40 s	72	
	3	1	10 min	72	1
	4	1	∞	10	1

ubiquitina	Segmentos	Paso	Tiempo	Temperatura (°C)	Ciclos
	1	1	5 min	94	1
		1	30 s	94	
	2	2	30 s	55	30
		3	40 s	72	
	3	1	10 min	72	1
	4	1	∞	10	1

18S	Segmentos	Paso	Tiempo	Temperatura (°C)	Ciclos
	1	1	5 min	94	1
		1	30 s	94	
	2	2	30 s	52	30
		3	40 s	72	
	3	1	10 min	72	1
	4	1	∞	10	1

RT-PCR	Segmentos	Paso	Tiempo	Temperatura (°C)
		1	5 min	70
	1	2	5 min	Hielo
		3	5 min	25
	2	1	60 min	42
		2	15 min	70
	3	1	∞	10

## **2.7 Determinación y cuantificación del producto de PCR**

Para la visualización del producto de PCR se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X (Tris base 40 mM, ácido acético glacial 19 mM y EDTA 1 mM pH 8), además de bromuro de etidio en una concentración de 1µg/mL para la visualización de los ácidos nucleicos a la luz ultravioleta. Cada muestra fue mezclada con el tampón de carga preparado en el laboratorio que contenía azul de bromofenol 0.25%, xylene cyanol 0.25% y glicerol 80%, todo diluido en TAE pH 4. La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial de 80 V, durante 30 min.

La detección e identificación el tamaño de banda esperada en cada electroforesis, se hizo con el estándar de peso molecular Ladder GeneRuler™ de 100pb y de 1Kb, ambos de Fermentas. Luego, para visualizar los geles se empleó un transiluminador Syngene, modelo MultiGenius. Las bandas fueron cuantificadas mediante el programa de análisis de imágenes Image J.

## **2.8 Análisis de datos**

Los datos obtenidos desde el programa Image J fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, asumiendo datos no paramétricos. Para los datos obtenidos desde los experimentos de estrés térmico, hídrico y combinado se realizaron comparaciones entre los distintos tratamientos para las puntas y las bases independientemente. Luego para determinar entre que tratamientos existía una expresión significativamente distinta se empleó el Test de Tukey.

En los gráficos realizados para la expresión de los genes de *ubiquitina* y de *hsp70* de plantas sometidas a estrés térmico e hídrico, los datos fueron expresados relativos al control de carga (el gen del RNA ribosomal 18S) y normalizados respecto a la condición control. Mientras que para los experimentos de estrés combinado, los datos sólo se

expresan relativos a la expresión del gen *18S*, obteniéndose una expresión calibrada, debido a que no se cuenta con un control válido para todos los experimentos.

### **2.9 Análisis de secuencias de *hsp70* y *ubiquitina***

En un trabajo anterior (Proyecto de seminario de título de Claudia Huerta) se clonaron los cDNAs de los genes *hsp70* y *ubiquitina* de Aloe vera en el vector pGEM®-T Easy Vector (Promega), posteriormente se mandaron a secuenciar. Paralelamente se realizó una búsqueda de ortólogos en distintas especies de plantas, usando la base de datos del NCBI, con estos datos más la secuencia obtenida, se realizaron cladogramas utilizando el programa ClustalW.

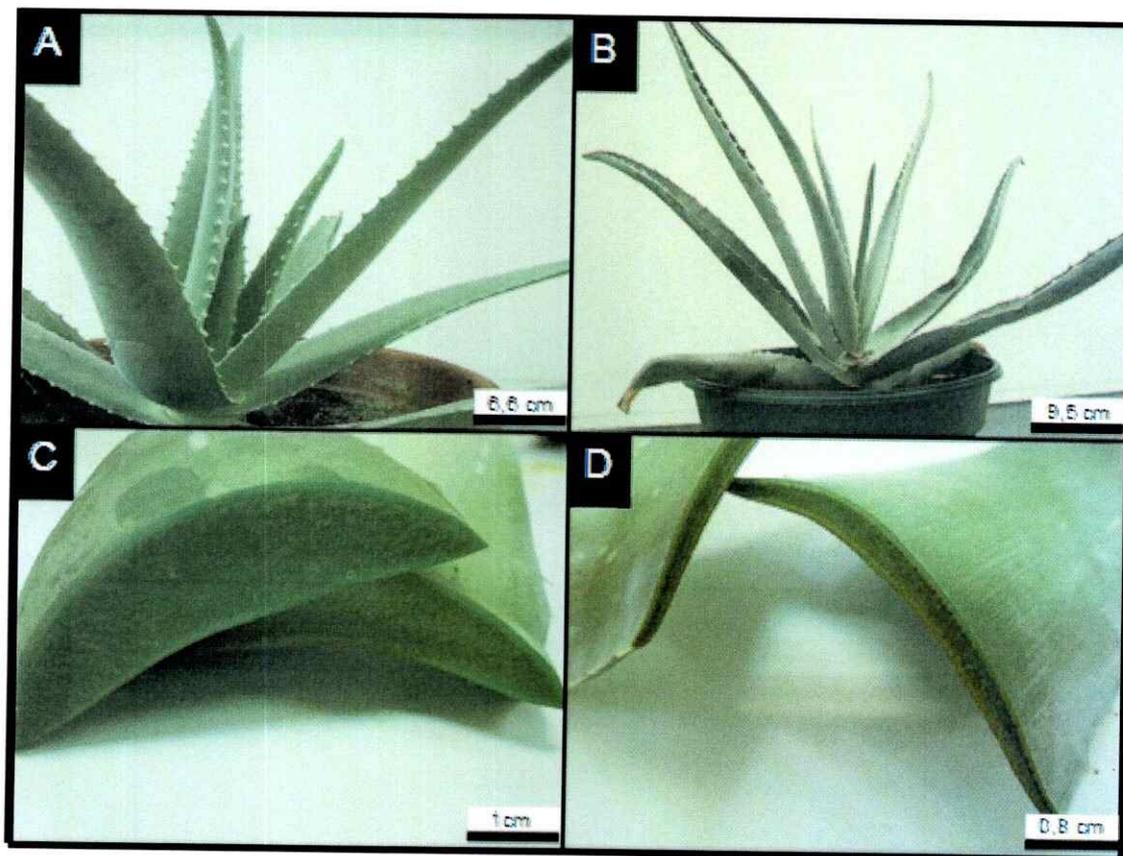
## RESULTADOS

### **3.1 Características fenotípicas de plantas de *Aloe vera* sometidas a estrés hídrico.**

Con el objetivo de determinar la influencia del estrés hídrico sobre el desarrollo foliar de *Aloe vera*, se midió el largo y ancho de las hojas de plantas sometidas a los distintos tratamientos hídricos, además se determinó la masa de las hojas para cuantificar entre otros parámetros, el porcentaje de agua de cada hoja. En la Figura 2 se muestran 2 plantas de *Aloe barbadensis* Miller, una regada con 75% de CDC (Figura 2 A y C) y otra regada con el tratamiento más extremo utilizado en este estudio, de 25% de CDC (Figura 2 B y D). En esta Figura se puede observar la diferencia fenotípica que presentan las plantas con distinto suministro de agua. La planta con mayor riego exhibe hojas mucho más gruesas y turgentes que las regadas con menos agua, presentando además estas últimas una escasa cantidad de gel (Comparar Figura 2 C y D). La elevada turgencia de las hojas de las plantas con más riego se determinó por la fácil ruptura de éstas al doblarlas, lo cual no ocurría en las de menos riego, mucho más flexibles a la curvatura. Una diferencia interesante entre estas dos plantas, es en la coloración de sus hojas. En la Figura 1A, se aprecia que la coloración de las hojas es verde claro intenso, mientras que en la Figura 1B ésta es de color verde oscuro con algunas zonas cafés y rojizas.

Los primeros parámetros de comparación para determinar el efecto de los distintos tratamientos en las plantas, fueron el largo y el ancho de las bases de las hojas. Para ello, se escogieron hojas de 3 plantas similares sometidas a cada régimen hídrico. Esto se resume en la Tabla 3, donde se ve que las hojas significativamente más largas se presentaban en las plantas con 50% y 100% de CDC, alcanzando longitudes por sobre los 40 cm. Mientras que el ancho de las bases fue incrementando, en plantas regadas

con el 50%, 75% y 100% de CDC. Lo anterior evidencia una relación directa y significativa entre el agua recibida por la planta y el largo y ancho de sus hojas.



**Figura 2: Fenotipo de plantas de Aloe vera sometidas a 75% y 25% de CDC.** A) Planta sembrada en maceta y regada por 3 meses con 200 mL de agua (75% CDC) de agua una vez por semana. B) Planta sembrada en maceta y regada por 3 meses con 80 mL de agua (25% CDC) una vez por semana. C y D) Cortes transversales de las hojas ilustradas en A y B. En el centro de cada hoja se observa el gel. En cada sección se muestra la barra de tamaño empleada para cada imagen.

**Tabla 3: Determinación del largo y ancho de bases de las hojas de A. vera sometidas a 4 tratamientos hídricos (25%, 50%, 75% y 100% de CDC).** Cada valor es el promedio de 3 medidas  $\pm$  DE. Las letras indican valores significativamente diferentes con un  $p < 0,05$  (Test de Tukey)

Porcentaje CDC (%)	Largo de la Hoja (cm)	Ancho de la base (cm)
25	34,17 $\pm$ 2,25 a	4,17 $\pm$ 0,76 o
50	41,83 $\pm$ 2,93 b,c	4,83 $\pm$ 0,29 o,p
75	39,17 $\pm$ 1,89 b	5,73 $\pm$ 0,25 p
100	48,00 $\pm$ 3,05 c	5,53 $\pm$ 0,45 p

Debido a la forma triangular de la hoja de aloe vera, se podría calcular un área foliar con su largo y ancho (base x largo / 2). Aplicando esta fórmula se obtienen áreas foliares aproximadas de 71; 101; 112; y 132 cm<sup>2</sup>, para las plantas sometidas a 25%, 50%, 75% y 100% de CDC.

Para establecer la existencia de una relación entre la variación en el tamaño de las hojas y ancho de sus bases, con la cantidad de gel presente en las hojas, se cuantificó el peso seco (psg), el peso fresco (pfg) y la cantidad de agua de 3 hojas similares de cada tratamiento hídrico. Los datos recolectados se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4: Determinación de cantidad de gel y de agua almacenada en hojas de A. vera sometidas a 4 tratamientos hídricos (25%, 50%, 75% y 100% de CDC).** En esta Tabla se muestran el peso seco del gel (psg), peso fresco del gel (pfg) y agua del gel. Los valores de psg se obtuvieron a partir de la razón del peso seco del gel de la hoja (g) en relación al peso de la hoja fresca (g), mientras que los valores de pfg se obtuvieron dividiendo el peso del gel (g) en el peso de la hoja fresca (g). Cada valor es el promedio de 3 medidas  $\pm$  DE. Las letras indican valores significativamente diferentes con un  $p < 0,05$  (Test de Tukey)

Porcentaje CDC (%)	psg	pfg	Agua del gel
25	0,08 $\pm$ 0,03 a	2,03 $\pm$ 1,59 a	2,23 $\pm$ 1,57 a
50	0,13 $\pm$ 0,04 a	6,14 $\pm$ 3,62 a	6,01 $\pm$ 3,58 a
75	0,17 $\pm$ 0,01 b	12,0 $\pm$ 3,98 a	11,8 $\pm$ 3,97 a
100	0,14 $\pm$ 0,04 a	16,97 $\pm$ 7,04 b	16,8 $\pm$ 7,02 b

La Tabla 4 muestra que el peso seco del gel es mayor en las plantas regadas con 75% de CDC, mientras que el peso fresco del gel resulta ser mayor (con un valor de

aproximadamente 17) para la planta regada con 100% de CDC y disminuye paulatinamente con el déficit hídrico, llegando a un pfg de 2,03 para las plantas mantenidas con 25% de CDC. Además, esta Tabla indica que las plantas con mayor cantidad de agua en las hojas, son aquellas que corresponden a las plantas mantenidas con 100% de la CDC.

