

UNIVERSIDAD DE TALCA
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“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”

Tesis entregada al Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Talca en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado académico de:

**Doctor en Ciencias
Mención Ingeniería Genética Vegetal**

**Por
Samuel Elías Morales Navarro**

Director de Tesis : Dr. Simón Ruiz Lara.

Marzo de 2016

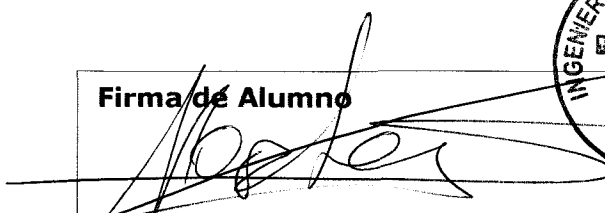
**Autorización para la publicación
de memorias de Pregrado y tesis de Postgrado**

Yo, **Samuel Elías Morales Navarro**, Cédula de Identidad N° 15.313.351-4 autor de la memoria o tesis que se señala a continuación, autorizo a la Universidad de Talca, para publicar en forma total o parcial, tanto en formato papel y/o electrónico, copias de mi trabajo.

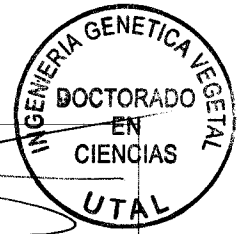
Esta autorización se otorga en el marco de la ley N° 17.336 sobre Propiedad Intelectual, con carácter gratuito y no exclusivo para la Universidad.

Título de la memoria o tesis:	"EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DEL GEN <i>SchSDD1-like</i> SOBRE LA DENSIDAD ESTOMÁTICA Y SU EFECTO EN LA RESPUESTA FRENTE A DÉFICIT HÍDRICO EN PLANTAS HETEROLÓGAS"
Unidad Académica:	INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Carrera o Programa:	PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL
Título y/o grado al que se opta:	DOCTOR EN CIENCIAS MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL.
Nota de calificación	6,8

Firma de Alumno



Rut: 15.313.351-4



Candidato a Doctor : Samuel Elías Morales Navarro
Fecha inicio de Tesis : Agosto de 2009
Fecha término de Tesis : Marzo de 2015
Fecha entrega de Tesis : Noviembre de 2015
Fecha defensa de Tesis : Marzo de 2016

Profesor Guía

Dr. Simón Ruiz Lara
Instituto de Ciencias Biológicas
Universidad de Talca
2 norte 685, casilla 747, Talca.
sruiz@utalca.cl

Integrantes de la Comisión de Evaluación:

Dra. Lorena Norambuena Morales
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Dra. Carolina Torres Del Campo
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad de Talca

Dra. M. Alejandra Moya León
Instituto de Ciencias Biológicas
Universidad de Talca

DEDICATORIA

“...Fíate de Jehová de todo tu corazón, Y no te apoyes en tu propia prudencia. Reconócelo en todos tus caminos, Y él enderezará tus veredas...” Proverbios 3:4-5

Fue duro alcanzar esta meta. Aunque estoy seguro que vendrán muchos desafíos más, siempre el primer paso es el más importante. Sin embargo, sería un mal agradecido y una falta de honestidad enorme de mi parte, si no reconociera que llegar hasta el momento de escribir estas líneas, fuese por exclusivo mérito y coraje personal. Hay personas que fueron claves en el desarrollo de mi trabajo, y a quienes a través de estas exiguas líneas, quiero reconocer.

Como siempre, y como corresponde, el primer lugar es para Dios, quien a pesar de todo lo bien o mal hecho, los buenos y malos momentos, jamás me abandono y pude llegar a feliz puerto. Por no darme lo que le pedí, sino otorgarme lo que me era necesario. “...Me despojo de mi gloria, y quito la corona de mi cabeza...” Te pertenecen por siempre.

A mi amada esposa no me queda más que hacerle un “monumento” a la paciencia. Por comprender que esta carrera es 24/7, por no reclamar cuando no estuve porque tenía un ensayo en curso; por ausentarme los fines de semana y apoyarme hasta el final. No es fácil entender la vida y ritmo de un científico, pero ella lo hizo. No tengo palabras para agradecerle. Es la dueña de mi corazón. Este amor vino a ser fortalecido con la llegada de la preciosa e inquieta Amada Victoria, quien con su presencia y sonrisa constante, alegró cada uno de mis retornos desde el lab. a casa. Este logro también es de ellas (y para la que viene en camino).

A mis padres, quienes siempre estuvieron preocupados por mí y mi familia, y que a la distancia me apoyaron permanentemente. Gracias por que hoy lo que soy, es mérito de Ustedes. También agradezco a la familia Rojas Henríquez por cobijarme como uno más de su casa y apoyarnos como familia siempre.

Finalmente, a toda la congregación de la Iglesia Evangélica de Dios Pentecostal de Talca (14 Sur #1551 entre 9 y 10 Oriente), encabezada por mi Pastor Walter Aburto Soto y su esposa Nancy Ojeda González, quienes cuando inicié mi aventura talquina, me abrieron las puertas de su casa, fui un hijo más y hasta el día de hoy son los *representantes* de mis padres en Talca, siempre dispuestos a escucharme, darme un consejo y apoyarme. Agradezco a la Junta Oficial, a la cual también por misericordia pertenezco, y a todos y cada uno de los integrantes de esta bella familia en Cristo. Esto también es para Uds.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONICYT por otorgarme la beca para estudios de doctorado en Chile. De igual forma, al programa CONICYT-DAAD-ALECHILE y a Becas Chile por financiar mis pasantías de investigación en Alemania y España, respectivamente.

Al Dr. Simón Ruiz por dirigir mi tesis doctoral, por permitirme integrar su equipo de investigación, y por siempre estar disponible para no tan solo conversar de ciencia sino también trasmitirme experiencias de vida. Al Dr Enrique González por todas las sugerencias realizadas durante el desarrollo de esta tesis. Agradecimientos especiales para ambos por apoyarme económicamente cuando mi beca doctoral expiró.

A mi comisión examinadora de tesis: La Dra Lorena Norambuena Morales, la Dra. Carolina Torres Del Campo y la Dra. Alejandra Moya-León por sus valiosos y provechosos comentarios.

Al cuerpo docente y de apoyo del Instituto de Ciencias Biológicas (Ex Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología), por aportar a mi formación profesional. En particular a la Dra. Iris Pereira, al Sr. Chávez, al Sr. Moreno, a Luis Araya y Victoria Ruz.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de genómica funcional del ICB, en especial a Isabel Verdugo, Carola Campos, Patricio Muñoz, Jorge y Ricardo Pérez, por hacer más grato el trabajo. Mención especial para mi amigo Ricardo Pérez por tantos momentos de lucha, conversación, desánimo y ánimo. Al fin llegamos a la meta.

A mis amigos, Karen Balboa, Gabriel Ballesteros, Alejandro Vega y Nuri Cabrera por su amistad y ánimo durante el desarrollo de mi tesis.

A mi primo Guillermo Caroca Navarro, por ayudarme con las figuras de mi tesis.

A las constantes oraciones del Cuerpo de Hnas. Dorcas de la IEDDP de Conchalí.

A la familia Morales Vargas, por su preocupación y apoyo.

Al grupo de Biotecnología y Biología Molecular de Plantas de la UCLM en Toledo – España, encarecidamente a la Dra. Carmen Fenoll-Comes por abrirme las puertas de su laboratorio para trabajar y colaborar con mi tesis y permitirme regresar a discutir los resultados. Especiales agradecimientos a Javier Cabrera Chaves y Alberto de Marcos. Así mismo, al Dr. Juan Carlos Sánchez Hernández y su familia por acogerme con cariño en Toledo.

Finalmente, agradezco el interés que manifiesta el lector de esta tesis por conocer mi trabajo, el cual, es mi deseo, le sean de mucha utilidad.

I. ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
DEDICATORIA	<i>iii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iv</i>
I. ÍNDICE DE MATERIAS	<i>v</i>
II. ÍNDICE DE FIGURAS	<i>xi</i>
III. ÍNDICE DE TABLAS	<i>xii</i>
IV. LISTA DE ABREVIATURAS Y OTROS TÉRMINOS	<i>x</i>
V. RESUMEN	<i>1</i>
VI. ABSTRACT	<i>3</i>
VII. INTRODUCCIÓN	<i>5</i>
VII.1 Mecanismos de resistencia a la sequía	<i>6</i>
VII.2 Desarrollo estomático en <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>8</i>
VII.2.1 Determinación del destino celular	<i>8</i>
VII.2.2 Control Genético	<i>11</i>
VII.2.3 Señalización celular involucrada en el patrón estomático: Regla del espaciamiento de una célula.	<i>13</i>
VII.3 Control endógeno y ambiental del desarrollo estomático	<i>20</i>
VII.3.1 Regulación hormonal: ABA.	<i>20</i>
VII.3.2 Respuesta frente a señales ambientales	<i>21</i>
VII.4 Genes que controlan el desarrollo estomático como blanco para mejorar el uso eficiente de agua y el rendimiento en plantas: <i>SDD1</i>	<i>24</i>
VII.5 Hipótesis de Trabajo.	<i>27</i>
VII.6 Objetivos	<i>28</i>

	Página
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	29
VIII.1 Material vegetal y condiciones de cultivo	29
VIII.2 Identificación <i>in silico</i> de genes de tomate involucrados en el desarrollo estomático	29
VIII.3 Ensayos de estrés salino, sequía y tratamiento con ABA	31
VIII.3.1. Tratamiento con estrés salino en plantas de <i>Solanum chilense</i>	31
VIII.3.2. Tratamiento de sequía en plantas de <i>Solanum chilense</i>	31
VIII.3.3. Medición de parámetros fisiológicos de tolerancia bajo condiciones de estrés en <i>Solanum chilense</i>	31
VIII.3.4 Tratamiento de sequía en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
VIII.3.5 Tratamiento con ABA en <i>Solanum chilense</i>	32
VIII.3.6 Tratamiento con ABA en <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
VIII.4 Extracción y purificación de RNA	33
VIII.5 Síntesis de cDNA	33
VIII.6 Análisis de la expresión génica	33
VIII.7 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y clonamiento de las secuencias amplificadas	34
VIII.8 Aislamiento y purificación de DNA plasmidial	35
VIII.9 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético	36
VIII.10 Análisis <i>in silico</i> de las regiones promotoras de genes de interés	36
VIII.11 Generación de construcciones genéticas para transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Solanum lycopersicum</i>	36
VIII.12 Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Solanum lycopersicum</i>	37
VIII.13 Impresiones epidermales y conteo estomático	39
VIII.14 Análisis de tolerancia a la deshidratación en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Solanum lycopersicum</i>	39
VIII.15 Análisis de tolerancia a la sequía en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
VIII.15 Análisis estadístico	40

	Página
IX. RESULTADOS	41
CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>SDD1</i> Y DE LOS GENES MAESTROS DEL DESARROLLO ESTOMÁTICO BAJO CONDICIONES DE SEQUÍA Y SU MODULACIÓN POR ABA EN PLANTAS DE <i>ARABIDOPSIS</i>	41
IX.1 <i>AtSDD1</i> presenta una modulación opuesta respecto a <i>AtSPCH</i> , <i>AtMUTE</i> y <i>AtFAMA</i> en hojas de plantas de <i>Arabidopsis</i> bajo sequía y ABA.	41
a) Estrés por sequía	41
b) Tratamiento con ABA	43
CAPÍTULO II: IDENTIFICACIÓN DEL GEN <i>SchSDD1-like</i> HOMÓLOGO DE <i>AtSDD1</i> Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE ESTOMAS EN TOMATE	48
IX.II.1 Identificación del gen <i>SchSDD1-like</i> en <i>Solanum chilense</i> .	48
IX.II.2 <i>SchSDD1-like</i> exhibe un perfil de expresión espacial diferencial en plantas de Tomate silvestre	53
IX.II.3 La expresión del gen <i>SchSDD1-like</i> se incrementa frente a estrés salino, sequía y tratamiento con ABA.	54
a) Estrés salino	54
b) Estrés por déficit hídrico	57
c) Tratamiento con ABA	60
IX.II.4 Figuras suplementarias Capítulo II	63
CAPÍTULO III: ESTUDIO FUNCIONAL DE <i>SchSDD1-like</i> EN PLANTAS HETERÓLOGAS: EFECTO EN LA ABUNDANCIA ESTOMÁTICA Y EN LA TOLERANCIA A DÉFICIT HÍDRICO	64
IX.III.1 El gen <i>SchSDD1-like</i> restaura fenotipo de la línea mutante <i>sdd1-3</i> de <i>A. thaliana</i> .	64
IX.III.2 La sobreexpresión de <i>SchSDD1-like</i> reduce la densidad estomática en las hojas de <i>Arabidopsis</i>	69
IX.III.3 La sobreexpresión del gen <i>SchSDD1-like</i> aumenta la tolerancia a la sequía en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> mediante una disminución en la tasa de pérdida de agua.	73

	Página
IX.III.4 La sobreexpresión del gen <i>SchSDD1-like</i> reduce la densidad estomática y mejora la tolerancia a la deshidratación en plantas transgénicas de <i>S. lycopersicum</i> .	76
IX.II.5 Figuras suplementarias Capítulo III	81
X.DISCUSIÓN	84
X.1 Generalidades	84
X.2 La proteína SDD1-like de tomate mantiene características propias de la familia de las subtilisinas	85
X.2.1 Antecedentes generales de la familia de serino proteasas presentes en plantas y su relación con <i>SchSDD1-like</i>	85
X.3 <i>SchSDD1-like</i> presenta un patrón de expresión órgano-específico similar a <i>AtSDD1</i>	89
X.4 Regulación diferencial de los genes <i>SchSDD1-like</i> y <i>AtSDD1</i> por estrés abiótico y ABA	92
X.5 <i>SchSDD1-like</i> está involucrado en la regulación de la densidad estomática y en su patrón de distribución en las hojas.	103
X.6 La reducción en la densidad estomática producto de la sobreexpresión de <i>SchSDD1-like</i> aumenta la tolerancia a la deshidratación en plantas de <i>Arabidopsis</i> y tomate.	105
XI.CONCLUSIONES	114
XII. BIBLIOGRAFÍA	115

II. ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Morfología y patrón de distribución estomática en plantas	8
Figura 2.	Distribución y desarrollo estomático en <i>Arabidopsis</i> .	11
Figura 3.	Transiciones del linaje estomático en <i>Arabidopsis</i>	13
Figura 4.	Modelo genético del desarrollo estomático en <i>A.thaliana</i> .	19
Figura 5.	Control hormonal del desarrollo de estomas en hojas y cotiledones de <i>Arabidopsis</i> .	21
Figura 6.	Representación esquemática de la regulación del desarrollo de estomas mediante señalización sistémica	23
Figura 7.	Perfil de expresión de <i>SDD1</i> en plantas wild-type de <i>Arabidopsis</i> expuestas a sequía.	42
Figura 8.	Perfil de expresión de los genes maestros del desarrollo estomático en plantas wild-type de <i>Arabidopsis</i> expuestas a sequía.	43
Figura 9.	Perfil de expresión de <i>SDD1</i> en plantas wild-type de <i>Arabidopsis</i> tratadas con ABA exógeno.	44
Figura 10.	Perfil de expresión de los genes maestros del desarrollo estomático en plantas wild-type de <i>Arabidopsis</i> tratadas con ABA exógeno	45
Figura 11.	Representación esquemática de la estructura de prepro-proteínas de los miembros mejor caracterizados de la familia de proteasas S8A de plantas y SchSDD1-like.	49
Figura 12.	Análisis filogenético de SchSDD1-like y serino-proteasas de la familia subtilisina de varias plantas	50
Figura 13.	Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida de SchSDD1-like aislada desde <i>S. chilense</i> y de otras SBT's homólogas	52
Figura 14.	Perfil de expresión del gen <i>SchSDD1-like</i> en diferentes órganos de tomate silvestre	53
Figura 15.	Evaluación de parámetros fisiológicos bajo condiciones de estrés salino en plantas de <i>S. chilense</i>	55

	Página
Figura 16. Perfil de expresión de <i>SITSW12</i> (<i>SchTSW12-like</i>) en plantas wild-type de <i>S. chilense</i> expuestas a estrés salino	55
Figura 17. Perfil de expresión de <i>SchSDD1-like</i> en plantas wild-type de <i>S. chilense</i> expuestas a estrés salino	56
Figura 18. Evaluación de parámetros fisiológicos y moleculares bajo condiciones de estrés por sequía en plantas de <i>S. chilense</i>	57
Figura 19. Perfil de expresión de <i>SchSDD1-like</i> en plantas wild-type de <i>S. chilense</i> expuestas a sequía	59
Figura 20. Perfil de expresión de los posibles genes maestros del desarrollo estomático en plantas wild-type de <i>S. chilense</i> expuestas a sequía.	59
Figura 21. Perfil de expresión de <i>SchSDD1-like</i> en plantas wild-type de <i>S. chilense</i> tratadas con ABA exógeno	61
Figura 22. Perfil de expresión de los posibles genes maestros del desarrollo estomático en plantas wild-type de <i>S. chilense</i> tratadas con ABA exógeno	61
Figura S1-II. Evolución del fenotipo durante el estrés por sequía en plantas de <i>S. chilense</i>	63
Figura 23. Análisis de expresión en plantas mutantes <i>sdd1-3</i> de <i>Arabidopsis</i> complementadas con el gen <i>SchSDD1-like</i> aislado del <i>S. chilense</i> .	64
Figura 24. Impresiones de resina dental de hojas completamente expandidas de plantas mutantes <i>sdd1-3</i> de <i>Arabidopsis</i> complementadas con el gen <i>SchSDD1-like</i>	65
Figura 25. Densidad estomática en plantas de <i>Arabidopsis</i> silvestre (WT), mutante <i>sdd1-3</i> y complementadas con el gen <i>SchSDD1-like</i> .	66
Figura 26. qPCR de genes implicados en el desarrollo de estomas en plantas mutante <i>sdd1-3</i> de <i>Arabidopsis</i>	67
Figura 27. qPCR de genes implicados en el desarrollo de estomas en plantas mutantes <i>sdd1-3</i> de <i>Arabidopsis</i> complementadas con el gen <i>SchSDD1-like</i> de <i>S. chilense</i> .	68
Figura 28. Expresión ectópica del gen <i>SchSDD1-like</i> aislado de <i>S. chilense</i> en <i>Arabidopsis</i>	69

	Página
Figura 29. Densidad estomática (número de estomas por área) en plantas de <i>Arabidopsis</i> silvestre y sobreexpresoras del gen <i>SchSDD1-like</i>	70
Figura 30. Impresiones de resina dental de hojas completamente expandidas de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> que sobreexpresan el gen <i>SchSDD1-like</i>	70
Figura 31. qPCR de genes implicados en el desarrollo de estomas en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i>	71
Figura 32. La sobreexpresión de <i>SchSDD1-like</i> en <i>Arabidopsis</i> aumenta la tolerancia a la deshidratación.	73
Figura 33. Peroxidación de lípidos y gen marcador asociados con la respuesta a estrés abiótico en las plantas sobreexpresoras <i>P₃₅:SchSDD1-like</i> de <i>Arabidopsis</i> durante sequía	74
Figura 34. Expresión ectópica del gen <i>SchSDD1-like</i> aislado del <i>S. chilense</i> en Tomate cultivado	75
Figura 35. Densidad estomática (número de estomas por campo visual al microscopio) en plantas de Tomate silvestre y sobreexpresoras del gen <i>SchSDD1-like</i>	76
Figura 36. Impresiones de resina dental de hojas completamente expandidas de plantas transgénicas de <i>S. lycopersicum</i> que sobreexpresan el gen <i>SchSDD1-like</i>	77
Figura 37. qPCR de genes implicados en el desarrollo de estomas en plantas transgénicas de <i>S. lycopersicum</i> .	78
Figura 38. La sobreexpresión de <i>SchSDD1-like</i> en tomate aumenta la tolerancia a la deshidratación	79
Figura S1-III. La sobreexpresión de <i>SchSDD1-like</i> restaura el fenotipo silvestre en la planta mutante <i>sdd1-3</i> de <i>Arabidopsis</i> .	81
Figura S2-III Características fenotípicas de plantas de <i>Arabidopsis</i> que sobreexpresan <i>SchSDD1-like</i>	82
Figura S3-III La sobreexpresión de <i>SchSDD1-like</i> disminuye la densidad estomática en plantas silvestres de <i>Arabidopsis</i>	82
Figura S4-III Características fenotípicas de plantas de tomate que sobreexpresan <i>SchSDD1-like</i>	83

III. ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados en esta investigación	30

IV. LISTA DE ABREVIATURAS Y OTROS TÉRMINOS

ABA	Ácido Abscísico
ABRE	Elemento de respuesta a ABA
bHLH	Basic helix-loop-helix
BLAST	Herramienta para la búsqueda básica de alineamientos locales
bZIP	Basic leucine zipper domain
CBLE	Célula basal del linaje estomático
cDNA	DNA complementario
CaMV 35S	Promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S
CBF/DREB	Dehydration-responsive element (DRE) binding proteins
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Columbia 0
CRA	Contenido Relativo de Agua
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasal	Desoxirribonucleasa I
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DREB	Dehydration response element binding protein
E	Evaporación
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
GC	Célula Guardiania
gDNA	DNA genómico
GMC	Célula Madre Guardiania
Gs	Conductancia estomática
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
LB	medio Luria-Bertani
LTRE	Low Temperature Responsive Element
M	Meristemoide
MAPK	Proteína quinasa activada por Mitógeno
MAPKK	Proteína quinasa quinasa activada por Mitógeno
MAPKKK	Proteína quinasa quinasa quinasa activada por Mitógeno
MDA	Malonaldehído

MKTD	Sitio blanco de MAPK
mM	milimolar
MMC	Célula Madre del Meristemoide
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
NaCl	Cloruro de Sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanogramos
nm	nanometros
nM	namo Molar
ORF	Marco de Lectura Abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PF	Peso fresco
Pn	Fotosíntesis neta
PS	Peso seco
PT	Peso turgente
qRT-PCR	PCR cuantitativo o Real time-PCR
RNA	Ácido Ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
S	Estomas
SD	Densidad estomática
SI	índice estomático
T0	Transformante 0 (inicial)
T1	Transformante, primera generación
µg	microgramos
µl	microlitros
µM	micro molar
VPD	déficit en la presión de vapor
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

V. 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 mantiene 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.

VI. 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.

VII. INTRODUCCIÓN

En biología, estrés se define como una condición fisiológica alterada causada por factores ambientales que perturban el normal funcionamiento y desarrollo de un sistema biológico. En el caso de las plantas, la exposición permanente a condiciones de estrés abiótico, tales como alta temperatura, sequía, salinidad, frío y niveles tóxicos de metales pesados, así como también, el ataque de hongos, virus, bacterias y herbívoros, limitan su potencial genético y afectan el rendimiento de los cultivos (Jaleel *et al.*, 2009). De hecho, desde la perspectiva agrícola, el estrés abiótico es la principal causa de daño en los cultivos a nivel mundial, disminuyendo aproximadamente en un 50% la producción afectada y generando pérdidas de millones de dólares, lo que amenaza seriamente la sustentabilidad de la industria (Boyer, 1982; Wang *et al.*, 2003). La sequía, es un fenómeno que se caracteriza por un espacio de tiempo sin un nivel significativo de precipitaciones. El estrés bajo esta condición ocurre cuando disminuye la disponibilidad de agua en el suelo y los factores ambientales producen continua pérdida de agua por evapotranspiración (Jaleel *et al.*, 2009). Típicamente, es la causa más común de bajo rendimiento de los cultivos y escasez de alimentos en el mundo, toda vez que el éxito de la producción agrícola depende crucialmente de la disponibilidad del recurso hídrico. Sin ir más lejos, la agricultura consume alrededor del 70% del agua disponible, siendo superior al 95% en los países desarrollados (FAO, 2007). Es por esta razón, que se ha planteado que el aumento de las temperaturas y una reducción del nivel de precipitaciones producto del cambio climático, traerá negativas consecuencias a la disponibilidad de agua para el uso agrícola (Battisti y Rosamond, 2009). Esta problemática ha impulsado la búsqueda de nuevos cultivos que sea capaces de optimizar el uso del agua disponible, así como también, sean tolerantes al estrés por déficit hídrico. Con este objetivo, trabajos utilizando métodos de mejoramiento genético convencional, han obtenido resultados positivos en el intento de generar cultivos de interés económicos, tales como los cereales tolerantes a la sequía y/o salinidad (Witcombe *et al.*, 2008; Nevo y Chen, 2010) . Sin embargo, la ingeniería genética vegetal ha reportado un mayor potencial para producir cultivos con mejoras importantes en el área del estrés abiótico (Hervé y Serraj, 2009; Cominelli y Tonelli, 2010) .

VII.1. Mecanismos de resistencia a la sequía.

Las plantas son organismos sésiles, y como tal han tenido que desplegar una serie de mecanismos que le permitan sobrevivir en medio de variados cambios en las condiciones ambientales. Las plantas han desarrollado dos estrategias para resistir a la sequía: evasión y tolerancia (Blum, 2005). La evasión a la deshidratación, se define como la habilidad de la planta para mantener un status hídrico compatible con sus necesidades fisiológicas en condiciones de baja disponibilidad de agua. Las plantas evitan los efectos de la deshidratación captando mayor humedad del suelo o reduciendo la pérdida de agua. Por su parte, se habla de tolerancia cuando las plantas son capaces de mantener sus funciones fisiológicas mínimas en condiciones de deshidratación (Blum, 2005). Algunas plantas soportan pérdidas de agua superiores al 90% de su contenido hídrico, volviendo a crecer cuando las condiciones de humedad del suelo vuelven a la normalidad, siendo un ejemplo de esto, las llamadas “plantas de resurrección” (Cominelli y Tonelli, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010) . La mayoría de las plantas pueden soportar una pérdida de agua no superior al 30%.

Sequía, salinidad, temperaturas extremas y estrés oxidativo están frecuentemente interconectados y pueden inducir similar daño celular. Por ejemplo, la manifestación inicial de la falta de disponibilidad de agua y/o salinidad, es el estrés osmótico, lo que altera la homeostasis y la distribución iónica en la célula (Zhu, 2001). Así mismo, el estallido oxidativo como consecuencia de la sequía (también observado en estrés salino y por temperatura), genera desnaturalación y alteraciones estructurales de proteínas (Smirnov, 1998). Es manifiesto entonces, que diferentes tipos de estrés, activan similares rutas de señalización, y que la adaptación de las plantas a los diversos tipos de estrés ambiental, no solo involucra procesos fisiológicos y bioquímicos, sino también la activación de redes moleculares involucradas en la percepción de la señal ambiental, la transducción de dicha señal y la expresión de genes específicos relacionados con el estrés, así como también la síntesis de metabolitos (Cushman y Bohnert, 2000; Vinocur y Altman, 2005). El surgimiento en los últimos años de los métodos de ingeniería genética, ha permitido identificar una gran cantidad de genes involucrados en la respuesta a estrés abiótico, principalmente en *Arabidopsis thaliana*, volviéndose candidatos para su manipulación (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Estos genes se agrupan en 3 categorías: genes que codifican para proteínas con función enzimática o estructural, genes reguladores y genes con función desconocida (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2007; Cominelli y Tonelli, 2010).

Los efectos fisiológicos frente al estrés hídrico sobre la plantas, incluyen la reducción del contenido de agua, disminución del potencial hídrico en las hojas y pérdida de la turgencia celular, además del cierre estomático. Un estrés más severo, tendrá como efecto una caída en la actividad fotosintética, alteraciones metabólicas y finalmente la muerte de la planta (Shao *et al.*, 2008). Respecto a los cambios morfológicos, la sequía inhibe la elongación más que la división celular, reduciéndose el crecimiento vegetativo, en particular, tallos y hojas (Schuppler *et al.*, 1998). El crecimiento de las hojas, es mucho más sensible que las raíces en condiciones de sequía, ya que reducir la expansión foliar expuesta, trae como consecuencia una beneficiosa disminución de la transpiración en condiciones de déficit hídrico. En cuanto al sistema radicular, raíces más largas permiten aumentar la capacidad de absorción de humedad desde capas más profunda de suelo (Mahajan y Tuteja, 2005; Cominelli y Tonelli, 2010) .

Un evento fisiológico temprano y de gran importancia en la adaptación de las plantas al estrés hídrico, es el cierre de los estomas para prevenir la pérdida de agua (Chaves *et al.*, 2003; Casson y Gray, 2008; Ahuja *et al.*, 2010; Casson y Hetherington, 2010; Cominelli y Tonelli, 2010). Tan importante es su función, que se piensa que el desarrollo de los estomas, asociado a un sistema vascular, les permitió a las plantas superiores colonizar la tierra (Raven, 2002). Los estomas están formados por un par de células guardianas especializadas que rodean dicho poro, las cuales actúan como una microválvula y que son morfológicamente distintas de las células epidermales que forman los tejidos aéreos (**figura 1**), siendo capaces de responder a cambios ambientales aumentando o disminuyendo su presión de turgor para abrir/cerrar el poro estomático (Chaerle *et al.*, 2005; Nadeau, 2009). Esta cualidad, le permite a las plantas tomar CO₂ y/o conservar agua, siendo esencialmente esto último, clave para regular las relaciones hídricas en las hojas (Farquhar y Sharkey, 1982). Además de estas funciones, los estomas colaboran en el control de la temperatura foliar, transporte de metabolitos y señalización a larga distancia dentro de la planta (Brownlee, 2001; Lake *et al.*, 2001; Jia y Zhang, 2008).

Avances recientes en la comprensión de cómo las plantas enfrentan y responden a los cambios ambientales, han situado a los estomas como elementos esenciales para investigar estos fenómenos. Desde el punto de vista fisiológico, generalmente, los poros permanecen abiertos durante las horas de luz, frente a bajas concentraciones de CO₂ en el interior de la hoja y elevada humedad, mientras que el cierre del poro se produce en la situación opuesta y elevadas temperaturas (Vavasseur y Raghavendra,

2005). Por otra parte, el desarrollo de los estomas en la epidermis también está influenciado por las condiciones ambientales; tan así es, que se ha observado que altas concentraciones de CO₂, baja intensidad lumínica, concentraciones endógenas de fitohormonas o baja humedad relativa, resultan en una menor frecuencia estomática en las hojas en desarrollo (Woodward, 1987; Tricker *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2013; Santrucek *et al.*, 2014). Dada su habilidad para controlar la pérdida de agua, los estomas son elementos clave para aclimatarse a las condiciones ambientales. Esta adaptación sigue 2 estrategias: la reducción de la apertura del poro estomático o mediante la modulación de la frecuencia a la cual se desarrollan los estomas en los nuevos órganos (Casson y Gray, 2008; Casson y Hetherington, 2010). Sin embargo, estas estrategias presentan el inconveniente para la planta, que una menor tasa de transpiración en respuesta a la sequía, generalmente traerá asociada una disminución en la acumulación de biomasa, ya que la asimilación de carbono también se verá reducida (Casson y Hetherington, 2010; Yoo *et al.*, 2010).



Figura 1. Morfología y patrón de distribución estomática en plantas. (A) A la **izquierda**, morfología características de un estoma de arroz; a la **derecha**, un estoma típico de dicotiledónea tal como *Arabidopsis* (extraído de Hetherington y Woodward, 2003). **(B) Arriba**, *Arabidopsis*. Las células están dispuestas al azar, con estomas (células de guarda) dispersos través de la superficie foliar; **Abajo**, Arroz. Las células se disponen en fila, con algunos estomas flanqueados por dos células subsidiarias (extraído de Serna, 2011).

VII.2 Desarrollo estomático en *Arabidopsis thaliana*

VII.2.1 Determinación del destino celular

En la mayoría de las plantas, los estomas se desarrollan en los órganos con actividad fotosintética, aunque existen diferencias en su distribución. En las hojas en la que los estomas se desarrollan en ambas superficie, se denominan hojas anfiestomáticas, siendo la superficie inferior (abaxial) la que presenta la mayor concentración de estomas respecto a la superior (adaxial). En

algunas especies, principalmente árboles, las hojas son hipoestomáticas, es decir, los estomas solo se encuentran en la cara abaxial, mientras que en algunas plantas acuáticas, los estomas se encuentran solo en la superficie adaxial (hoja epiestomáticas) (Lawson, 2009).

Actualmente, existen dos morfologías estomáticas claramente distinguibles, dependiendo de la forma de las células guardianas. Las células de guarda tipo “riñón”, son típicas de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas, siendo las células de guarda tipo “pesa” las características de la mayoría de las monocotiledóneas (**figura 1A**). Las hojas de monocotiledóneas presentan una venación paralela y sus estomas se distribuyen de manera ordenada en filas. Por su parte, las hojas de dicotiledóneas presentan una venación reticulada y sus estomas se distribuyen de manera dispersa por toda la superficie de la hoja (**figura 1B**) (Nadeau, 2003; Serna, 2011). Estas diferencias en el patrón estomático entre monocotiledóneas y dicotiledóneas responden, probablemente, a la arquitectura tanto interna como externa de las hojas; esto es, acicular y plana, respectivamente (Croxdale, 2000).

