
**“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DEL GEN *SchSDD1-like*
SOBRE LA DENSIDAD ESTOMÁTICA Y SU EFECTO EN LA RESPUESTA
FRENTE A DÉFICIT HÍDRICO EN PLANTAS HETERÓLOGAS”**

**SAMUEL ELÍAS MORALES NAVARRO
DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL**

RESUMEN

Los estomas desempeñan un papel fundamental en la regulación del intercambio gaseoso y del control del contenido hídrico de las plantas. Los complejos estomáticos se distribuyen en toda la extensión de la epidermis de los tejidos aéreos, aunque en hojas, el patrón de distribución es muy variable entre las especies, pero altamente regulados por un mecanismo que mantienen una distancia mínima, y necesaria, para su correcto funcionamiento. Estudios realizados en *Arabidopsis*, han permitido identificar una serie de componentes genéticos implicados en este mecanismo, incluyendo ligandos proteicos y receptores de membrana involucrados en la activación de una cascada de señalización de MAP quinasas que actúan de manera negativa sobre los factores de transcripción maestros que controlan secuencialmente las etapas del desarrollo de estomas: SPCH, MUTE y FAMA. Sin embargo, a la fecha, la ruta de desarrollo estomático observada en *Arabidopsis* no ha sido estudiada en otra especie de plantas. Inicialmente se pensaba que el número de estomas en la superficie de las hojas dependía exclusivamente de factores genéticos, sin embargo, recientes resultados han mostrado que la abundancia estomática varía en respuesta a señales fisiológicas y también frente a factores ambientales, tales como la baja disponibilidad de agua; por lo que intervenir el desarrollo de estomas con el objetivo de modular la densidad estomática y de esta forma, controlar la tasa de pérdida de agua, podría ser una promisorio herramienta para la generación de plantas con un incremento en la tolerancia frente al estrés por déficit hídrico. Entre los genes descritos involucrados en el desarrollo de los complejos estomáticos, existe evidencia de que el gen *SDD1* de *Arabidopsis thaliana*, el cual codifica para una subtilisina, está involucrado en el control del número de estomas. Sin embargo, escaso es el conocimiento respecto de su expresión bajo condiciones de estrés abiótico y tratamiento con ABA. Por otra parte, se ha descrito que en plantas de tomate silvestre (*Solanum chilense*) –especie tolerante a la sequía- bajo condiciones de estrés salino, reducen el número de estomas en las hojas, y sobre-expresan un gen que codifica para una subtilisina. Estos resultados abren la posibilidad de que un putativo gen homólogo a *AtSDD1* en tomate podría estar involucrado en el control del número de

estomas, aumentando su probabilidad de supervivencia. Por lo anterior, en esta tesis se determinó el comportamiento transcripcional de *AtSDD1* y de los “genes maestros” implicados en el desarrollo estomático en *Arabidopsis* bajo condiciones de sequía y tratamiento con ABA. Asimismo, se aisló y caracterizó parcialmente al gen *SchSDD1-like*, el cual comparte una alta homología con secuencias de otros miembros de la familia de serino-proteasas de la familia de las subtilisinas al igual que *AtSDD1*. El análisis de expresión de este gen en tomate silvestre, indicó que sus transcritos son mayormente acumulados en hojas en desarrollo, lo que estaría relacionado con su función en la abundancia estomática. Análisis experimentales demostraron que la expresión de *SchSDD1-like* en hojas de tomate silvestre, es inducida en respuesta a estrés salino, sequía y ABA. Así, este gen es un candidato para controlar la frecuencia estomática frente a condiciones de estrés. Para determinar si *SchSDD1-like* cumple similares funciones que *AtSDD1*, *SDD1-like* de *S. chilense* fue sobreexpresado en plantas mutantes *sdd1-3* de *Arabidopsis thaliana*. Esta mutante presenta un fenotipo que exhibe gran cantidad de estomas y agrupaciones de ellos en la superficie de sus hojas. Sin embargo, las plantas mutantes que sobreexpresan *SchSDD1-like*, revierten el fenotipo a la condición silvestre de *A. thaliana* (Col-0), sin afectar ninguna otra característica fenotípica aparente. Por otra parte, la sobreexpresión de *SchSDD1-like* en plantas de *A. thaliana* (col-0) produjo una significativa reducción de la densidad estomática en las hojas en comparación a las plantas silvestres. El análisis de los posibles genes afectados por la actividad de *SchSDD1-like*, mostró una represión de los factores de transcripción maestros que controlan los pasos secuenciales de desarrollo de estomas en *Arabidopsis*. Además, estas plantas fueron sometidas a deshidratación y estrés por sequía evidenciando un aumento en la tolerancia al estrés comparado con las plantas control (col-0). Para validar la función de *SchSDD1-like* en la tolerancia a la pérdida de agua en un cultivo de interés agro-económico, *SchSDD1-like* fue sobre-expresado en plantas de tomate cultivado (“Moneymaker”), las que exhibieron una reducción en la frecuencia estomática en sus hojas y una menor tasa de deshidratación comparado con la planta control. Estos resultados permiten concluir que *SchSDD1-like* es el ortólogo a *AtSDD1* y sugieren que ambos controlan el número de estomas en las hojas, en respuesta a sequía y ABA en sus respectivas especies; que el modelo descrito para el desarrollo de estomas en *Arabidopsis*, también es válido para tomate; y que la modulación de la expresión génica de *SchSDD1-like* sería suficiente para aumentar la tolerancia al déficit hídrico en especies cultivadas de tomate.