### **3.2 Análisis molecular**

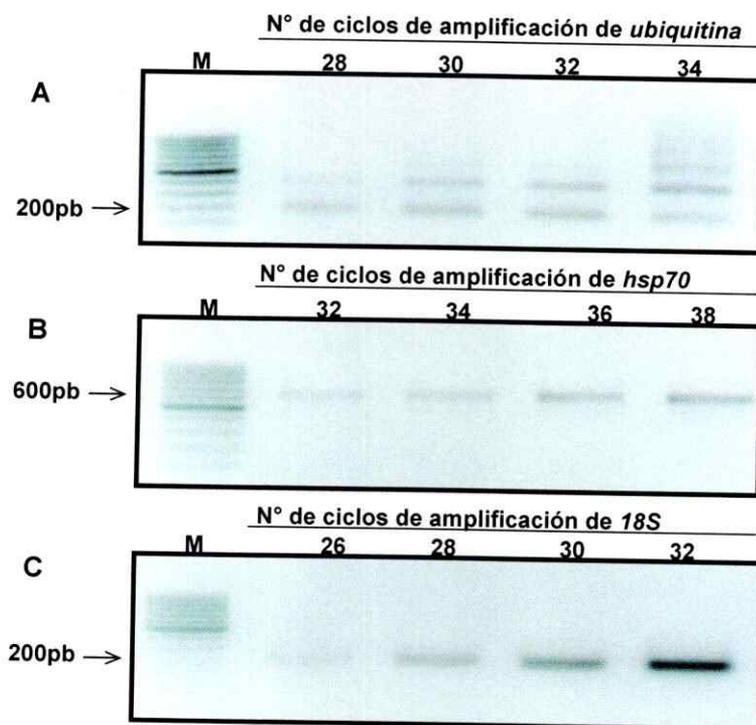
Una vez que se realizaron los experimentos fisiológicos, es decir el estrés térmico, hídrico y combinado, se evaluó la expresión de los genes de estrés térmico *hsp70* y *ubiquitina* mediante RT-PCR semi-cuantitativo. Primero se muestran los distintos pasos necesarios para asegurar que se efectúa este método correctamente y que los resultados que se obtuvieron son válidos. Con el propósito de determinar el efecto del estrés combinado sobre las plantas de Aloe vera, es necesario en primer lugar determinar en forma independiente efecto del estrés térmico y del déficit hídrico sobre la expresión génica. Con estos resultados, se pueden obtener conclusiones respecto a la expresión génica determinada para los genes de *hsp70* y *ubiquitina* en plantas bajo estrés combinado.

#### **3.2.1 Estandarización del número de ciclos del programa de PCR**

Con el fin de estandarizar el número óptimo de ciclos de amplificación por PCR de los genes *hsp70*, *ubiquitina* y el control correspondiente al gen del RNA ribosomal *18S* (*18S*), se hicieron PCR a distintos ciclos para así obtener la fase exponencial de la amplificación, es en esta fase donde existe una relación lineal entre el cDNA molde y el producto final, lográndose la cuantificación. En la Figura 3 se observa que para amplificar *hsp70* la cantidad de ciclos óptimos para alcanzar la fase exponencial deseada,

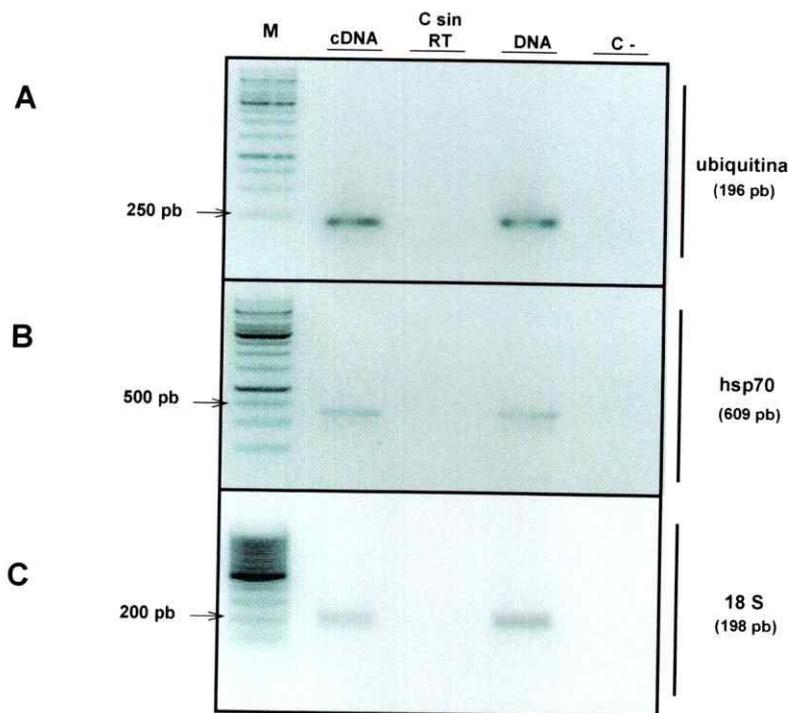
corresponde a 36 (Figura2B), mientras que para *ubiquitina* y *18S*, ésta corresponde a 30 ciclos ( Figura 2A y C).

Para asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos durante toda la evaluación molecular cuando se utiliza RT-PCR semi-cuantitativo, es necesario comprobar que no se está amplificando DNA genómico residual, sino que se está verificando solo la expresión de los genes (acumulación de mRNA). Para esto, cada vez que se realizó RT-PCR se realizó un control sin RT, en el cual se utilizó como molde del PCR la solución sometida a transcripción reversa, pero a la cual no se le agregó la enzima transcriptasa reversa (C sin RT en Figura 4). Además se debe utilizar un control positivo que nos indique que la reacción de PCR se lleva a cabo correctamente.



**Figura 3: Estandarización del programa de RT-PCR semi-cuantitativo para los genes *hsp70*, *ubiquitina* y *18S*.** Se determinó el número de ciclos óptimos para obtener una banda amplificando cDNA que corresponde a la fase exponencial de amplificación. A) Gen de *ubiquitina* amplificado en 28, 30, 32 y 34 ciclos de PCR, B) Gen de *hsp70* amplificado en 32, 34, 36 y 38 ciclos de PCR. C) Gen *18S* amplificado en 26, 28, 30 y 32 ciclos de PCR. M corresponde al estándar de peso molecular de 100 pb.

En la Figura 4 se ilustra la amplificación de los genes *ubiquitina* (196 pb), *hsp70* (609pb) y *18S* (198pb) a partir de DNA genómico y cDNA de Aloe vera, con el fin de comprobar el correcto diseño de los partidores. En los tres genes analizados se obtuvieron bandas de igual tamaño, independiente el molde utilizado. En consecuencia, se utilizó DNA genómico como control positivo para todos los análisis de RT-PCR semi-cuantitativo realizados en este seminario de título. Además se comprobó la limpieza del proceso de extracción de RNA, donde no existe DNA residual que pudiese intervenir con los resultados.



**Figura 4: Evaluación del diseño de los partidores para la amplificación de los genes *ubiquitina*, *hsp70* y *18S*.** Se muestra bandas de equivalentes tamaño al utilizar como molde de amplificación cDNA o DNA genómico. A) Fragmentos amplificados de 196 pb, correspondientes a *ubiquitina*. B) Fragmentos amplificados de 609 pb, correspondientes a *hsp70*. C) Fragmentos amplificados de 198 pb, correspondientes a *18S*. De izquierda a derecha, se cargaron las muestras correspondientes al marcador de peso molecular (M) de 1Kb (en A y B) o 100 pb (en C), cDNA, control sin transcriptasa reversa (C sin RT), DNA genómico y un control negativo, correspondiente a agua (C-).

### 3.2.2 Análisis de las secuencias de *hsp70* y *ubiquitina*

Para comprobar que efectivamente los fragmentos de cDNA amplificados con los partidores diseñados amplificaran para los genes *hsp70* y *ubiquitina*, estos fueron clonados y secuenciados (Proyecto de Tesis de Claudia Huerta). En la Figura 5 se muestran las secuencias obtenidas. Los fragmentos secuenciados se compararon con secuencias de otras especies tomadas desde la base de datos del NCBI. Los cladogramas construidos se exponen en la Figura 6, en la cual se observa que el fragmento del gen de *ubiquitina* (A) obtenido tiene similitud con el grupo de las plantas monocotiledóneas. Para el gen de *hsp70* (Figura 6B) se observa una mayor identidad nucleotídica con arroz (*Oryza sativa*). Sin embargo, en este cladograma también hay una alta similitud con genes de *Solanum commersonii*, planta dicotiledónea.