A pesar de las diferencias existentes en morfología de las células guardianas y de la distribución estomática en los órganos fotosintéticos observadas en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, una característica común encontrada en ambas es que los estomas no se encuentran agrupados uno junto al otro. Esta disposición se conoce como la “*regla del espaciamiento por una célula*”, la cual consiste en que los estomas deben estar separados por a lo menos una célula del pavimento, siendo este espaciamiento el óptimo para el funcionamiento de los estomas (Geisler *et al.*, 2000). Esta zona libre de células guardianas, reduce la sobreposición de la capa de difusión gaseosa entre los estomas, minimiza la tasa de evaporación y garantiza una óptima relación entre la captura del CO₂ del entorno y la capacidad fotosintética de la planta; además de asegurar la presencia de células vecinas a los estomas capaces de responder a los cambios iónicos y de agua necesarios para las variaciones en la presión de turgencia de las células guardianas que permite la apertura/cierre del poro estomático (Nadeau y Sack, 2002b). Para forzar este correcto patrón de distribución en la hoja, los estomas presentes y/o células precursoras del linaje estomático deben enviar señales a sus células vecinas, ya sea para reprimir la entrada al linaje estomático o que las divisiones de espaciamiento ocurran en una dirección que se aleje del estoma pre-existente (Lau y Bergmann, 2012).

Aunque el patrón de distribución y morfología de los estomas en las superficies de las hojas es variable entre las especies de angiospermas, ambas características están asociadas a eventos similares de división celular no azarosas, sino orientadas y asimétricas. A diferencia de lo que ocurre en monocotiledóneas, en las que los estomas están dispuestos de manera muy ordenada, en dicotiledóneas las células guardianas maduras surgen de una serie de divisiones asimétricas de un set de precursores del linaje estomático que se distribuyen aparentemente al azar por la superficie de la hoja (Carpenter, 2005; Bergmann y Sack, 2007; Abrash y Bergmann, 2009) (**figura 2A**). En *Arabidopsis*, la especie dicotiledónea modelo, el desarrollo estomático ha sido descrito en profundidad en los últimos años, lo que ha permitido avanzar cuantitativamente en el conocimiento del mecanismo celular y molecular involucrado en tan complejo proceso. Todos los estomas de *Arabidopsis* provienen de al menos una división asimétrica y una simétrica final (Nadeau, 2003). Este proceso se inicia cuando una célula protodermal ingresa al linaje estomático y se vuelve una célula madre del meristemoide (MMC); las señales involucradas en esta etapa inicial son desconocidas (Bergmann y Sack, 2007). Una división asimétrica (división de “entrada”) de la MMC, genera dos tipos celulares: una célula pequeña denominada meristemoide (M) y una más grande denominada célula basal del linaje estomático (CBLE) (**figura 2B**). La célula M tiene una limitada capacidad de auto-regeneración y puede continuar experimentando divisiones asimétricas (división de “amplificación”) produciendo una célula hija pequeña en cada división manteniendo la cantidad e identidad de células del meristemoide y una nueva célula CBLE. La célula M se diferenciará hacia célula madre guardiana (GMC), quien experimentará una división simétrica para producir una de las dos células guardianas (GC) que conforma un estoma. Las CBLE producidas en varias etapas de este proceso pueden diferenciarse en células del pavimento o también pueden generar nuevas MMC, las que dividiéndose asimétricamente nuevamente, producen un meristemoide denominado secundario o satélite (Zhao y Sack, 1999; Abrash y Bergmann, 2009). La división asimétrica (división de “espaciamiento”) que produce estas meristemoides satélites tiene por objetivo mantener la regla del *espaciamiento por una célula* que debe existir entre un estoma maduro y el resto de las células precursoras, siendo esta división orientada de tal forma que el nuevo meristemoide se ubique alejado (distal) del estoma preexistente (Nadeau y Sack, 2002b; Bergmann y Sack, 2007; Lau y Bergmann, 2012).

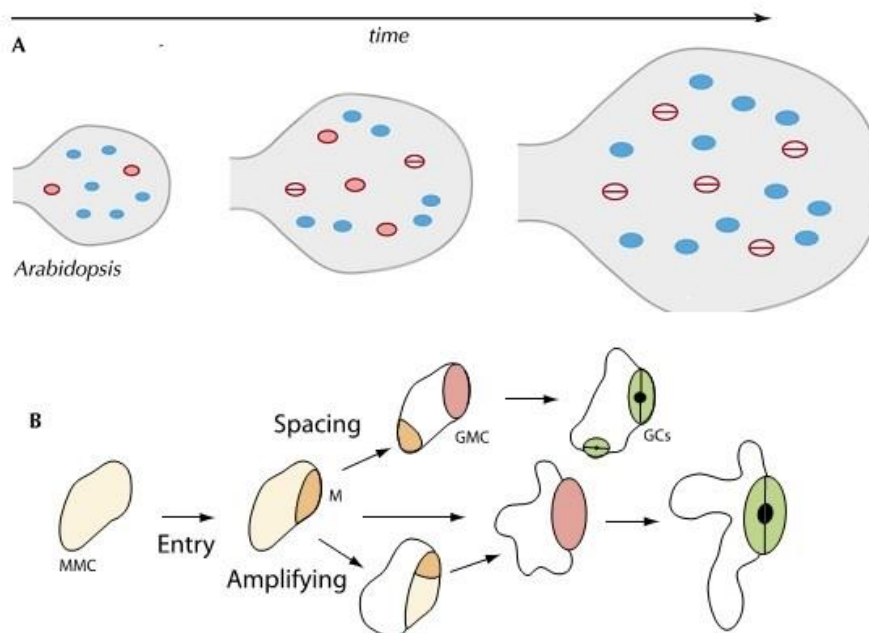


Figura 2. Distribución y desarrollo estomático en Arabidopsis. (A) En Arabidopsis, las hojas presentan un crecimiento disperso y clonal (derivado del mismo meristemoide), y sólo las células proliferativas en el estadio adecuado del ciclo de división celular son capaces de producir un estoma (rojo). Otros grupos de células proliferativas (azul) no son capaces de entrar en el linaje estomático. A medida que la hoja crece, surgen nuevos grupos de células proliferativas, mientras que las ya existentes se convierten en estomas (Extraído de Croxdale, 2000). (B) El desarrollo estomático requiere de divisiones asimétricas de entrada de las MMC's para crear M, las que pueden autoregenerarse mediante divisiones de amplificación ó derivar en una GMC. Las divisiones de espaciamento de las MMC's adyacente a los estomas, son orientadas y asimétricas (Extraído de Abrash y Bergmann, 2009).

Como se ha descrito, el desarrollo estomático en *Arabidopsis* implica una serie de divisiones estereotipadas y altamente ordenadas, cambios de identidad y destino celular y un patrón de espaciamiento establecido. Este complejo proceso debe estar sometido a una estricta regulación génica que permita el correcto desarrollo del complejo estomático, que garantice el espaciamiento óptimo entre estas estructuras que permita un balance equilibrado entre fotosíntesis y transpiración.

VII.2.2 Control Genético

En *Arabidopsis*, los mecanismos que conducen a la producción de estomas maduros involucran una serie de divisiones, transiciones celulares con morfología, nivel de transcritos y localización de proteínas bien definidas (Pillitteri *et al.*, 2011). El avance por los distintos estadios celulares comprometidos durante el desarrollo estomático, está controlado mediante una actividad secuencial y combinatoria de los factores de transcripción del tipo hélice-loop-hélice básicos (bHLH) llamados SPEECHLESS (SPCH), MUTE, FAMA, SCREAM (SCRM) y SCRM2 (Bergmann *et al.*, 2004; MacAlister *et al.*, 2007; Pillitteri *et al.*, 2007; Kanaoka *et al.*, 2008). La familia de factores de transcripción del tipo

bHLH, actúan en cascadas de señalización para especificar identidad celular operando por lo general como dímeros (Murre *et al.*, 1989; Weintraub *et al.*, 1991). Típicamente, el dominio bHLH consiste en aproximadamente 18 residuos básicos e hidrofílicos en la región N-terminal del dominio, seguido de dos regiones hidrofóbicas que forman una α -hélice anfipática separadas por un loop (Heim, 2003). Estas dos regiones funcionalmente distintas, la básica y la HLH, están involucradas en la unión a DNA y en la dimerización entre dos proteínas bHLH, respectivamente (Jones, 2004). En la progresión del linaje estomático, dos grupos de proteínas bHLH han sido identificados. SPCH, MUTE y FAMA pertenecen al primer grupo que codifica parálogos pertenecientes al subgrupo “Ia” (Pires y Dolan, 2009). A pesar de pertenecer al mismo subgrupo, características únicas de cada gen reflejan su participación específica en cada etapa de la transición celular estomática, siendo incapaces de reemplazarse funcionalmente entre ellos (MacAlister *et al.*, 2007). Entre las diferencias estructurales destacables, solo SPCH posee un dominio fosforilable que es clave para su función (sitio MKTD) (Lampard *et al.*, 2008). SPCH, MUTE y FAMA se comportan como puntos de control molecular para la transición celular propia de cada etapa de desarrollo estomático, por lo cual se les ha categorizado como los *genes maestros* que regulan de manera positiva cada uno de estos eventos (Pillitteri y Torii, 2007). Así, SPCH impulsa la división asimétrica inicial de MMC’s y también la división de “entrada” al linaje estomático. MUTE dirige la diferenciación de las células M hacia GMC’s (MacAlister *et al.*, 2007; Pillitteri *et al.*, 2007); y FAMA es esencial para la diferenciación hacia GC’s (Ohashi-Ito y Bergmann, 2006; MacAlister y Bergmann, 2011) (**figura 3A**). Los análisis fenotípico de mutantes de pérdida y ganancia de función de cualquiera de estos tres factores de transcripción, indican que éstos son necesarios y suficientes para dirigir la cascada transcripcional en su respectivo punto de acción de la progresión estomática (**figura 3B**). Por otra parte, otros dos factores de transcripción parálogos y parcialmente redundantes miembros del subgrupo “IIIb” de las bHLH denominados SCRM, originalmente denominado ICE1 por su participación en la respuesta a frío (Chinnusamy *et al.*, 2003), y SCRM2, están ampliamente expresados durante todo el proceso de transición de las tres fases celulares del desarrollo estomático (a diferencia de SPCH, MUTE y FAMA los cuales actúan secuencialmente) operando como integradores de cada etapa mediante la interacción heterodimérica secuencial con SPCH, MUTE y FAMA (**figura 3A**). El mecanismo de formación y estabilización del heterodímero no ha sido aún determinado con precisión (Kanaoka *et al.*, 2008; Pillitteri y Torii, 2012). La combinación funcional de estos cinco genes establece

una cascada regulatoria secuencial que dirige la transición celular durante el desarrollo estomático (Pillitteri y Torii, 2012).

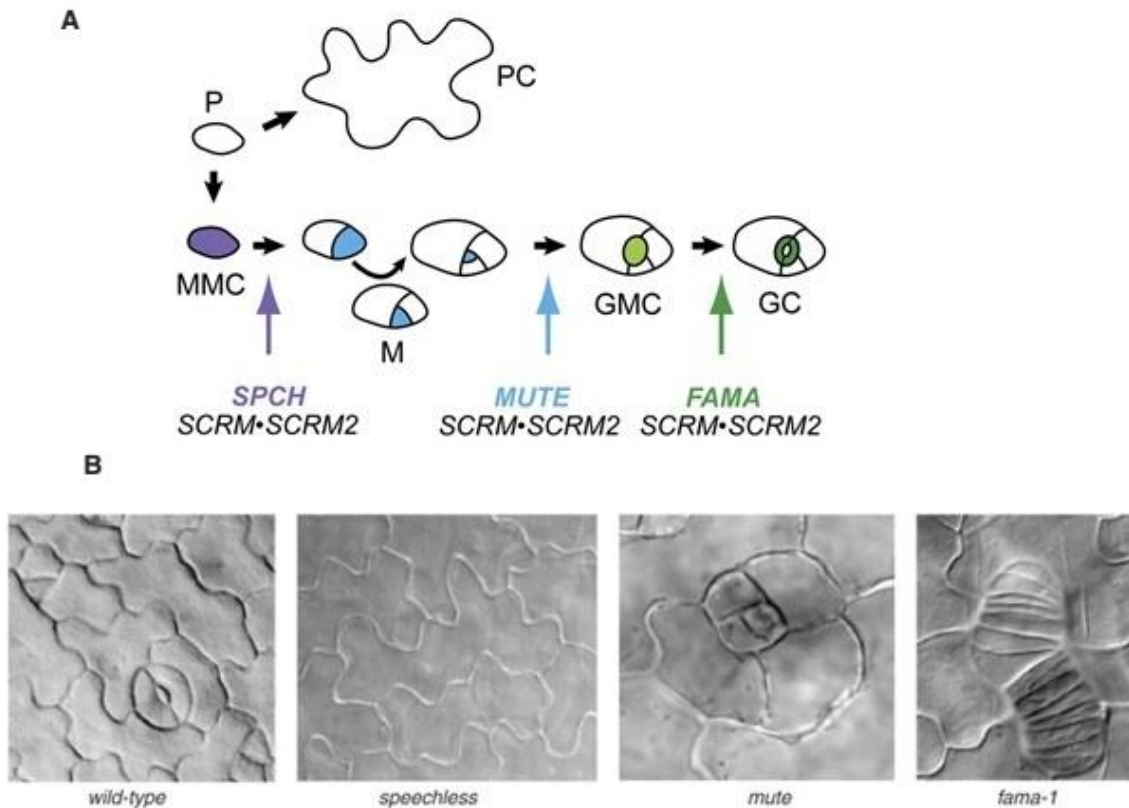


Figura 3. Transiciones del linaje estomático en *Arabidopsis*. (A) Diagrama esquemático de las transiciones celulares durante el desarrollo de estomas ilustrando el patrón de expresión secuencial de los genes bHLH (P: célula protodermal; PC: célula del pavimento). Las flechas de colores indican el punto de acción de cada bHLH (Extraído de Pillitteri et al., 2011). (B) Micrografías epidermales de wild-type y mutantes de pérdida de función de SPCH, MUTE y FAMA. El mutante *spch* es incapaz de producir células del meristemoide, guardianas y estomas. *Mute* produce solo células del meristemoide las que experimentan excesivas divisiones de amplificación, no produciendo estomas. Por su parte, *fama* presenta gran cantidad de células madres guardianas. (Extraído de Gray, 2007).

VII.2.3 Señalización celular involucrada en el patrón estomático: Regla del espaciamiento de una célula.

Si bien es cierto, existen apreciables diferencias en el origen de los estomas en las distintas especies, la separación entre los estomas presentes en su epidermis es un patrón conservado en las plantas superiores (Peterson *et al.*, 2010). Esta regla probablemente responde a la exigencia adaptativa de las plantas para permitir el correcto funcionamiento de apertura/cierre de los estomas, el cual requiere un rápido movimiento de agua y iones entre las GC's y las células no estomáticas de su entorno cercano, por ejemplo las células subsidiarias. En *Arabidopsis*, especie en la que se forman

complejos estomáticos anisocíticos (Serna y Fenoll, 2000), la división de espaciamento de una CBLE se orienta en el sentido apropiado para alejarse del estoma preexistente (**figura 2B**). Sin embargo, y para demostrar que la regla es estricta, hay evidencia que existe un mecanismo de corrección de células M ubicadas en una posición incorrecta, esto es una al lado de la otra, que ocurre en el linaje estomático, forzando a estas células a dividirse alejándose entre sí (Nadeau y Sack, 2002a; Nadeau y Sack, 2002b). Todo esto indica que la diferenciación y desarrollo del complejo estomático, aun con un patrón de distribución espacial aparentemente al azar, está estrechamente regulado, mediante señales a corta distancia célula-célula, no solo desde el punto de vista genético, sino también, a través de una compleja red de señalización intracelular (Pillitteri y Torii, 2012). Este modelo no es ajeno a las plantas, ya que es conocido que el crecimiento y desarrollo vegetal implica una gran cantidad de procesos de señalización y comunicación célula-célula, en los que péptidos-ligando extracelulares y proteínas receptoras de membrana, capaces de percibirlos, juegan un papel muy clave en cada proceso.

Con respecto a los receptores de membrana, se han identificado dos tipos distintos que participan en el desarrollo estomático. TOO MANY MOUTHS (TMM) codifica una proteína receptora rica en residuos de leucina (LRR-RLP; Leucine Rich Repeated – Receptor Like Protein) que se expresa en Ms, GMCs y en CBLEs competentes para producir GCs (Geisler *et al.*, 2000). Los mutantes *tmm* exhiben distintos fenotipos que dependen del órgano evaluado: en hojas, *tmm* muestra estomas agrupados y por lo tanto, TMM estaría involucrado en la regulación de las divisiones asimétricas de “entrada” y “amplificación” de los componentes del linaje estomático y la mantención del espaciamento; mientras que en tallos la planta mutante *tmm* no presenta estomas, aunque si hay presencia de células M, por lo que TMM induciría el paso de M a GMC’s, no siendo esencial para el inicio del linaje estomático en este órgano (Yang y Sack, 1995; Nadeau y Sack, 2002a; Nadeau, 2009; Dong y Bergmann, 2010). Este receptor, que no presenta un dominio quinasa que le permita transmitir las señales que perciba al espacio intracelular, parece estar interactuando con el segundo tipo de receptores de membrana implicados en el desarrollo estomático, que a diferencia de TMM, sí presentan el dominio quinasa intracelular: las proteínas quinasa ricas en residuos de leucina (LRR-RLK; Leucine Rich Repeated – Receptor Like Kinase). En esta familia se incluyen tres proteínas implicadas en desarrollo estomático: ERECTA (ER), y sus parálogos funcionales ERECTA-LIKE1 (ERL1) y ERECTA-LIKE2 (ERL2), denominadas en conjunto ERf (Shpak *et al.*, 2005). Con el objetivo de determinar la función específica de cada uno de estos miembros en el desarrollo estomático, distintas combinaciones

de mutaciones en los genes ERf fueron analizadas, evidenciándose que cada uno tiene función distinta, aunque superpuestas, en el desarrollo estomático (Shimada *et al.*, 2011). Así, ER restringiría la entrada en el linaje estomático y la formación de las células Ms, así como también podría promover la diferenciación de M a GMC, mientras que ERL1, y en menor medida ERL2, inhibe la diferenciación de los Ms en GMCs, y ambos parecen promover las nuevas divisiones asimétricas de M's y la producción de un nuevo conjunto de CBLEs (Shpak *et al.*, 2005).

A la fecha, varios ligandos involucrados en los eventos iniciales de señalización intercelular han sido descubiertos que participan en el desarrollo estomático. La familia denominada EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE (EPFL); incluye a EPF1 y EPF2 (Rychel *et al.*, 2010). Ambos son pequeños péptidos secretados que actúan como reguladores negativos del desarrollo estomático (Hara *et al.*, 2007; Hunt y Gray, 2009). La sobreexpresión de *EPF2* produce una epidermis que no presenta prácticamente estomas, mientras que *epf2* muestra un exceso de CBLE y un aumento de la densidad estomática, lo que sugiere que *EPF2* estaría involucrado en la regulación del número de células protodermales que ingresan (y permanecen) al linaje estomático (Hunt y Gray, 2009). Por su parte, la sobreexpresión de *EPF1* produjo una disminución significativa en el número de estomas exhibiendo prácticamente solo CBLE; en cambio, *epf1* evidenció un aumento en la densidad estomática aunque una clara alteración a la regla del espaciamiento de una célula, apareciendo estomas agrupados, lo que apuntaría a una función en la regulación de la orientación de las divisiones de espaciamiento que generan la células M secundarias (Hara *et al.*, 2007; Shimada *et al.*, 2011). Concordante con su función, el perfil transcripcional de estos genes indica que *EPF2* se expresa en MMC's y Ms jóvenes, mientras que *EPF1* lo hace en GMC's y GC's jóvenes. Se ha planteado que estos péptidos secretados reprimen la diferenciación de las células adyacentes mediante retroalimentación negativa (Shimada *et al.*, 2011). Finalmente, EPFL9 o STOMAGEN es otro péptido secretado, cuyo gen no se expresa en epidermis, sino en células del mesófilo. Este péptido actúa como regulador positivo de la densidad estomática (Kondo *et al.*, 2009; Sugano *et al.*, 2010). El análisis fenotípico de distintas combinaciones de mutantes de estos genes ha permitido plantear un modelo de actividad e interacción entre ellos. De esta forma, en hoja ha sido propuesto que los reguladores negativos EPF1 y EPF2 actúan como ligandos de los receptores TMM y ERf, compitiendo con el regulador positivo STOMAGEN por los mismos receptores. Esta estrategia de utilización de un mismo set de receptores que regulen en dirección contraria el desarrollo estomático, parece ser un método efectivo para controlar la densidad de estomas que

aparecen en las hojas.(Hara *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 2009; Kondo *et al.*, 2009; Rychel *et al.*, 2010; Sugano *et al.*, 2010; Abrash *et al.*, 2011).

Es posible que otros miembros de la familia EPF o tal vez otra clase de ligandos estén siendo parte de la ruta de desarrollo de estomas. En este sentido, otro gen supuestamente actuando río arriba de TMM y ERECTA o funcionando paralelamente a ellos, ha sido implicado en la señalización mediante ligandos en el desarrollo estomático. Este gen denominado STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION (*SDD1*), codifica para una serino-proteasa perteneciente a la familia de las subtilisinas, se expresa en células M y GMC's y los análisis fenotípicos de la planta sobreexpresora y la mutante *sdd1-1*, permitieron determinar que actúa regulando negativamente la entrada al linaje estomático y su patrón de distribución, mediante el control de las divisiones asimétricas de las células vecinas a los estomas (Berger y Altman, 2000; Von Groll *et al.*, 2002). Se sabe que esta clase de subtilisinas participan en algunos casos procesando ligandos extracelulares, situación que en el caso de *SDD1* se ve apoyada por el hecho de que se ha demostrado que es secretada hacia el espacio extracelular, posiblemente asociada a la membrana, donde actuaría (Von Groll *et al.*, 2002). Sin embargo, los análisis moleculares a la fecha demuestran que ninguno de los reguladores negativos identificados hasta el momento - EPF1, EPF2, entre otros - son el posible péptido procesado por *SDD1* (Hara *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 2009; Abrash y Bergmann, 2010) . En la actualidad se desconoce la función molecular de *SDD1*, aunque se ha propuesto que podría estar modulando la actividad de los receptores de la ruta de control negativa de estomas TMM y ERf mediante su procesamiento proteolítico (Shimada *et al.*, 2011). Alternativamente a esta posibilidad, se piensa que *SDD1* pueda estar actuando sobre un regulador positivo del desarrollo de estomas, y de esta manera, ejercer un control negativo global sobre esta ruta, siendo STOMAGEN el péptido candidato de ser procesado (Sugano *et al.*, 2010; Shimada *et al.*, 2011).

Luego que ha ocurrido la percepción de la señal en el espacio extracelular, esta rápidamente debe ser propagada hacia el medio intracelular, siendo generalmente el destino final el núcleo en donde se producirá la respuesta específica que generará cambios en la expresión génica acorde con el estímulo. El transporte de la señal a través del citosol, ocurre mediante mecanismo de transducción de señales, el cual en plantas involucra la participación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase; MAPK). Las cascadas de señalización controladas por estas proteínas son universales y están presentes en la mayoría de los eucariotas, incluyendo animales, plantas y levaduras (Group *et al.*, 2002). Esta ruta de transmisión de señales, implica sucesivas

fosforilaciones secuenciales de tres quinasas siendo la MAPK la última de la ruta y que fosforila distintas proteínas diana. La fosforilación de activación de las MAPK's es realizada por la MAP quinasa-quinasa (MAPKK's), la que a su vez a es activada mediante fosforilación también por MAP quinasa-quinasa-quinasa (MAPKKK's) (Meng *et al.*, 2012). En el proceso de desarrollo estomático en *Arabidopsis*, ha sido posible identificar la participación de una MAPKKK denominada YODA (YDA) (Bergmann *et al.*, 2004; Gray y Hetherington, 2004), cuatro MAPKKs (MKK4/5/7/9) (Wang *et al.*, 2007a) y dos MAPKs (MPK3/6) (Lampard *et al.*, 2008). El estudio de los fenotipos mutantes por pérdida o ganancia de función, mostró que la cascada de señalización descrita regula de manera negativa la etapa inicial del linaje estomáticos y controla la distribución de estos en la epidermis, evitando la presencia de estomas en contacto (Wang *et al.*, 2007b). Por su parte, análisis genéticos permitieron ubicar la actividad quinasa de YDA río abajo de TMM (Bergmann *et al.*, 2004), de la misma manera que MKK4/5 y MPK3/6 actuarían posteriormente de YDA (Wang *et al.*, 2007a; Lampard *et al.*, 2009). Sin embargo y a pesar del gran avance en la develación de los determinantes moleculares involucrados en la ruta de desarrollo estomático, aún no ha sido posible establecer si la señal inicial en esta cascada de fosforilación es producida directamente por los receptores de membrana con dominio quinasa del tipo ERECTA, o involucra una (o más) proteína(s) (Bergmann y Sack, 2007). Por otra parte, se ha identificado el gen de la enzima MAPK fosfatasa AP2C3 que podría actuar inactivando la cascada de señalización MAP, la cual se expresa en células del linaje estomático, y parece inactivar las proteínas MPK3 y MPK6 (Umbrasaitte *et al.*, 2010).

Una vez que la señal de fosforilación llega a la MAPK, ésta transfiere su grupo fosfato a los factores de transcripción *maestros* del desarrollo de estomas, con el objetivo de regular su actividad; aunque a la fecha no hay claridad absoluta de cómo la cascada de MAP quinasas puede controlar la actividad de estos factores de transcripción. De los tres factores de transcripción tipo bHLH que regulan los eventos clave en el desarrollo estomático, únicamente en SPCH se ha identificado una región proteica enriquecida en secuencias blanco de fosforilación por MAP quinasas. Lampard y cols.(2008) confirmó que este dominio, denominado MPKTD (MAPK target domain), es fosforilado por MPK3 y MPK6. Una serie de análisis experimentales han demostrado que la fosforilación de SPCH por MPK3 y MPK6 reduciría el nivel de SPCH activo, y que los componentes de señalización previamente identificados (TMM y ERf) participarían en un evento previo a la fosforilación de SPCH y podrían modular su actividad (**figura 4**) (Lampard *et al.*, 2008). El estudio de la actividad de distintas proteínas

de la cascada de fosforilación bajo el control de los promotores de SPCH, MUTE y FAMA reveló que YDA regula negativamente la actividad de SPCH y MUTE, restringiendo la formación de estomas, tanto a nivel de divisiones de entrada (SPCH) como de amplificación (MUTE), pero funciona como regulador positivo de la diferenciación de MGC's en GC's, interaccionando positivamente con FAMA. Por su parte, MKK7 y MKK9 participan en los mismos procesos que YDA, pero no así MKK4 y MKK5, que sólo inhiben la formación de estomas, no presentando un papel positivo en la diferenciación final (Lampard *et al.*, 2009; Dong y Bergmann, 2010). Basados en ensayos *in vitro* depositados en bases de datos, han permitido establecer que ICE1/SCRM1 contiene sitios consenso de fosforilación por MAP quinasas (Blom *et al.*, 1999; Dong y Bergmann, 2010). MUTE sería blanco de MPK4, pero no de MPK3 o MPK6 (Popescu *et al.*, 2008). Análisis más detallados realizados *in vivo* son necesarios para determinar la relevancia biológica de la posible fosforilación de estos genes (Dong y Bergmann, 2010).

Como se puede apreciar, el desarrollo estomático es un proceso altamente regulado que requiere la participación ordenada de diversos actores de muy diversa naturaleza molecular. La **figura 4** resume la información disponible hasta la fecha.

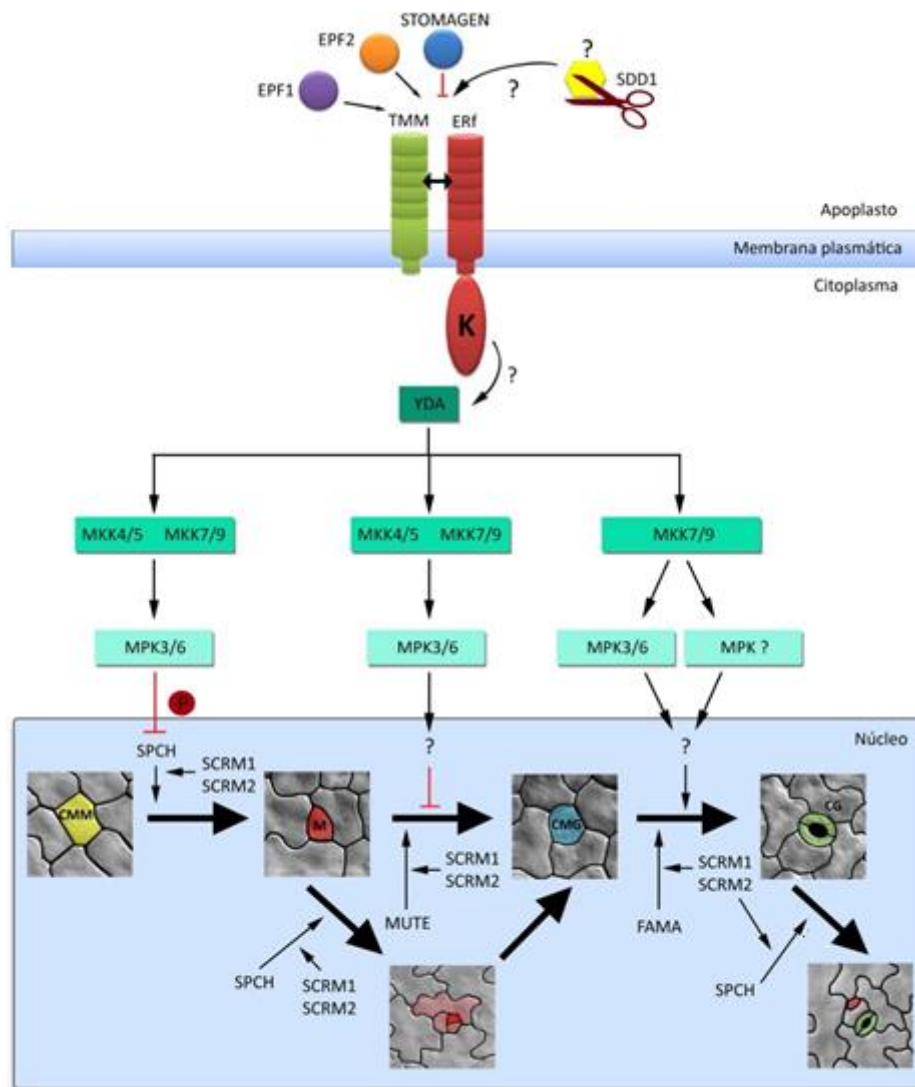


Figura 4. Modelo genético del desarrollo estomático en *A. thaliana*. En la base de la figura, factores de transcripción tipo bHLH promueven tres pasos secuenciales en la transición de identidades celulares. SPCH participa en la transición de MMC's (CMM) a M, MUTE en la transición de M a GMC's (CMG), y FAMA en la transición de GMC's (CMG) a GC's (CG). SCRMs/SCRMs2 se expresan a lo largo del linaje estomático y podrían formar heterodímeros con SPCH, MUTE y FAMA, para facilitar la progresión en cada paso. Por sobre los bHLH, tres niveles de la cascada de señalización de MAP quinasa modulan los mismos tres tránsitos de identidad celular. Se ha demostrado experimentalmente que SPCH es fosforilado por MPK3/6. YDA y MKK4/5/7/9 regulan negativamente los dos primeros cambios de identidad, mientras que el tercero está regulado positivamente por YDA y MKK7/9. Las MPKs están implicadas en cada transición, habiéndose demostrado la participación de MPK3/6 en la primera transición, y funcionando en colaboración con otras MPKs aún no identificadas en el tercer tránsito de identidad celular. La activación de la cascada de MAP quinasa mediante la fosforilación de YDA se produce, directamente o a través de una proteína intermediaria, por los receptores de membrana TMM y ERf, que estarían regulados de distinto modo por los péptidos señal EPF1, EPF2, STOMAGEN y un hipotético péptido procesado por SDD1. (Extraído y modificado de Carmen Fenoll, comunicación personal).

VII.3 Control endógeno y ambiental del desarrollo estomático

VII.3.1 Regulación hormonal: ABA.

A pesar del paulatino incremento del conocimiento del desarrollo estomático principalmente en *Arabidopsis*, escaso conocimiento se tiene del papel y efecto de las fitohormonas en este proceso. Sin embargo, ha sido posible evaluar la participación de algunas de ellas en el control de la frecuencia estomática.

Ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que regula una serie de procesos en los organismos vegetales (Cutler *et al.*, 2010), siendo, en el contexto del estrés, una molécula señal clave en la expresión de muchos genes involucrados en respuesta a estrés abiótico y que participa en un amplio espectro de funciones en respuesta a esta condición ambiental, incluido, el estrés por déficit hídrico (Wang *et al.*, 2003; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). Entre ellas, participa en el control de la pérdida de agua regulando la apertura de los estomas (Mishra, 2006). En este último aspecto, se ha reportado que participa de manera central en la función estomática, ya que las GC's perciben y responden rápidamente a la señal de ABA para cerrar el poro estomático (Kim *et al.*, 2010). A pesar del vasto conocimiento de ABA sobre la función estomática, su participación en el desarrollo de los complejos estomáticos ha sido poco estudiada. Es por esto que el análisis de plantas sometidas a estrés por sequía y aplicación de ABA exógenamente, han permitido estudiar el posible papel en la frecuencia estomática. Ambos tratamientos realizados en trigo, mostraron una disminución en el número de estomas en su hojas, así como en el tamaño de las células epidermales (Quarrie y Jones, 1977), mientras que en *Tradescantia virginiana* la aplicación exógena de ABA aumento la densidad estomática y las células del pavimento, disminuyendo el índice estomático (Franks y Farquhar, 2001). Recientemente, Tanaka *et al.* (2013), demostró que ABA tiene una función represora del desarrollo estomático en cotiledones y hojas, esto mediante el análisis de plantas mutantes ABA-deficientes (*aba2-2*) e insensible (*abi1-1* y *abi1-2*) a la señal de ABA, las cuales exhibieron mayor cantidad de estomas que el control en estos órganos, lo opuesto que se observó en la planta mutante hiperacumuladora de ABA (*cyp707a1a3*) (Tanaka *et al.*, 2013). Otra de las características observadas en estas plantas, fue un aumento del tamaño de las células del pavimento, lo que permitió concluir que ABA no solo reprimía la entrada al linaje estomático directamente, sino que también contribuía a una menor densidad estomática vía un aumento de la superficie de las células epidermales (Serna, 2014).

Además, ABA parece reducir el número de GMC's que experimentan divisiones asimétricas, ya que tanto *aba2-2*, como *abi1-1* y *abi1-2* mostraron niveles de transcrito de SPCH y MUTE muy superiores a la planta control, lo opuesto que se observó en la *cyp707a1a3* (Tanaka *et al.*, 2013). La **figura 5** resume los blancos moleculares detectados que están involucrados en la señalización del control estomático en *Arabidopsis* ejercido por ABA.

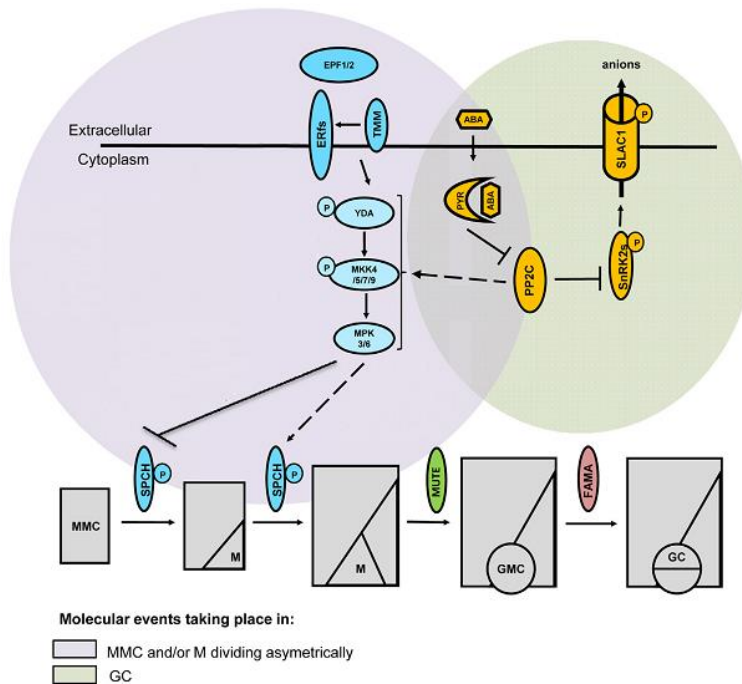


Figura 5. Control hormonal del desarrollo de estomas en hojas y cotiledones de *Arabidopsis*. La presencia de ABA y la activación de su receptor soluble, secuestraría la fosfatasa PP2C, permitiendo que la señalización vía MAP quinasas reprima la actividad de SPCH, el cual regula negativamente la ruta de desarrollo de estomas. La activación de la cascada MAP quinasas también podría afectar a en las células M's para promover sus divisiones celulares asimétricas. MUTE reprime la actividad de auto-mantenimiento y carácter indiferenciado de las células M, lo que provoca la formación de GMC's. Por último, FAMA induce la formación de GC a partir del GMC. Los componentes que actúan río arriba de MUTE y FAMA siguen siendo desconocidos. Flechas discontinuas indican pasos hipotéticos (Extraído y modificado de Serna, 2014)

VII.3.2 Respuesta frente a señales ambientales.

Las plantas son organismos sésiles que deben desarrollar complejos sistemas de percepción de cambios en el ambiente que les rodea, y así poder responder de manera eficiente permitiéndoles asegurar su supervivencia (Jones *et al.*, 2011; Schenck *et al.*, 2013). Las plantas deben adoptar un amplio rango de estrategias de desarrollo y adaptativas para escapar o tolerar un ambiente hostil (Jones *et al.*, 2011). Esto le permite a las plantas adquirir con el tiempo características diferenciales entre poblaciones de una especie que han evolucionado en distintos ambientes. De hecho, se ha observado

Tesis: "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"

que esto ocurre con la abundancia de estomas, ya que se ha demostrado que existe una variabilidad natural en la frecuencia estomática al analizar cotiledones y la primera hoja de 62 accesiones silvestres de *Arabidopsis* (Delgado *et al.*, 2011). Estas diferencias encontradas en el número de estomas en *Arabidopsis* puede deberse a la necesidad de optimizar la relación entre el CO₂ captado y la pérdida de agua. Los rasgos cuantitativos usados actualmente para estimar la cantidad de estomas sobre la superficie de los órganos es el índice estomático (SI) que mide la proporción de células epidérmicas que son estomas, y la densidad estomática (SD), que mide el número de estomas por unidad de área. Ambos parámetros son el resultado de la división, proliferación y expansión celular durante el crecimiento de los órganos (Delgado *et al.*, 2011). Así mismo, la abundancia estomática (medida como SI o SD) y su patrón de distribución en las hojas, son factores claves en determinar el balance entre fotosíntesis y transpiración, y de esta manera optimizar el uso eficiente del agua disponible (Schroeder *et al.*, 2001; Ahmet *et al.*, 2014).

Entre los factores ambientales que producen un cambio en la densidad de estomas, la concentración atmosférica de CO₂ y la sequía (también luz) se encuentran entre los más estudiados (**figura 6**). En general, las plantas tienden a disminuir su SI y SD cuando el CO₂ aumenta, tanto a lo largo de la evolución vegetal como en condiciones controladas de laboratorio (Woodward, 1987; Hetherington y Woodward, 2003). Sin embargo, no todas las especies presentan la misma capacidad de respuesta frente a los cambios en la cantidad de CO₂, de hecho, incluso existe variabilidad dentro de la misma especie, como ocurre en *Arabidopsis thaliana* (Woodward *et al.*, 2002). Además, el desarrollo de las hojas nuevas se ve influido por las condiciones ambientales imperantes a las que han estado expuestas las hojas maduras. Hojas maduras de *Arabidopsis* expuestas a altas concentraciones de CO₂ tuvo como consecuencia que las hojas que estaban desarrollándose a la concentración de CO₂ ambiental presentarían una reducción en el SI. El resultado opuesto se registró cuando las hojas maduras fueron expuestas a una concentración de CO₂ inferior a la ambiental (Lake *et al.*, 2001). En *Arabidopsis*, el gen *HIGH CARBON DIOXIDE (HIC)* está involucrado en la regulación negativa del SI en respuesta a altas concentraciones de CO₂ sin modificar el patrón de distribución de estomas, y la mutante de pérdida de función no presenta la capacidad específica de controlar el número de estomas en respuesta a cambios en la concentración de CO₂ (Gray *et al.*, 2000). *HIC* codifica una 3-cetoacil-CoA sintasa implicada en la elongación de ácidos grasos en la síntesis de ceras (Post-Beittenmiller, 1996), y se expresa mayoritariamente en estomas, lo que hace pensar que los mutantes *hic* no regulan la

densidad estomática por alteraciones en la permeabilidad de la matriz extracelular de las GC's, permitiendo la "fuga" de señales que promoverían el desarrollo de estomas (Gray *et al.*, 2000).

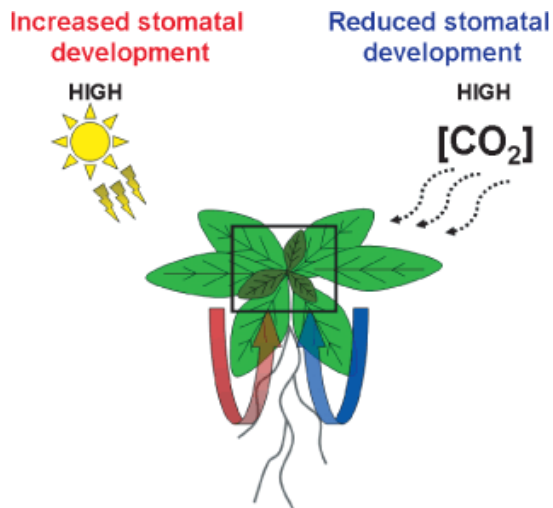


Figura 6. Representación esquemática de la regulación del desarrollo de estomas mediante señalización sistémica. Las hojas maduras son esenciales para detectar las condiciones ambientales y la generación de una señal a larga distancia desconocida (**flechas**). Esta señal es percibida por los primordios de las hojas jóvenes (**cuadro**) modulando la frecuencia con la que los estomas se desarrollan en su epidermis. Condiciones tales como alta intensidad lumínica producen un aumento del índice estomático, mientras que altas concentraciones de CO₂, baja humedad o escasa disponibilidad de agua pueden generar una reducción en el índice estomático. (Extraído de Casson y Gray, 2008)

Por otra parte, Tricker y cols. (2012), demostró en plantas de *Arabidopsis* crecidas en condiciones de baja humedad relativa y que evidenciaron una disminución del número de estomas en sus hojas, que dos de los genes maestros de la ruta de desarrollo de estomas, SPCH y FAMA, están sometidos a regulación epigenética provocando una represión transcripcional de ellos, lo que explicaría la disminución del SI observado (Tricker *et al.*, 2012); sugiriendo que la plasticidad fenotípica y anatómica inducida bajo las condiciones ambientales prevalentes durante el crecimiento, está mediada por la metilación del DNA como control de la transcripción de genes de la ruta de desarrollo estomático, explicando, al menos, uno de los mecanismos de resistencia de la planta frente a las variaciones en las condiciones de humedad relativa atmosférica, y quizás compartida bajo otras condiciones de estrés.

Recientemente, el impacto de la sequía sobre la densidad estomática fue evaluado en cultivo de interés ecológico y económico como *Populus*. Comparados dos genotipos de álamo, la SD y el SI de hojas de árboles sometidos a 30 días de sequía fue menor que el encontrado en hojas de árboles que se mantuvieron bajo riego normal. Al analizar el nivel de transcritos de los homólogos del desarrollo estomático en *Populus*, una mayor abundancia del mRNA del homólogo de *ER* y *SDD1* fue detectada. Por contraparte, una disminución de los transcritos de *STOMAGEN* y *FAMA* fue observada. Estos resultados sugirieron que existe una regulación transcripcional de estos genes para modular el desarrollo estomático en *Populus* bajo estrés por sequía (Hamanishi *et al.*, 2012).

Similar a lo encontrado en *Populus*, *SDD1* ha sido implicado en la modulación del desarrollo estomático como parte del mecanismo de respuesta a la sequía en *Arabidopsis*. Yoo *et al.* (2010), demostró que *SDD1* interactúa con el factor de transcripción *GTL1*; el cual bajo condiciones de crecimiento normales, reprime la transcripción de *SDD1*, para así modular la densidad estomática y controlar la transpiración; y consecuentemente, mejorar el uso eficiente de agua y la tolerancia a la sequía. Sin embargo, bajo condiciones de sequía *GTL1* es reprimido, lo que indica que *GTL1/SDD1* es un punto de conexión entre el desarrollo estomático y la modulación ambiental de la densidad estomática (Yoo *et al.*, 2010). Sorprendentemente, plantas mutantes *gtl1* y que tienen altamente inducido *SDD1* y que por consiguiente, presentan una considerable disminución en la frecuencia estomática y aumento en el uso eficiente del agua y, por tanto, en la tolerancia a la deshidratación, no mostraron diferencias significativas en la tasa de asimilación de CO_2 (Yoo *et al.*, 2010). Considerando los antecedentes planteados anteriormente, *SDD1* sería un potencial gen candidato de interés biotecnológico en la generación de plantas tolerantes a la sequía mediante la modulación de la frecuencia estomática.

VII.4 Genes que controlan el desarrollo estomático como blanco para mejorar el uso eficiente de agua y el rendimiento en plantas: *SDD1*

Dentro de los métodos de mejoramiento genético utilizando herramientas de biología molecular hasta aquí explorados, se cuentan la manipulación de un único gen, generalmente responsable de modificar la acción de un metabolito o alguna proteína que confiera tolerancia (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2007); o la manipulación de factores de transcripción que regulan la expresión de genes que participan en la respuesta de la planta frente a la sequía (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). La mayoría de las aproximaciones realizadas a la fecha en búsqueda de mejores características frente a la sequía, implican la sobreexpresión constitutiva de genes. Generalmente, los promotores de mayor uso son el del virus del mosaico de la coliflor 35S (CaMV35S) o promotores de genes expresados constitutivamente en plantas, tales como ubiquitina y actina (Cominelli y Tonelli, 2010). Dados todos estos antecedentes y los anteriormente expuestos, resulta interesante plantear la manipulación de un gen involucrado en la regulación de la apertura o densidad de estomas, con la idea de optimizar el uso eficiente del agua disponible, especialmente en cultivos de interés comercial, de gran demanda por la población y que son fuertemente afectados por la escasez de agua.

En este sentido, el estudio del gen *SDD1* que codifica para una serina proteasa del tipo subtilisina, y cuya mutación exhibe un aumento en SD y la sobreexpresión el fenotipo opuesto al mutante (Berger y Altman, 2000; Von Groll *et al.*, 2002), demostró que el producto de *SDD1* estaría involucrado en gatillar la entrada de las células del linaje estomático en la ruta de diferenciación a estomas, controlar la proliferación celular durante todo el proceso, así como la orientación de las divisiones celulares ejerciendo control sobre la posición de las células guardianas que forman el complejo estomático (Berger y Altman, 2000; Casson y Gray, 2008). Dada su naturaleza proteasa, es posible que *SDD1* pueda procesar algún péptido que actúe como ligando de TMM, no descartándose incluso que procese al mismo TMM, ya que se ha determinado que *SDD1* y TMM participan en una ruta común (Von Groll *et al.*, 2002). A la fecha, la ruta que conduce el desarrollo de estomas en *Arabidopsis* no ha sido validada en otras especies vegetales, por lo que el estudio de esta vía de desarrollo en una planta modelo de interés agronómico, permitiría no solo establecer la ruta estomática en dicha especie, sino también manipular de manera específica elementos claves involucrados en la ruta, con el objetivo de aumentar el uso eficiente de agua mediante el control de la densidad estomática. De hecho, recientemente se ha demostrado la participación de *SDD1* en un aumento del uso eficiente de agua y tolerancia a la sequía mediante la disminución de la tasa de transpiración en *Arabidopsis* (Yoo *et al.*, 2010).

Investigaciones previas en nuestro laboratorio han indicado que las plantas de tomate silvestre (*Solanum chilense*) sometidas a estrés salino desarrollan distintas estrategias para sobrevivir, siendo una de ellas la reducción del número de estomas en las hojas. La medición de la densidad estomática en hojas *S. chilense* cultivadas con 400 mM de NaCl durante 30 días, indicó que en la zona adaxial de las hojas, hubo una disminución de aproximadamente un 90% en el número de estomas por mm² y en la zona abaxial la disminución fue de un 35%, sugiriendo que uno de los genes responsables de esta disminución observada en *S. chilense* bajo estrés, podría ser el homólogo de *AtSDD1*. Concomitantemente, los resultados de microarreglos de plantas bajo estrés salino y sequía, mostraron aumento de la expresión de genes que codifican para subtilisinas similares a *AtSDD1* (Tapia, 2005). Por otra parte, Meichtry *et al.*, (1999), identificó 15 genes que codifican para subtilisinas en *Solanum lycopersicum*, exhibiendo algunas de ellas un patrón de expresión similar al esperado para una posible homólogo de *AtSDD1*; sin embargo, actualmente con el desarrollo de técnicas de secuenciación masiva a gran escala, ha sido posible secuenciar el genoma del tomate (The Tomato Genome, 2012) lo que

permitirá realizar un análisis más preciso de las secuencias depositadas en la base de datos SolGenomics (Fernandez-Pozo *et al.*, 2015) e identificar con mayor precisión genes candidatos homólogos a SDD1 de *Arabidopsis*. De esta forma, será posible determinar su perfil transcripcional y asignarle una posible participación en el control de la SD. Para ello, es imprescindible conocer si en el control del desarrollo estomático en tomate participan los mismos genes descritos en *Arabidopsis thaliana*, y que si su regulación está determinada por factores similares. En este contexto, la presente tesis pretende: a) contribuir al conocimiento respecto de los elementos moleculares iniciadores del desarrollo estomático de tomate tomando como referencia el modelo descrito para *Arabidopsis*; b) determinar la participación del ortólogo de *AtSDD1* de tomate en la regulación del desarrollo de estomas; y c) determinar que la manipulación de este gen es suficiente para obtener plantas con mayor eficiencia en la retención del agua, y por lo tanto, aumentando la tolerancia a la sequía.

Arabidopsis thaliana es el modelo ideal para el estudio de los procesos biológicos en vegetales y la información obtenida a partir de ella, es de gran relevancia para ser aplicada a cultivos de interés comercial. Durante los últimos años en nuestro país, la reducción paulatina de la extensión de terrenos de cultivo, plantea la necesidad de obtener nuevas variedades cultivables con una mayor tolerancia frente a los ambientes desfavorables. Con todos estos antecedentes, sumado a los resultados experimentales obtenidos en nuestro laboratorio en *Solanum chilense* bajo condiciones de estrés y la reciente investigación que demuestra la participación de SDD1 en un aumento del uso eficiente de agua, hacen interesante identificar y caracterizar el putativo gen ortólogo en la especie de tomate tolerante a la sequía *Solanum chilense* y evaluar su funcionalidad en *Arabidopsis* como plataforma para su uso potencial en la generación de cultivos con aumentada tolerancia a la sequía. Además, la caracterización de genes involucrados en la ruta de desarrollo de estomas en plantas de tomate, ofrecerá nuevos genes blancos susceptibles de modificar, en la búsqueda de nuevos cultivos tolerantes al estrés hídrico.

VII.5 Hipótesis de Trabajo.

Considerando que:

1. El gen *SDD1* que codifica para una subtilisina, está involucrado en el desarrollo y densidad de estomas en *Arabidopsis thaliana*.
2. Miembros de la familia de las subtilisinas se encuentran altamente expresados en plantas de *Solanum chilense* expuestas a estrés salino.
3. Existe una relación inversa entre la densidad de estomas y el uso eficiente del agua disponible.
4. Plantas que presentan una menor densidad de estomas en sus hojas, muestran mayor tolerancia a déficit hídrico.

La hipótesis de trabajo es:

La sobreexpresión del gen *SDD1-like* de *Solanum chilense*, putativo ortólogo de *AtSDD1*, provoca una disminución en la expresión de genes involucrados en el desarrollo de estomas que conducen a una menor densidad estomática en las hojas de *Arabidopsis thaliana*, disminuyendo la pérdida de agua desde estos órganos y consecuentemente dichas plantas presentarán mayor tolerancia a sequía.

VII.6 Objetivos

GENERAL

Evaluar la capacidad del gen de *Solanum chilense* ortólogo a *SDD1* de *Arabidopsis thaliana* para modular la densidad estomática y disminuir la pérdida de agua en plantas heterólogas bajo condiciones de déficit hídrico.

ESPECÍFICOS

1. Analizar la regulación de la transcripción de *AtSDD1* y de los genes maestros involucrados en la ruta de desarrollo basal de estomas en plantas de *Arabidopsis* bajo condiciones de sequía y tratamiento exógeno de ABA.
2. Identificar el gen que codifica para una subtilisina de *Solanum chilense* putativo ortólogo del gen *SDD1* de *Arabidopsis thaliana*.
3. Determinar el comportamiento transcripcional del gen *SchSDD1-like* bajo diferentes tipos de estrés abiótico.
4. Determinar el perfil transcripcional de los putativos genes involucrados en la ruta de desarrollo basal de estomas en plantas de *Solanum chilense* bajo condiciones de sequía y tratamiento exógeno de ABA.
5. Determinar el efecto sobre la densidad estomática de la sobreexpresión del gen *SDD1-like* de *Solanum chilense* en la planta mutante *sdd1-3* de *Arabidopsis*.
6. Determinar el efecto de la sobreexpresión del gen de *Solanum chilense* ortólogo a *AtSDD1* sobre la densidad estomática y parámetros fisiológicos en plantas transgénicas de *Arabidopsis*.
7. Determinar el efecto de la sobreexpresión del gen *SchSDD1-like* sobre la tasa de pérdida de agua en plantas de *Arabidopsis* y tomate expuestas a deshidratación.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

VIII.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

El material vegetal utilizado en este estudio fueron plantas clónicas de tomate silvestre *Solanum chilense* (Dunal) Reiche, las cuales fueron propagadas a partir de esquejes enraizados en agua. Una vez emergidas las raíces, las plántulas fueron trasplantadas a maceteros de 0,5 L con sustrato perlita y vermiculita (1:1) y mantenidas en condiciones de invernadero con fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a 25°C. Las plantas fueron regadas según necesidad aproximadamente cada 2 días y fertilizadas con solución nutritiva preparada según Hoagland y Arnon (1950) (solución "Hoagland") una vez por semana. Al cabo de 6-8 semanas fueron utilizadas en ensayos de estrés salino, sequía y tratamiento con ABA.

Plantas de *Arabidopsis* del ecotipo Columbia-0 (Col-0) y de la línea mutante *sdd1-3*, proporcionada por la Dra. Carmen Fenoll Comes de la UCLM (Toledo, España), se cultivaron en sustrato compuesto por vermiculita, perlita y turba (1:1:1) bajo fotoperiodo de día largo (16 h luz/8 h oscuridad). Las plantas fueron mantenidas para transformación estable y para los ensayos de estrés por sequía y tratamientos con ABA.

VIII.2 Identificación *in silico* de genes de tomate involucrados en el desarrollo estomático

Utilizando las secuencias de genes ya descritos y caracterizados en *A. thaliana* (*AtSDD1*, *AtSPCH*, *AtMUTE*, *AtFAMA*) se buscaron en el genoma de *S. lycopersicum* (tomate) secuencias que presentasen alta identidad. Los algoritmos BLASTx y tBLASTn se usaron sobre la base de datos de SolGenomics (solgenomics.net) y Gramene (<http://www.gramene.org/>). A las secuencias seleccionadas que presentaron la mayor similitud al gen correspondiente de *Arabidopsis*, se les asignó la denominación *like*. Posteriormente, a partir de las secuencias de los genes candidatos se diseñaron partidores para amplificar los cDNA de dichos genes desde los transcritos de *S. chilense* (**Tabla 1**).

Tabla 1 Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados en esta investigación

➤ **Partidores empleados para amplificar los marcos de lectura abiertos completos**

Gen	Partidor	Secuencia Partidor (5'-3')	Temperatura de annealing (°C)
<i>SchSDD1-like</i>	<i>SISDD1-2ATG</i>	F: <u>GAGATCT</u> ATGGGATACAGTACTCAATC R: <u>GGGTAACCT</u> CACTTCATTGATGC	50
<i>SchSDD1_like</i>	<i>SchSDD1-vpbi</i>	F: <u>TCTAGA</u> ATGGGATACAGTACTCAATC R: <u>GAGCTCT</u> CACTTCATTGATGC	50

➤ **Partidores empleados en PCR en tiempo real**

Gen	Partidor	Secuencia Partidor (5'-3')	Temperatura de annealing (°C)
<i>AtSDD1</i>	<i>AtSDD1q</i>	F: TGC TCT TAT CCG GTC TGC AT R: ATC AAT GCG GAT TTG ATT GC	56
<i>AtSPCH</i>	<i>AtSPCHq</i>	F: TTC TGC ACT TAG TTG GCA CTC AAT R: GCT GCT CTT GAA GAT TTG GCT CT	58
<i>AtMUTE</i>	<i>AtMUTEq</i>	F: CGT TGT TAA GAT AGG ATT GGA GTG R: CAA AGC TTT TCT GAA CTT CAA GAGT	58
<i>AtFAMA</i>	<i>AtFAMAq</i>	F: TCA AGA TAA CAA GTG AAA CGA GGT R: AAT ATC TGT TGG ATG GAA CTT GC	58
<i>AtRD29</i>	<i>qAtRD29A</i>	F: GGACTAAGGTGTTTCCTGTGCG R: TCCGATGTAACGTCGTCC	56
<i>AtFbox</i>	<i>AtFbox</i>	F: TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT R: GATTCCAAGACGTAAGCAGATCAA	58
<i>SlySDD1</i>	<i>SlySDD1q</i>	F: TTGGAGGAATGGTAATAGGA R: TGAGAATTGAAGGATCAGTATAG	56
<i>SlySPCH</i>	<i>SlySPCHq</i>	F: CATCAGATTCAGCAGACAT R: CTCTACTAGATTGAGACACTTC	56
<i>SlyTSW12</i>	<i>SITSW12</i>	F: CTCCAGGGTTCAGTAAAG R: CCATAAGCAGGATCACAC	58
<i>SlyMUTE</i>	<i>SlyMUTEq</i>	F: ATGTTGAAGCAAGAATATGTG R: ACTGATGTTGAGATGAAGAAT	56
<i>SlyFAMA</i>	<i>SlyFAMAq</i>	F: GGCTGATGTTGAAGTGAA R: TATGAGTTGTCCTGGTCTT	56
<i>SlyGAPDH</i>	<i>qSIGAPDH</i>	F: ACAACTTAACGGCAAATTGACTGG R: TTACCCTCTGATTCCTCCTTGATTG	58
<i>SlyAREB1</i>		F: CAGGTTAATGGCTGGTAGTATCCC R: GCTGTGATTGTTGGTTCTGTTGC	58

Nota: Subrayado se destacan los sitios de restricción añadidos a los partidores sentido (F) y anti sentido (R)

VIII.3 Ensayos de estrés salino, sequía y tratamiento con ABA.

Plantas de *Solanum chilense* (Dunal) Reiche propagadas vegetativamente de aproximadamente 8 semanas de edad, fueron seleccionadas para los ensayos de estrés salino, sequía y tratamiento con ABA. Cada macetero de 2L con mezcla de perlita y vermiculita (1:1) contenía un individuo. Para cada tratamiento en su respectivo tiempo evaluado se dispuso de 3 réplicas biológicas para su análisis.

Por su parte, plantas de *Arabidopsis thaliana* de aproximadamente 4 semanas de edad, fueron seleccionadas por su homogeneidad entre ellas para los ensayos de sequía y tratamiento con ABA. Cada macetero de 0,1L con mezcla de vermiculita, perlita y turba (1:1:1) contenía tres individuos. Para cada tratamiento en su respectivo tiempo evaluado se dispuso de 3 réplicas biológicas para su análisis.

VIII.3.1. Tratamiento de estrés salino en plantas de *Solanum chilense*

Un conjunto de 40 plantas fueron regadas con 200 ml de una solución salina (300 mM de NaCl preparada en agua y evaluadas durante el transcurso de 8 días. Se muestreó hoja, tallo y raíces por cada individuo en los siguientes periodos de tiempo: 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 h y 8 días de iniciado el tratamiento de estrés salino, considerando 3 réplicas biológicas para cada tiempo. Las plantas control fueron regadas solo con agua en las mismas condiciones.

VIII.3.2. Tratamiento de sequía en plantas de *Solanum chilense*

Un total de 20 plantas fueron sometidas a sequía por espacio de 6 días. El tiempo de estrés fue determinado a medida que las plantas fueron paulatinamente manifestando señales de marchitamiento producto del estrés. Las plantas en maceta fueron dejadas de regar y las plantas control fueron regadas normalmente en las mismas condiciones. Se muestreó tejido foliar y tallos a los 0, 3, 4, 6 días de iniciado el tratamiento, considerando 3 réplicas biológicas para cada tiempo.

VIII.3.3. Medición de parámetros fisiológicos de tolerancia bajo condiciones de estrés en *Solanum chilense*

Con el objetivo de determinar alteraciones en los parámetros fisiológicos producto de las condiciones de estrés impuestas, fotosíntesis neta (Pn), transpiración (E), conductancia estomática (Gs), déficit de presión de vapor (VPD) y concentración interna de CO₂ fueron medidos en hojas completamente expandidas de tomate, utilizando el sistema portable CIRAS-2 (CIRAS-2 Portable Photosynthesis System; PP Systems, Amesbury, MS, USA). Por su parte, el contenido relativo de agua

(CRA) fue estimado de acuerdo al protocolo modificado de Maggio *et al.* (2007) y Vásquez-Robinet *et al.* (2008); donde $CRA = [(PF-PS) / (PT-PS)] \times 100$. Una mezcla de las segundas y terceras hojas de cada individuo vegetal fueron pesadas (peso fresco, FW) y luego, incubadas en agua destilada por 24 h a temperatura ambiente en oscuridad por toda la noche. Al cabo de este tiempo, el exceso de agua fue removido usando un papel absorbente antes de pesar nuevamente (peso turgente, PT) y finalmente, las muestras fueron secadas a 100°C hasta alcanzar un peso constante para la determinación del peso seco (PS).

VIII.3.4. Tratamiento de sequía en plantas de *Arabidopsis thaliana*

Un conjunto de 20 plantas de *Arabidopsis* col-0 fueron sometidas a sequia por espacio de 8 días. El tiempo de estrés fue determinado a medida que las plantas fueron paulatinamente manifestando señales de marchitamiento producto del estrés. Las plantas fueron dejadas de regar en maceta y las plantas control fueron regadas normalmente bajo las mismas condiciones de temperatura y luminosidad. Se colectaron muestras de tallos y hojas de la planta a 0, 4, 6 y 8 días de iniciado el tratamiento, considerando 3 réplicas biológicas para cada tiempo.

VIII.3.5 Tratamiento con ABA en *Solanum chilense*

40 plantas fueron tratadas con ABA exógeno mediante aspersión foliar con 100 μ M ABA, a la cual se le añadieron \sim 50 μ L del surfactante Silwet L-77, al inicio del experimento. Las plantas control fueron asperjadas con una solución de agua (más Silwet L-77). Se colectaron muestras de hoja en los siguientes tiempos: 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 h de iniciado el tratamiento con ABA, considerando 3 réplicas biológicas para cada tiempo.

VIII.3.6 Tratamiento con ABA en *Arabidopsis thaliana*

Un total de 35 plantas de *Arabidopsis* col-0 fueron tratadas con ABA exógeno, mediante la aspersión foliar con 100 μ M ABA (más una gota del surfactante Silwet L-77) al inicio del experimento. Las plantas control fueron asperjadas con una solución de agua más una gota del surfactante Silwet L-77. Se colectaron muestras de hojas y tallos en los siguientes tiempos: 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48h de iniciado el tratamiento con ABA, considerando 3 réplicas biológicas para cada tiempo.

VIII.4 Extracción y purificación de RNA

RNA total fue extraído desde 100 mg de tejido de las muestras recolectadas para cada ensayo, usando el kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo el protocolo descrito por los proveedores. Para cada muestra se obtuvo 100 μ l de volumen final de RNA el cual fue tratado con DNasa I libre de RNasas (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) según protocolo de los fabricantes para eliminar contaminación de DNA genómico con algunas modificaciones *lab-made*. Las modificaciones a la metodología radican en el número variable de tratamientos con DNasa que se realizó a cada muestra de RNA según la cantidad de DNA genómico presente. La calidad de las muestras fue verificada en geles de agarosa al 1% (p/v) y la concentración de RNA fue cuantificada a 260/280 nm, en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) y su pureza estimada a 260/230 nm. Las muestras de RNA fueron re-suspendidas en agua estéril y almacenadas a -20°C.