ABSTRACT

Stomata play a key role in the regulation of gas exchange and control of water content in plants. Stomatal complexes are distributed throughout the extent of the epidermis of the aerial tissues, although in leaves, the distribution pattern varies among species, but highly regulated by a mechanism that maintains a minimum distance, and necessary for appropriate operation. Studies performed in *Arabidopsis* have identified a set of genetic components involved in this mechanism, including protein ligands and membrane receptors involved in the activation of a signaling cascade of MAP kinases which act negatively on master transcription factors that control sequentially the stages of stomata development: SPCH, MUTE and FAMA. However, the stomatal development pathway observed in *Arabidopsis* has not been studied in other species of plants to date.

Initially it was thought that the number of stomata on the leaf surface depended exclusively on genetic factors, however, recent results have shown that the stomatal abundance changes in response to physiological signals and environmental factors, such as low water availability. In this sense, the intervention of stomatal development in order to modulate their density; and thus control the water loss rate, could be a promising tool to generate plants with increased water deficit stress tolerance.

Among the described genes involved in the development of stomatal complex, there is evidence that the *SDD1* gene of *Arabidopsis thaliana*, which encodes a subtilisin, is involved in the control of stomatal number. However, few is the knowledge about its expression under abiotic stress conditions and treatment with ABA. Moreover, it was reported that wild tomato plants (*Solanum chilense*) – a drought tolerant specie- under salt stress conditions, reduce the stomatal number on the leaves, and overexpress a gene encoding a subtilisin. These results open the possibility that a putative gene homologous to *AtSDD1* from tomato may be involved in the control of the stomatal number, increasing its chance of survival.

Therefore, in this thesis the transcriptional behavior of *AtSDD1* and “master genes” involved in stomatal development in *Arabidopsis* under drought and ABA treatment conditions was determined. Also, *SchSDD1-like* gene was isolated and partially characterized, which shares a high sequence homology

with other serine proteases members of subtilisin family, similar to *AtSDD1*. The analysis of expression of this gene in wild tomato, indicated that its transcripts are mostly accumulated in developing leaves, which would be related to its role in stomatal abundance. Experimental analysis showed that *SchSDD1-like* expression in of wild tomato leaves, is induced in response to salt stress, drought and ABA. Thus, this gene is a candidate to control stomatal frequency to cope with stress conditions. To determine whether *SchSDD1-like* performs a similar functions that *AtSDD1*, *SDD1-like* from *S. chilense* was overexpressed in *sdd1-3* mutant plants of *Arabidopsis thaliana*. This mutant has a phenotype with lots of stomata and clusters of them on the surface of leaves. However, *SchSDD1-like*- overexpressing mutant plants, reversed the phenotype to wild-type condition of *A. thaliana* (Col-0) without affecting any other apparent phenotypic trait. Moreover, overexpression of *SchSDD1-like* in *A. thaliana* plants (col-0), produced a significant reduction in stomatal density in leaves compared to wild-type plants. The analysis of possible genes affected by *SchSDD1-like* activity showed a down-regulation of master switch transcription factors that control the sequential steps of stomatal development in *Arabidopsis*. Moreover, these plants were subjected to drought and dehydration stress showing increased stress tolerance compared to control plants (Col-0). To validate the *SchSDD1-like* function in tolerance to water loss in crops of agro-economic interest, *SchSDD1-like* was overexpressed in cultivated tomato plants ('Moneymaker'), which showed a reduction in stomatal frequency in its leaves and a lower rate of dehydration compared to control plant.

These results allow to conclude that: *SchSDD1-like* is the orthologue gene to *AtSDD1* and suggest that both genes control the stomatal number in leaves in response to drought and ABA in their species. The model described of stomatal development in *Arabidopsis* is also valid in tomato; and that modulation of gene expression of *SchSDD1-like* would be sufficient to increase tolerance to water deficit in cultivated species of tomato