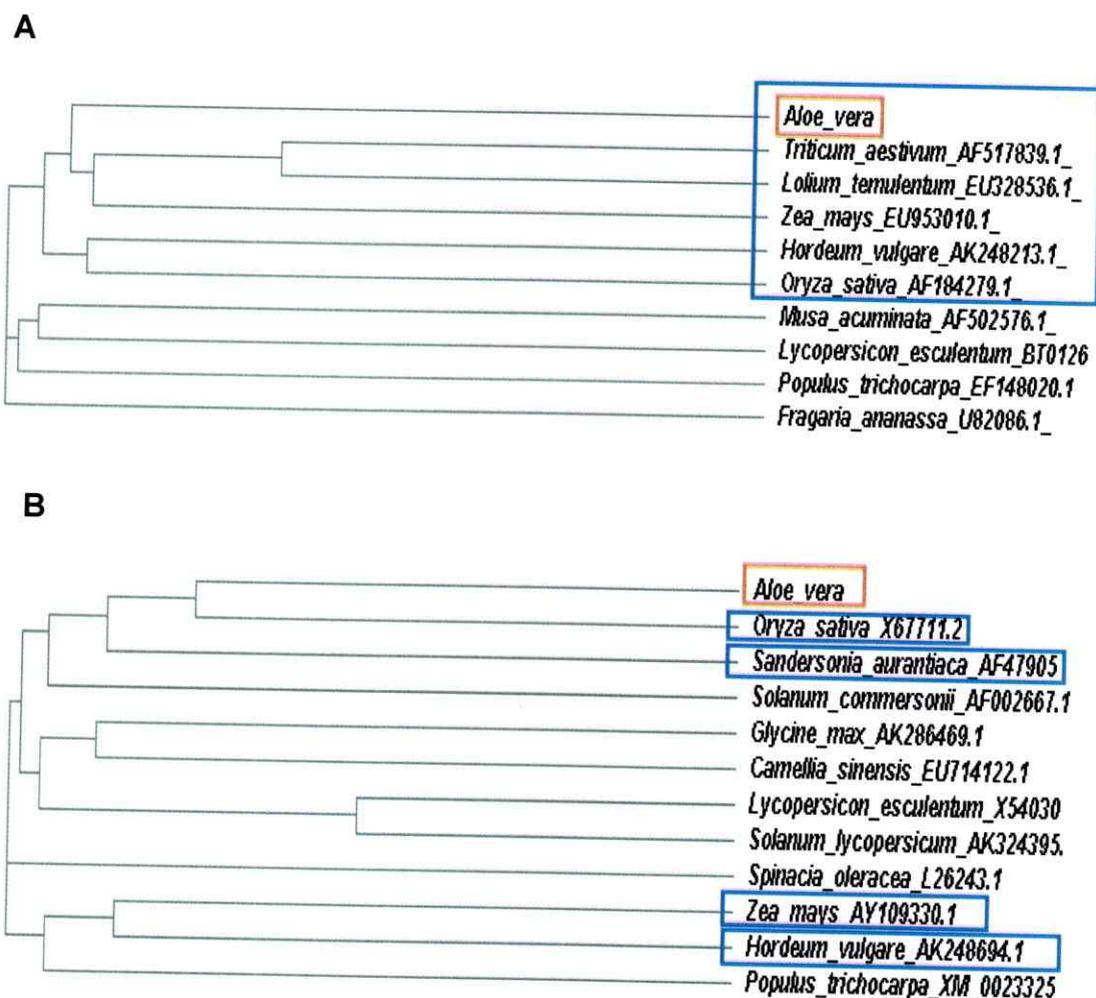
**A**

```
5' -GGTTTGAGGAGCTCAACATGGATCTCTTCAGGAAGTGCATGGAACCGGTTGAGAAGTGTT
TGAGGGATGCCAAGATGGACAAGAGCAGTGTTACCGATGTCGTGCTTGTCGGTGGGTCCA
CCAGAATCCCAAGGTGCAGCAGCTGCTGCAGGACTTCTTCAACGGGAAGGAGCTCTGCA
AGAGCATCAACCCGGATGAGGCTGTTGCCTATGGTGCTGCTGTGCAGGCTGCTATCTTGA
TGGTGAGGGCAATGAGAAGGTGCAGGATCTTCTCTGTTGGATGTTACCCCTCTGTCTC
TTGGTCTTGAGACTGCTGGAGGTGTGACGACTGTCTTGATCCCGAGGAACACAACATCC
CAACGAAGAAGGAGCAGGTGTTCTCCACATACTCGGACAACCAGCCAGGTGTCTTGATCC
AGGTGTACGAGGGTGAGAGGACAAGGACCAAGACAACAACCTTGCTTGGCAAGTTTGAGC
TCTCTGGCATCCCACCTGCACCTAGGGGAGTTCCTCAGATTACTGTGTGTTTTGACATTG
ATGCCAATGGTATCTTGAATGTCTCTGCTGAGGACAAGACGACTGGTCAGAAGAACAAGA
TCACCATCAC-3'
```

**B**

```
5' -GGCAAGACCATCACCCCTGGGGTGGAGAGCTCTGACACGATTGACAATGTCATAGCTA
AGATTCAGGATAATGAGGGCATCCCCCTGACCAGCAGAGGCTCATCTTCGCTGGCA
AGCAGCTCGAGGACGGGCGGACTCTGGCTGACTACAACATCCAGAAGGAGT -3'
```

**Figura 5: Secuencias de *hsp70* y *ubiquitina*.** En trabajos previos del laboratorio se secuenciaron los cDNAs correspondientes a *hsp70*(A) y a *ubiquitina* (B).

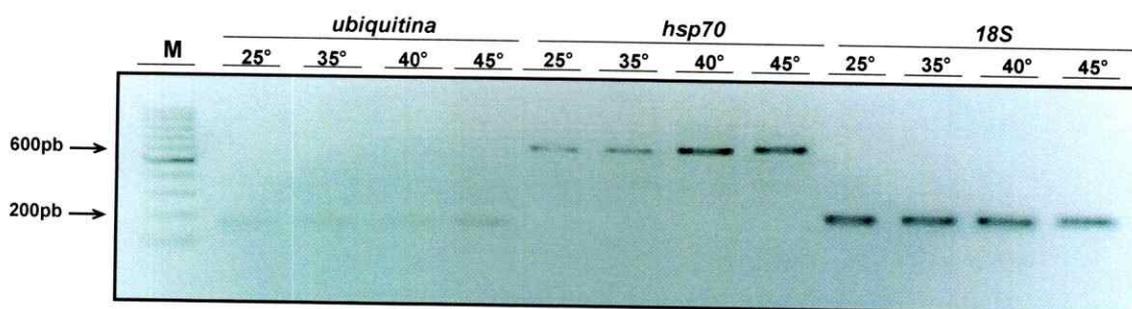


**Figura 6: Homología de Aloe vera y otras especies.** A) Cladograma realizado con el fragmento de *ubiquitina*; B) Cladograma hecho con el fragmento de *hsp70* secuenciado. Los recuadros rojos señalan Aloe vera, los recuadros azules indican las plantas monocotiledoneas. El código de cada secuencia empleada se indica a continuación de cada especie en los cladogramas (NCBI). Para ambos casos se empleó el programa ClustalW

### 3.2.3 Expresión de los genes *ubiquitina*, *hsp70* en A.vera bajo estrés térmico

Con el objeto de determinar la expresión de los genes *hsp70* y *ubiquitina* de plantas de A. vera sometidas a distintas temperaturas (25°C, 35°C, 40°C y 45°C), se realizaron análisis de RT-PCR. En la Figura 7 se muestra la fotografía tomada a un gel donde se cargaron los productos de PCR para los genes de *ubiquitina* (196pb), *hsp70* (609pb) y *18S*(198pb) amplificados desde muestras foliares de plantas sometidos a los

estrés térmicos mencionados. En el caso de *ubiquitina* se ve una banda más intensa en el carril donde se cargó la muestra correspondiente al tratamiento de 45°C, mientras en *hsp70* se observan 2 bandas de mayor intensidad, correspondientes a las muestras tratadas a 40°C y de 45°C. El gen *18S* se utilizó como control de carga, ya que su expresión permanece constante, independiente de los tratamientos aplicados. Para todas las pruebas de RT-PCR se realizaron controles positivos, negativos y sin RT (no mostrados en la Figura 7) que dieron resultados equivalentes a los mostrados en la Figura 4.



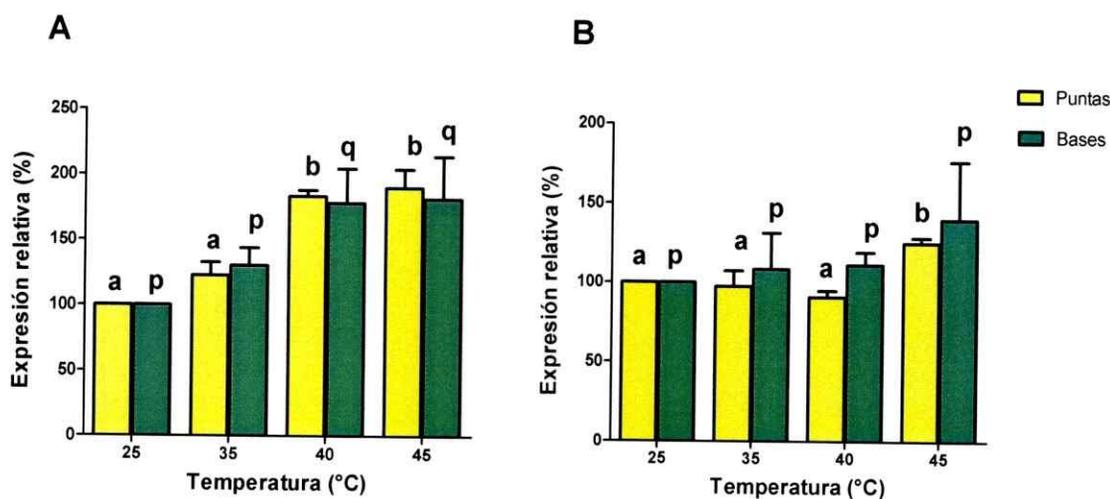
**Figura 7: Expresión de *ubiquitina* y *hsp70* en plantas sometidas a estrés térmico.** Se cargó el producto de PCR proveniente de muestras de plantas sometidas a 25°C, 35°C, 40°C y 45°C. Se muestran los dos genes analizados, primero *ubiquitina*, luego *hsp70*, y finalmente, el control *18S*. Todos los carriles fueron cargados con igual cantidad de producto de RT-PCR. El estándar de peso molecular utilizado (M) es de 100 pb.

Se cuantificó la intensidad de las bandas registradas para cada réplica mediante el programa Image J. En cada caso se utilizaron 3 plantas similares (réplicas biológicas), desde las cuales se obtuvo el RNA. A cada muestra se les realizó una transcripción reversa y a partir de ésta se realizaron 2 replicas técnicas del RT - PCR. Por lo tanto, para cada tratamiento se registraron 6 datos. Estas mediciones se resumen en la Figura 8, la cual muestra 2 gráficos. La Figura 8A ilustra la semi- cuantificación de *hsp70*, mientras que B la de *ubiquitina*. En A se observa una relación proporcional entre el aumento de la temperatura y el aumento de la expresión relativa del gen que codifica para *hsp70*, tanto

en las puntas como en las bases de las hojas. Particularmente, en el caso de las puntas hay una diferencia estadísticamente significativa entre el control y los dos tratamientos más extremos (40°C y 45°C), siendo los valores porcentuales similares para ambas temperaturas.

En los análisis de *ubiquitina* (Figura 8B), se observa una diferencia significativa entre las puntas de las plantas control y las plantas sometidas a 45°C, no existiendo diferencias significativas en los demás tratamientos, tanto en las puntas como en las bases. Para esta medición, se consideró como 100% a los valores correspondientes a las plantas sometidas a 25°C, es decir, las plantas controles. Es por esto que los datos se expresan en forma porcentual.

Los resultados mostrados en la Figura 8 permiten hacer comparaciones solo entre cada tratamiento, para las puntas y las bases de manera independiente, por esto, para las puntas se muestran las diferencias significativas con las letras a y b, mientras que para las bases con p y q.