VIII.5 Síntesis de cDNA

La reacción de transcripción reversa para síntesis de la primera hebra de cDNA se realizó sobre 1-2 μ g de RNA total tratado con DNasa, extraído desde tejido según tratamiento realizado y en los respectivos tiempos analizados. Para estas reacciones se utilizó el sistema kit First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) en un volumen final de 20 μ l, conteniendo: 10 μ l de RNA (1-2 μ g), 1 μ l oligo (dT), 4 μ l buffer de reacción (5X), 1 μ l de Inhibidor de ribonucleasa RiboLock, 2 μ l de 10 mM dNTP's y 2 μ l de transcriptasa reversa MMuLV. La síntesis se llevó a cabo incubando las muestras 37 °C por 60 min y un periodo de incubación final a 70 °C por 5 min para detener la reacción. Los cDNA se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

VIII.6 Análisis de la expresión génica

El análisis de la expresión de los genes de interés fue determinada mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando un termociclador Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies, Inc.). Las reacciones de amplificación de los cDNA se realizaron usando el método de SYBR green (Stratagene) en un volumen final de 20 μ l y de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Cada reacción de 20 μ l contenía: 2 μ l of cDNA diluido (50 ng), 10 μ l del reactivo 2X Maxima® SYBR Green/ROX qPCR

Master Mix (Fermentas), 0,5 µl de cada uno de los partidores específicos a una concentración de 0,25 µM y agua libre de nucleasas. Tres replicas técnicas fueron realizadas para cada réplica biológica y un control negativo de agua fue incluido en cada análisis. El programa de temperaturas utilizado fue ajustado a las temperaturas específicas (T_m) de cada partidor utilizado, el cual en general fue el siguiente: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de: 95°C por 15s, entre 56-58°C según partidor por 15s, y 72°C por 20s. Al final de cada paso de amplificación se midió la fluorescencia y al término de la amplificación, una curva de desnaturalización fue generada a través de la lectura continua de la fluorescencia durante un incremento de temperatura desde 55°C a 95°C. La expresión de cada uno de los genes de tomate fue normalizada por la expresión del gen gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*GAPDH*, número de acceso U97257) (Orellana *et al.*, 2010). Para el análisis de expresión de los genes ya descritos en *Arabidopsis*, se emplearon partidores disponibles en literatura (Yang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014), y para los genes candidatos involucrados en la ruta de desarrollo estomático en *S. chilense*, se diseñaron partidores específicos a partir de las secuencias nucleotídicas descritas en la sección VIII.2 utilizando el software Beacon Designer 8 (Premier Biosoft). La secuencia nucleotídica de los partidores analizados por qRT-PCR se describe en la **Tabla 1**. Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados con la finalidad de corroborar la identidad del producto. Los datos obtenidos luego del protocolo completo de qPCR fueron analizados manualmente y los cálculos para estimar la expresión relativa de cada gen fueron hechos siguiendo el método de $2^{-\Delta CT}$ de Livak y Schmittgen (2001). Las barras de error en los datos de qRT-PCR representan el promedio \pm error estándar de tres replicas biológicas y tres técnicas. Para los cálculos de expresión, al órgano o tratamiento control, le fue asignado el valor relativo de 1.

VIII.7. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y clonamiento de las secuencias amplificadas

La región codificante de largo completo (ORF) del gen *SchSDD1-like* fue amplificada a partir de DNA genómico (gDNA) de *S. chilense*, para lo cual la purificación del DNA genómico fue realizado a partir de hojas usando el kit comercial Genomic DNA Mini Kit (Plant) (Maestrogen, Nevada, USA) siguiendo el protocolo descrito por los proveedores. La reacción de amplificación se realizó usando los partidores diseñados a partir de las secuencias depositadas en bases de datos (sección VIII.2) y la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen). En cada reacción de PCR se emplearon aproximadamente 25 ng totales de gDNA aislado desde hojas de *S.*

chilense como templado, 1,5 mM de MgCl₂, 1X de buffer PCR, 250 nM de cada partidor, 200 nM dNTPs y 0,25U de Taq DNA polimerasa. El programa de temperaturas de cada PCR consistió de: 96°C por 10 min, 35 ciclos de 96°C por 45s, 50°C por 45s, 68°C por 2 min y 30s, seguido de una extensión final de 68°C por 7min.

Los productos PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE 1X. Las bandas de interés fueron rescatadas desde el gel y purificadas usando el sistema EZNA Gel extraction kit (Omega Bio-Tek), para luego proceder a ser ligadas al vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA). Los productos de la ligación fueron usados para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (Sambrook y Russell, 2001), y las colonias positivas fueron detectadas en medio de selección en base a su coloración (0,15 mM de IPTG, 30 μ g/ml de X-Gal) y a la resistencia a ampicilina (100 μ g/ml). Posteriormente, los DNA plasmidiales fueron purificados (ver VIII.8) y la secuencia nucleotídica de los fragmentos contenidos en los plásmidos recombinantes fue determinada mediante secuenciación (MACROGEN; <http://www.macrogen.com>). El análisis de las secuencias se llevó a cabo mediante el uso del programa BioEdit (Hall, 1999). Posteriormente y con el objetivo de determinar la integridad del ORF, las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas y comparadas con las existentes en las bases de datos.

VIII.8 Aislamiento y purificación de DNA plasmidial

Las colonias positivas portadoras de los plásmidos de interés (analizadas por PCR) fueron inoculadas en 5 mL de medio LB líquido más el respectivo antibiótico de selección e incubadas a 37°C en agitación por 12-16 hr. Posteriormente, las bacterias fueron procesadas para la obtención de DNA plasmidial utilizando el kit comercial EZNA Plasmid Mini Kit (Omega Bio-Tek). La purificación del vector de expresión pBI121, por ser de bajo número de copias se realizó a partir de 100 ml de cultivo bacteriano (LB, 50 mg/L kanamicina) y utilizando un método basado en precipitación con PEG-8000 (Ruiz-Lara, 1989). Para la purificación del vector de expresión pCAMBIA1301, se realizó a partir de 10 ml de cultivo bacteriano (LB, 50 mg/L kanamicina), utilizando el procedimiento descrito para el kit comercial EZNA Plasmid Mini Kit (Omega Bio-Tek).

VIII.9 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Utilizando la secuencia aminoacídica deducida de *SchSDD1-like*, se realizó una búsqueda en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) de proteínas relacionadas usando el algoritmo BLASTp. La proteína de interés junto a sus proteínas relacionadas (homólogas) fueron alineadas usando el programa BioEdit (Hall, 1999). Los árboles filogenéticos fueron construidos a partir de los alineamientos de secuencias múltiples generados por BioEdit y utilizando el programa MEGA versión 4.0 (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura *et al.*, 2007). Se empleó el método de neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) con análisis bootstrap de 1000 réplicas. Las predicciones de la putativa localización de la proteína *SchSDD1-like* se realizó utilizando los softwares Plant-mPLoc (Chou y Shen, 2010), TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2007) y Wolf PSORT-II (Horton *et al.*, 2007).

VIII.10 Análisis *in silico* de las regiones promotoras de genes de interés

Se analizaron 2000 pb río arriba del codón ATG de los genes *AtSDD1*, *AtSPCH*, *AtMUTE*, *AtFAMA* en busca de putativos elementos *in cis*. El análisis se llevó a cabo utilizando los siguientes programas: PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) (Higo *et al.*, 1999), PlantCARE (<http://www.bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) (Lescot *et al.*, 2002) y PlantPAN (http://www.plantpan.mbc.nctu.edu.tw/seq_analysis.php) (Chang *et al.*, 2008).

VIII.11 Generación de construcciones genéticas para transformación estable de *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum*

La región codificante del gen *SchSDD1-like* fue amplificada desde gDNA utilizando partidores específicos (**Tabla 1**) con los sitios de restricción necesarios para su clonamiento en el vector de expresión. Una vez secuenciados, los genes fueron liberados desde el vector pGEM-T por digestión enzimática e insertados en orientación sentido en los sitios BglIII-BstEII ó XbaI-SacI del vector binario pCAMBIA1303 y pBI121, respectivamente; para reemplazar al gen de la β -glucoronidasa (GUS) contenido en ambos vectores binarios, de esta forma los genes quedaron bajo el control del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor CaMV 35S. Las construcciones obtenidas se denominaron 35S:*SchSDD1-like* y 35S:*SchSDD1_like*, respectivamente.

VIII.12 Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum*

Los vectores binarios conteniendo las construcciones 35S:*SchSDD1-like* y 35S:*SchSDD1_like*, fueron introducidas en células químicamente competentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pmp 90 (Sambrook y Russell, 2001). Las bacterias transformadas fueron crecidas y seleccionadas en medio YM sólido (0,04% p/v de extracto de levadura, 1% p/v manitol, 1,7 mM NaCl, 0,8 mM MgSO₄ x·7H₂O, 2,2 mM K₂HPO₄ y 1,5% p/v de agar) con los siguientes antibióticos: 100 mg/L rifampicina, 25 mg/L gentamicina y 50 mg/L kanamicina. Luego de 48 h de incubación a 30°C, las colonias transformadas positivamente fueron analizadas por PCR. Las bacterias recombinantes fueron utilizadas para transformar plantas wild-type (col-0) y la línea mutante *sdd1-3* de *Arabidopsis thaliana* por medio de infección de yemas florales ("floral-dip") siguiendo el protocolo descrito por Clough y Bent (1998) con algunas modificaciones (Logemann *et al.*, 2006). A partir de una colonia única se creció un pre inóculo en 5 ml de medio YEB líquido (0,1% p/v de extracto de levadura, 0,5% p/v de extracto de carne, 0,5% p/v de peptona, 0,5% p/v de sacarosa y 0,05% p/v de MgSO₄ x·7H₂O, pH 7) con los antibióticos de selección durante 24 h a 30°C. Posteriormente, este cultivo fue utilizado para inocular 500 ml de medio YEB líquido hasta alcanzar una absorbancia de 0,8-1 a una densidad óptica de 600 nm. Las células fueron centrifugadas a 4000 rpm por 15 min, luego de lo cual el sedimento bacteriano fue resuspendido en igual volumen de medio de infiltración (5% p/v de sacarosa, 2,2 g/L de MS y 0,02% v/v de Silwet L77). La transformación consistió en sumergir durante 10 segundos inflorescencias de *Arabidopsis* con flores en estado de pre antésis. Se realizaron transformaciones de plantas tipo silvestre (Col-0) con la construcción 35S:*SchSDD1-like* y de la línea mutante *sdd1-3* (Col-0) con la construcción 35S:*SchSDD1_like*. Las semillas obtenidas desde las plantas transformadas fueron desinfectadas con una solución de etanol 70% durante 1 min, luego hipoclorito de sodio comercial (con Silwet-L77) durante 45 seg y luego lavadas 5-6 veces con agua estéril bajo cámara de flujo laminar. Se sembraron en medio MS conteniendo 50 mg/L de kanamicina para la transformación de la mutante *sdd1-3* ó 50 mg/L de higromicina para la transformación de la planta col-0, 5mg/L de anfotericina B y 500 mg/L de augmentina para seleccionar las plantas transgénica T0 y eliminar la presencia de *Agrobacterium* remanente desde las semillas. Estas plantas posteriormente fueron establecidas *ex vitro* y analizadas por PCR para detectar la inserción del transgen, así como los niveles de transcritos mediante qPCR. Las semillas generadas por estas plantas fueron sembradas nuevamente en medio de selección con los

mismos antibióticos con la finalidad de obtener plantas T1, las cuales fueron usadas para su evaluación molecular y fenotípica.

Para la generación de plantas transgénicas de *Solanum lycopersicum* cv. "Moneymaker" sobreexpresoras del gen *SchSDD1-like*, explantes de cotiledones de tomate de 8 días de edad, fueron infectados con *Agrobacterium tumefaciens* que contenían la construcción 35S:*SchSDD1-like* en el vector binario pCAMBIA1303. La transformación se realizó según el método de Fillatti *et al.* (1987). Los callos que se originaron de los cotiledones infectados se transfirieron a placas con medio inductor de brotes (sacarosa 3% p/v, zeatin 2mg/L, higromicina 5mg/L, augmentina 500mg/L, 6gr/L de Phytoagar, 1 ml/L de PPM -plant preservative mixture-). Los cotiledones fueron mantenidos en este medio con renovación cada 20 días hasta que existió desarrollo de plántulas, proceso que duró entre 5-6 meses. Finalmente, las plántulas desarrolladas en cada callo fueron cortadas y colocadas en medio de cultivo para la inducción de raíces por un espacio de 10 días (sacarosa 3% p/v, higromicina 5mg/L, augmentina 500mg/L, 6gr/L de Phytoagar, 1 ml/L de PPM -plant preservative mixture-). Plantas transformadas de 1 mes de edad y seleccionadas en antibiótico, fueron micropropagadas continuamente para mantener un stock de biomasa vegetal. Estas plantas *in vitro* correspondieron a líneas transgénicas hemicingóticas T0. Las plantas transformadas fueron traspasadas a condiciones *ex vitro* y analizadas por PCR para detectar la inserción del transgen, así como los niveles de transcritos mediante qPCR. Para ello, las magentas que contenían las plantas *in vitro* fueron abiertas, y se cubrieron con un trozo de film plástico. Se colocaron dentro de una caja de acrílico con el fin de aclimatarlas por un periodo de 2 semanas, tiempo clave para el cambio a condiciones de menor humedad. Luego, las plantas fueron lavadas en sus raíces para eliminar restos de medio residual y rápidamente fueron plantadas en macetas pequeñas con mezcla de perlita, vermiculita y turba (1:1:1). Las macetas se dejaron dentro de una caja de acrílico y se procedió por espacio de 3-4 semanas a mantenerlas en aclimatación con respectivo resguardo de su humedad mediante riego asperjado tanto en las macetas, sobre las hojas de las plantas y las paredes de la caja de acrílico. Finalmente, fueron trasladadas y crecidas bajo condiciones de invernadero donde se mantuvieron por 1,5 a 2 meses.

VIII.13 Impresiones epidermales y conteo estomático.

Plantas de *Arabidopsis* col-0, *sdd1-3*; y transgénicas T1 *P_{35S}:SchSDD1-like* (sobreeexpresora-col0 & sobreeexpresora-*sdd1-3*) fueron transplantadas en macetas con sustrato compuesto por vermiculita, perlita y turba (1:1:1) bajo fotoperiodo de día largo (16 h luz/8 h oscuridad). Hojas completamente expandidas de la roseta de plantas de 4 semanas de edad fueron usadas para determinar la abundancia estomática. De modo similar, hojas completamente expandidas de plantas de *S. lycopersicum* wild-type y transgénicas T0 *P_{35S}:SchSDD1-like* fueron usadas para determinar la densidad estomática.

Para obtener las impresiones epidermales, se realizaron moldes de la cara abaxial de las hojas empleando resina dental según el método descrito por Geisler *et al.* (2000) usando Light Body Quick (3M, St. Paul, Minnesota, USA) (Geisler *et al.*, 2000). Una mezcla de esta resina fue depositada sobre un portaobjetos y la epidermis a ser impresa fue cuidadosamente presionada sobre esta mezcla por aproximadamente 30 segundos hasta que la resina estuviese seca. Los moldes fueron cubiertos con una capa de esmalte de uñas, los cuales una vez secos fueron retirados cuidadosamente para ser observados. Los estomas fueron fotografiados y contados tomando 3 áreas por hoja. La observación se realizó con un aumento del 400X al microscopio óptico (Zeiss Primo Star, ZEISS Germany). Con propósitos estadísticos del análisis de la densidad estomática, dos hojas de 10 diferentes plantas fueron consideradas para las impresiones epidermales. SD (estomas/mm²) fueron obtenidos a partir de un área foliar de 0,085 mm². En todos los cálculos, los estomas fueron considerado como un par de células guardianas (Yoo *et al.*, 2010). Las imágenes representativas de los campos visuales, fueron obtenidas mediante la técnica de tratamiento vectorial utilizando el software Adobe Photoshop CC (www.adobe.com). La microscopia confocal luego de aplicar yoduro de propidio, fue realizada según Delgado *et al* (2011), usando un microscopio confocal Leica TCS SP2 (www.leica-microsystems.com/).

VIII.14 Análisis de tolerancia a la deshidratación en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y de *Solanum lycopersicum*

Para el ensayo de deshidratación por *shock* (evaluación de la pérdida de agua foliar), se procedió a escindir cuidadosamente 3 hojas de la roseta por planta *Arabidopsis* wild-type y transgénicas y puestas sobre un papel absorbente. De manera similar, hojas completamente expandidas fueron escindidas de plantas de *Solanum lycopersicum* wild-type y transgénicas. Todas las muestras fueron

deshidratadas sobre el mesón (25°C, 50% de humedad relativa) y pesadas a diferentes tiempos: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas, para el caso de *Arabidopsis*; y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 12 horas para tomate, con tres réplicas biológicas por tiempo. El porcentaje de pérdida de agua a cada tiempo fue calculado como el porcentaje de reducción del peso inicial de cada hoja (Xie *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014).

VIII.15 Análisis de tolerancia a la sequía en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

Plantas de *Arabidopsis* col-0 y 2 líneas transgénicas T1 independientes que sobreexpresan el gen *SchSDD1* fueron sometidas a sequía por espacio de 8 días. El tiempo de estrés fue determinado a medida que las plantas fueron paulatinamente manifestando señales de marchitamiento producto del estrés. Las plantas fueron dejadas de regar en maceta y las plantas control fueron regadas normalmente bajo las mismas condiciones de temperatura y luminosidad. Se colectaron muestras de tallos y hojas de la planta a 0, 4, 6 y 8 días de iniciado el tratamiento, considerando 3 réplicas biológicas para cada tiempo.

El producto malondialdehído (MDA) generado por lipoperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, fue determinado de acuerdo al protocolo modificado de Dionisio-Sese y Tobita (1998) y Ghanem (2008). Los contenidos de MDA medidos espectrofotométricamente fueron calculados usando el coeficiente de extinción molar de $155 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

VIII.15 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron ejecutados mediante el programa GraphPad Prism 6.01 (<http://www.graphpad.com>). Para todos los análisis de expresión génica, el nivel de significancia fue determinado por análisis de ANOVA de dos vías ($p < 0.05$), seguido por comparación múltiple con la prueba *Tukey's honestly significant difference (HSD) mean-separation*. Los datos fueron evaluados según su distribución normal y en aquellas excepciones que no exhibieron esta característica, fueron transformados para obtener su normalidad. En cambio, para los datos obtenidos para análisis fisiológicos se aplicó estadística descriptiva para determinar las medias y errores estándares. Para el conteo de estomas, las medias fueron comparadas con la prueba de *t-student* con un nivel de significancia ≤ 0.05 .

IX. RESULTADOS

CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DEL GEN *SDD1* Y DE LOS GENES MAESTROS DEL DESARROLLO ESTOMÁTICO BAJO CONDICIONES DE SEQUÍA Y SU MODULACIÓN POR ABA EN PLANTAS DE *ARABIDOPSIS*

IX.I.1 *AtSDD1* presenta una modulación opuesta respecto a *AtSPCH*, *AtMUTE* y *AtFAMA* en hojas de plantas de *Arabidopsis* bajo sequía y ABA.

Existen evidencias fenotípicas que la diferenciación estomática y su patrón de distribución en la epidermis de los órganos aéreos, responde a los factores ambientales prevalentes durante el desarrollo de las hojas, lo que le permite a la planta adaptarse a los cambios del entorno respondiendo en escala de tiempos que van de minutos a milenios (Casson y Gray, 2008). Sin embargo, escaso es el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en este proceso de diferenciación y desarrollo bajo condiciones de estrés. En el contexto del desarrollo estomático, estudios realizados en *Arabidopsis* bajo condiciones normales de crecimiento, han propuesto que dada la naturaleza molecular, *SDD1* procesa algún ligando involucrando en la señalización que controla la densidad y distribución estomática en los órganos aéreos (Berger y Altman, 2000). Por lo tanto, existe la posibilidad que *AtSDD1* podría ser modulado por factores ambientales, tal como la sequía y también por ABA, más aun considerando que esta hormona tiene una importante participación en la respuesta de la planta frente a una variedad de factores ambientales, entre ellas, el rápido cierre estomático bajo condiciones de estrés para evitar la pérdida de agua (Qin y Zeevaart, 2002; Melhorn *et al.*, 2008). De esta forma, esta tesis se inició con un estudio de la modulación de la expresión génica mediante qPCR de la modulación de *AtSDD1* bajo condiciones de sequía y tratamientos con ABA exógeno.

a) Estrés por sequia

Plantas de *Arabidopsis* (Col-0) de 4 semanas de edad fueron sometidas a tratamiento de sequía durante 8 días, tiempo durante el cual se colectaron muestras de tejidos de hojas y tallos para extraer RNA total y mediante qPCR se procedió a evaluar el comportamiento transcripcional de *AtSDD1*. La **Figura 7** muestra los niveles de expresión del *AtSDD1* bajo esta condición. El perfil transcripcional

señala que hay una significativa inducción al día 4 después del último riego, para luego hacia el final del periodo considerado exhibir una represión.

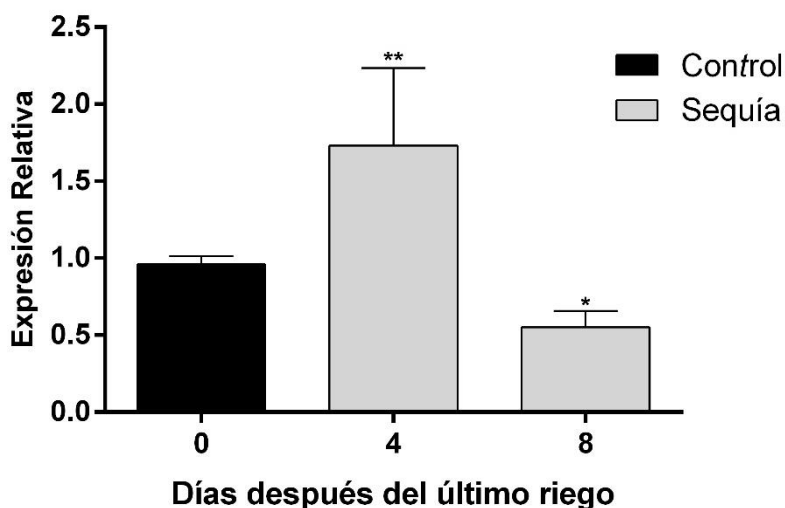


Figura 7 Perfil de expresión de SDD1 en plantas wild-type de Arabidopsis expuestas a sequía. Análisis de expresión fueron evaluados por qRT-PCR usando RNA total extraído de hojas y tallos de plantas de 4 semanas de edad después del tratamiento por el periodo de tiempo indicado. Las barras indican los valores promedios de expresión relativa \pm error estándar ($n=3$) de dos experimentos independientes, normalizados con el gen de expresión constitutiva *F-box*. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión entre ambas

Considerando este resultado, en que *AtSDD1* se induce bajo condiciones de déficit hídrico y su producto génico es un activador de la cascada de señalización represora del desarrollo estomático, resultado de interés conocer que ocurre con la expresión de los genes que codifican para los factores de transcripción “maestros” involucrados en la producción estomática. Para verificar esto, se determinó la expresión de los genes maestros del desarrollo estomático, lo que se muestra en la **Figura 8**. Los datos observados indican que la expresión génica de los factores de transcripción se ve afectada por la sequía impuesta en el periodo de tiempo indicado, presentando *SPCH*, *MUTE* y *FAMA* una represión transcripcional estadísticamente significativa en todos los casos, siendo *AtSPCH* el que presentó un mayor nivel de represión, alcanzado ~50% a los 4 y 8 días. Por su parte, *AtMUTE* y *AtFAMA* exhibieron una represión cercana al 40% a los 4 y 8 días de estrés. Este comportamiento se correlaciona con la inducción de la expresión génica que muestra *AtSDD1* a los 4 días de estrés. Como marcador molecular de estrés, se utilizó el gen *AtRD29A* el cual ha sido reportado que se induce bajo sequía (Hua *et al.*, 2006) y que en la evaluación realizada, mostró una alta inducción respecto al control validando los datos transcripcionales obtenidos bajo esta condición.

Tesis: "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"

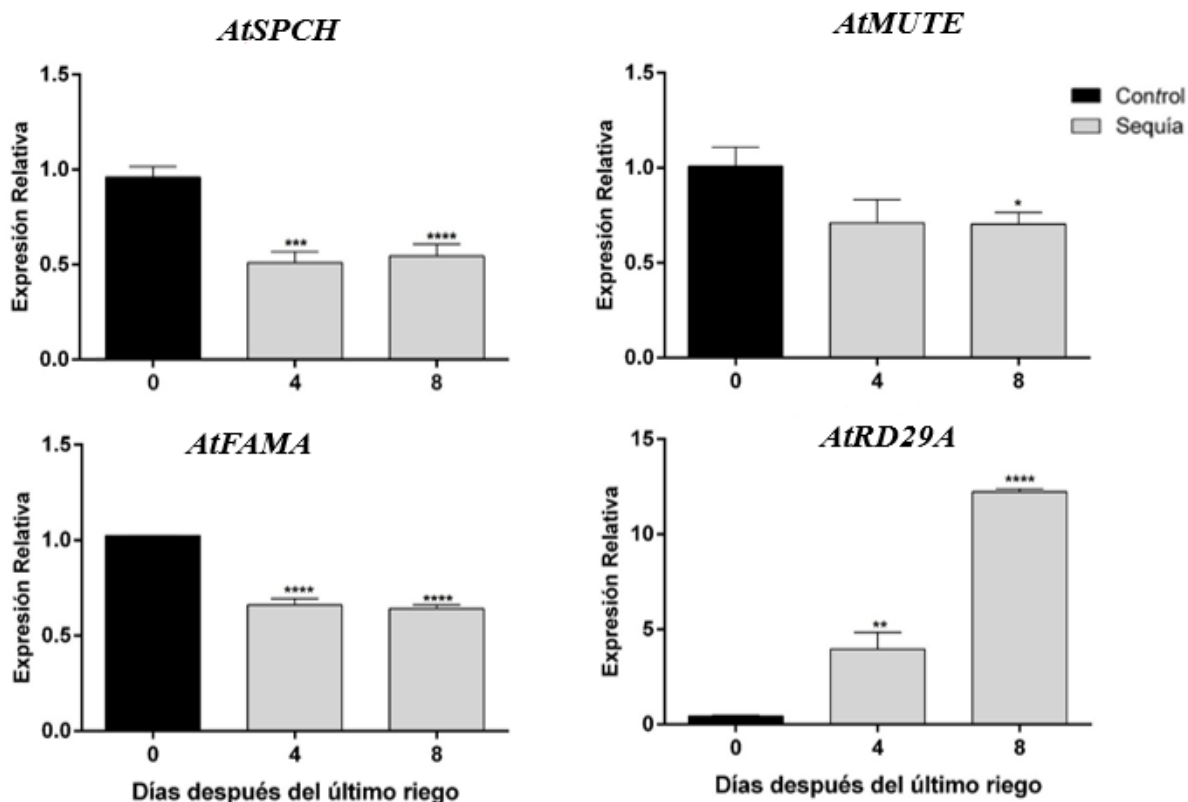


Figura 8 Perfil de expresión de los genes maestros del desarrollo estomático en plantas wild-type de *Arabidopsis* expuestas a sequía. Análisis de expresión fueron evaluados por qRT-PCR usando RNA total extraído de hojas y tallos de plantas extraído de plantas de 4 semanas de edad después del tratamiento por el periodo de tiempo indicado. *AtRD29A* fue utilizado como marcador de inducción por sequía. Las barras indican los valores promedio de expresión relativa \pm error estándar ($n=3$) de dos experimentos independientes, normalizados con el gen de expresión constitutiva *F-Box*. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión entre ambos tratamientos (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ y **** $P<0.0001$)

b) Tratamiento con ABA

Para evaluar la regulación transcripcional mediada por ABA de estos genes, plantas de *Arabidopsis* (Col-0) de 4 semanas de edad fueron asperjadas con 100 μ M de ABA y estudiada la expresión génica bajo estas condiciones. Para ello, se obtuvieron muestras de hojas y tallos a las 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24 y 48 horas post-tratamiento. A estas muestras se les extrajo RNA total y mediante qPCR se procedió a evaluar el comportamiento transcripcional de *AtSDD1*. La **Figura 9** muestra que la inducción de *AtSDD1* es estadísticamente significativa a las 6h y 12h de iniciado el tratamiento. Posteriormente, a las 24h y 48h la expresión es similar al control en los mismos tiempos.

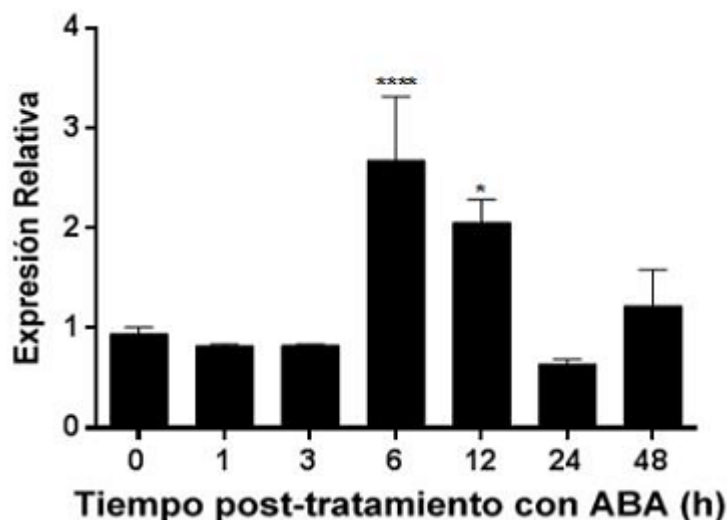


Figura 9 Perfil de expresión de SDD1 en plantas wild-type de Arabidopsis tratadas con ABA exógeno. Análisis de expresión fueron evaluados por qRT-PCR usando RNA total extraído de hojas y tallos de plantas de 4 semanas de edad después del tratamiento con ABA por el periodo de tiempo indicado. Las barras indican los valores promedios de expresión relativa \pm error estándar ($n=3$) de dos experimentos independientes, normalizados con el gen de expresión constitutiva F-Box. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión entre ambas condiciones (* $P<0.05$; y **** $P<0.0001$).

Debido al significativo cambio de expresión de *AtSDD1* inducido por ABA, el análisis de la expresión de los genes *maestros* del desarrollo estomático resultaba trascendente para comprender la importancia de esta hormona en el control del número estomático de las hojas. La **Figura 10** muestra el perfil transcripcional de tales genes, además del marcador molecular de respuesta a ABA, *AtRD29A* (Hua *et al.*, 2006). Similar a lo observado bajo condiciones de déficit hídrico, la expresión de los genes *maestros* fue reprimida bajo tratamiento con ABA. Sin embargo, se observaron diferencias entre los tres genes en los tiempos de respuesta frente a la aplicación de la hormona. *AtSPCH* no mostró ningún cambio en los niveles de mRNA hasta las 12h post-tratamiento, lo que coincidió con la inducción observada en *AtSDD1* al mismo tiempo de ensayo. A diferencia de *AtSPCH*, *AtMUTE* y *AtFAMA* mostraron una rápida represión a las 3h y 1h después de la aplicación de ABA, respectivamente, manteniéndose durante todos los tiempos evaluados. Interesantemente, esto último, no es concordante con los tiempos de activación de *AtSDD1* bajo tratamiento con ABA, *AtMUTE* alcanzó un nivel de represión cercano al 70% a las 24h y 48h de estrés. *AtFAMA* mostró su máxima represión (~60%) a 1h de estrés, disminuyendo a un 40% su nivel de represión entre a las 3h y manteniéndose así hasta las 24h. En resumen, considerando en conjunto los resultados de expresión génica obtenidos, estos indicarían que sequía y ABA regulan a *SDD1* y a los genes *maestros* involucrados en el desarrollo

estomático en *Arabidopsis*. Notablemente, los datos sugieren que ABA ejerce un control negativo sobre los reguladores positivos del desarrollo de estomas, los que en el caso de *AtMUTE* y *AtFAMA* parece ser independiente de la regulación que ABA realiza sobre la expresión de *AtSDD1*, a diferencia de lo observado con *AtSPCH* donde pareciera depender de la expresión-inducida por ABA de *AtSDD1*.

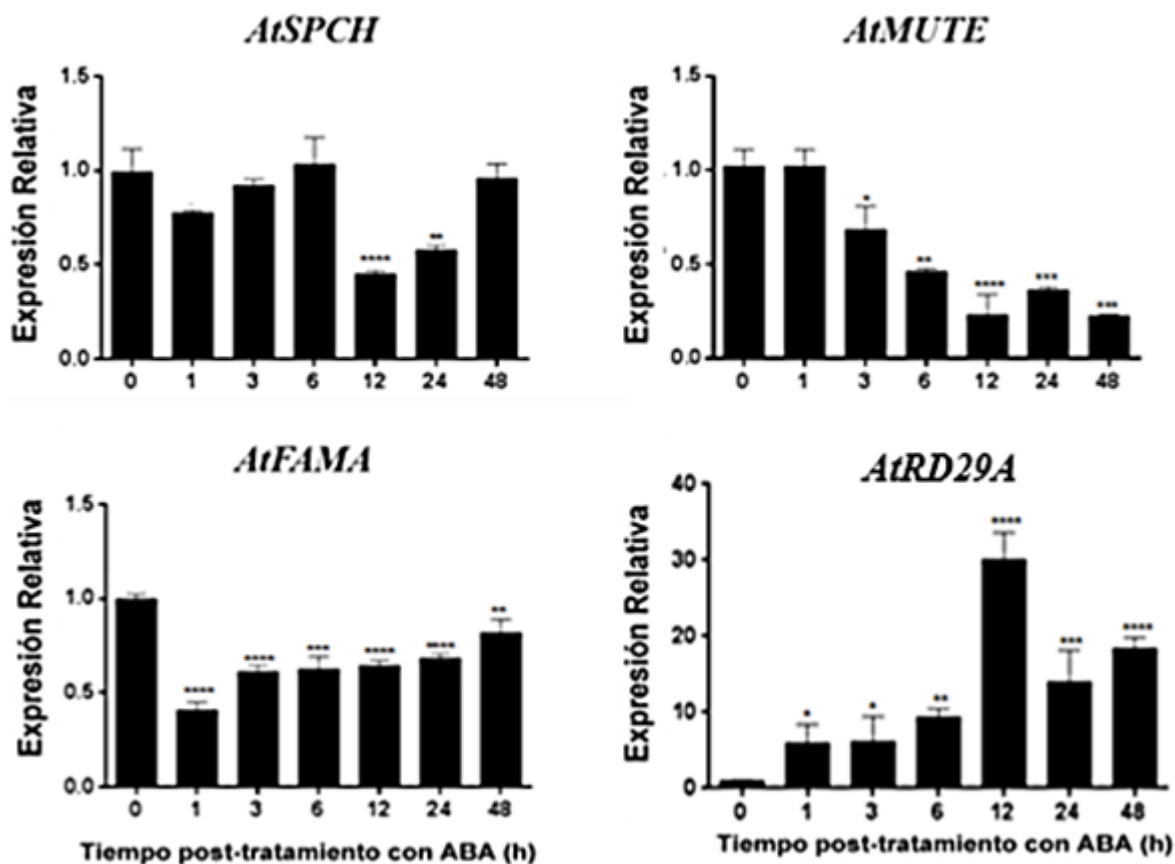


Figura 10 Perfil de expresión de los genes maestros del desarrollo estomático en plantas wild-type de *Arabidopsis* tratadas con ABA exógeno. Análisis de expresión fueron evaluados por qRT-PCR usando RNA total extraído de hojas y tallos de plantas de 4 semanas de edad después de la aplicación del tratamiento por el periodo de tiempo indicado. *AtRD29A* fue utilizado como marcador de inducción por ABA. Las barras indican los valores promedios de expresión relativa \pm error estándar ($n=3$) de dos experimentos independientes, normalizados con el gen de expresión constitutiva *F-Box*. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión entre ambos tratamientos (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ y **** $P<0.0001$).