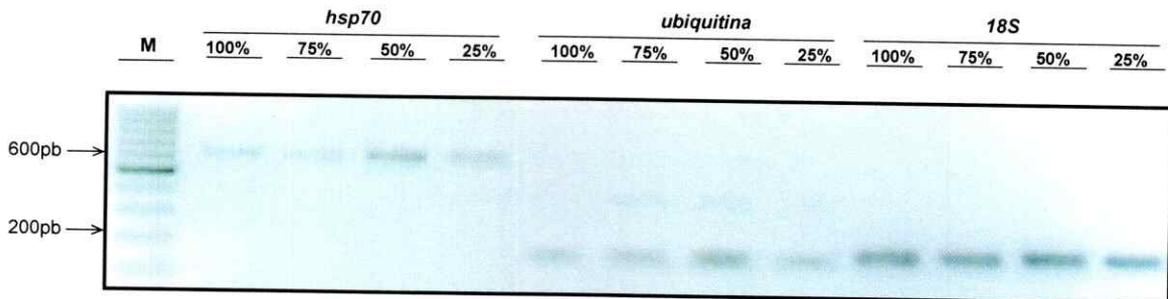


**Figura 8: Expresión relativa de los genes *hsp70* y *ubiquitina* en plantas sometidas a estrés térmico.** A) Expresión relativa de *hsp70*. B) Expresión relativa de *ubiquitina*. En los gráficos mostrados en esta Figura se consideró como 100% lo expresado por la planta control (25°C). Los valores corresponden al promedio de 3 determinaciones independientes con sus desviaciones estándar. Letras distintas denotan diferencias significativas con un  $p < 0,05$  entre tratamientos (Test de Tukey).

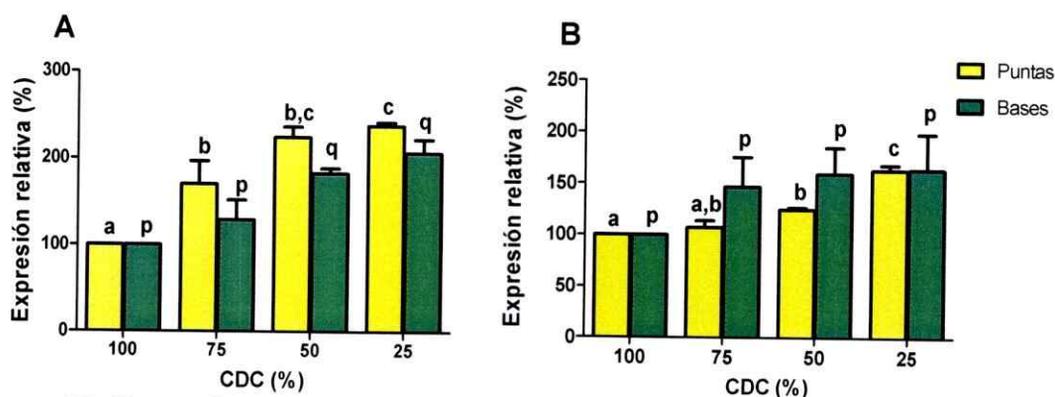
### 3.2.4 Expresión de los genes *ubiquitina*, *hsp70* en *A.vera* bajo estrés hídrico

Haciendo un análisis similar al del estrés térmico, se determinó la expresión de los genes de *ubiquitina* y *hsp70* para muestras de plantas mantenidas por 3 meses con distintos regimenes de riego (100%, 75%, 50% y 25% de CDC). El experimento se realizó a una temperatura constante de 25°C. En la Figura 9 se presenta el gel con los fragmentos amplificados por RT-PCR, donde es posible observar una banda más intensa en el tratamiento con 50% de CDC, tanto para *hsp70* como para *ubiquitina*.

Para todas las pruebas de RT-PCR se realizaron controles positivos, negativos y sin RT (no mostrados en la Figura 7) que dieron resultados equivalentes a los mostrados en la Figura 4.



**Figura 9: Expresión de *ubiquitina* y *hsp70* en plantas sometidas a estrés hídrico.** Se cargó el producto de PCR proveniente de muestras de plantas sometidas a 100%, 75%, 50% y 25% de CDC. En este gel se muestra primero *hsp70*, luego *ubiquitina* y finalmente 18S, el control de carga. Todos los carriles fueron cargados con igual cantidad de producto de RT-PCR. Se utilizó un estándar de peso molecular (M) de 100 pb .



**Figura 10: Expresión relativa de los genes *hsp70* y *ubiquitina* en plantas sometidas a distintos tratamientos hídricos (25%, 50%, 75% y 100% de las CDC).** A) Expresión relativa de *hsp70*. B) Expresión relativa de *ubiquitina*. En los gráficos mostrados en esta Figura se consideró como 100% lo expresado por la planta control (25°C). Los valores corresponden al promedio de 3 determinaciones independientes con sus desviaciones estándar. Letras distintas denotan diferencias significativas con un  $p < 0,05$  entre tratamientos (Test de Tukey).

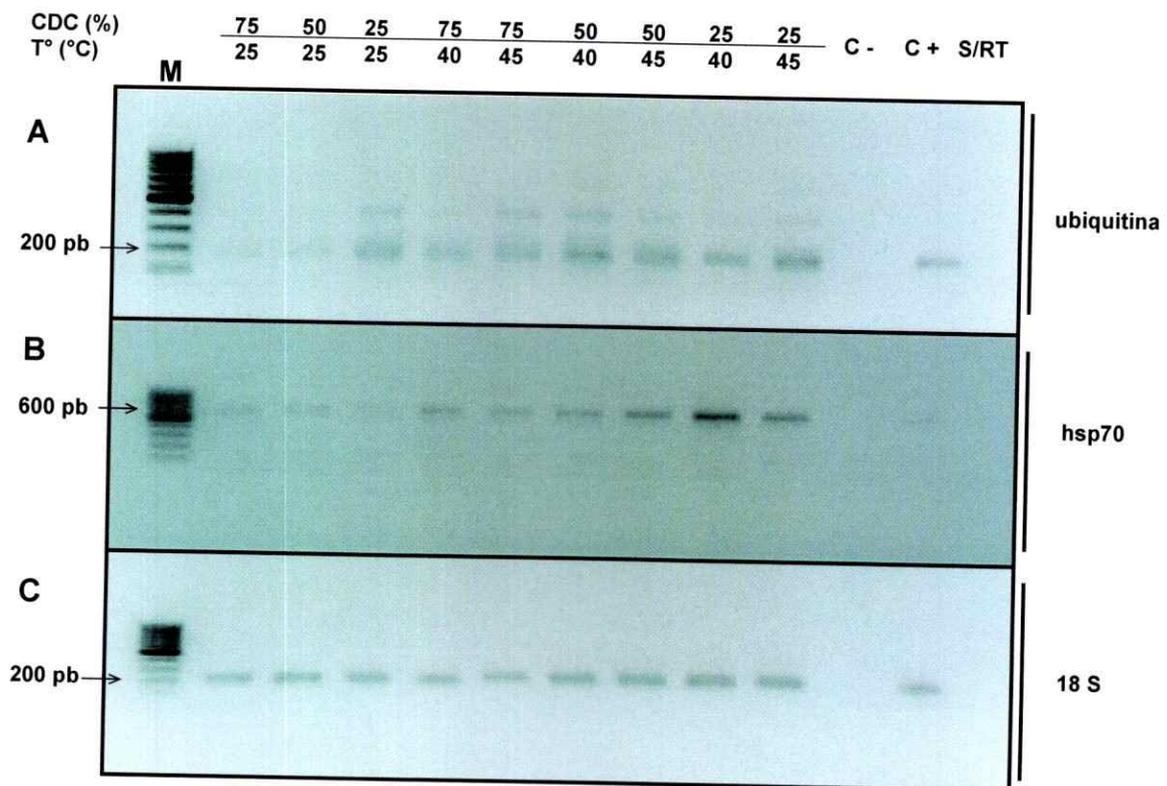
En la Figura 10 se presenta la semi-cuantificación de las bandas correspondientes a cada fragmento de PCR (Figura 9). Es posible observar que la expresión del gen *hsp70* aumenta significativamente con el estrés hídrico, tanto en las puntas como en las bases de las hojas (Figura 10A).

En la Figura 10B, se observa que la expresión del gen de *ubiquitina*, aumenta significativamente en las puntas de las hojas al disminuir la cantidad de agua suministrada. En las bases no existen diferencias significativas entre los 4 tratamientos hídricos.

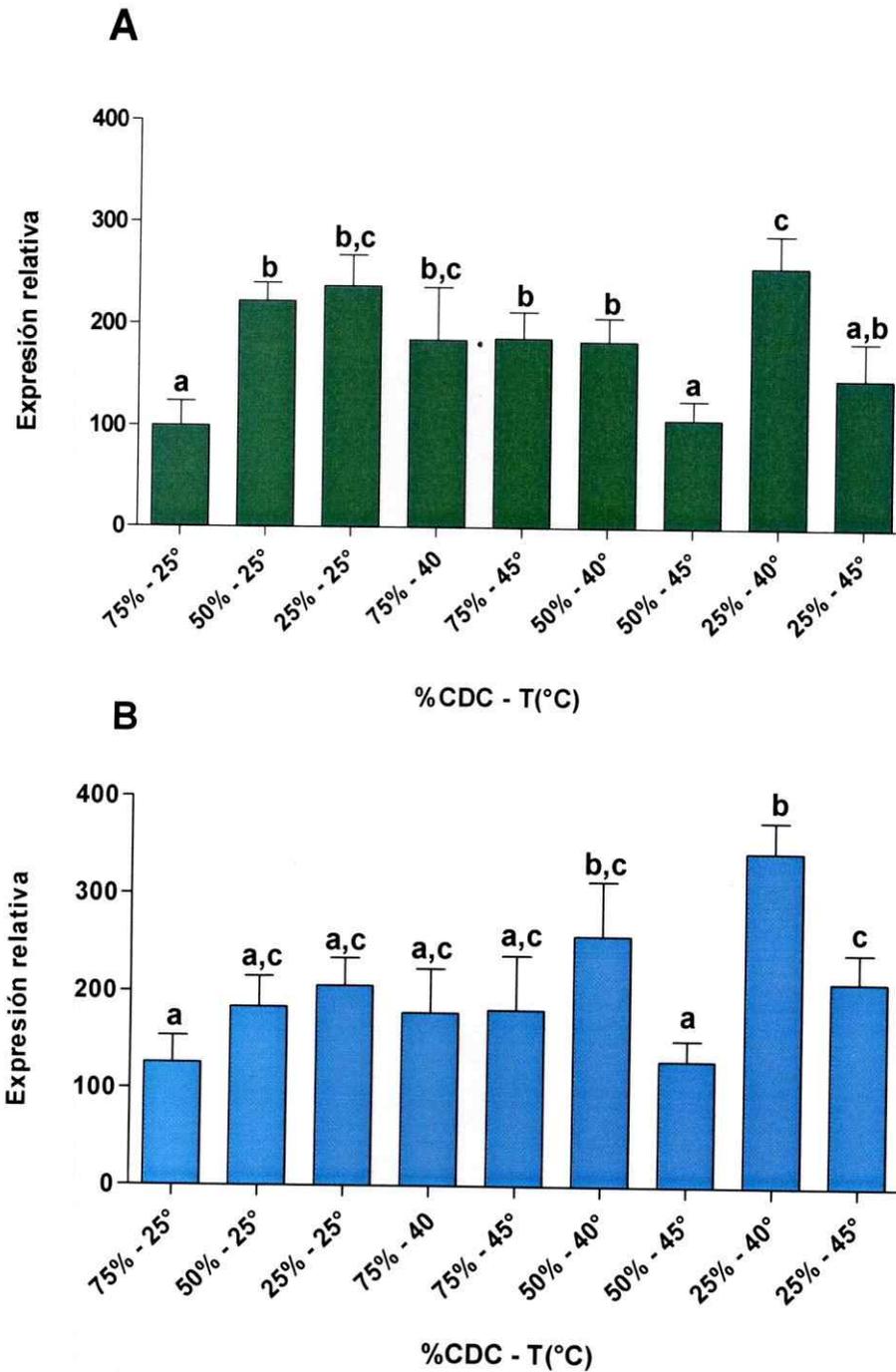
Los resultados mostrados en la Figura 10 permiten hacer comparaciones solo entre cada tratamiento, para las puntas y las bases de manera independiente, por esto, para las puntas se muestran las diferencias significativas con las letras a y b, mientras que para las bases con p y q.