Con el propósito de obtener información adicional que explique la respuesta frente a sequía y ABA observada de los genes del desarrollo estomático evaluados en *Arabidopsis*, se realizó una búsqueda en la región promotora de estos genes, secuencias nucleotídicas que han sido descritas como involucradas en la respuesta a sequía y ABA, y estrés abiótico en general. Para ello, se consideró

una región de 2000 pares de bases (pb) río arriba del sitio de inicio de la transcripción (-2000pb) y se analizaron usando las bases de datos PLACE, PlantCARE y PLANTPAN (Higo *et al.*, 1999; Lescot *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2008).

Respecto al análisis del promotor de *AtSDD1*, una serie de elementos de respuesta a sequía, deshidratación y ABA fueron encontrados. Los motivos ABRELATERD1 (CAGTG) y ACGTATERD1 (ACGT) (Simpson *et al.*, 2003) se encontraron representados 1 vez (-597pb) y 3 veces (-664, -648 y -1633pb), respectivamente. El motivo MYCCONSENSUSAT (CANNTG) de respuesta a ABA, bajas temperaturas y deshidratación (Abe *et al.*, 2003) se encontró también representada 5 veces (-266, -752, -1799, -1784, -1461pb). Sumado a esto, el análisis también reveló elementos que son reconocidos por factores de transcripción MYB: MYBATRD22 (CTAACCA) involucrado en la respuesta a deshidratación y en la inducción por ABA (Abe *et al.*, 2003), el cual está representado a lo menos 2 veces en la región promotora de *AtSDD1* (-580, -344 pb). También se encontró el motivo CBFHV (GTCGAC) en la posición -1969pb la cual está relacionada con la respuesta a deshidratación y baja temperatura (Xue, 2002; Xue, 2003). Además, el motivo GT está presente dentro de la región promotora más de 10 veces, los cuales han sido identificados en genes activados por luz, aunque recientemente han sido asociados con la tolerancia a estrés abiótico en *Arabidopsis* (Xie *et al.*, 2009). Específicamente, el elemento GT en la posición -428 (GGTAAA) ha sido reportado como el sitio de unión del represor GTL1 el cual ve disminuidos sus niveles de mRNA bajo condiciones de déficit hídrico (Yoo *et al.*, 2010) y ABA (<http://bar.utoronto.ca/efp>). Otro elemento involucrado en la ruta de señalización mediada por ABA encontrado en el promotor de *SDD1*, fue el motivo ATHB-5, el cual es reconocido como un regulador positivo de la respuesta a ABA, fundamentalmente en el efecto inhibitorio que ejerce ABA en la maduración de las semillas (Johannesson *et al.*, 2003), encontrándose representado 2 veces en la secuencia promotora de *SDD1* (-457, -498bp). En conjunto, el análisis *in silico* del promotor de *AtSDD1* confirman los datos de expresión génica observados en que *AtSDD1* es un gen inducible por sequía y de respuesta a ABA. Probablemente, la inducción mostrada no solo involucre la alta presencia de elementos ABRE o ERD1 y otros, si no que la represión del gen que codifica para el factor de transcripción GTL1 que actúa como represor *SDD1*, genera la consecuente alta expresión de *AtSDD1* bajo sequía (**Figura 7**) y tratamiento con ABA (**Figura 9**). Adicionalmente, los elementos *cis* encontrados indican que los factores ambientales pueden afectar la densidad y/o distribución estomática mediante la regulación de la expresión de *AtSDD1*.

Paralelamente, se realizó el mismo análisis para la región promotora de *AtSPCH*, *AtMUTE* y *AtFAMA*. El motivo ABRELATERD1 fue encontrada en *SPCH* (-1285pb), *MUTE* (-1910, -1850, -763, -602bp) y en *FAMA* (-1858, -1774, -1474, -1462, -126bp). La secuencia ACGTATERD1 fue encontrada en *SPCH* (-534, -366pb), *MUTE* (-1759, -1630, -565bp) y en *FAMA* no fue detectada. Respecto al motivo MYCCONSUSAT, este fue encontrado altamente representado en las 3 regiones promotoras: *SPCH* (-1427, -1340, -1045, -1017, -700,-647pb), *MUTE* (-1743, -1703, -959, -733, -434bp) y en *FAMA* (-1483, -1474, -1188, -1038, -552, -491bp). A diferencia de la secuencia en *cis* anterior, los motivos MYB, CBF y COR15 (CCGAC), este último involucrado en la respuesta a sequía, ABA y frío (Baker *et al.*, 1994), se encontraron representadas solo una vez en *SPCH*: -887pb, -818pb y -589pb, respectivamente; en *MUTE*: -1543pb, -1870pb y -1274, respectivamente. En *FAMA* solo fue detectada la presencia del motivo COR15 en la posición -1063bp. Similar a lo observado en el promotor de *AtSDD1*, el motivo GT se encontró altamente representado, estando aproximadamente 10 veces en *SPCH*, 14 veces en *MUTE* y 19 veces en *FAMA*. Interesantemente, otro elemento altamente representado en la secuencia promotora de los genes maestros del desarrollo estomático, fue ATHB-5, presentándose 8, 7 y 12 veces en *SPCH*, *MUTE* y *FAMA*, respectivamente. Considerando que los tres genes maestros del desarrollo estomático se reprimen bajo las condiciones evaluadas, es probable que las diferencias en el porcentaje de represión y en el tiempo de respuesta frente a ABA, se deba a la distinta cantidad de elementos en *cis* encontrados en los promotores. De manera relevante, la alta presencia del elemento inhibitorio frente a ABA, denominado ATHB-5, probablemente tiene un papel preponderante en la represión por sequía y ABA mostrada. En conjunto, estos datos indican que la regulación de la expresión génica observada bajo condiciones de estrés en los tres genes maestros, está bajo la influencia de factores ambientales, siendo estos genes clave en la modulación de la densidad estomática como respuesta al estrés.

CAPÍTULO II: IDENTIFICACIÓN DEL GEN *SchSDD1-like* HOMÓLOGO DE *AtSDD1* Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE ESTOMAS EN TOMATE

IX.II.1 Identificación del gen *SchSDD1-like* en *Solanum chilense*.

A través de una búsqueda en la base de datos de Solgenomics, fue posible identificar un gen de tomate homólogo a *AtSDD1* de *Arabidopsis thaliana*, una serino-preotasa perteneciente a la familia de las subtilisinas, cuya función ha sido asociada a la represión de la ruta canónica de desarrollo de estomas (Berger y Altman, 2000; Pillitteri y Torii, 2012). Este gen se denominó *SolycSDD1-like* (Solyc09g064490.1) y no ha sido caracterizado previamente. A partir de la secuencia de *SolycSDD1-like*, se diseñaron partidores para obtener la secuencia homóloga en *S. chilense* (*SchSDD1-like*). La región codificante del gen *SchSDD1-like* fue amplificada y luego clonada a partir de gDNA aislado desde hojas; y, al igual que *AtSDD1*, *SchSDD1-like* no presenta intrones en su región codificante. Su tamaño fue de 2313 pb y codifica para una proteína predicha de 770 residuos aminoacídicos, la cual posee los dominios característicos de los miembros de la subfamilia S8A de subtilisinas (SBT's); esto es, la triada catalítica en el orden Asp, His y Ser y un dominio asociado a proteasas el cual ha sido asociado a la interacción proteína-sustrato proteico (Beers *et al.*, 2004; Rawlings *et al.*, 2010; Schaller *et al.*, 2011). Además de la triada catalítica, una característica bien definida de esta familia de proteasas es que ellas son sintetizadas como pre-pro-péptidos, que luego de ser dirigidas hacia el sistema de endomembranas o a la región extracitoplasmática, experimentan procesamiento proteolítico de los pre y pro dominios para generar la proteasa madura y activa (Beers *et al.*, 2004). En el caso de *SchSDD1-like*, existe un sitio de escisión entre los residuos 22 y 23 del N-terminal que predice un péptido señal de secreción, el cual debe ser procesado en el retículo endoplasmático como prerrequisito para su inclusión en la ruta secretora (Rose *et al.*, 2010; Petersen *et al.*, 2011). A continuación del péptido señal, presenta el prodominio cuyo procesamiento autocatalítico es requerido para la generación de la actividad proteolítica de la enzima. La comparación de secuencias con *AtSDD1* indicó que el posible inicio de la proteína madura es en la posición 111 de la secuencia aminoacídica deducida. Las características presentes en la proteasa *SchSDD1-like* se resumen en la **Figura 11**.

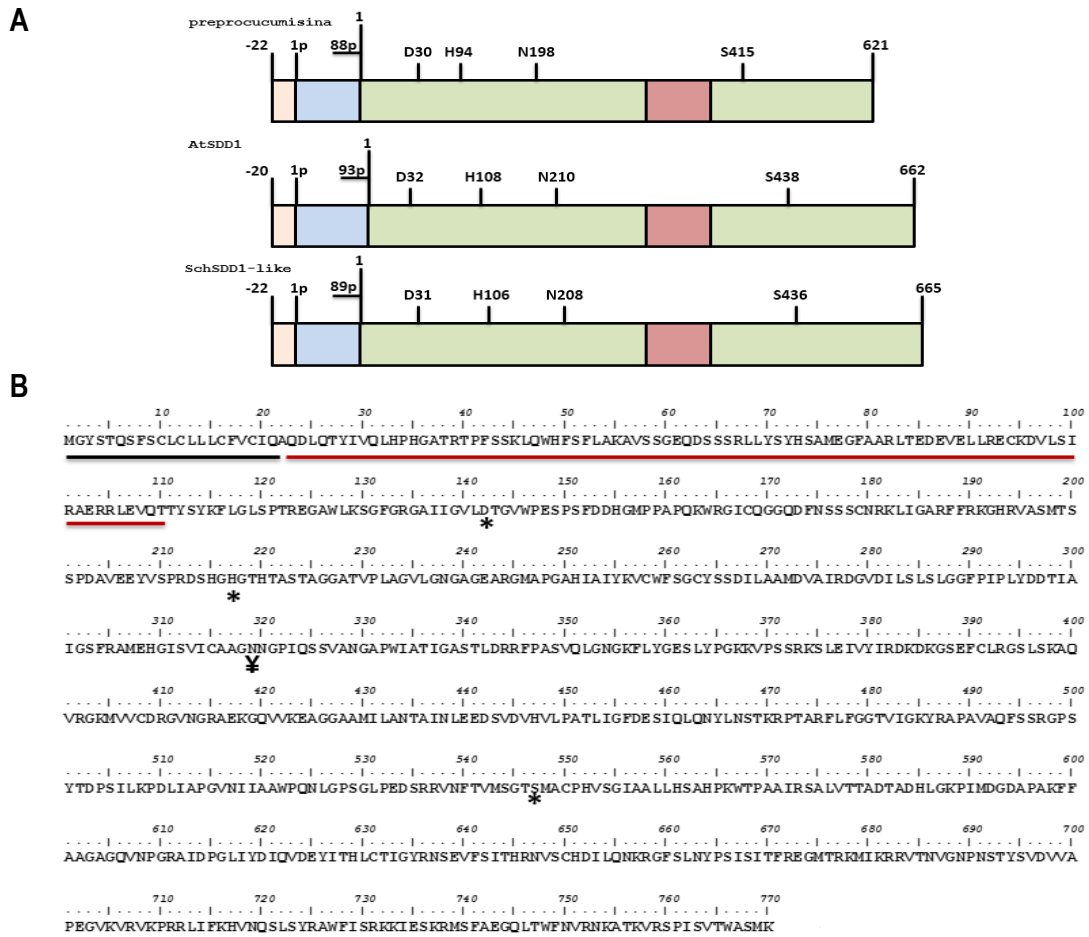


Figura 11 Representación esquemática de la estructura de pre-proteínas de los miembros mejor caracterizados de la familia de proteasas S8A de plantas y SchSDD1-like. (A) preprocucumisina de melón, SDD1 de Arabidopsis y SDD1-like de *S. chilense*. La secuencia señal se indican por números negativos (rosado) y cada prodominio esta indicado usando un número seguido de "p" (azul). La numeración de la enzima madura indica la posición del N y C terminal. Se indica en cada caso la triada catalítica, así como el residuo de Asn involucrado en la estabilización del oxianion clave en el mecanismo catalítico de las serina proteasas (Hedstrom, 2002). La región conservada del dominio asociado a proteasa (PA) involucrado en la interacción proteína-sustrato también se indica (rojo) (Mahon y Bateman, 2000). **(B)** Secuencia aminoacídica deducida de SchSDD1-like. La secuencia señal predicha de destino extracelular procesada en el retículo endoplasmático esta subrayada en negro. La secuencia subrayada en rojo representa el prodominio predicho, cuya escisión es necesario para generar la proteasa madura. Los aminoácidos conservados en la triada catalítica (sitio D, H y S) y el sitio N de unión a sustrato, los cuales están presentes en todas las subtilasas estudiadas, se indican con * y ‡, respectivamente.

Para establecer las relaciones evolutivas de SchSDD1-like con otras proteínas SBT's de especies vegetales, se realizó un árbol filogenético incluyendo las secuencias de las proteínas predichas (**Figura 12**). El análisis filogenético mostró que la proteína SchSDD1-like está ubicada en el mismo grupo de proteínas que agrupan con AtSDD1, y el cual incluyó a SDD1 de *Solanum tuberosum* (StuSDD1) del que se ha reportado que su represión, aumenta el número de estomas en hojas de plantas de papa, planteando su participación en la regulación de la abundancia estomática en esta especie vegetal, filogenéticamente relacionada con tomate (Xiao *et al.*, 2009). En este mismo grupo,

Tesis: "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"

también se encuentra ItSDD1 la que ha sido descrita en la planta *Isatis indigotica* y se ha asociado su participación no solo en el control del número de estomas en las hojas en desarrollo, sino que también su implicancia en la respuesta a estrés biótico y abiótico, así como también un posible papel en la adaptación más rápida y eficiente de genomas poliploides a estímulos ambientales estresantes (Xiao *et al.*, 2009). Por el contrario, otras proteínas del tipo SBT's incluidas en este análisis y que han sido previamente caracterizadas molecular y funcionalmente, agruparon separadamente (**Figura 12**).

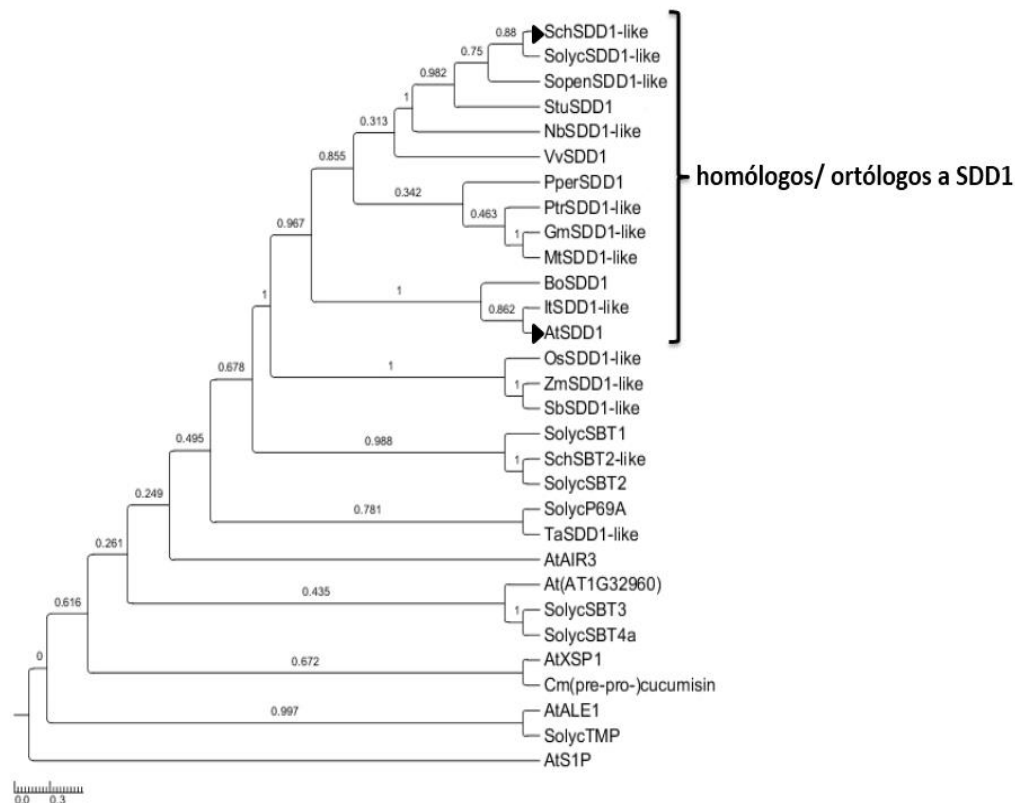


Figura 12. Análisis filogenético de SchSDD1-like y serino-proteasas de la familia subtilisina de varias plantas. El árbol filogenético fue construido usando el método de neighbor-joining con el programa MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2013) con 1000 réplicas para los valores de bootstrap. Los números de accesiones de las secuencias en GenBank, Solgenomics y Gramene son los siguientes (entre paréntesis): *Solanum lycopersicum* SolycSDD1-like (Solyc09g064490), SolycSBT2 (CAA64730), SolycP69A (CAA76724), SolycSBT1 (CAA67429), SolycSBT3 (NP_001234774), SolycTMP (AAB38743) SolycSBT4a (NP_001234780); *Solanum pennellii* SopenSDD1-like (Sopen09g025640); *Solanum tuberosum* StuSDD1 (PGSC0003DMT400085430), *Vitis vinifera* VvSDD1 (VIT_07s0005g04410); *Prunus persica* PperSDD1 (EMJ03000); *Populus trichocarpa* PtrSDD1-like (POPTR_0002s25800); *I. tinctoria* L ItSDD1 (ABD64827); *Arabidopsis thaliana* AtSDD1 (NP_563701), AtAIR3 (AAK74005), At1g32960 (NP_568255), AtXSP1 (NP_568889), AtALE1 (NP_564793), AtS1P (AAM97020); *Oryza sativa* OsSDD1-like (BGIOGA011836-PA); *Zea mays* ZmSDD1-like (GMZM2G107686_P01); *Nicotiana benthamiana* NbSDD1-like (NbS00008079g0002); *Sorghum bicolor* SbSDD1-like (SBo01g047390), *Solanum chilense* SchSBT2-like; *Triticum aestivum* TaSDD1-like (Traes_2DL_6B5F4F3CF); *Cucumis melo pre-pro-cucumisín* (BAA06905); *Glycine max* GmSDD1-like (Glyma036324701), *Medicago truncatula* SDD1-like (AES81608); *Brassica oleracea* BoSDD1 (Bo5g004320).

Tesis: "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"

SchSDD1-like, es la proteína de *S. chilense* que presenta mayor similitud de secuencia con AtSDD1, compartiendo un 67% de identidad de secuencia aminoacídica. Utilizando el algoritmo BLASTP en la base de datos de GenBank se encontró que la proteína con mayor homología a esta proteína de *S. chilense* fue SolycSDD1-like (Solyc09g064490) de *S. lycopersicum*, seguido de StuSDD1 (PGSC0003DMT400085430) de *S. tuberosum* con un 98% y 95% de identidad, respectivamente. Otras proteínas que mostraron alta identidad de secuencia con SchSDD1-like fueron VvSDD1 (VIT_07s0005g04410) de vid con un 76%; PtSDD1-like (POPTR_0002s25800) de Álamo exhibió un 75% de identidad, mientras que PperSDD1 (EMJ03000) de *Prunus pérsica* mostró una identidad de 73%.

El alineamiento múltiple y comparación de las secuencias aminoacídicas SchSDD1-like, StuSDD1, AtSDD1, cucumisina de melón y la proteína más relacionadas de tomate, reveló la presencia conservada de los típicos dominios de las proteasas del tipo subtilisina en SchSDD1-like (**Figura 13**). Los sitios catalíticos D, H y S; este último denominado *centro catalítico* (Berger y Altman, 2000), han sido propuestos que están involucrados en la formación de una compleja red de puentes de hidrógeno que atraviesan el sitio activo de la enzima y que son claves para su actividad hidrolasa (Hedstrom, 2002). El cuarto sitio altamente conservado en todas las subtilisinas conocidas, es el residuo de asparagina medianamente al centro del sitio de unión a sustrato (Dodson y Wlodawer, 1998). Como se muestra en la **figura 13**, los cuatro dominios proteicos y todos los aminoácidos esenciales para el funcionamiento de las subtilisinas están conservados en SchSDD1-like (**figura 11B**). Por lo tanto, y dado las características similares de secuencia, dominios estructurales y sitios funcionales presentes en SchSDD1-like y compartidos con otros miembros de la familia de subtilisinas analizadas, es posible sugerir que esta proteína corresponde a una serino-proteasa del tipo subtilisina de *S. chilense*, aunque su función aún no ha sido estudiada y asignada.

Con la finalidad de obtener antecedentes en relación a la posible localización subcelular de la proteína codificada por *SchSDD1-like*, se realizó un análisis predictivo *in silico* utilizando las herramientas online TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2007) y Plant-mPLoc (Chou y Shen, 2010). Según TargetP, tanto AtSDD1 como SchSDD1-like, son proteínas secretadas con una alta confiabilidad según los parámetros indicados por el software. Consistentemente con estos resultados, el análisis con mPLoc señaló que el destino de ambas proteínas es la pared celular.

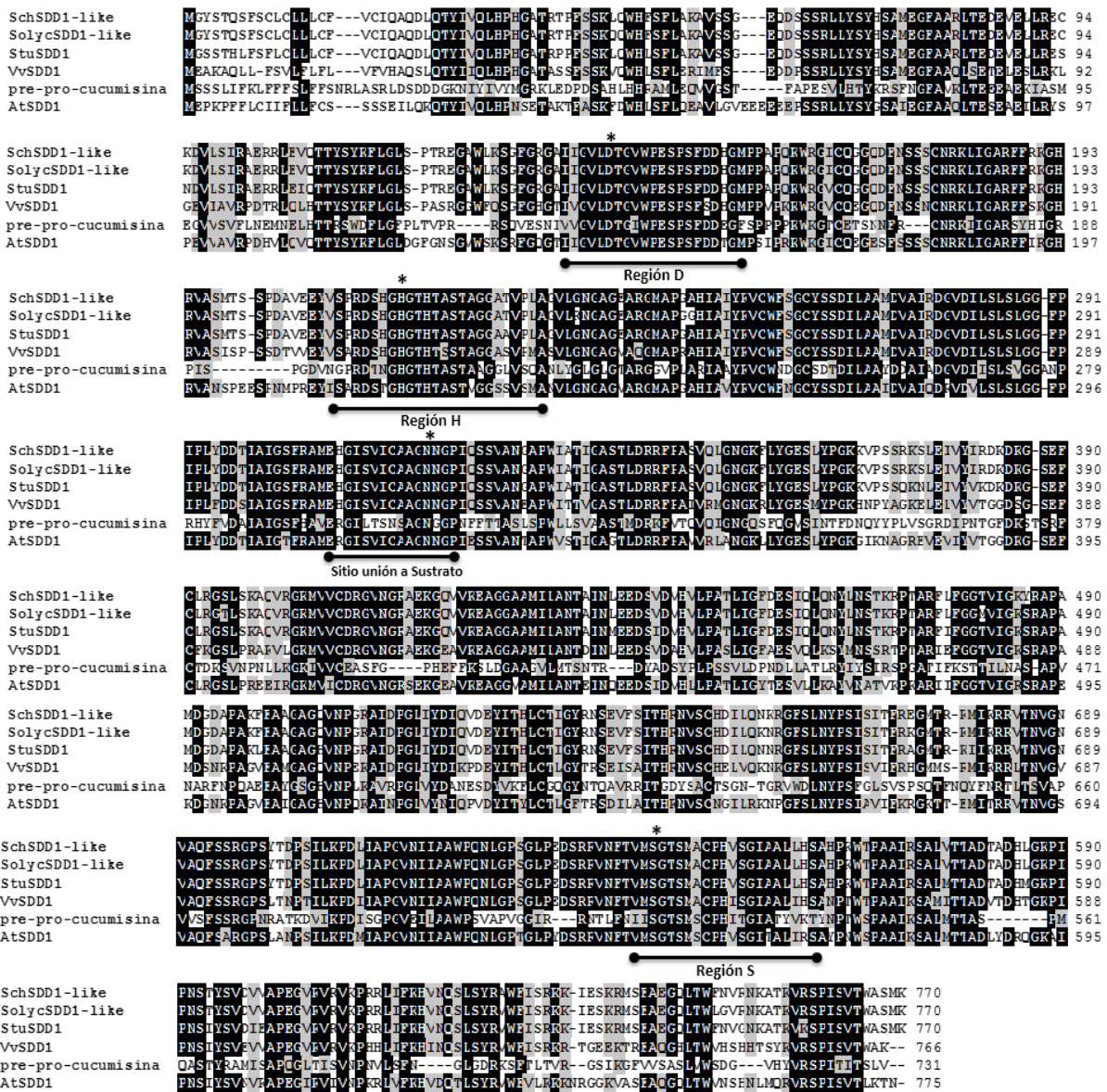


Figura 13 Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida de SchSDD1-like aislada desde S. chilense y de otras SBT's homólogas. Los residuos idénticos en más de 75% son marcados en negro, mientras que aminoácidos similares son marcados en gris. La ubicación de los dominios D, H y S, además del sitio de unión a sustrato se indican debajo del alineamiento. Los residuos esenciales de cada dominio se señalan con asterisco. Las secuencias alineadas fueron obtenidas desde GenBank, Solgenomics y Gramene y su número de accesión corresponde a: SolycSDD1-like (Solyc09g064490), StuSDD1 (PGSC0003DMT400085430), VvSDD1 (VIT_07s0005g04410), cucumisina (BAA06905) y AtSDD1 (NP_563701).

IX.1.2 *SchSDD1-like* exhibe un perfil de expresión espacial diferencial en plantas de tomate silvestre

Con el propósito de determinar el posible papel que *SchSDD1-like* pudiese estar cumpliendo en las plantas de *S. chilense*, se evaluó su perfil transcripcional en diferentes órganos de plantas de 8 semanas de edad crecidas en condiciones normales, que incluyeron hojas, raíces y flores. RNA total de cada uno de estos órganos fue aislado y posteriormente utilizados para realizar la reacción de qPCR.

Los resultados permitieron observar una regulación espacial, así como temporal en tejido foliar, en la expresión de *SchSDD1-like* (**Figura 14**). En todos los tejidos analizados se detectaron transcritos de *SchSDD1-like*, a excepción de raíz, donde prácticamente la expresión de este gen es indetectable. El máximo nivel de expresión de *SchSDD1-like* fue observado en hojas jóvenes, sin embargo, también sus transcritos fueron abundantes en flores, botones florales y hoja madura (pre-senescente). La expresión de este gen también fue detectada en tallos, aunque comparativamente muy inferior a los otros órganos aéreos evaluados.

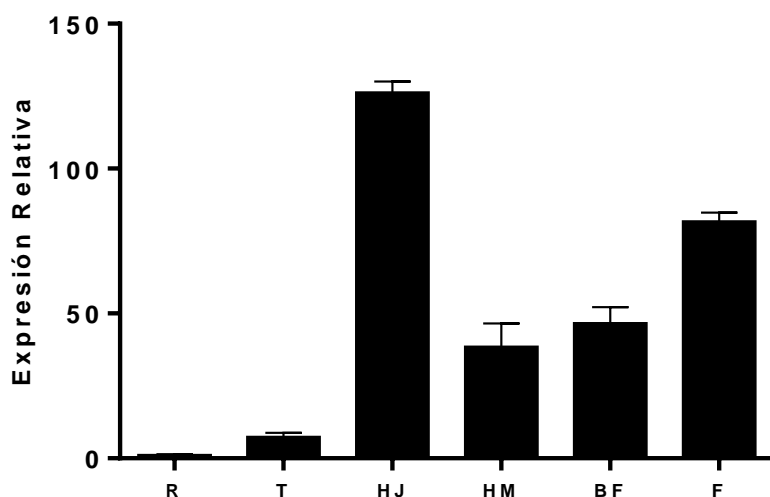


Figura 14 Perfil de expresión del gen *SchSDD1-like* en diferentes órganos de tomate silvestre. La abundancia relativa de los transcritos se determinó mediante qRT-PCR a partir de RNA total de los órganos indicados: R raíz, T tallo, HJ hoja Joven, HM hoja madura, BF botones florales y F flores. Los valores de las barras corresponden al promedio de la expresión de cada gen relativa \pm error estándar de 3 réplicas biológicas, normalizados con el gen de expresión constitutiva *SolycGAPDH*.

IX.1.3 La expresión del gen *SchDD1-like* se incrementa frente a estrés salino, sequía y tratamiento con ABA.

Con el propósito de evaluar el comportamiento transcripcional del gen *SchSDD1-like* bajo condiciones de estrés abiótico, plantas de tomate silvestre fueron sometidas a estrés salino, sequía y tratamiento con la fitohormona ABA.

a) Estrés salino

Plantas de *S. chilense* que habían sido crecidas en sustrato perlita: vermiculita (1:1) y regadas durante 8 semanas con medio nutritivo Hoagland, fueron regadas con 300 mM de NaCl y evaluadas durante un periodo de 8 días. Con el objetivo de determinar que el estrés salino estaba afectando a las plantas, un conjunto de parámetros fisiológicos fueron medidos, tales como la fotosíntesis (Pn), el déficit en la presión de vapor foliar (VPD), la conductancia estomática (Gs) y transpiración (E). La **Figura 15** muestra, que mientras en las plantas control (regadas solo con agua), los parámetros fisiológicos indicados se mantenían o se incrementaban levemente, en el caso de las plantas tratadas se producía una acentuada reducción de ellos la cual se iniciaba a las 24h de tratamiento, los que fueron incrementándose a medida que transcurría el ensayo. Adicionalmente, se evaluó el perfil transcripcional del gen *SITSW12 (SchTSW12-like)*, el cual fue utilizado como un indicador molecular de la percepción de estrés por parte de las plantas, ya que ha sido reportado que incrementa su expresión bajo condiciones de salinidad en tomate (Torres-Schumann *et al.*, 1992; Orellana *et al.*, 2010) (**Figura 16**). Este gen mostró una significativa inducción transcripcional respecto a la condición control a partir de las 3h de iniciado el estrés salino y mostrando diferentes niveles de expresión durante el tiempo de duración del ensayo. Por tanto, considerando estos resultados en su conjunto (fisiológicos y moleculares), fue posible establecer que efectivamente las plantas de *S. chilense* sometidas al riego con la solución de NaCl, estaban bajo condiciones de estrés salino.

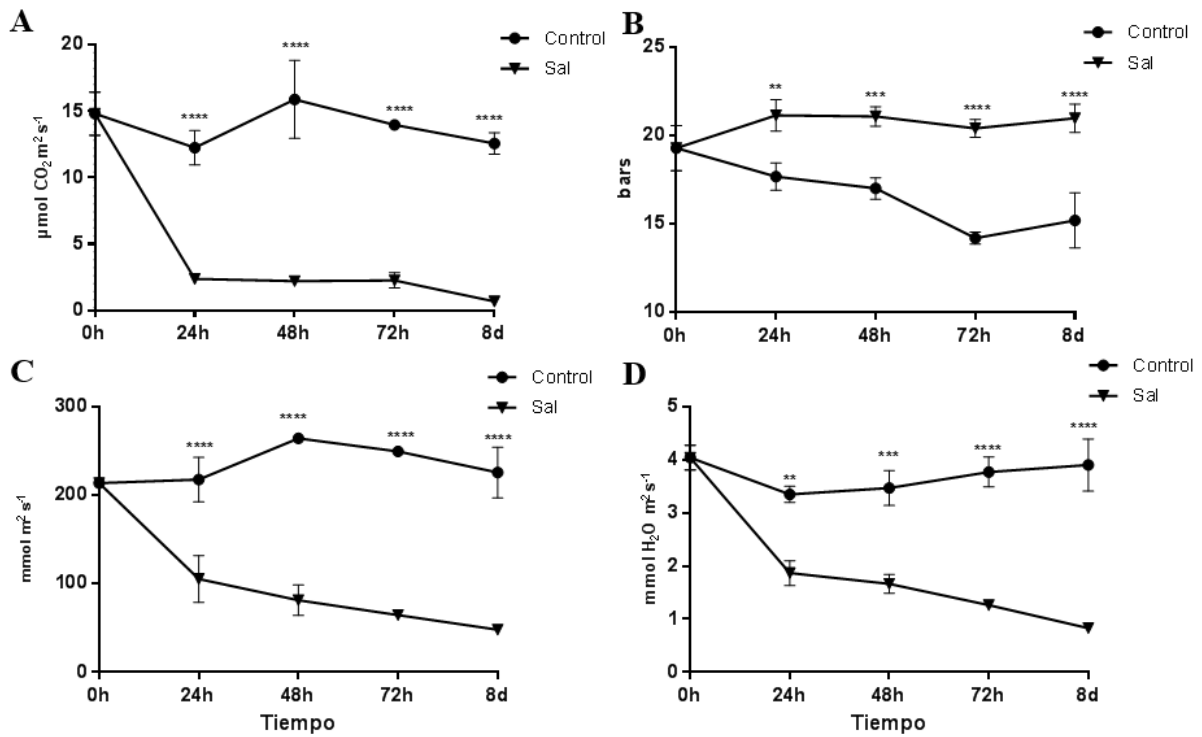


Figura 15 Evaluación de parámetros fisiológicos bajo condiciones de estrés salino en plantas de *S. chilense*. Plantas de 8 semanas de edad fueron tratadas con 200 ml de una solución 300 mM NaCl. (A) Fotosíntesis neta, (B) déficit en la presión de vapor, (C) conductancia estomática y (D) transpiración de plantas cada 24h post-riego con la solución salina. Cada punto indica el valor promedio \pm error estándar ($n=3$). Las barras con asteriscos indican diferencias significativas entre ambos tratamientos (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ y **** $P<0.0001$).

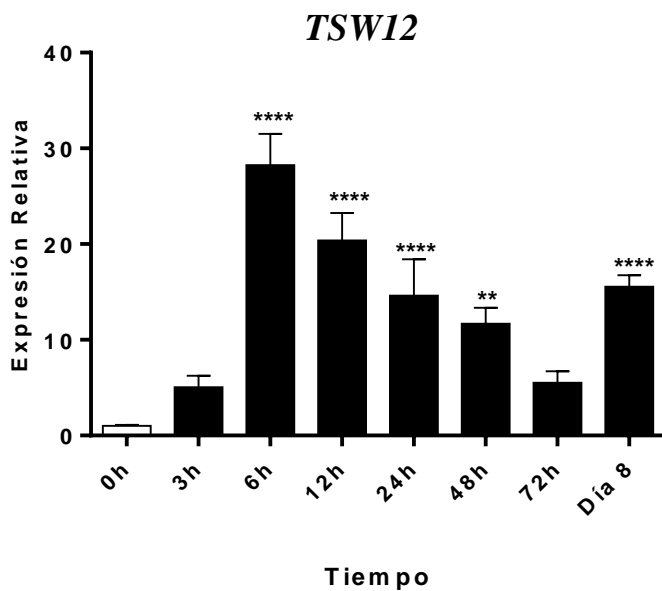


Figura 16 Perfil de expresión de TSW12 (*SchTSW12*-like) en plantas wild-type de *S. chilense* expuestas a estrés salino. Análisis de expresión fueron evaluados por qRT-PCR usando RNA total extraído de raíces de plantas de 8 semanas de edad después de aplicación de tratamiento de estrés salino (300 mM NaCl) por el periodo de tiempo indicado. Las barras indican los valores promedio de expresión relativa \pm error estándar ($n=3$) de dos experimentos independientes, normalizados con el gen de expresión constitutiva GAPDH. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión entre ambos tratamientos (** $P<0.01$ y **** $P<0.0001$).

Una vez constatada la condición de estrés salino en las plantas de *S. chilense*, se procedió a determinar los niveles de transcritos de *SchSDD1-like* en hojas y tallos. La **Figura 17** muestra que el gen *SchSDD1-like* se induce durante todo el periodo de evaluación, tanto en tejido foliar como en tallo. Sin embargo, la expresión en hojas era significativamente superior respecto a tallos, observándose una inducción de hasta 13 veces a las 12h de iniciado el tratamiento, respecto de la expresión observada a tiempo 0 (control). En hoja, pasadas las 12h de tratamiento, se visualizó un comportamiento oscilante en la expresión del gen, aunque siempre ésta fue superior respecto a lo observado en la planta control (0h).

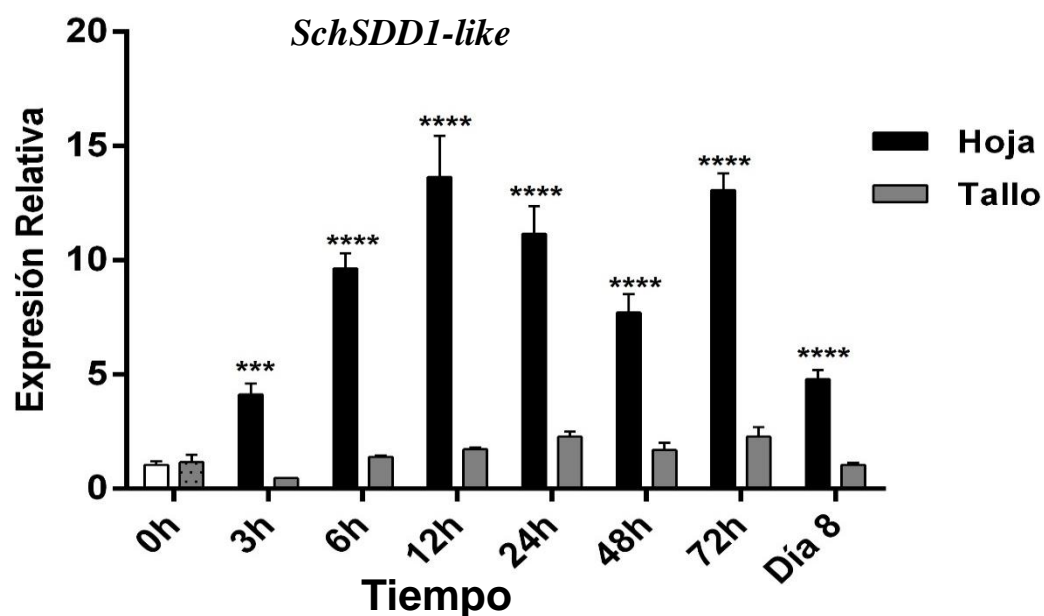


Figura 17 Perfil de expresión de *SchSDD1-like* en plantas wild-type de *S. chilense* expuestas a estrés salino. Análisis de expresión fueron evaluados por qRT-PCR usando RNA total extraído de hojas y tallo de plantas de 8 semanas de edad después de aplicación de tratamiento de estrés salino (300 mM NaCl) por el periodo de tiempo indicado. A tiempo 0h, la barra blanca y gris punteada, señalan la expresión relativa control de hoja y tallo, respectivamente. Las barras indican los valores promedios de expresión relativa \pm error estándar ($n=3$) de dos experimentos independientes, normalizados con el gen de expresión constitutiva GAPDH. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión entre ambos tratamientos (** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$).

b) Estrés por déficit hídrico

Con la finalidad de investigar también la respuesta de *SchSDD1-like* frente a estrés por déficit hídrico, se examinaron los perfiles transcripcionales en hojas de plantas silvestres de *S. chilense* expuestas a sequía (6 días de privación de riego; **Figura S1-II**). Con el mismo objetivo que en el caso del estrés salino, también se determinaron parámetros fisiológicos y moleculares que pudieran dar cuenta del efecto del estrés aplicado sobre las plantas (**figura 18**). Además de los parámetros fisiológicos determinados en el estrés salino, se incluyó el contenido relativo de agua (CRA, RWC *del inglés*), el cual es el mejor parámetro para determinar el estatus hídrico de la planta (Ganji Arjenaki *et al.*, 2012).

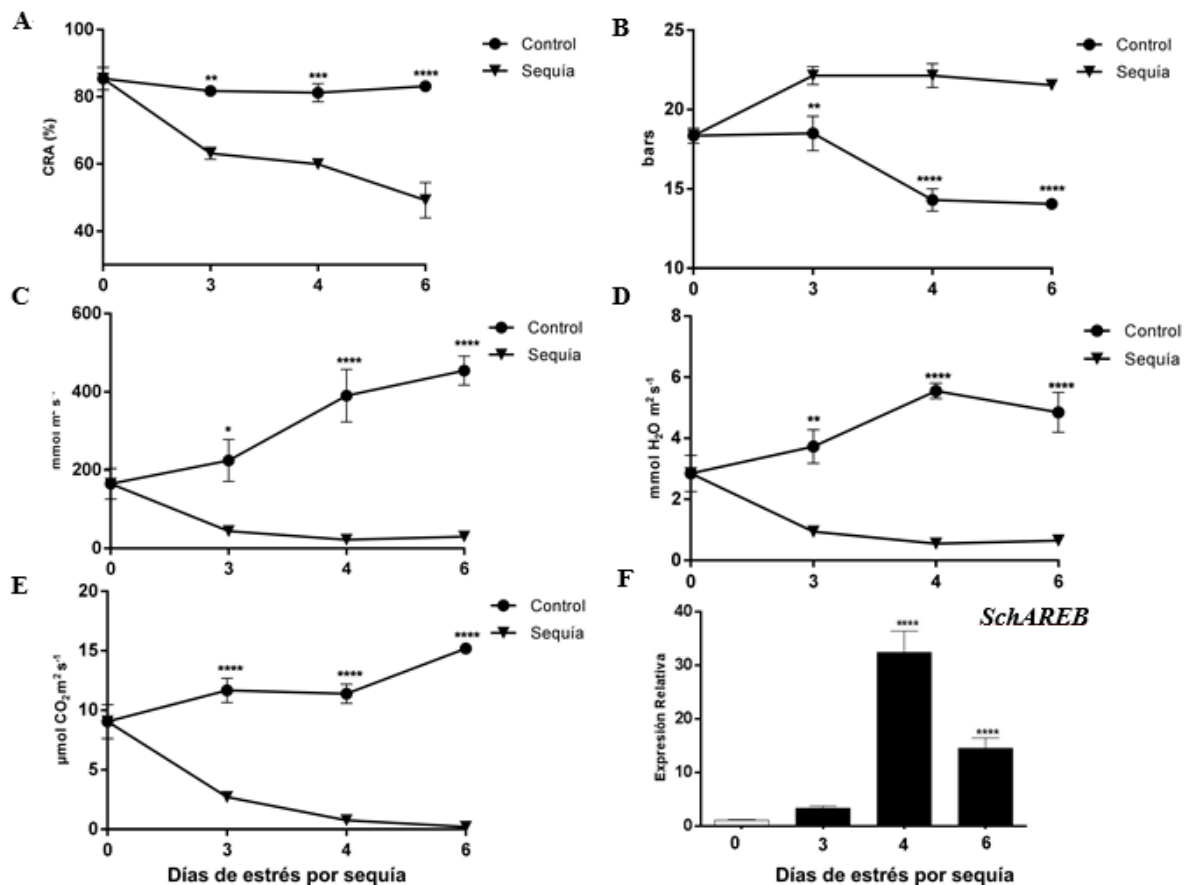


Figura 18 Evaluación de parámetros fisiológicos y moleculares bajo condiciones de estrés por sequía en plantas de *S. chilense*. Plantas de 8 semanas de edad fueron dejadas de regar. (A) Contenido relativo de agua, (B) déficit en la presión de vapor, (C) conductancia estomática, (D) transpiración, (E) fotosíntesis neta de plantas tratadas. (F) Perfil de expresión de SIAREB (*SchAREB1-like*). Análisis de expresión fueron evaluados por qRT-PCR usando RNA total extraído de hojas después de aplicación de tratamiento de estrés por el periodo de tiempo indicado. Las barras indican los valores promedios de expresión relativa \pm error estándar ($n=3$) de dos experimentos independientes, normalizados con el gen de expresión constitutiva *GAPDH*. Cada punto indica el valor promedio \pm error estándar ($n=3$). Las barras con asteriscos indican diferencias significativas entre ambos tratamientos (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ y **** $P<0.0001$).

Tesis: "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"

Efectivamente, el CRA indicó que las plantas estaban severamente afectadas durante el periodo de estrés, disminuyendo aproximadamente en un 50% hacia el día 6 comparado con la planta control (**Figura 18A**). La fotosíntesis es uno de los procesos fisiológicos que mayormente se ve afectado bajo condiciones de estrés, observándose una disminución significativa a los 3 días de tratamiento por déficit hídrico, manteniéndose muy por debajo de lo medido en las plantas bien irrigadas (**Figura 18E**). El mismo comportamiento se observó en la determinación de la conductancia estomática (**Figura 18C**) y en la transpiración (**Figura 18D**), indicando que la planta cerró sus estomas para disminuir la pérdida de agua. Así mismo, se observó un aumento en la presión de vapor en las plantas estresadas, lo cual concuerda a lo descrito en la literatura (Streck, 2003), ya que esto se debe a un “esfuerzo” de la planta por aumentar la tasa de absorción radicular de agua. Como un indicador molecular de la percepción de estrés por déficit hídrico por parte de las plantas, se evaluó el perfil transcripcional del gen *SIAREB1* (*SchAREB1-like*) que codifica para un factor de transcripción perteneciente a la familia bZIP el cual ha sido reportado que incrementa su expresión bajo condiciones déficit hídrico en tomate (Orellana *et al.*, 2010) (**Figura 18F**). Éste, mostró un perfil transcripcional significativamente incrementado respecto a la condición control en todos los tiempos de muestreo. Estos datos en conjunto, mostraron que las plantas se encontraban bajo una condición de estrés por déficit hídrico, lo cual permite evaluar bajo esta condición el comportamiento transcripcional de *SchSDD1-like*.

Para evaluar el perfil transcripcional de *SchSDD1-like* bajo estrés por sequía en plantas de *S. chilense*, se extrajo RNA total de hojas, descartándose otros órganos o tejidos debido a la muy baja expresión exhibida bajo condiciones normales (**figura 14**) y la baja inducción en tallo bajo condiciones salinas (**figura 17**). Tal como lo indica la **Figura 19**, el análisis mediante qPCR mostró que el gen *SchSDD1-like* presentó una significativa inducción al día 3 de iniciado el tratamiento. Sin embargo, mostró una marcada represión en los siguientes días de estrés evaluados.

Considerando que si *SchSDD1-like* está involucrado en la represión del desarrollo de estomas en tomate y es inducido por sequía (y también por salinidad), entonces los putativos genes *maestros* del desarrollo de estomas en *S. chilense* probablemente serían afectados en su expresión génica bajo esta condición de estrés. Para analizar esta situación, se determinó el perfil transcripcional de *SchSPCH-like*, *SchMUTE-like* y *SchFAMA-like*. La **figura 20** muestra que los dos primeros genes descritos, muestran una modulación bajo sequía. *SchSPCH-like* exhibió una respuesta más rápida que *SchMUTE-like*, iniciando su represión a los 3 días de iniciado el tratamiento, haciéndose mayor a los 4 y 6 días donde

fue similar a la observada en *SchMUTE*. En cuanto a *SchFAMA-like*, no se observó una variación significativa en su expresión génica bajo las condiciones de estrés del ensayo.

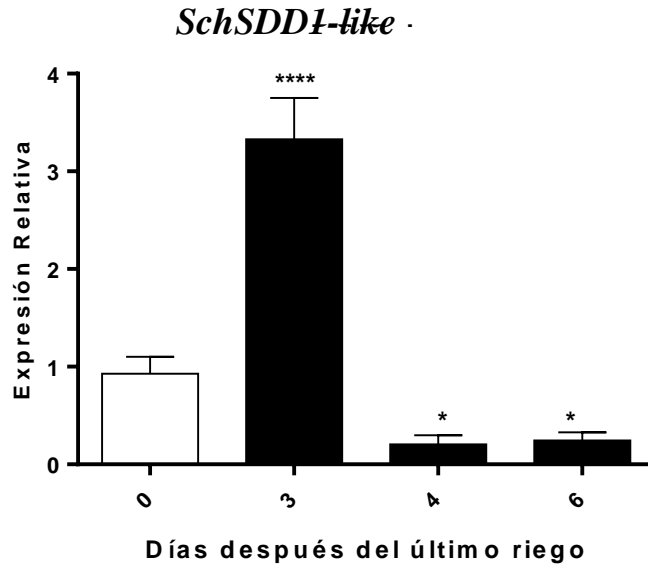


Figura 19 Perfil de expresión de *SchSDD1-like* en plantas wild-type de *S. chilense* expuestas a sequía. Análisis de expresión fueron evaluados por qRT-PCR usando RNA total extraído de hojas de plantas de 8 semanas de edad después de la aplicación del tratamiento por el periodo de tiempo indicado. A tiempo 0h, la barra blanca, señala la expresión relativa control de hoja. Las barras indican los valores promedios de expresión relativa \pm error estándar ($n=3$) de dos experimentos independientes, normalizados con el gen de expresión constitutiva GAPDH. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión entre ambos tratamientos (* $P<0.05$; y **** $P<0.0001$)

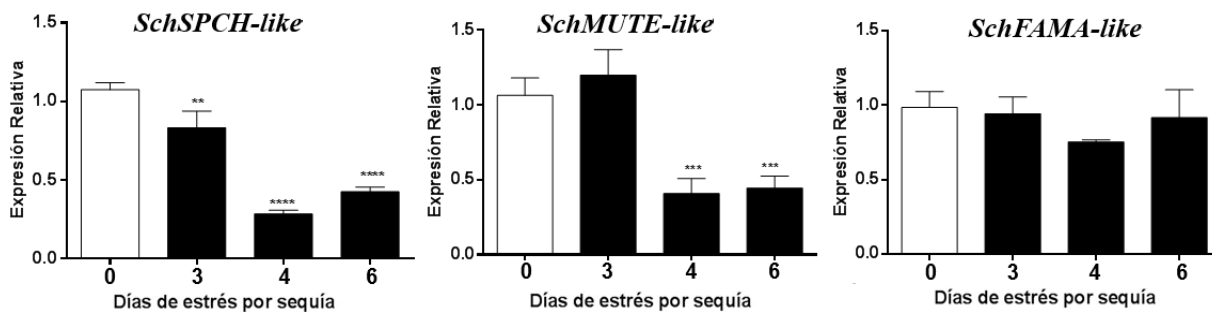


Figura 20 Perfil de expresión de los posibles genes maestros del desarrollo estomático en plantas wild-type de *S. chilense* expuestas a sequía. Análisis de expresión fueron evaluados por qRT-PCR usando RNA total extraído de hojas de plantas de 8 semanas de edad después de la aplicación del tratamiento por el periodo de tiempo indicado. A tiempo 0h, la barra blanca, señala la expresión relativa control de hoja. Las barras indican los valores promedios de expresión relativa \pm error estándar ($n=3$) de dos experimentos independientes, normalizados con el gen de expresión constitutiva GAPDH. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión entre ambos tratamientos (** $P<0.01$; *** $P<0.001$ y **** $P<0.0001$).

c) Tratamiento con ABA

Considerando que *SchSDD1-like* incrementa su expresión bajo salinidad y sequía, la posibilidad de que también respondiera a la acción de Ácido Abscísico requería de análisis; sobre todo porque ABA es considerada la señal química más importante para generar respuestas de la planta frente a condiciones de estrés abiótico, tales como frío, salinidad y sequía (Christmann *et al.*, 2005). Además, esta hormona participa de manera central en la función estomática (Cutler *et al.*, 2010). Por tanto, para poder aproximarse al conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en el efecto de ABA en la densidad estomática, se evaluó la expresión de *SchSDD1-like*, *SchSPCH-like*, *SchMUTE-like* y *SchFAMA-like*, todos ellos probablemente relacionados con el control de la diferenciación estomática en tomate *S. chilense*. El ensayo consistió en la aplicación exógena de esta hormona en una concentración de 100 μM a plantas de tomate silvestre de ocho semanas de edad. La **figura 21** indica que los niveles de expresión de *SchSDD1-like* fueron inducidos en forma significativa a la hora de tratamiento y mantuvieron tal tendencia durante las 24h del análisis, siendo a las 12h de iniciado el tratamiento el punto máximo de expresión, alcanzando una acumulación de transcritos 15 veces mayor al control. Estos datos sugieren que la expresión génica de esta serino-proteasa tiene un papel potencial en la modulación de la densidad estomática como una respuesta fisiológica y anatómica inducible por ABA en las hojas nuevas de la planta.

Al igual que bajo sequía, si *SchSDD1-like* se induce por ABA y reprime el desarrollo estomático, entonces los factores de transcripción involucrados en la producción estomática, debiesen también reducir su nivel de expresión. La **figura 22** muestra el perfil transcripcional de tales genes. Similar a lo observado en condiciones de sequía, *SchSPCH-like* y *SchMUTE-like* reprimen significativamente su expresión génica durante los tiempos evaluados. Tanto *SchSPCH-like* y *SchMUTE-like* mostraron una significativa represión a 1h y 24h de iniciado el tratamiento. Adicionalmente, *SchSPCH-like* también mostró una disminución en sus niveles de transcritos a las 12h post aplicación de ABA. Por contraste, *SchFAMA-like* no presentó variación transcripcional significativa durante el transcurso del ensayo. Para corroborar el efecto de ABA sobre las plantas y de esta manera poder validar los resultados de expresión génica, se utilizó como marcador molecular el gen inducible por ABA *SIAREB1* (*SchAREB1-like*), el cual se ha reportado que se induce bajo este tratamiento (Orellana *et al.*, 2010). La inducción observada en el perfil transcripcional de este gen, indica que efectivamente las plantas están percibiendo la señal de ABA, validando los resultados obtenidos bajo estas condiciones.

Tesis: "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"

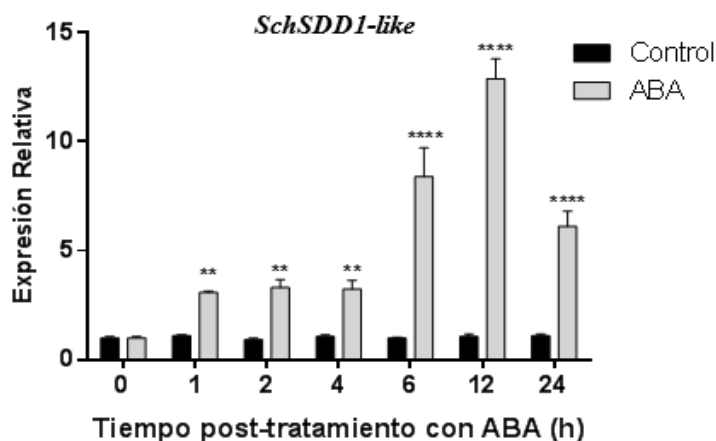


Figura 21 Perfil de expresión de *SchSDD1-like* en plantas *wild-type* de *S. chilense* tratadas con ABA exógeno. Análisis de expresión fueron evaluados por qRT-PCR usando RNA total extraído de hojas de plantas de 8 semanas de edad después de aplicación exógena de 100 μ M ABA sobre tejido foliar por el periodo indicado. Las barras indican los valores promedios de expresión relativa \pm error estándar, normalizados con gen de expresión constitutiva GAPDH. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión entre ambos tratamientos (** $P < 0.01$; y **** $P < 0.0001$).

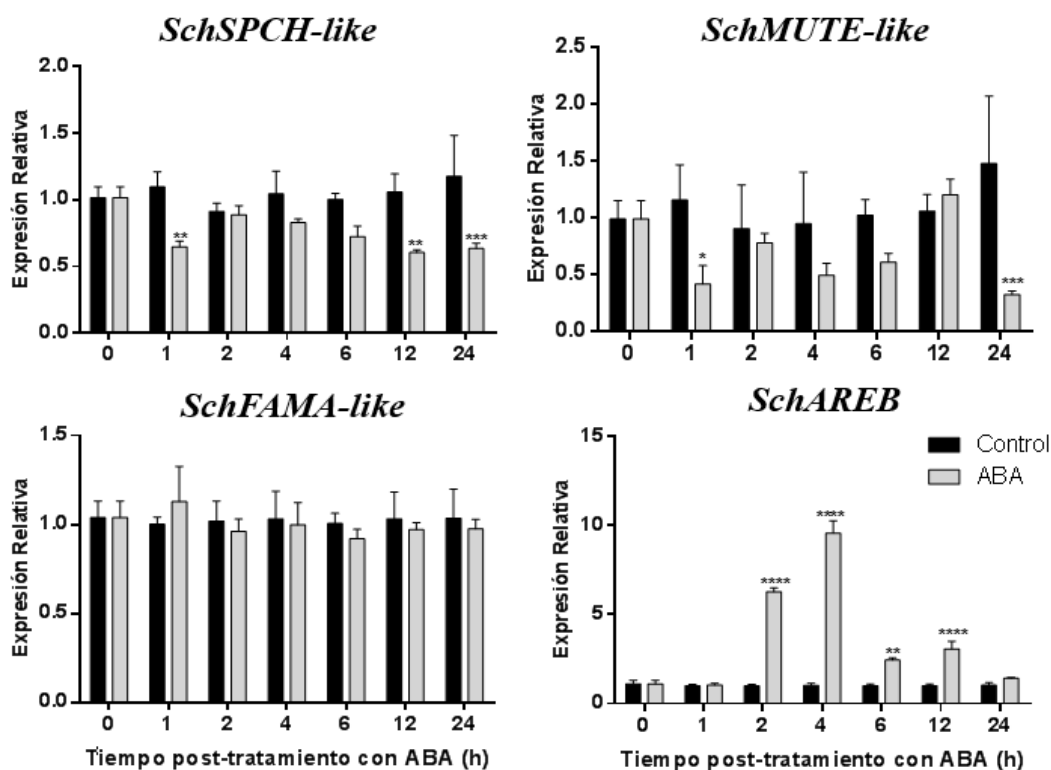


Figura 22 Perfil de expresión de los posibles genes maestros del desarrollo estomático en plantas *wild-type* de *S. chilense* tratadas con ABA exógeno. Análisis de expresión fueron evaluados por qRT-PCR usando RNA total extraído de hojas de plantas de 8 semanas de edad después de la aplicación del tratamiento por el periodo de tiempo indicado. A tiempo 0h, las barras señalan la expresión relativa control de hoja. AREB (*SchAREB1-like*) fue utilizado como marcador de inducción por ABA. Las barras indican los valores promedios de expresión relativa \pm error estándar ($n=3$) de dos experimentos independientes, normalizados con el gen de expresión constitutiva GAPDH. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión entre ambos tratamientos (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$).

Tesis: "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"

Tomando estos resultados en su conjunto, sugieren que el control del desarrollo estomático se ve afectado en las hojas nuevas por salinidad, sequía y ABA, a la inducción de *SchSDD1-like*, un posible activador de la ruta de control negativa de estomas, así como por la represión de los putativos genes maestros *SchSPCH-like* y *SchMUTE-like* involucrados en la producción estomática en la epidermis de las hojas de *S. chilense*.

IX.II.4 Figuras suplementarias Capítulo II

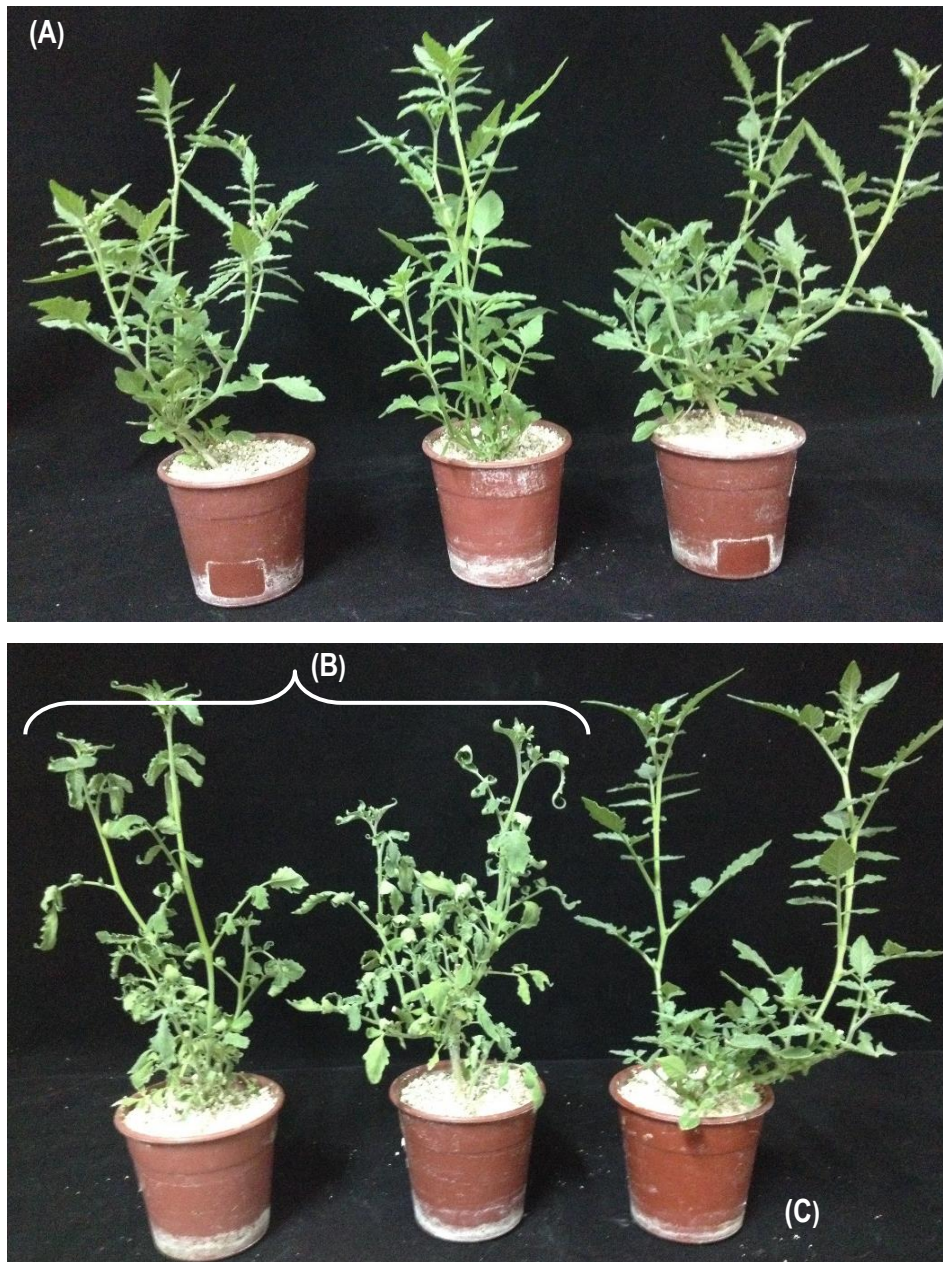


Figura S1-II. Evolución del fenotipo durante el estrés por sequía en plantas de *S. chilense*. Plantas de 8 semanas de edad fueron dejadas de regar. **(A)** Estado de las plantas al momento de iniciar el ensayo de estrés (plantas control), **(B)** Estado de las plantas a 6 días de dejar de regar las plantas. **(C)** Fenotipo control de las plantas regadas normalmente durante los días de estrés. Nótese el fenotipo marchito de las plantas.

CAPÍTULO III: ESTUDIO FUNCIONAL DE *SchSDD1-like* EN PLANTAS HETERÓLOGAS: EFECTO EN LA ABUNDANCIA ESTOMÁTICA Y EN LA TOLERANCIA A DÉFICIT HÍDRICO

IX.III.1 El gen *SchSDD1-like* restaura fenotipo de la línea mutante *sdd1-3* de *A. thaliana*.

Para determinar si *SchSDD1-like* presenta un comportamiento funcional similar a su homólogo de *Arabidopsis SDD1*, se realizó un experimento que consistió en sobreexpresar el gen *SchSDD1-like* en el genotipo mutante *sdd1-3* de *Arabidopsis thaliana*. Esta mutante, al igual que los alelos *sdd1-1* (Berger y Altman, 2000) y *sdd1-2* (J. Nadeau y F. Sack, datos no publicados), se caracteriza por presentar una densidad estomática en las hojas 2,5 a 3 veces mayor respecto a la planta silvestre, además de un alterado patrón de espaciamiento entre los estomas, generado agrupamientos entre ellos (*clusters*). A diferencia de los otros 2 alelos mutantes quienes tienen un codón stop en su secuencia, el alelo *sdd1-3* contiene una mutación puntual que convierte el residuo de Glicina⁵⁶⁰ en Glutámico. Esta mutación es parte de los residuos consenso presentes en la región S de la proteína (**figura 13**), lo que afecta el entorno catalítico de la Serina⁵⁵² la cual es clave para la función proteasa de SDD1, generando entonces una proteína no funcional.