### 3.2.5 Análisis de la expresión de los genes *hsp70* y *ubiquitina* de plantas sometidas a estrés hídrico y térmico combinado

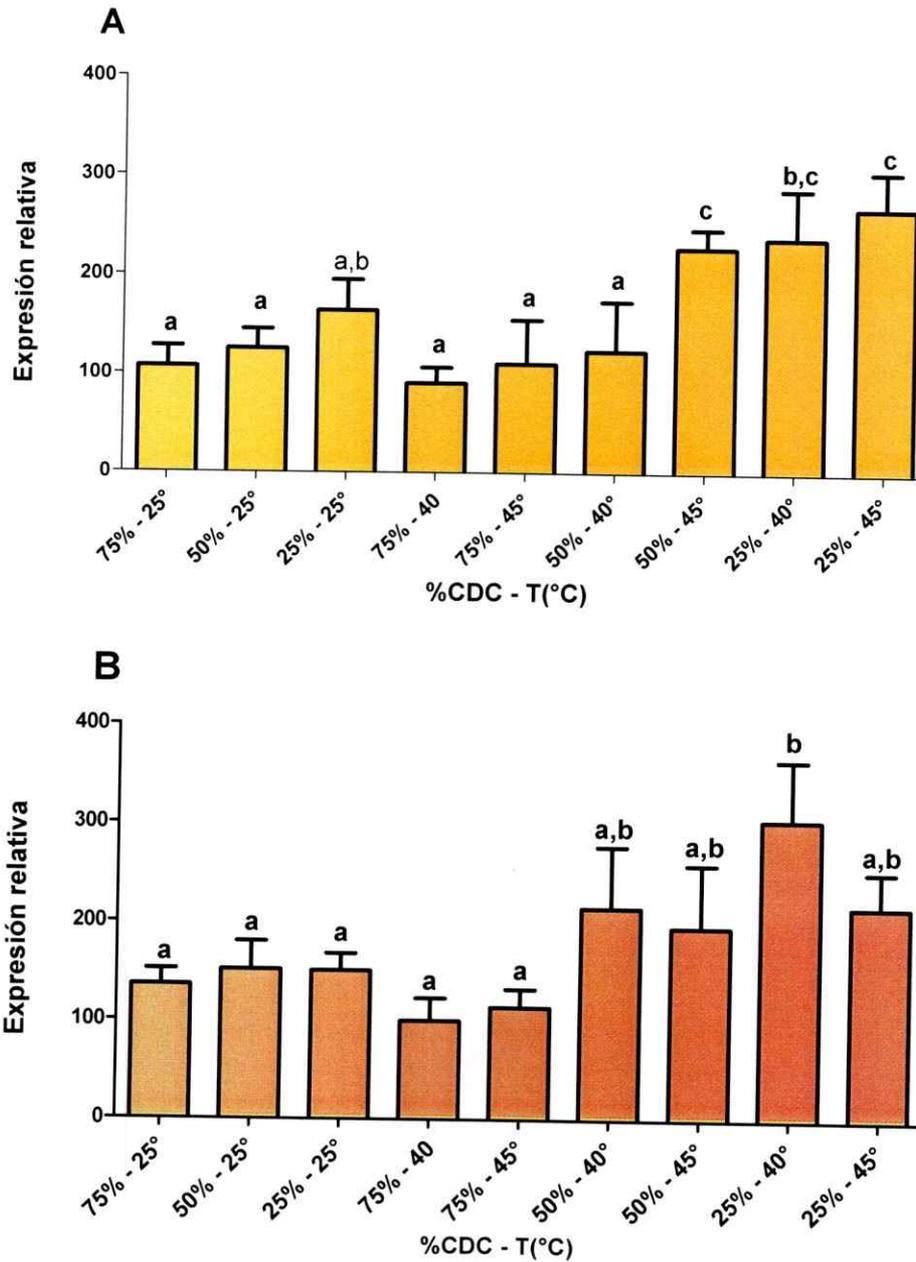
Para evaluar la expresión de los genes *hsp70* y *ubiquitina* de plantas sometidas a estrés combinado de temperatura y déficit hídrico, se efectuaron ensayos de RT-PCR semi-cuantitativo. El estrés combinado se hizo en plantas regadas con 50% y 25% de CDC, las cuales se pusieron en una cámara a 40°C y 45°C. En la Figura 11 se muestra uno de los geles que se cargaron para realizar éste análisis. Aquí se observa que la mayor expresión del gen de *ubiquitina* fue en el tratamiento de 25% de CDC a 45°C (Figura 11A). La Figura 11B muestra la expresión del gen *hsp70*, donde se puede observar que la mayor expresión es a 25% de CDC y 40°C. En la Figura 11C se ilustra la expresión constante del gen *18S* en estos tratamientos.



**Figura 11: Expresión de los genes *ubiquitina* y *hsp70* de plantas sometidas a estrés hídrico y de temperatura.** A) Gen de *ubiquitina*, B) Gen de *hsp70*. C) *18S*, control de carga. Todos los carriles fueron cargados con igual cantidad de producto de RT-PCR. M corresponde al estándar de peso molecular de 100 pb. C-, control negativo C+, control positivo y S/RT, control sin transcriptasa reversa.



**Figura 12: Expresión relativa de *hsp70* respecto a la expresión del gen *18S* de plantas sometidas a estrés combinado.** A) Expresión de *hsp70* en las puntas de las hojas de Aloe vera. B) Expresión de *hsp70* en las bases de las hojas de Aloe vera. Se muestra el promedio de las expresiones relativas a diferentes regimenes de riego de 3 análisis independientes con sus desviaciones estándar. Letras distintas denotan diferencias significativas con un  $p < 0,05$  entre tratamientos (Test de Tukey).



**Figura 13: Expresión relativa de *ubiquitina* respecto a la expresión del gen *18S* de plantas sometidas a estrés combinado. A) Expresión de *ubiquitina* en las puntas de las hojas de Aloe vera. B) Expresión de *ubiquitina* en las bases de las hojas de Aloe vera. Se muestra el promedio de las expresiones relativas a diferentes regimenes de riego de 3 análisis independientes con sus desviaciones estándar. Letras distintas denotan diferencias significativas con un  $p < 0,05$  entre tratamientos (Test de Tukey).**

En la Figura 12 y 13 se muestran respectivamente, la cuantificación de *hsp70* y de *ubiquitina*. Se graficó la cantidad de producto de PCR registrada para *hsp70* o *ubiquitina* frente a la de *18S* correspondiente, con el fin de obtener una expresión calibrada.

En la Figura 12 se observa que la mayor expresión para *hsp70*, tanto en puntas como en bases, se registra en el tratamiento de 25% de CDC y 40°C. Por otro lado, la expresión del gen de *ubiquitina* es máxima en las condiciones de 25% de CDC y 45°C para las puntas, mientras que para las bases es la de 25% de CDC y 40°C (Figura 13).

**Tabla 5: Determinación de la diferencias entre puntas y bases para el gen de *hsp70*.** En esta Tabla se informa las diferencias significativas entre la expresión de *hsp70* en puntas y bases para cada tratamiento. Los tratamientos se expresan como % de CDC – T°. *ns* indica que entre las puntas y bases de esos tratamientos no hubo diferencias significativas, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias significativas, desde menos a más diferencias (Test de Tukey,  $p < 0,05$ )

Puntas \ Bases	25%	50%	75%	75%	75%	50%	50%	25%	25%
	25°	25°	25°	40°	45°	40°	45°	40°	45°
25% 25°	<i>ns</i>								
50% 25°	<i>ns</i>								
75% 25°	*	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	**	<i>ns</i>
75% 40°	<i>ns</i>								
75% 45°	<i>ns</i>								
50% 40°	<i>ns</i>	<i>ns</i>	***	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	*
50% 45°	*	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	***	**	<i>ns</i>
25% 40°	*	*	***	*	***	***	***	<i>Ns</i>	***
25% 45°	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	<i>ns</i>

**Tabla 6: Determinación de la diferencias entre puntas y bases para el gen de *ubiquitina*.** En esta Tabla se informa las diferencias significativas entre la expresión de *ubiquitina* en puntas y bases para cada tratamiento. Los tratamientos se expresan como % de CDC – T°. *ns* indica que entre las puntas y bases de esos tratamientos no hubo diferencias significativas, \*, \*\*, \*\*\* indican diferencias significativas, desde menos a más diferencias (Test de Tukey,  $p < 0,05$ )

Puntas \ Bases	25%	50%	75%	75%	75%	50%	50%	25%	25%
	25°	25°	25°	40°	45°	40°	45°	40°	45°
25% 25°	<i>ns</i>	*							
50% 25°	<i>ns</i>	*							
75% 25°	<i>ns</i>	*							
75% 40°	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*	**	***
75% 45°	<i>ns</i>	*	**						
50% 40°	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	<i>ns</i>
50% 45°	<i>ns</i>	**	<i>ns</i>						
25% 40°	**	***	***	***	***	***	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	<i>ns</i>
25% 45°	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	<i>ns</i>

Las Tablas 5 y 6 muestran en que condiciones de tratamiento existe diferencia significativa entre la expresión de los genes *hsp70* y *ubiquitina* en las puntas y las bases respectivamente. En la Tabla 5 se observa que las bases de las hojas correspondientes al tratamiento de 25% de CDC y 40°C presentan diferencias significativas con casi todos los tratamientos de las puntas.

En la Tabla 6, la expresión de las bases en el tratamiento de 25% de CDC y 40°C muestra diferencias significativas en 6 de los tratamientos presentados para puntas. Además, la expresión de puntas en el tratamiento de 25% de CDC y 45°C exhibe diferencias significativas con 5 de los tratamientos.

## DISCUSIÓN

### *4.1 Características fenotípicas de plantas de Aloe vera sometidas a estrés hídrico.*

En la Figura 2, donde se muestra la diferencia entre los fenotipos de plantas sometidas a 75% y 25% de CDC, se observan claramente los efectos causados por los distintos regímenes hídricos. Esto concuerda con los múltiples estudios que señalan al estrés abiótico y en especial al hídrico, como uno de los mayores responsables de las pérdidas de rendimiento y por daños de cultivos (Boyer, 1982, Wang y cols, 2003, Mittler y cols., 2006 y Kotak y cols., 2007).