El gen *SchSDD1-like* fue clonado en el vector pBI121 y dirigido por el promotor CaMV 35S (*35S:SchSDD1_like*), siendo entonces utilizado para transformar plantas de la línea mutante *sdd1-3* de *A. thaliana* (Delgado *et al.*, 2012). Se generaron varias líneas transgénicas, seleccionándose 4 de ellas para los análisis posteriores. La **figura 23** muestra la expresión del gen *SchSDD1-like* de estas 4 líneas T1. Como control se utilizaron plantas wild-type y la línea mutante *sdd1-3* no transformadas. El análisis morfológico de las plantas transgénicas y *sdd1-3* durante su ciclo de vida bajo condiciones de invernadero, no evidenció diferencia entre ambos genotipos.

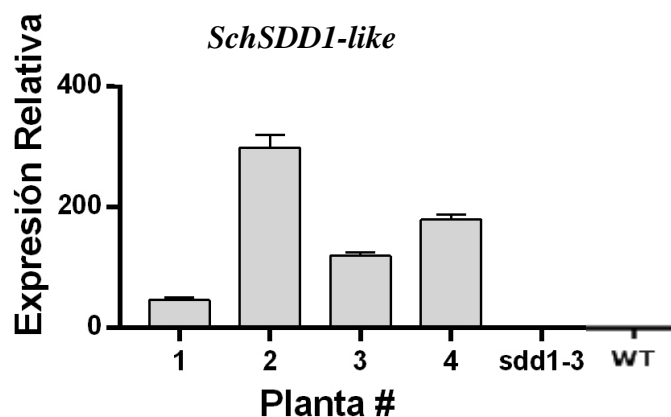


Figura 2 Análisis de expresión en plantas mutantes *sdd1-3* de *Arabidopsis* complementadas con el gen *SchSDD1-like* aislado del *S. chilense*. Los niveles de transcritos del gen *SchSDD1-like* fueron evaluados mediante qPCR a partir de cDNA sintetizado desde RNA total de hojas de plantas silvestres (WT), mutantes y complementadas. La expresión relativa de *SchSDD1-like* se calculó usando el gen de expresión constitutiva *F-box* y los valores corresponden a la media \pm error estándar a partir de tres replicas biológicas.

Considerando los antecedentes reportados de *AtSDD1*, cuya expresión es predominantemente en la epidermis de las hojas en desarrollo (Von Groll *et al.*, 2002) y en hojas jóvenes para *SchSDD1-like* (**figura 14**), se realizaron moldes en resina dental de la cara abaxial de hojas completamente expandidas de la roseta de las líneas transgénicas complementadas y de la mutante *sdd1-3*, para luego tomar una impresión y observarlas al microscopio óptico. Previo a esto, se realizó el mismo análisis en cotiledones de plantas de 20 días de edad para observar el fenotipo estomático de la mutante y la planta transgénica (**Figura S1-III**). La **Figura 24** indica que las hojas analizadas de las líneas complementadas presentaron una reducción en la abundancia y en la distribución estomática en la epidermis de sus hojas respecto a la planta mutante *sdd1-3*. Los estomas observados en las plantas transgénicas, presentaron una morfología normal aunque de mayor tamaño. De igual forma, las células del pavimento (epidermales) fueron de mayor tamaño. No se observaron otras características anómalas o aberrantes. Sin embargo, se apreciaron en algunos campos visuales la permanencia de algunos estomas agrupados característicos del fenotipo mutante (**figura 24C&D**)

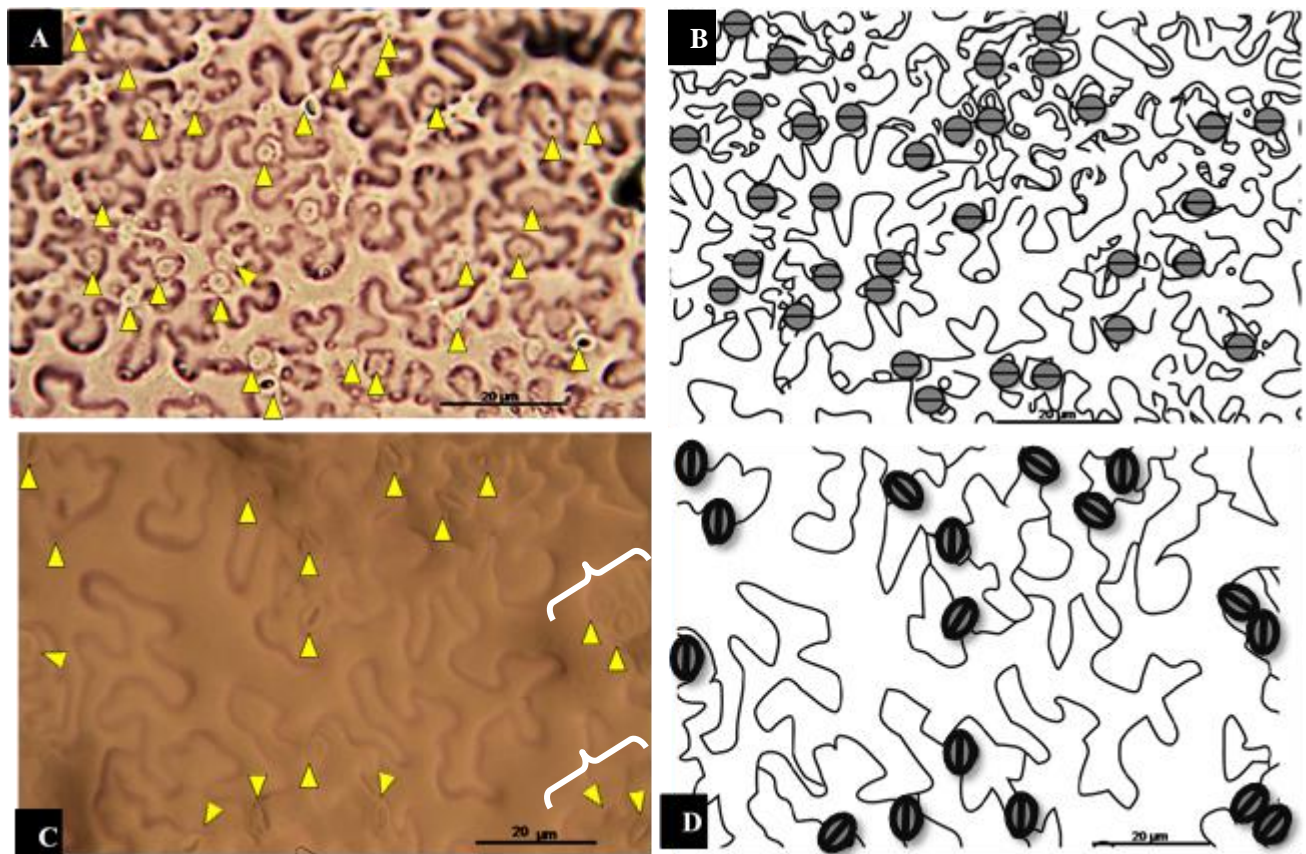


Figura 3 Impresiones de resina dental de hojas completamente expandidas de plantas mutantes *sdd1-3* de *Arabidopsis* complementadas con el gen *SchSDD1-like*. (A) y (C) micrografía óptica de la epidermis abaxial de *sdd1-3* y de la línea transgénica complementada #2, respectivamente. Las flechas blancas indican los estomas. Los corchetes muestran la presencia de estomas agrupados (clusters) característicos del fenotipo mutante. (B) y (D) imágenes representativas de la epidermis abaxial de las mismas plantas. Las células del pavimento y los estomas están ilustrados en blanco y gris, respectivamente.

Comparado con la planta *sdd1-3* de *Arabidopsis*, las plantas complementadas con *P_{35S}:SchSDD1-like* mostraron una reducción en la densidad estomática. Tal como lo señala la **figura 25**, la cuantificación de los estomas de la cara abaxial de las hojas de las plantas complementadas, mostró que la reducción en la densidad estomática fue de $55,4\% \pm 1,50\%$ para el caso de la línea #1, de $67,7\% \pm 2,5\%$ para la línea #2, de $61,8\% \pm 1,7\%$ para la línea #3, de $57,6\% \pm 1,5\%$ para la línea #4. Este análisis también reveló que todas las líneas transgénicas, a excepción de la línea #2, no presentaron una densidad estomática significativamente inferior a la que se observó en las plantas wild-type de *Arabidopsis*.

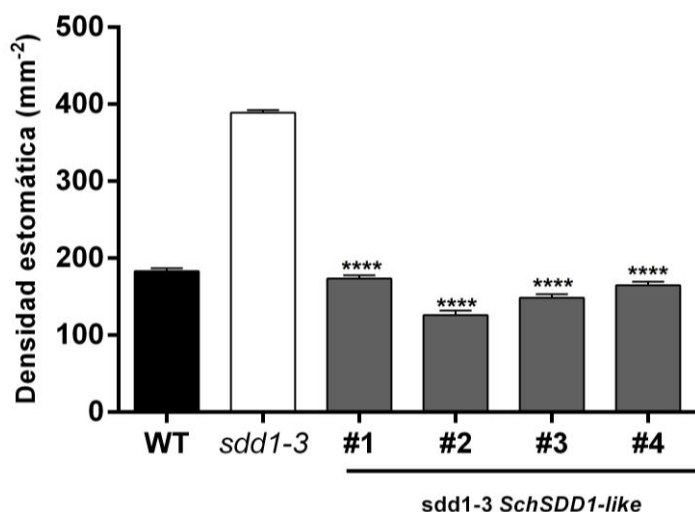


Figura 4 Densidad estomática en plantas de *Arabidopsis silvestre* (WT), mutante *sdd1-3* y complementadas con el gen *SchSDD1-like*. La cuantificación fue realizada en la epidermis abaxial de hojas de roseta completamente expandidas. Los datos son el promedio de tres plantas individuales. Los * indican diferencias significativas respecto a la planta mutante (prueba-t Student's, $P < 0,0001$)

Considerando que el control de la densidad estomática es regulado positivamente por los genes maestros *AtSPCH*, *AtMUTE* y *AtFAMA*, resultó interesante determinar el nivel de expresión de estos genes en la planta mutante *sdd1-3* y compararlos con lo que ocurre en las plantas complementadas. Para este análisis, se consideraron la línea complementada #2 y #4, debido a que son las que presentan la mayor expresión del transgen (**figura 23**) y la disminución en la densidad estomática más significativa (**figura 25**).

La comparación se inició con un análisis de la expresión de los genes *SPCH*, *MUTE* y *FAMA* en *sdd1-3*. Este antecedente permitiría entender el fenotipo de exceso de desarrollo de estomas en la planta *sdd1-3* y relacionarlo con la abundancia estomática observada (2,2 veces más elevado que en las plantas silvestre aproximadamente). La **Figura 26** muestra el análisis comparativo de expresión génica entre *col-0* (WT) y *sdd1-3*, el cual claramente indica una alta inducción de los tres genes en hojas jóvenes en desarrollo (~3cms de longitud). Comparado con la expresión en plantas silvestres, *SPCH* esta inducido 5,6 veces, *MUTE* lo está 3,9 veces y *FAMA* 7,62 veces. Este resultado relacionaría la actividad de *SDD1* con una regulación transcripcional de los reguladores positivos, lo que explicaría, en parte, la alta densidad estomática observada en la mutante *sdd1-3*.

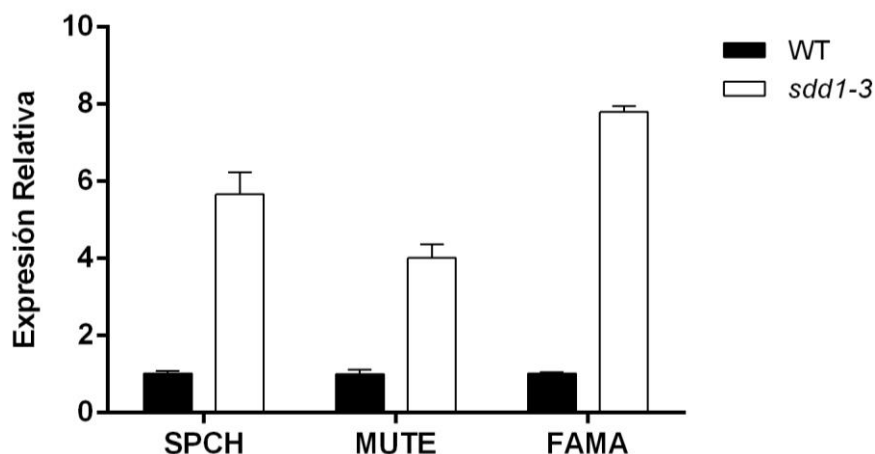


Figura 5 qPCR de genes implicados en el desarrollo de estomas en plantas mutante *sdd1-3* de *Arabidopsis*. Expresión de SPCH, MUTE y FAMA en plantas silvestres y mutantes para *AtSDD1*. El RNA fue aislado de hojas jóvenes de ambas plantas. Los niveles relativos fueron calculados respecto al gen *F-box*. Los valores corresponden a la media \pm error estándar a partir de cinco replicas biológicas.

Luego de verificar la alta actividad transcripcional de los genes *maestros* en la mutante, se realizó el mismo análisis anterior en las plantas complementadas con *P_{35S}:SchSDD1-like* y observar si esta sobreexpresión tendría algún efecto sobre estos factores de transcripción. Tal como muestra la **figura 27**, los niveles de transcritos de estos genes fueron drásticamente disminuidos en las plantas complementadas con *P_{35S}:SchSDD1-like* las cuales también mostraron una densidad estomática comparable a las plantas silvestres (*col-0*). Por lo tanto, los resultados de complementación génica obtenidos, permiten señalar que el gen *SchSDD1-like* es el más probable homólogo funcional del *AtSDD1* involucrado en el control de la densidad y distribución de los estomas en las hojas de *S. chilense*. Por otra lado, estas evidencias permitieron determinar que la señal generada producto de la expresión de *SDD1-like* ejerce un efecto negativo en la regulación transcripcional de los genes involucrados en la ruta de desarrollo de estomas en *Arabidopsis* y probablemente también en los genes de *Solanum chilense*.

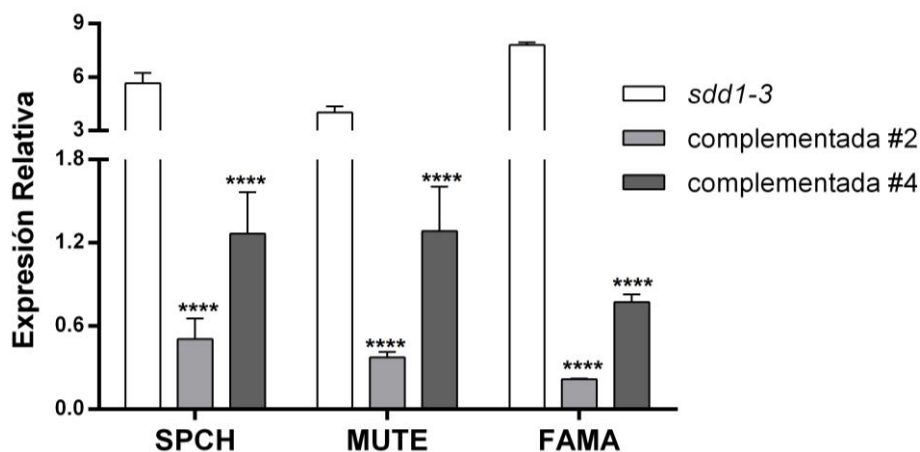


Figura 6 qPCR de genes implicados en el desarrollo de estomas en plantas mutantes *sdd1-3* de *Arabidopsis* complementadas con el gen *SchSDD1-like* de *S. chilense*. Expresión de SPCH, MUTE y FAMA en plantas *sdd1-3* y de las líneas complementadas que mostraron la mayor expresión del transgen. El RNA fue aislado de hojas jóvenes de ambas plantas. Los niveles relativos fueron calculados respecto al gen *F-box*. Los valores corresponden a la media \pm error estándar a partir de tres replicas biológicas. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión respecto a la planta mutantes ($P < 0,0001$).

IX.III.2 La sobreexpresión de *SchSDD1-like* reduce la densidad estomática en las hojas de *Arabidopsis*

Considerando que *SchSDD1-like* mostró ser un gen inducible por sequía y ABA (**Figura 19 y 21**), observándose un comportamiento similar en su homólogo de *Arabidopsis* (**Figura 7 y 9**), se evaluó su potencial aplicación en la tolerancia al estrés por déficit hídrico en plantas. Con este objetivo, se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresaron de forma constitutiva este gen. La región codificante del gen *SchSDD1-like* dirigida por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, fue usada para transformar plantas silvestres de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0. Varias líneas transgénicas de *Arabidopsis* fueron analizadas para la expresión del transgen, observándose que ellas presentaron distintos niveles de expresión, y de las cuales se seleccionaron dos para análisis posteriores (**Figura 28**).

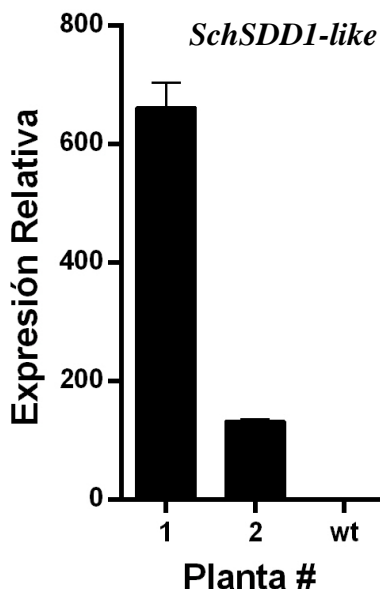


Figura 7 Expresión ectópica del gen *SchSDD1-like* aislado de *S. chilense* en *Arabidopsis*. Los niveles de transcritos del gen *SchSDD1-like* fueron evaluados mediante qPCR a partir de cDNA sintetizado desde RNA total de hojas de plantas silvestres (WT) y transgénicas. La expresión relativa de *SchSDD1-like* se calculó usando el gen de expresión constitutiva *F-Box* y los valores corresponden a la media \pm error estándar a partir de tres replicas biológicas.

El análisis morfológico realizado a las plantas silvestres y transgénicas T1 de *Arabidopsis*, no reveló diferencias a nivel de tejido vegetativo ni tampoco en sus estadios de desarrollo (**Figura S2-III**). Por ello, el análisis fenotípico de la epidermis de hojas completamente expandidas fue realizado mediante el método de la resina dental descrito. Comparado con la planta silvestre de *Arabidopsis*, las plantas $P_{35S}::SchSDD1-like$ mostraron una significativa disminución en la densidad estomática (**figura 29** y **Figura S3-III**). La cuantificación de los estomas de la cara abaxial de las hojas, indicó que la reducción en la densidad estomática fue de $33,7\% \pm 1,53\%$ para el caso de la línea #1 y de $18,5\% \pm 2,3\%$ para la línea #2. Como se aprecia en la **Figura 30**, hojas completamente expandidas de las líneas transgénicas presentaron diferencias evidentes en la abundancia estomática en la epidermis de sus hojas respecto a la Col-0, siendo este el único cambio fenotípico detectado. Los estomas observados en las plantas transgénicas, presentaron una morfología normal aunque de mayor tamaño. No se observaron otras características anómalas o aberrantes. Interesantemente, las células del pavimento (epidermales) fueron de mayor tamaño también.

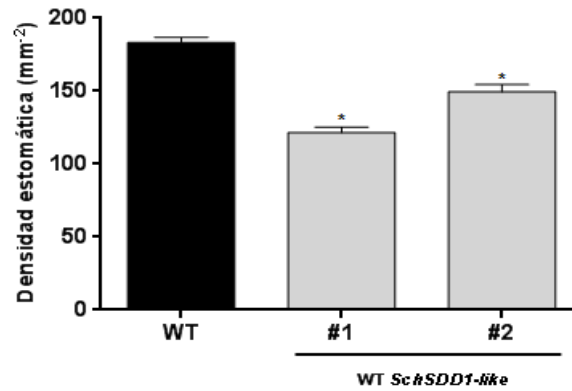


Figura 8 Densidad estomática (número de estomas por área) en plantas de *Arabidopsis* silvestres y sobreexpresoras del gen *SchSDD1-like*. La cuantificación fue realizada en la epidermis abaxial de hojas de roseta completamente expandidas. Los datos son el promedio de ocho plantas individuales. Los * indican diferencias significativas respecto a la planta silvestre (prueba-t Student's, $P < 0,05$)-

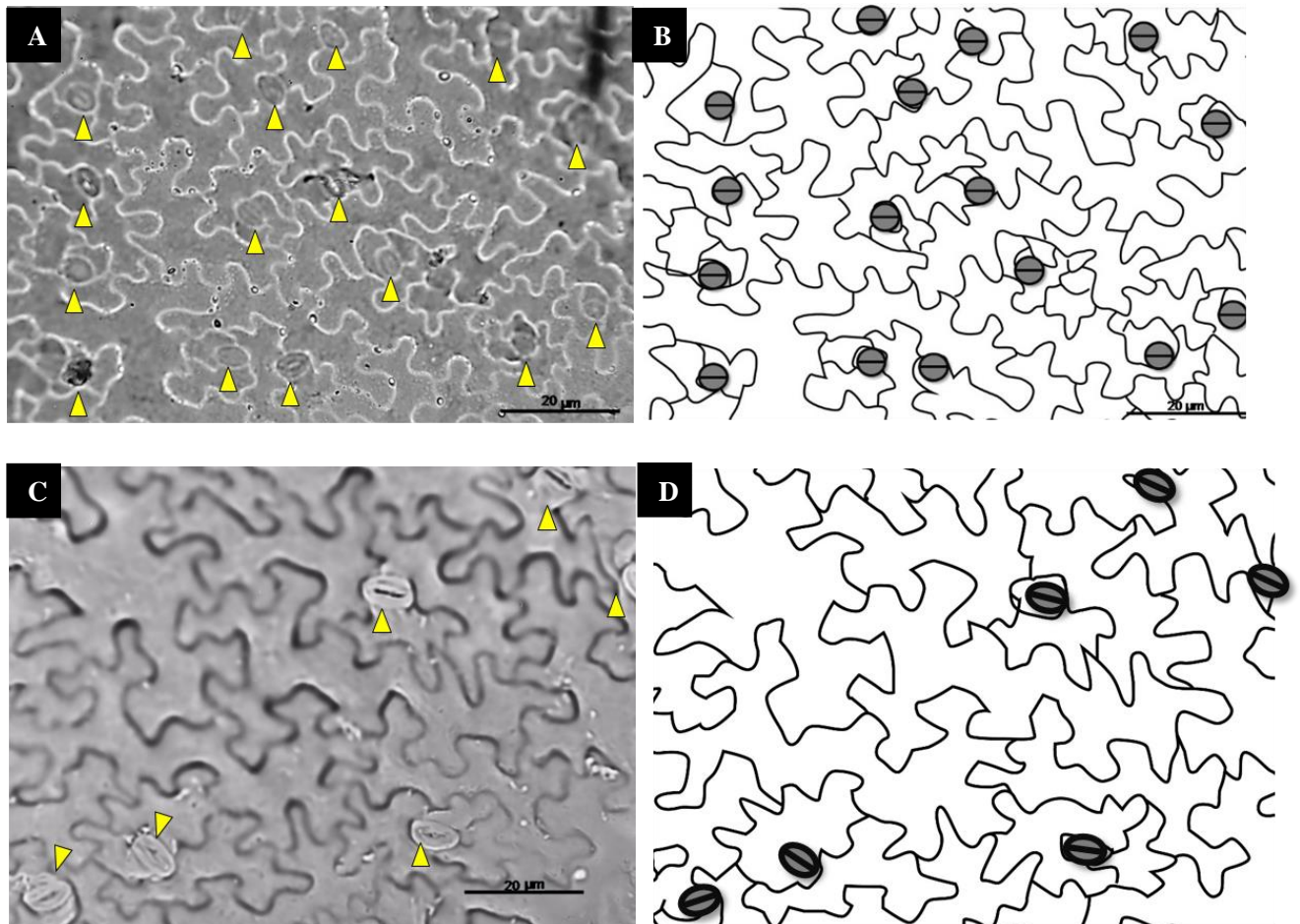


Figura 9 Impresiones de resina dental de hojas completamente expandidas de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *SchSDD1-like*. (A) y (C) micrografía óptica de la epidermis abaxial de wild-type y de la línea transgénica #1, respectivamente. Las flechas blancas indican los estomas. (B) y (D) imágenes representativas de la epidermis abaxial de las mismas plantas. Las células del pavimento y los estomas están ilustrados en blanco y gris, respectivamente.

Tesis: "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"

Los resultados del análisis fenotípico realizado a las plantas silvestres y transgénicas de *Arabidopsis*, indicaron que la sobreexpresión del *SchSDD1-like* afectó el desarrollo de estomas. Debido al efecto observado en la abundancia estomática de las plantas sobreexpresoras, fue importante determinar el nivel de expresión de *AtSPCH*, *AtMUTE* y *AtFAMA* en las plantas transgénicas y compararlos con las plantas silvestres. Por tanto, RNA total fue aislado de hojas jóvenes de la roseta de plantas de *Arabidopsis* y cuantificada la expresión los tres genes. Los niveles de transcritos de estos genes fueron significativamente menores en las plantas *P_{35S}:SchSDD1-like* como se muestra en la **figura 31**, las cuales también mostraron una menor densidad estomática. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión del gen *SchSDD1-like* reprime la expresión de los genes reguladores positivos del desarrollo estomático, disminuyendo la cantidad de estomas en la epidermis de las hojas de *Arabidopsis*

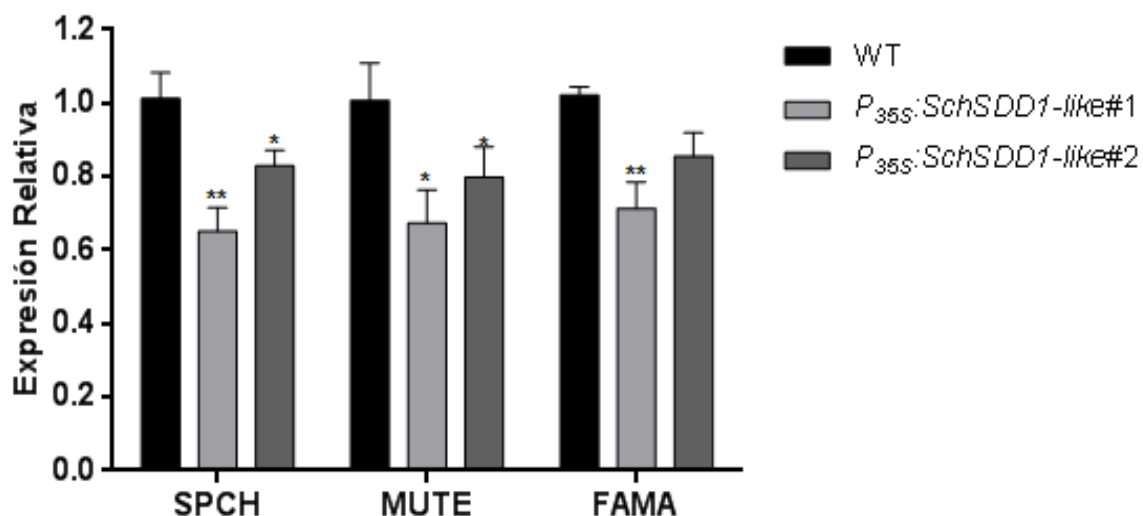


Figura 10 qPCR de genes implicados en el desarrollo de estomas en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Expresión de *SPCH*, *MUTE* y *FAMA* en plantas silvestres y *P_{35S}:SchSDD1-like*. El RNA fue aislado de hojas jóvenes de ambas plantas. Los niveles relativos fueron calculados respecto al gen *F-box*. Los valores corresponden a la media \pm error estándar a partir de tres replicas biológicas. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión respecto a la planta silvestres (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

En general, se observó que a mayor expresión del transgen, las plantas mostraron una mayor reducción del número de estomas (**Figura 28**), evidenciando la participación de este gen en el control de la abundancia estomática.

IX.III.3 La sobreexpresión del gen *SchSDD1-like* aumenta la tolerancia a la sequía en plantas transgénicas de *A. thaliana* mediante una disminución en la tasa de pérdida de agua.

La reducción en la densidad estomática observada en las plantas transgénicas de *Arabidopsis*, como consecuencia de la sobreexpresión del gen *SchSDD1-like*, abrió la posibilidad de evaluar el efecto que esta reducción en el número de estomas en la hojas sobre la tolerancia al déficit hídrico de estas plantas. Con este propósito, plantas silvestres y transgénicas $P_{35S}:SchSDD1-like$ de 4 semanas de edad fueron sometidas a un periodo de estrés por sequía durante 8 días, tiempo en el cual se midió la tasa de pérdida de agua y el nivel de lipoperoxidación de lípidos de membrana a través del contenido de malondealdehído (MDA) en sus hojas (Chen & Murata, 2002). Adicionalmente, se evaluó el perfil transcripcional del gen *AtRD29A*, como un indicador molecular de la percepción de estrés por parte de las plantas, ya que éste gen es inducible por sequía (Hua *et al.*, 2006).

Como primera aproximación, la tasa de pérdida de agua de las plantas fue evaluada midiendo el peso fresco en función del tiempo de hojas desprendidas desde ambas líneas transgénicas y de la planta silvestre. Con propósitos comparativos, en esta evaluación también se incluyó la línea complementada #2, la cual es la que presenta la mayor expresión del transgén, así como también la planta mutante *sdd1-3*. Comparado con la planta wild-type, las dos líneas sobreexpresoras y también la complementada, mostraron una tasa de pérdida de agua significativamente menor después de 6 horas de deshidratación (**Figura 32**). El peso fresco de la planta silvestre se redujo en un 68%; en cambio la reducción observada en las plantas sobreexpresoras que llevan la construcción $P_{35S}:SchSDD1-like$ fue de 50% para la línea #1 y de 56% para la línea #2. La reducción en la planta mutante *sdd1-3* complementada con la construcción $P_{35S}:SchSDD1-like$ fue de 60,14%. Por su parte, la planta mutante *sdd1-3* exhibió la mayor tasa de pérdida de agua respecto a la planta wild-type y a las transgénicas, alcanzando un 90,13% a las 4 horas de estrés. En conjunto estos datos indican que una menor densidad estomática en las hojas de la planta transgénicas efectivamente favorece la retención de agua por parte de la planta permitiéndole ser más tolerante a la deshidratación. Esto se confirma por lo observado durante este ensayo en las plantas mutantes *sdd1-3*.

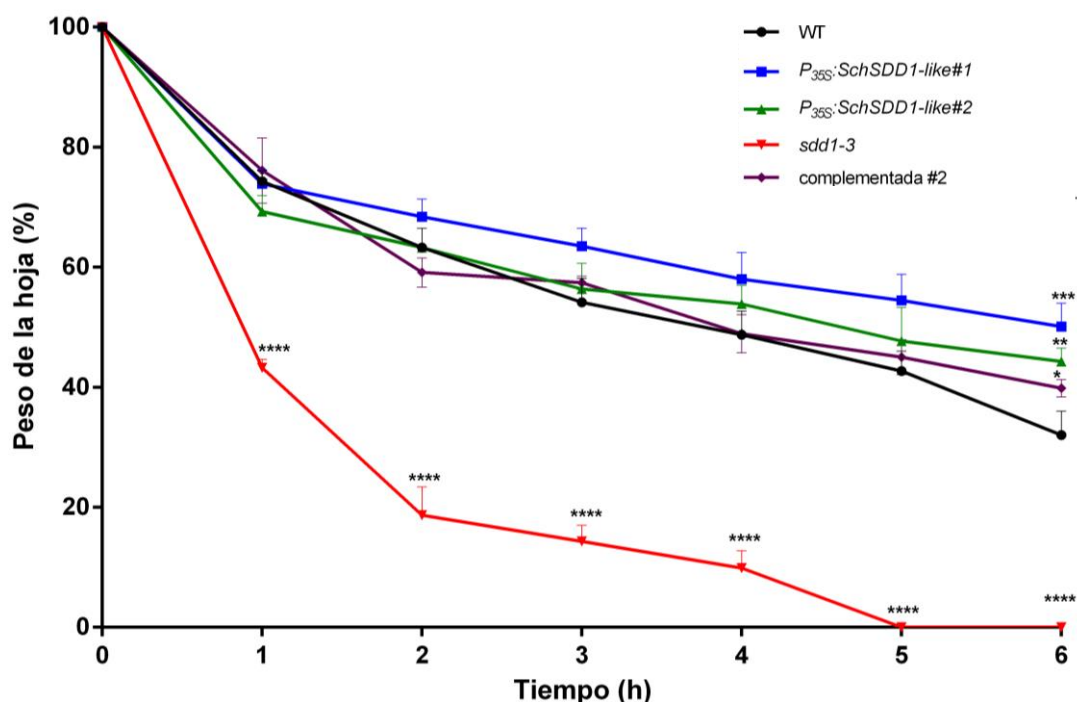


Figura 11 La sobreexpresión de SchSDD1-like en Arabidopsis aumenta la tolerancia a la deshidratación. Pérdida de agua en hojas desprendidas de plantas de 5 semanas de edad a diferentes puntos de tiempo con tres replicas por planta. Tres ensayos independientes fueron realizados con resultados similares. Los valores corresponden a la media \pm error estándar a partir de tres replicas biológicas. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión respecto a la planta WT. Los * indican diferencias significativas respecto a la planta WT (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$).