Dependiendo de las diferencias en comportamiento del aparato fotosintético, durante la desecación se distinguen dos grupos de plantas tolerantes a esta agresión, las tolerantes a la desecación homoclorófilas (HDT, de su sigla en inglés homochlorophyllous desiccation tolerant) y las tolerantes a la desecación poiquiloclorófilas (PDT poikilochlorophyllous desiccation tolerant). La mayor diferencia entre las plantas HDT y PDT es que durante la desecación el aparato fotosintético de las HDT se mantiene en una forma recuperable, es decir no se ve afectado irreversiblemente por la desecación, mientras que en las plantas PDT, la clorofila y el sistema de tilacoides se degradan y necesitan ser reconstruidos completamente, lo que implica un mayor gasto energético para la planta, lo que no siempre se logra realizar, desencadenándose la muerte de la planta (Yordanov y cols, 2003). Los distintos fenotipos mostrados por las plantas de aloe en los diferentes tratamientos hídricos (Figura 2) dan indicios de que estaría siendo afectado el aparato fotosintético de la planta, dado que cambia de color verde a rojizo, lo que sugiere que existe una redistribución de pigmentos o una degradación de clorofila, producto del daño oxidativo que conlleva el estrés hídrico (Alexieva y cols., 2001).

Paralelamente, en el laboratorio, se demostró la rápida recuperación de una planta de Aloe vera sometida a déficit extremo. Plantas regadas por tres meses con el 25% de CDC, se pasaron a un riego de 100% de la CDC. En sólo dos semanas las plantas presentaban el color verde de una planta mantenida en condiciones controles, recuperando la turgencia y aspecto normal de sus hojas. Por lo tanto, de acuerdo a las apreciaciones fenotípicas, aloe vera correspondería a plantas HDT, según la clasificación de Yordanov y cols, 2003. De esta forma es posible recuperar cultivos mal mantenidos actualmente, tanto por déficit hídrico cómo por exceso de riego, estas apreciaciones son sólo fenotípicas, se deben corroborar con el análisis molecular que posteriormente se expone.

Para cuantificar el efecto del estrés hídrico en la planta se midió el largo y ancho de las hojas. Con estos datos se determinó las áreas foliares correspondientes a las hojas en cada tratamiento hídrico. Los valores calculados expresan el aumento de la superficie de la hoja, obteniéndose un 47% de diferencia entre el área de las hojas correspondientes a las plantas regadas con mayor y menor cantidad de agua. Si se analiza por separado ambos parámetros, las hojas con mayor longitud son las regadas con 100% de capacidad de campo, mientras que las que tienen una base más ancha son las de 75% de CDC, valor estadísticamente similar al registrado para las plantas con 100% de CDC. Por lo tanto existiría una variación mayor en el largo que en el ancho de las hojas (Tabla 3).

Otra manera de evaluar el efecto de los distintos tratamientos hídricos en las plantas de Aloe vera, es cuantificar el peso seco y fresco del gel, además de determinar la cantidad de agua que presentan las hojas. Esto permite determinar el riego con el cual se podrá tener mayor rendimiento tanto en peso fresco como en peso seco. Lo cual tiene un alto valor comercial.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el tratamiento hídrico que producía mayores cantidades de gel, es el de 75% de CDC, sin embargo no se ha estudiado si la calidad y composición del gel varía con los distintos tratamientos hídricos. Antecedentes obtenidos paralelamente en el laboratorio de la Dra Liliana Cardemil, demuestran que la concentración de los carbohidratos se incrementa de forma significativa en el tratamiento con 25% de CDC con respecto al de 100% de CDC, aumentando además los fructanos presentes. Obviamente la disminución de agua conlleva una concentración de los azúcares presentes y probablemente una mayor síntesis de estas moléculas para asegurar una cantidad de moléculas de agua suficiente para evitar la desecación. Seguramente este aumento que se registró a 75% de CDC se podría deber, además del agua en su mayor proporción, a otras moléculas distintas a los azúcares, tales como betaínas o prolina, que en investigaciones posteriores serían interesantes de estudiar, para determinar la composición y calidad del gel, dependiendo de las moléculas de interés particular, que se produce con cada protocolo de riego.

El peso fresco del gel (pfg) resulta mayor en el tratamiento de 100%, al igual que la cantidad de agua, sugiriendo que el pfg depende directamente de la cantidad de agua presente en el gel, más que de la cantidad del gel. Para comprobar esto se realizó un análisis de Pearson, determinándose la correlación entre el pfg con la cantidad de agua ( $r$  de Pearson= 0,9998, correlación estadísticamente significativa con un  $\alpha=0,05$ ) y el pfg con el peso seco de este mismo ( $r$  de Pearson= 0,7449, correlación estadísticamente no significativa con un  $\alpha=0,05$ ). De acuerdo a este análisis estadístico, existe una correlación en ambos casos, sin embargo la correlación entre el pfg y la cantidad de agua, naturalmente es mayor que la correlación entre el peso fresco del gel (pfg) y su peso seco, de acuerdo al  $r$  de Pearson. De esta forma, el riego que se le proporcione a los cultivos de *A.vera* es el factor de mayor peso para obtener mayores rendimientos de

tejidos frescos que es una de las formas en las cuales se comercializa esta planta. En especial debido a que para preparar algunas cremas y suplementos alimenticios se utiliza directamente el gel, más allá que el tejido liofilizado. Para aquellas preparaciones que necesitan el gel liofilizado también resulta importante el riego, sin embargo, la mayor concentración de azúcares se da en plantas con el menor riego.

#### **4.2 Análisis molecular**

Con el objetivo de determinar la expresión génica de *hsp70* y *ubiquitina* en condiciones de estrés combinado de calor y sequía se realizó RT-PCR semi-cuantitativo, técnica adecuada para este propósito debido a que entrega sensibilidad y especificidad en la determinación de la acumulación de mRNAs (Dean y cols, 2002).

El análisis de RT-PCR se debe realizar en la fase exponencial de amplificación, debido a que en esta fase hay una relación lineal entre cantidad del oligo molde y el producto final, relación que se pierde al alcanzar la fase de saturación (*plateau*) del PCR, correspondiente a los últimos ciclos. De lo contrario, este análisis sería cualitativo más que cuantitativo. Una forma simple para prevenir una amplificación excesiva, es realizar PCRs a distintos ciclos y definir en cuál de ellos se observa amplificación exponencial (Dean y cols, 2002 y Al-Bader y Al-Sarraf, 2005). En este seminario se determinó que el número de ciclos óptimo para la amplificación de *hsp70* es 36, mientras que para *ubiquitina* y el control de expresión interna 18S (mRNA ribosomal 18S) son necesarios 30 ciclos (Figura 2).

Los fragmentos de cDNA amplificados clonados y secuenciados para genes de *hsp70* y de *ubiquitina* son muy útiles para determinar la relación que presenta Aloe vera con otras especies. Por esto, con las secuencias de *hsp70* (609pb) y *ubiquitina* (196pb)

se realizaron los cladogramas, utilizando el programa de alineamiento Clustal W, mostrados en la Figura 5. Según este análisis, el gen de la *ubiquitina* amplificado se encuentra dentro del grupo de las monocotiledóneas, como el trigo, el maíz o el arroz, lo cual concuerda con su clasificación científica. Sin embargo *hsp70* se situó entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, lo cual era bastante probable, debido a que el fragmento de *hsp70* amplificado corresponde a una porción ampliamente conservada del gen, esto porque se diseñaron partidores desde una región conservada entre varias especies, determinado por un alineamiento múltiple (datos no mostrados). Además, se ha reportado que este gen presenta una alta conservación entre todas las especies y reinos (Vierling 1991).

Para realizar una adecuada semi-cuantificación se debe contar con un buen control interno de amplificación. Para este fin se escogió el gen *18S* porque se ha demostrado que su expresión se mantiene constante, independiente de las condiciones a las cuales se someten las plantas (Al-Bader y Al-Sarraf, 2005). Además, en nuestros experimentos comprobamos que su expresión se mantuvo constante en las plantas sometidas a los distintos estrés.

Cabe destacar que el gen de *ubiquitina* presentó más de un fragmento amplificado en los tratamientos de estrés hídrico y al amplificar con un elevado número de ciclos. Esto ocurre debido a que es un poligen (poliubiquitina), que posee secuencias repetidas o duplicadas (Sharp y Li, 1987). Este comportamiento no se da en todas las muestras empleadas, por lo tanto, con el objetivo de estandarizar la cuantificación sólo se consideró la banda amplificada de menor tamaño (196pb), en base al fragmento que se espera amplifiquen los partidores diseñados.

Una vez que se discutieron las condiciones óptimas para realizar el análisis molecular de forma seria, a continuación se discuten los resultados obtenidos en la cuantificación de los productos génicos de *hsp70* y *ubiquitina*.

Con el fin de determinar si existe alguna diferencia entre la expresión génica de los genes *hsp70* y *ubiquitina* al ser sometidos a estrés térmico, a estrés hídrico y su combinación (hídrico previo al térmico), fue necesario realizar experimentos fisiológicos de ambos estrés por separado y posteriormente experimentos con estrés combinado. Luego, todas las muestras fueron analizadas por RT-PCR semi-cuantitativo, determinando la expresión de los genes *hsp70* y *ubiquitina*. Para establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos niveles de expresión, se realizó el análisis de varianza ANOVA y posteriormente el Test de Tukey, para identificar entre cuales tratamientos había diferencia.

Los análisis realizados para los experimentos de estrés térmico señalan que en la expresión de *hsp70* existe un incremento gradual en puntas y bases a medida que se aumenta la temperatura.

La expresión del gen es estadísticamente similar para 25°C y 35°C, aumentando significativamente a los 40°C y 45°C. Esto indicaría que en los tratamientos de 25°C y 35°C, la planta es capaz de sobreponerse al estrés generado con sus niveles basales del gen *hsp70*. Sin embargo, al aumentar la temperatura a 40° C, los niveles de expresión de *hsp70* aumentan, entonces, ésta sería la temperatura desde la cual se induciría la respuesta *heat shock*. Lo anterior concuerda con la literatura, donde se reporta la acumulación de mRNA de *hsp70* en tabaco (Rizhsky y cols. 2002) y *Arabidopsis* (Rizhsky y cols. 2004) sometidas a estrés térmico. Estos resultados se complementan con estudios realizados en plantas transgénicas que sobreexpresan los factores de transcripción HSF1

y HSF3, los cuales inducen la expresión de genes *heat shock* y generan termo-tolerancia (Wang y cols, 2003).

Para *ubiquitina* no se registró una modificación sustancial en su expresión en los distintos tratamientos, a excepción de las bases de las hojas sometidas al tratamiento de 45°C presentan una diferencia estadísticamente significativa con los otros grupos experimentales. En los estudios de Rizhsky y cols. 2004, realizados con microarreglos, se encontró una acumulación de mRNA de genes de estrés térmico como *hsp70*, *hsp100*, *ubiquitina*, fosfatasa 2C inducida por ácido abscísico, la fosfatasa trehalosa-6-fosfato etc. en plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés térmico. A partir de los resultados obtenidos de los tratamientos de estrés térmico se determinó que 40°C y 45°C eran las temperaturas adecuadas para lograr observar un efecto conjunto significativo al aplicar un estrés hídrico adicional (estrés combinado).

El análisis para las plantas sometidas a déficit hídrico señala que los tratamientos hídricos que inducen una mayor expresión de *hsp70* son los de 50% y 25% de CDC para puntas y bases. Además, se observó un aumento paulatino en la expresión desde los tratamientos con mayor a menor riego, seguramente debido a que la planta al disponer de menos agua, necesita desplegar una maquinaria de defensa articulada por las proteínas de estrés térmico induciéndose una transcripción mayor a la basal. Según la literatura, la expresión de *hsp70* se ve incrementada en condiciones de déficit hídrico (Rizhsky y cols. 2002, Wang y cols, 2003 y Rizhsky y cols. 2004). Para el gen de *ubiquitina* la mayor expresión se obtuvo en el tratamiento de 50% de CDC, lo cual concuerda con un aumento en la expresión de este gen en condiciones de estrés hídrico en plantas de *Arabidopsis* (Rizhsky y cols. 2004). Según los resultados obtenidos a partir de los tratamientos de estrés hídrico se determinó que 50% y 25% de la CDC eran las mejores opciones para realizar el estrés combinado. Sin embargo, es curioso que la expresión del gen de

ubiquitina es mayor al 50% CDC que a 25% CDC. Este efecto se debe a que el volumen de agua suministrada a la planta es insuficiente (25% CDC), lo que induce en ella un estrés severo por déficit hídrico perjudicial. Llevando a la planta a una condición casi letal, es decir su límite de supervivencia. L

En general, los resultados obtenidos para los experimentos de estrés térmico e hídrico son similares a los documentados en el proyecto de Seminario de Título de Claudia Huerta. En este seminario se analizó la expresión del gen de *hsp70* de puntas de hojas correspondientes a plantas cultivadas en condiciones de campo (estrés hídrico) y plantas mantenidas en el laboratorio para estrés térmico, donde se sometieron hojas a estrés térmico en baños de agua. La expresión resultó ser mayor para los tratamientos de 40°C y 45°C. Los análisis de estrés hídrico que se realizaron, también provienen de plantas cultivadas en campo, regadas con cuatro tratamientos hídricos, T1: 8L/ha/15 días; T2: 6L/ha/15 días; T3: 4L/ha/15 días, y T4: 2L/ha/15 días. Determinándose una mayor expresión de *hsp70* en T3 y T4. Estos tratamientos, son similares a los empleados en este seminario de título con la diferencia de que este se realizó enteramente con plantas completas dentro del laboratorio, lo cual reafirma los análisis realizados y los resultados obtenidos.

El objetivo central de este trabajo es determinar si existe alguna diferencia entre la expresión de *hsp70* y *ubiquitina* en plantas sometidas a estrés hídrico y térmico por separado o al combinar estos dos experimentos. Para esto, se seleccionaron los tratamientos que presentaron una mayor expresión génica en los experimentos de estrés térmico (40°C y 45°C) y los que indujeron mayor expresión génica en plantas con déficit hídrico (50% y 25% de CDC). En la Figura 11A se observa que para *ubiquitina* los tratamientos que presentan mayor expresión son los de 25% CDC – 25°C, 50% CDC – 40°C y 25% - 45°C. Esto se puede observar más claramente al graficar la expresión

relativa de ubiquitina de todas las réplicas realizadas, tanto para las puntas (Figura 13A), como para bases (Figura 13B). En general, para todos los tratamientos hay un aumento con respecto al control (75%CDC – 25°C). Además, la expresión obtenida para las plantas sometidas a estrés combinado es mayor que en las sometidas sólo a estrés térmico o sólo a estrés hídrico. Si se comparan las expresiones relativas para *ubiquitina* en algunos tratamientos claves estresantes hídricos y térmicos (25%CDC-25°C y 75%-40°C respectivamente), con la expresión de los tratamientos combinados, se ve que estos últimos registran una expresión que corresponde aproximadamente a la adición de la registrada para los experimentos hídricos y térmicos por separado. Esto último estaría indicando que existe una comunicación cruzada de algunos de los elementos moleculares. Sin embargo, las vías moleculares que desencadenan el déficit de agua y el calor para este gen en su mayoría serían diferentes. Esto último se correlaciona con lo encontrado para mRNAs en tabaco por Rizhsky y cols.(2002) donde se ve que algunos genes de la respuesta *heat shock* presentan una expresión mucho mayor en plantas estresadas con déficit hídrico y calor que en plantas sometidas a alguno de los dos estrés por separado.

La Figura 11B muestra que los tratamientos con mayor expresión para *hsp70* resultaron ser los de 75%CDC – 40°C, 50%CDC – 40°C, 25%CDC- 40°C y 25%CDC – 45°C. Las expresiones promedio obtenidas desde todas las réplicas realizadas se muestran en la Figura 12, tanto para puntas (A), como para bases (B). La expresión obtenida para las plantas sometidas a estrés combinado es mayor que la obtenida para las plantas sometidas sólo a estrés térmico o sólo a estrés hídrico, con excepción del tratamiento 50%CDC – 45°C que en las puntas y las bases registra una expresión similar al control. Al comparar la expresión para 25%CDC combinada con 40°C y 45°C, se ve una disminución de la tasa de acumulación de transcrito. Una posible explicación para

esto es que al someter plantas previamente sometidas a estrés hídrico a una temperatura de 45°C, se induciría la degradación del mRNA de *hsp70*.

Al comparar las expresiones relativas para *hsp70* en algunos tratamientos estresantes claves hídricos y térmicos (25%CDC-25°C y 75%-40°C respectivamente), con la expresión, en los tratamientos mixtos, se ve que estos últimos registran una expresión un poco mayor a la de los experimentos hídricos y térmicos por separado, aunque en ningún caso representando la adición de la expresión de las plantas sometidas a los tratamientos por separado. Esto último estaría indicando que las vías moleculares que serían activadas por el déficit de agua y el calor para este gen son, en gran parte, similares. Seguramente existe un porcentaje de esta respuesta que implica vías específicas del estrés combinado. Un fenómeno similar se ha registrado para genes que codifican para proteínas de estrés térmico en *Arabidopsis* (Rizhsky y cols. 2004). En los resultados mostrados por Rizhsky y cols., (2004) se muestra que parte de los genes transcritos en estrés hídrico, son compartidos en estrés térmico y también al mezclar ambos tipos de estrés.

Con el objetivo de evaluar el posible efecto del potencial hídrico y la exposición de luz diferencial en la expresión de los genes *hsp70* y ubiquitina en las hojas de *Aloe vera*, todos los análisis se realizaron tomando muestras de puntas y bases. Para determinar si existe una expresión significativamente diferente en puntas y bases se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) y un Test de Tukey, para los genes de *hsp70* y *ubiquitina*, mostrados respectivamente en las Tablas 5 y 6. En general se determinó para *hsp70* que la expresión es similar tanto en puntas como bases, con excepción del tratamiento 25%CDC – 40°C donde en las bases se presenta una diferencia sustancial de expresión

con prácticamente todos los tratamientos de las puntas. Para *ubiquitina*, la situación es equivalente, sin embargo, el tratamiento de 25%CDC – 45°C de puntas resulta ser significativamente distinto entre las puntas y algunos tratamientos de las bases. Por lo tanto, el potencial hídrico diferencial y la diferente exposición a la luz no estaría afectando la expresión de los genes estudiados al evaluar su efecto a lo largo de la hoja. Paralelamente, el Investigador José de La Torre, determinó que para plantas de Aloe vera, el potencial hídrico varía en los distintos tratamientos hídricos (100%CDC: - 0,208; 75%CDC: - 0,268; 50%CDC: -0,273 y 25%CDC: - 0,288), lo cual es una evidencia clara de la mayor o menor presencia de agua en éstos órganos y sería un parámetro adicional capaz de reflejar de manera precisa el estrés hídrico que ocurre en las hojas de Aloe vera.

En resumen, el gen *ubiquitina* presenta una respuesta más compleja molecularmente hablando, al compararse con la de *hsp70* debido a que requiere de la activación y catalización de las proteínas E1, E2 y E3 (Dreher y Callis, 2007) . Entonces, para producir una respuesta completa, se deben transcribir varios genes, distinto de lo que ocurre con la familia de las HSP, donde por si solas son capaces de prevenir la agregación proteica (Goloubinoff y De Los Ríos, 2007) como una manera de disminuir la energía entrópica local que se genera en cada porción de las proteínas desplegadas. En cuanto a la energía de funcionamiento de cada proteína, ambas son dependientes de ATP, sin embargo *ubiquitina* necesita de una activación mediante un enlace tiol de alta energía para poder ser cedida a las proteínas dañadas. Por lo tanto, se presume que esta sería la razón a los resultados obtenidos, donde, la respuesta molecular para el estrés hídrico y térmico es independiente para *ubiquitina*, mientras que *hsp70*, al ser un sistema más simple es más probable el efecto de conversación cruzada (cross talking) en la respuesta a ambos estreses. Explicando de esta forma un efecto aditivo en la expresión

de los mensajeros de *ubiquitina* en el estrés combinado y un efecto equivalente en el estrés térmico, hídrico y combinado para *hsp70*. Sin perjuicio de que para ambos genes, en general haya una expresión mayor en estrés combinado que la registrada para los estreses por separado, debido a que las plantas seguramente se tratan de defender con la mayor capacidad que poseen sus vías de respuesta moleculares.

Después de desarrollar toda la investigación, se cuentan con resultados fisiológicos y moleculares, los primeros indican que el mejor volumen de riego para obtener el mayor rendimiento es 75% de la CDC, sin embargo la mayor expresión de mRNA ocurre en los tratamientos con mayor estrés, tanto por separado como cuando ambos se combinan. Los resultados obtenidos se puede inferir que posiblemente los genes estudiados repararían las moléculas de proteínas de la planta fundamentales para sobrevivir al estrés térmico, hídrico y su combinación. Por lo tanto se abre la posibilidad cierta de un manejo genético de la planta de Aloe vera para aumentar rendimiento económico en Chile, sobreexpresando ambos genes, seguramente, con más probabilidad de éxito con *hsp70*, debido a que para ubiquitina se necesitan más componentes moleculares para realizar una respuesta efectiva. Posiblemente de esta forma desplazar le mejor rendimiento desde el 75% CDC a menos cantidad de agua. Estableciéndose un equilibrio más eficiente entre la falta de agua y el bien estar de las proteínas presentes en la planta. Otro aspecto que es posible blanco a mejorar genéticamente son los mecanismos moleculares que le permiten a la planta almacenar más agua, resistiendo a las condiciones adversas que aumentan actualmente debido al calentamiento climático, manteniendo un buen pfg y un correcto funcionamiento de la maquinaria proteica de la planta en general. Esto hace referencia a las distintas enzimas que regulan la producción de distintos azúcares, mananos, acetomananos, prolina, betaínas, etc.

## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este seminario de título, es posible señalar las siguientes conclusiones:

Al evaluar el efecto del déficit hídrico en plantas de Aloe vera se determinó que el déficit de agua afecta directamente el tamaño de sus hojas, además de que el pfg se correlaciona con la cantidad de agua presente en el gel. Estableciéndose que el régimen hídrico que proporciona mejores rendimientos en la cantidad de gel, es el de 75% de CDC este finalmente se traduciría en los mejores rendimientos económicos.

Las pruebas de RT-PCR semi-cuantitativo permitieron determinar que cuando se somete a plantas de Aloe vera a estrés térmico, las temperaturas que inducen mayor expresión del gen de *hsp70* son 40°C y 45°C. Para el gen de ubiquitina la mayor expresión se registró a los 45°C.

Al someter plantas de Aloe vera a déficit hídrico se determinó mediante ensayos de RT-PCR semi-cuantitativo, que el régimen hídrico que induce mayor expresión del gen *hsp70* y el gen de *ubiquitina* es el de 50% de CDC.

En plantas sometidas a estrés hídrico y térmico combinados se determinó una mayor expresión para el gen de *hsp70* en el tratamiento de 25% de CDC y 40°C para las puntas y las bases. Mientras que para el gen de *ubiquitina*, la expresión es mayor en condiciones de 25% de CDC y 45°C para las puntas y de 25% de CDC y 40°C para las bases.

Los resultados demuestran que una temperatura de 45°C, en conjunto con un algún déficit de agua, resulta en una disminución de la expresión del gen de *hsp70* en la planta de Aloe vera.

La expresión de *hsp70* y *ubiquitina* es homogénea en las puntas y en las bases, por lo que el potencial hídrico diferencial, el desarrollo de la fotosíntesis y la exposición a la luz no afectan dicha respuesta frente a estrés hídrico y térmico.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que las vías moleculares que desencadenan el déficit de agua y el estrés térmico para el gen de *hsp70* en su mayoría son las mismas. Mientras que la acumulación de mensajero cuantificada para el gen de *ubiquitina* en los distintos tratamientos indica que en gran parte, el estrés térmico e hídrico induce componentes moleculares distintos que explican la expresión de ubiquitina.

Este seminario de título se enmarca en la investigación de la respuesta molecular y fisiológica de *Aloe barbadensis* Miller frente al estrés térmico e hídrico, en condiciones similares a las condiciones de las regiones donde se cultiva la planta. Para, en el futuro desarrollar, con los antecedentes logrados, un protocolo de manejo agrícola eficiente del uso del agua para el cultivo de esta planta.

## REFERENCIAS

- Al-Bader MD., Al-Sarraf HA.** 2005. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat—validation by semi-quantitative RT-PCR *Developmental Brain Research* **156**:38–45.
- Alexieva V., Sergiev I., Mapelli S. y Karanov E.** 2001 The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* **24**: 1337–1344
- Allakhverdiev S., Kreslavski V., Klimov V., Los D., Carpentier R. y Mohanty P.** 2008. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth Res* **98**:541–550.
- Amir-Shapira, D., Leustek, T., Dalie, B., Weissbach, Pl., Brot, N.** 1990. Hsp70 proteins, similar to *Escherichia coli* DnaK, in chloroplasts and mitochondria of *Euglena gracilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:1749-52.
- Baniwal SK., Bharti K., Chan KY., Fauth M., Ganguli A., Kotak S., Mishra SK., Nover L., Port M., Scharf KD., Tripp J., Weber C., Zielinski D. y Von Koskull-Döring P.** 2004. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.* **29**: 471–487.
- Bonan G,** 2008. Forests and Climate Change: Forcings, Feedbacks, and the Climate Benefits of Forests. *Science* **320**: 1444-1449.
- Boyer JS** 1982. Plant productivity and environment. *Science* **218**:443–448.
- Buchanan B., Grissem W. y Jones R.** 2000. American Society of Plant Physiologists. *Biochemistry & Molecular Biology of plant*. Pp. 624 – 626.
- Cardemil L.** 2007. Efecto de la disponibilidad de agua y de la temperatura sobre la fisiología de la planta, la producción y composición de gel de *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*). Proyecto FONDECYT 2007.
- Choi HI., Hong JH., Ha J., Kang JY., Kim SY.** 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* **275**:1723–1730.
- Choi S. W., Son B. W., Son Y. S. , Park Y. I. , Lee S. K., Chung M. H.** 2001. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera. *British Journal of Dermatology* **145**: 535-545.
- Chow J.T.N., Williamson D.A., Yates K.M., Y Goux W.J.** 2005. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of *Aloe vera* L. *Carbohydrate Research* **340**: 1131-1142.
- Colinet H., Lee SF. y Hoffmann A.** 2009. Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS Journal* **277**: 174–185
- Dean J.D., Goodwin P.H. y Hsiang T.** 2002. Comparison of Relative RT-PCR and Northern Blot Analyses to Measure Expression of  $\beta$ -1,3-Glucanase in *Nicotiana benthamiana* Infected With *Colltotrichum destructivum* *Plant Molecular Biology Reporter* **20**: 347–356.

- Dreher, K.A. y Callis, J.** 2007 Ubiquitin, Hormones and Biotic Stress in Plants. *Annals of Bot.* **9**: 787 - 822.
- Frank W, Munnik T., Kerkmann K., Salamini F. y Bartels D.** 2000. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* **12**:111-124.
- Govindarajan R., Vijayakumar M., y Pushpangadan P.** 2005. Antioxidant approach to diseasemanagement and the role of 'Rasayana' herbs of Ayurveda . *Journal of Ethnopharmacology* **99**: 165-178.
- Goloubinoff P. y De Los Rios P.** 2007. The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. *TRENDS in Biochemical Sciences* **32**: 372- 380.
- Hoekstra F., Golovina E. y Buitink J.** 2001 Mechanisms of plant desiccation Tolerance. *TRENDS in Plant Science* **6** :431-438
- Huerta C., Freire M. y Cardemil L.** 2008. "Análisis de la expresión de los genes hsp70, hsp100 y ubiquitina, mediante RT-PCR semi-cuantitativo en plantas de *Aloe barbadensis* Miller sometidas a estrés térmico". XX Reunión Anual de la Sociedad de Botánica de Chile. Olmué, 25 a 27 de Septiembre.
- Hutter J. A., Salman M., Stabinoha W. B., Satsang I. N., Williams R. F., Streeper R. T. y Weintraub S. T.** 1996. Antiinflammatory C-glucosil chromona from *Aloe barbadensis*. *Journal of Natural Products* **59**:541-543.
- James P., Pfund C., Craig E.**1997. Functional Specificity among Hsp70 Molecular Chaperones. *Science* **275**: 387-389.
- Kotak S., Larkindale J., Lee U., von Koskull-Do P. Vierling E. Y Scharf KD.** 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10**:310-316.
- Krishnan P.** 2006. The scientific study of herbal wound healing therapies: Current state of play. *Current Anaesthesia & Critical Care* **17**: 21-27.
- Law R, Crafts-Brandner SJ.**1999 Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiology* **120**:173-182.
- Machado S. y Paulsen GM.** 2001. Combined effects of drought and high temperature on water relations of wheat and sorghum. *Plant and Soil* **233**: 179-187.
- Marone M., Mozzetti S., De Ritis D., Pierelli L., Scambia G.** 2001. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample *Biol.Proced.***3**: 19-25.
- Mittler R.** 2006 Abiotic stress, the field environment and stress combination *TRENDS in Plant Science* **11**:15-9.
- Munnik T., Ligterink W., Meskiene I., Calderini O., Beyerly J., Musgrave A., Hirt H.** 1999 Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signaling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J* **20**:381-388.

- Murray, M.G. y Thompson, W.F.** 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**: 4321-4326.
- Nover L., Scharf KD., y Neumann D.** 1989. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* **9**: 1298-1308.
- Ortiz C. y Cardemil L.** 2001. Heat shock responses in two leguminous plants: a comparative study. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1711-1719.
- Parsell y Lindquist.** 1993. The Function of Heat-Shock Proteins in Stress Tolerance: Degradation and Reactivation of Damaged Proteins **27**: 437-496.
- Rizhsky,** 2002. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiology* **130**: 1143-1151.
- Rizhsky,** 2004. When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiology* **134**: 1683-1696.
- Schöffl F., Prändl, y Reindl A.** 1998. Regulation of the heat shock response. *Plant Physiology* **117**: 1135-1141.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* **115**:327-334.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **3**:217-223.
- Semenova GA.** 2004 Structural reorganization of thylakoid systems in response to heat treatment. *Photosynthetica* **42**:521-527.
- Su, C.K., Mehta, V., Ravikumar, L., Shah, R., Pinto, H., Halpern, J., Koong, A., Goffinet D., y Le Q.T.** 2004. Phase II double-blind randomized study comparing oral aloe vera versus placebo to prevent radiation-related mucositis in patients with head-and-neck neoplasms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **60**:171-177.
- Vani B, Saradhi PP, Mohanty P.** (2001) Characterization of high temperature induced stress impairments in thylakoids of rice seedlings. *Indian J Biochem Biophys* **38**:220-229 .
- Vierling E.** 1991. The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol.* **42**:579-20.
- Wahid A. y Close T.J.** 2007. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum* **51** : 104-109.
- Wang, W., Vinocur B. y Altman A.** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**, 1-14
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O. y Altman A.** 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* **9**: 244-252.

- Yagi A., y Takeo S.** 2003. Anti-inflammatory constituents, aloesin and aloemannan in Aloe species and effects of tanshinon VI in *Salvia miltiorrhiza* on heart. *Yakugaku Zasshi-Journal of The Pharmaceutical Society of Japan* **123**: 517-532.
- Yang J. y Tower J.** 2009. Expression of hsp22 and hsp70 Transgenes Is Partially Predictive of *Drosophila* Survival Under Normal and Stress Condition. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 8:828-838
- Yang P., Fu H.Y., Walker J., Papa C., Smalle J., Ju Y., y Vierstra R.D.** 2004. Purification of the Arabidopsis 26 S proteasome - Biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 6401-6413.
- YongchaiyudhaS., Rungpitarangsi N., Bunyapraphatsara I., y Chokechai-Jaroenporn O.** 1996. Antidiabetic activity of Aloe vera L. juice. Clinical trial in new cases of diabetes mellitus. *Phytomedicine* **3**:241-243.
- Yordanov I., Velikova V., Tsonev T.** 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg. J. Plant Physiol. Special Issue*, 187-206.
- Zhu JK.** 2001. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol* **4**:401-406.

## Financiamiento

Este seminario de título se desarrolló con el financiamiento del proyecto FONDECYT N° 7080094 "EFECTOS DE LA DISPONIBILIDAD DE AGUA Y DE LA TEMPERATURA SOBRE LA FISILOGIA DE LA PLANTA, LA PRODUCCION Y COMPOSICION DE GEL DE *ALOE BERBADENSIS MILLER* (ALOE VERA)". Donde la investigadora responsable es la Dra. Liliana Cardemil Olivia.