Además, la mayor tolerancia a la deshidratación de las plantas sobreexpresoras del gen *SchSDD1-like*, fue posible correlacionarla con parámetros fisiológicos y moleculares. Como muestra la **Figura 33**, bajo condiciones de riego normal, el contenido de MDA, fue similar en las plantas silvestres (WT) y transgénicas al inicio del tratamiento. A medida que transcurrió la sequía, el contenido de MDA fue significativamente menor en las plantas sobreexpresoras (**Figura 33A**). Así, mientras las plantas silvestres presentaban un contenido de MDA de 10 nmoles por gramo de peso fresco (nmoles/gr PF), la línea transgénica #1 y #2 presentaron una acumulación de MDA de 4 nmoles/gr de PF y 7 nmoles/gr de PF, respectivamente. A medida que transcurrió el tiempo de estrés, los niveles de MDA aumentaron en las plantas control y transgénicas, sin embargo, al octavo día de sequía, el contenido de MDA fue aproximadamente un 40% inferior en ambas líneas transgénicas, respecto a las plantas silvestres. Estos resultados muestran que la menor pérdida de agua en las plantas transgénicas va asociado también con un menor daño ocasionado por especies reactivas de oxígeno sobre las membranas de

Tesis: "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"

las células de la hojas, con lo cual la planta se encuentra en una condición de mayor tolerancia la estrés por deshidratación que las plantas silvestres.

Por otra parte, el perfil transcripcional del gen *AtRD29A* indicó que bajo condiciones normales, ambas líneas transgénicas mostraron una expresión mayor del gen comparado con la planta silvestre, aunque solo en la línea #1 la diferencia fue estadísticamente significativa siendo 3 veces mayor que el nivel de expresión en la planta silvestre, correlacionándose con el nivel de expresión en esa línea de *SchSDD1-like* (**Figura 28**). Durante el estrés, y como era de esperar, tanto la planta silvestre como las transgénicas, vieron altamente inducida la expresión del gen marcador (**Figura 33B**). Sin embargo, y sorprendentemente el gen presentaba una expresión más alto en ambas líneas transgénicas, alcanzando un nivel de inducción 2 veces más alto que en la planta silvestre al octavo día de estrés.

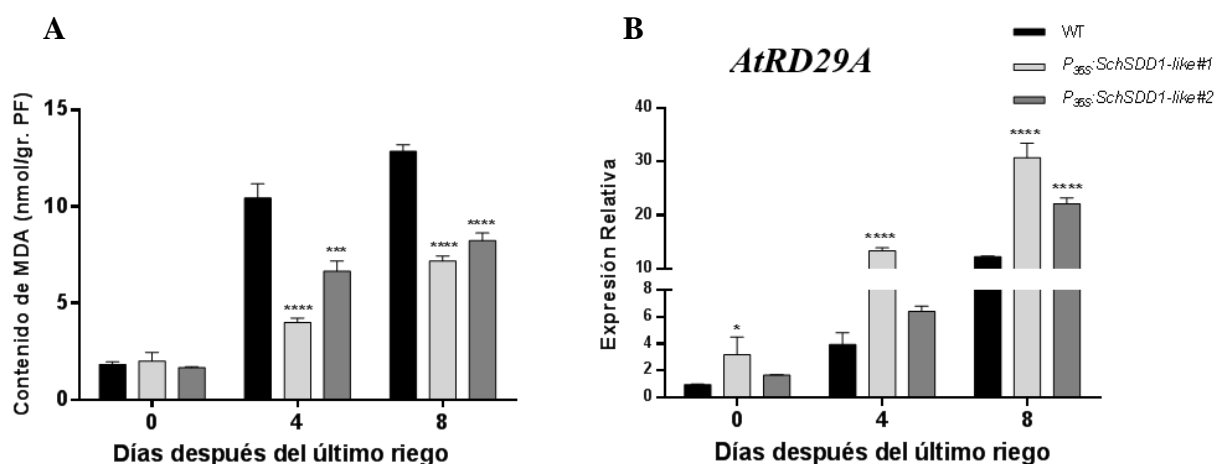


Figura 12 Peroxidación de lípidos y gen marcador asociados con la respuesta a estrés abiótico en las plantas sobreexpresoras *P₃₅:SchSDD1-like* de *Arabidopsis* durante sequía. (A) Contenido de malondialdehído (MDA). (B.) Expresión relativa del gen inducido por sequía *AtRD29A*. El RNA fue aislado de hojas y tallos. Los niveles relativos fueron calculados respecto al gen *F-box*. Los valores corresponden a la media \pm error estándar a partir de tres replicas biológicas. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión respecto a la planta mutantes (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$)

IX.III.4 La sobreexpresión del gen *SchSDD1-like* reduce la densidad estomática y mejora la tolerancia a la deshidratación en plantas transgénicas de *S. lycopersicum*

Debido a que *SchSDD1-like* cumple funciones similares a *AtSDD1* logrando revertir el fenotipo mutante de *sdd3-1*, ejerce un control negativo en la densidad estomática de las plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban el gen y que esta reducción en el número de estomas en las hojas aumentaba la tolerancia al déficit hídrico en las plantas, entonces la capacidad para realizar una función similar en plantas de tomate requería ser analizada. Con este objetivo la región codificante del gen *SchSDD1-like* dirigida por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, fue usada para transformar plantas de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker. Varias líneas transgénicas de tomate fueron analizadas para la expresión del transgen, observándose que ellas presentaron distintos niveles de expresión, y de las cuales se seleccionaron cuatro para análisis posteriores (**Figura 34** y **Figura S4-III**).

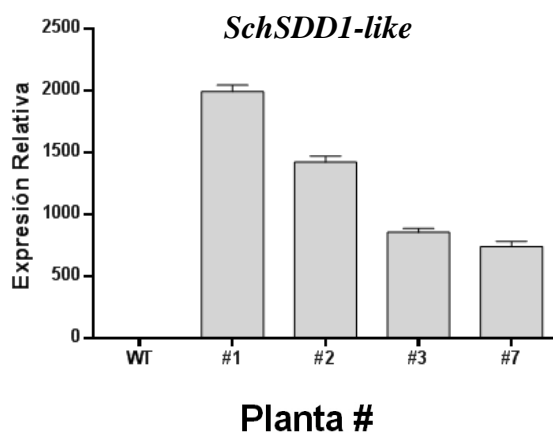


Figura 13 Expresión ectópica del gen *SchSDD1-like* aislado del *S. chilense* en tomate cultivado. Los niveles de transcritos del gen *SchSDD1-like* fueron evaluados mediante qPCR a partir de cDNA sintetizado desde RNA total de hojas de plantas silvestres (WT) y transgénicas. La expresión relativa de *SchSDD1-like* se calculó usando el gen de expresión constitutiva *SolycGAPDH* y los valores corresponden a la media \pm error estándar a partir de tres replicas biológicas.

Morfológicamente, no se observaron diferencias fenotípicas entre las plantas silvestres y transgénicas T0 de tomate durante su ciclo vital. La abundancia estomática fue determinada en hojas completamente expandidas de las plantas transgénicas y de la planta silvestre de tomate, visualizando improntas obtenidas mediante la técnica de la resina dental. La densidad estomática fue determinada como número de estomas por campo visual (Abrash y Bergmann, 2010). La **figura 35** muestra que todas las

líneas transgénicas presentan una significativa disminución en la densidad estomática respecto de las plantas silvestres. El análisis de la cuantificación de los estomas de la cara abaxial de las hojas, indicó que la reducción en la densidad estomática fue de $64,6\% \pm 2,6\%$ para el caso de la línea #1, de $50,2\% \pm 2,9\%$ para la línea #2; $49,3\% \pm 1,20\%$ para la línea #3 y $48,3\% \pm 1,8\%$ para la línea #7. La **Figura 36** de hojas completamente expandidas de plantas silvestres y transgénicas es ilustrativa para mostrar las diferencias en la abundancia estomática existente en la epidermis de sus respectivas hojas. Al igual que lo observado en las plantas transgénicas de *Arabidopsis*, los estomas en las hojas de las plantas de tomate sobreexpresoras de *SchSDD1-like*, presentaron una morfología normal aunque de mayor tamaño, una situación similar mostraron las células epidermales. No observándose otras características anómalas o aberrantes. Estos resultados muestran que *SchSDD1-like* pudo modular la frecuencia estomática que se desarrolló en las plantas de tomate cultivado.

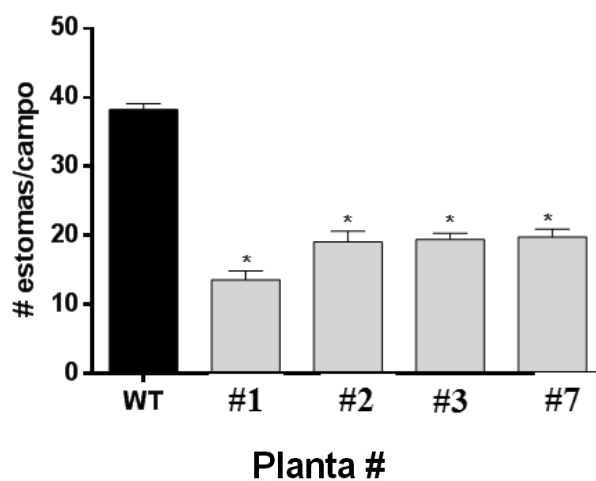


Figura 14 Densidad estomática (número de estomas por campo visual al microscopio) en plantas de *S. lycopersicum* (cv. Moneymaker) y sobreexpresoras del gen *SchSDD1-like*. La cuantificación fue realizada en la epidermis abaxial de hojas de roseta completamente expandidas. Los datos son el promedio de cuatro plantas individuales. Los * indican diferencias significativas respecto a la planta silvestre (prueba-t Student's, $P < 0,05$).

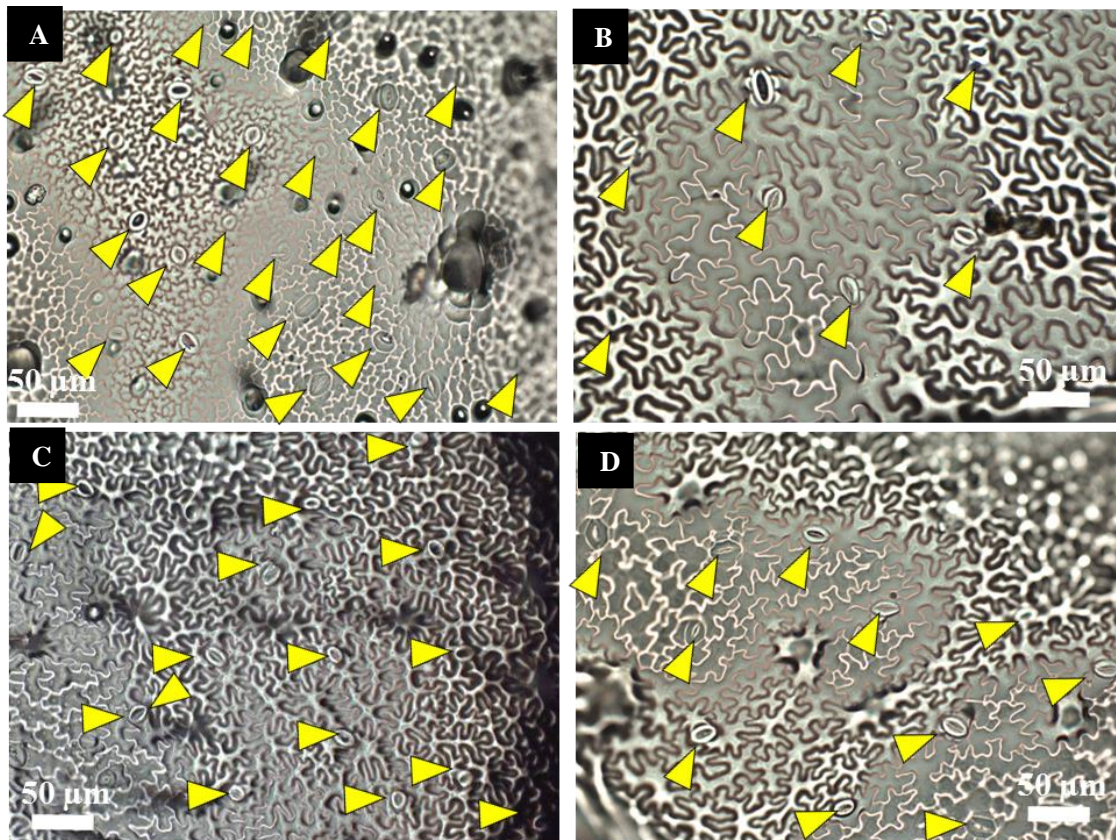


Figura 15 Impresiones de resina dental de hojas completamente expandidas de plantas transgénicas de *S. lycopersicum* que sobreexpresan el gen *SchSDD1-like*. Micrografía óptica de la epidermis abaxial de wild-type (A) y de la línea transgénica #1 (B), #2 (C) y #7 (D), respectivamente. Las flechas amarillas indican los estomas. La flecha blanca indica una célula del meristemoide.

Similar a lo observado en las plantas transgénicas de *Arabidopsis*, el análisis fenotípico realizado a las plantas silvestres y transgénicas de tomate, indicaron que la sobreexpresión del *SchSDD1-like* afectó la frecuencia de desarrollo estomático en sus hojas. Debido a esto, fue relevante determinar el perfil transcripcional de los putativos genes maestros del desarrollo de estomas en las plantas sobreexpresoras y compararlos con las plantas silvestres. Por tanto, RNA total fue aislado de hojas jóvenes de plantas de tomate y cuantificada la expresión de los genes *SolycSPCH-like*, *SolycMUTE-like* y de *SolycFAMA-like* mediante qPCR. Como lo muestra la **figura 37**, los niveles de transcritos de *SolycSPCH-like* fueron significativamente menores en todas las líneas transgénicas, siendo la línea #1 la que presenta el mayor nivel de represión (~70%). La cuantificación del mRNA de *SolycMUTE-like* mostró una significativa disminución en las líneas transgénicas #1 y #7, alcanzando un nivel de represión cercano al 50% y 30%, respectivamente. En las líneas transgénicas #2 y #3, no se

observó una variación significativa en los niveles de transcrito de *SolycMUTE-like*. Interesantemente, ninguna línea transgénica mostró diferencias en los niveles de expresión del gen *SolycFAMA-like*, respecto a lo observado en las plantas control.

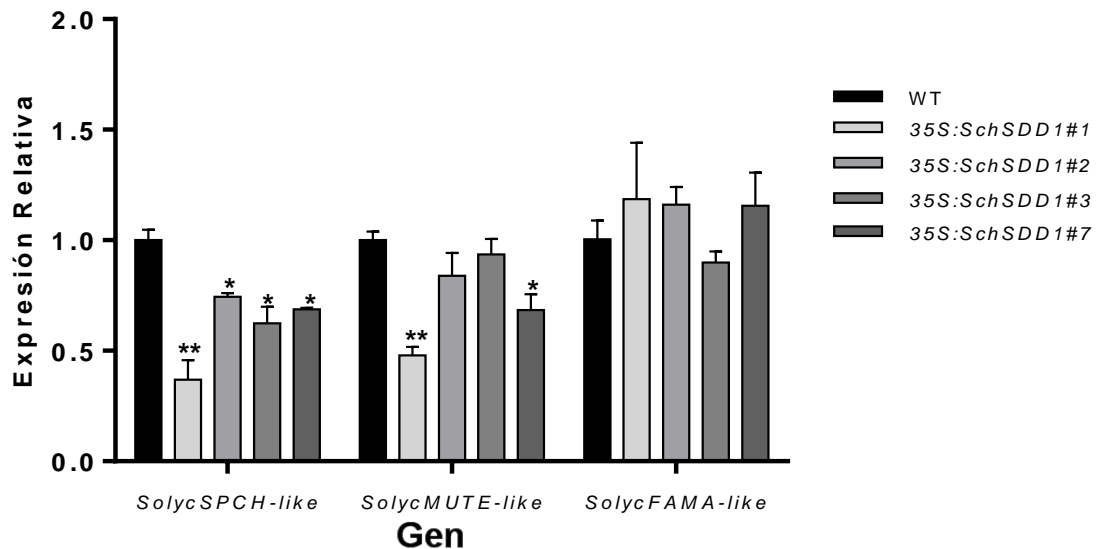


Figura 16 qPCR de genes implicados en el desarrollo de estomas en plantas transgénicas de *S. lycopersicum*. Expresión de *SPCH-like*, *MUTE-like* y *FAMA-like* en plantas silvestres y *P_{35S}:SchSDD1-like*. El RNA fue aislado de hojas jóvenes de las plantas. Los niveles relativos fueron calculados respecto al gen *SolycGAPDH*. Los valores corresponden a la media \pm error estándar a partir de tres replicas biológicas. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión respecto a la planta silvestres (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

Estos resultados muestran que la expresión del gen *SchSDD1-like* induce una señal que provoca la represión transcripcional de los genes *SolycSPCH-like* y *SolycMUTE-like*, dos de los putativos genes reguladores positivos del desarrollo estomático de tomate, disminuyendo la cantidad de estomas en la epidermis de las hojas de *S. lycopersicum*. Por otra parte, estos resultados sugieren la existencia de un patrón de regulación común entre *Arabidopsis* y tomate respecto del desarrollo estomático.

Finalmente para confirmar el papel de *SchSDD1-like* en la tolerancia a estrés por déficit hídrico, hojas de plantas de tomate de 8 semanas de edad fueron sometidas a estrés por deshidratación. Para ello, hojas completamente expandidas de las plantas de tomate transformadas con la construcción *P_{35S}:SchSDD1-like* y de las plantas silvestres de *Solanum lycopersicum*, fueron escindidas y determinada su tasa de pérdida de agua durante un periodo de 12 horas. Como lo indica la **figura 38**, durante las 7 primeras horas de desecación de las hojas, no se observaron diferencias en la disminución del peso de la hoja producto de la pérdida de agua, reduciéndose en promedio ~30%

Tesis: "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"

respecto al peso inicial tanto para la planta silvestre (WT) como para todas las líneas transgénicas. Sin embargo, a las 12 horas de tratamiento, las hojas de las plantas silvestres exhibieron una significativa reducción de su peso, alcanzando un nivel cercano al 55%, a diferencia de lo observado en las hojas de las líneas sobreexpresoras, quienes en promedio solo perdieron un 38% de su peso inicial (**figura 38**). Durante todo el ensayo, no hubo diferencias significativas en la tasa de pérdida de agua entre las líneas transgénicas. Este resultado confirma en tomate, una planta de interés comercial, que una menor densidad estomática en las hojas, controla la pérdida de agua desde la planta mejorando su respuesta frente a un estrés por deshidratación y por lo tanto es posible aumentar la tolerancia a estrés por déficit hídrico a través de la modulación de la expresión del gen *SDD1-like*.

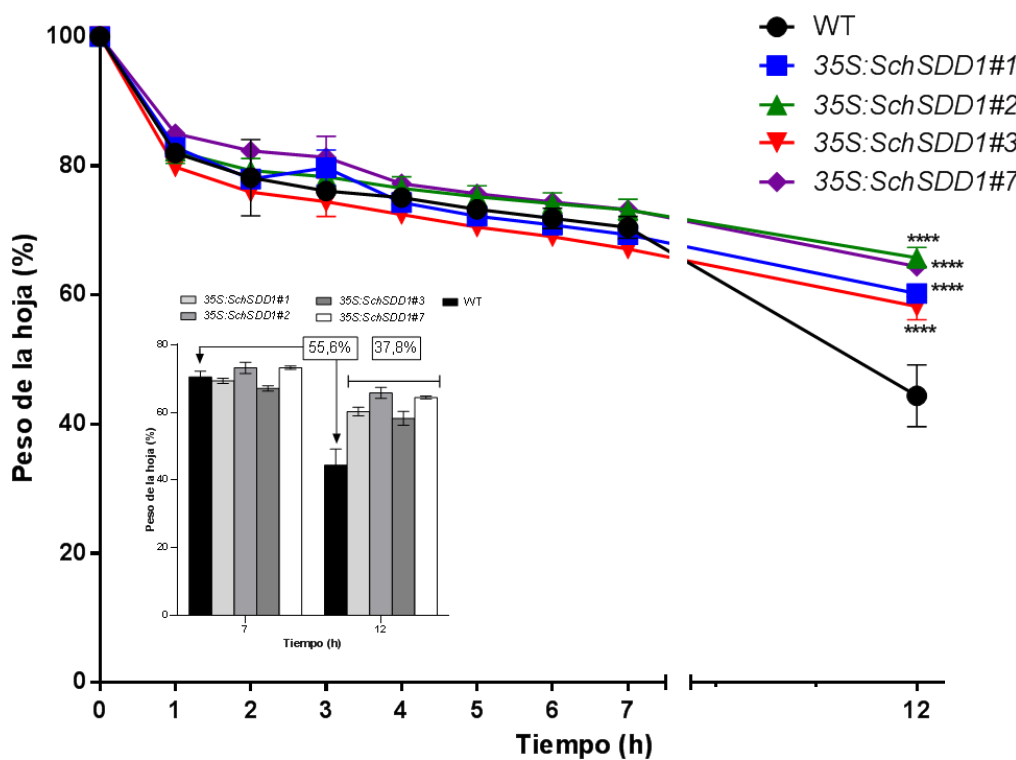


Figura 17 La sobreexpresión de SchSDD1-like en tomate aumenta la tolerancia a la deshidratación. Pérdida de agua en hojas completamente expandidas desprendidas de plantas de 8 semanas de edad a diferentes puntos de tiempo con tres replicas por planta. Tres ensayos independientes fueron realizados con resultados similares. Los valores corresponden a la media \pm error estándar a partir de tres replicas biológicas. Las barras con asteriscos indican diferencias significativas de expresión respecto a la planta WT. Los * indican diferencias significativas respecto a la planta WT (**** $P < 0.0001$). La figura inserta, indica la disminución significativa de la pérdida de peso de la hoja a las 12h de iniciada la desecación.

IX.III.5 Figuras suplementarias Capítulo III

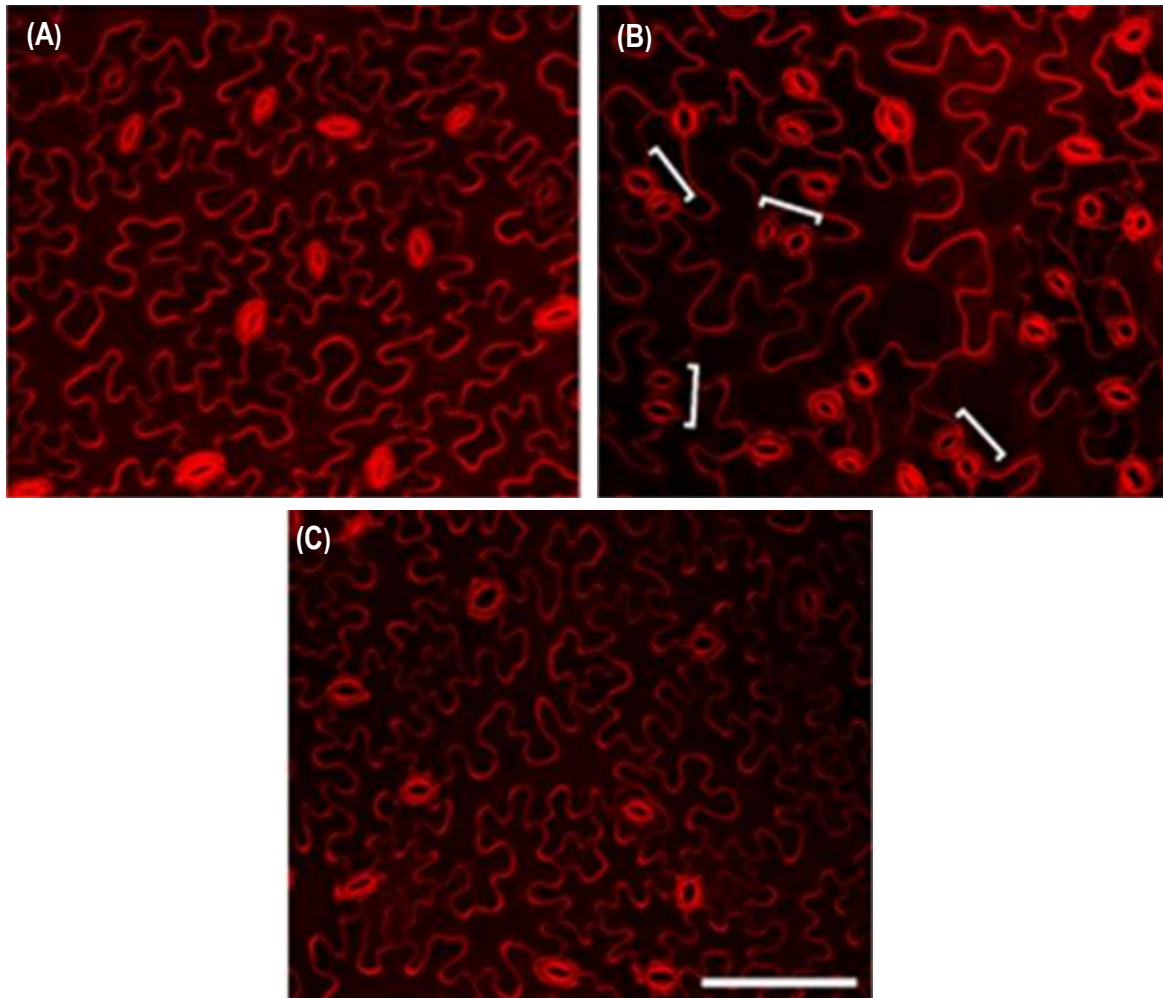


Figura S1-III. La sobreexpresión de SchSDD1-like restaura el fenotipo silvestre en la planta mutante *sdd1-3* de *Arabidopsis*. Micrografías confocales de la epidermis abaxial de cotiledones fueron tomadas en plantas silvestres (*Col-0*) (A), *sdd1-3* (B) y en las líneas sobreexpresoras en el background genético *sdd1-3* (C). Los corchetes muestran agrupaciones estomáticas típicas del fenotipo mutante *sdd1-3*. Cotiledones de plantas de 20 días fueron teñidos con yoduro de propidio. Barra: 50 μ m



Figura S2-III. Características fenotípicas de plantas de Arabidopsis que sobreexpresan SchSDD1-like. Plantas de *Arabidopsis silvestre* (Col-0), fueron transformadas mediante el método de “floral dip”, seleccionadas en medio suplementado con Kanamicina y luego crecidas en sustrato bajo condiciones controladas de luz en invernadero. Las dos líneas que exhibieron la mayor expresión del transgen fueron fotografiadas. El análisis morfológico realizado a las plantas silvestres (B) y a la línea transgénicas #1 (A) y #2 (C), no reveló diferencias a nivel de tejido vegetativo ni tampoco en sus estadios de desarrollo.

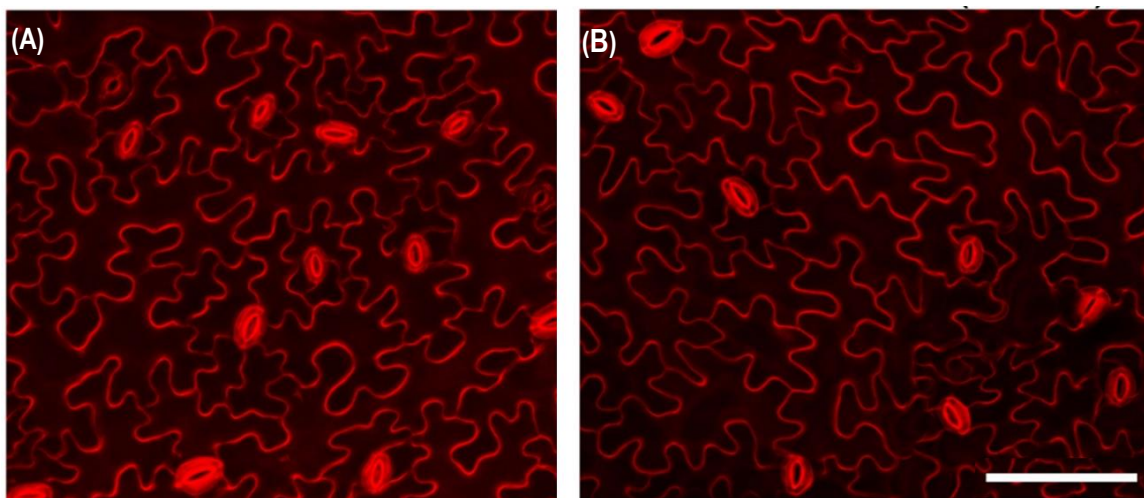


Figura S3-III. La sobreexpresión de SchSDD1-like disminuye la densidad estomática en plantas silvestres de Arabidopsis. Micrografías confocales de la epidermis abaxial de cotiledones de plantas de 20 días teñidos con yoduro de propidio fueron tomadas en plantas silvestres (Col-0) (A), y en las líneas sobreexpresoras en el background genético silvestre (Col-0) (B). Barra: 50µm

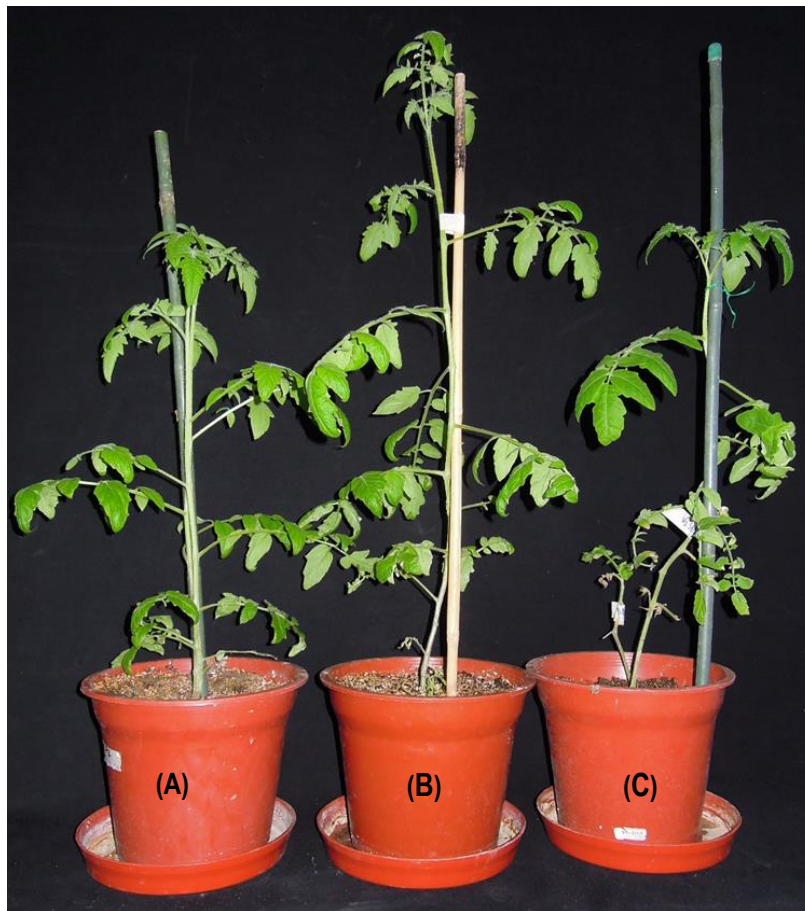


Figura S4-III. Características fenotípicas de plantas de tomate que sobreexpresan SchSDD1-like. Plantas de *S. lycopersicum*, fueron transformadas mediante el método de transformación de explantes de cotiledones, seleccionadas en medio suplementado con Higromicina y luego crecidas en sustrato bajo condiciones controladas de luz en invernadero. Dos de las líneas que exhibieron la mayor expresión del transgen fueron fotografiadas (#2 (B), #3 (C)). El análisis morfológico realizado a las plantas silvestres (A) y a las líneas transgénicas, no reveló diferencias a nivel de tejido vegetativo ni tampoco en sus estadios de desarrollo.

X. DISCUSIÓN

X.1 Generalidades

Solanum chilense es una planta herbácea perteneciente a la familia de las Solanáceas, que habita naturalmente en regiones áridas del norte de Chile, en donde los niveles pluviométricos bajos y la salinidad del suelo impiden el crecimiento y desarrollo de los cultivos tradicionales, siendo por tanto clasificada como una especie tolerante a la sequía y a la salinidad (Warnock, 1991; Tapia, 2005). La tolerancia que exhibe naturalmente *S. chilense*, está asociada a un programa de expresión génica específica, que permite mantener la homeostasis iónica y osmótica de la planta (Yañez *et al.*, 2009; Loyola *et al.*, 2012). Estos antecedentes hacen de esta especie un modelo para estudiar los mecanismos moleculares y fisiológicos involucrados en la aclimatación y tolerancia a estrés abiótico en plantas. Uno de estos mecanismos de tolerancia y aclimatación que pone en marcha *S. chilense* bajo estrés, es la disminución significativa de su densidad estomática en las hojas que se desarrollaron durante el periodo de estrés (Tapia *et al.*, 2005).

Con el fin de dar luces respecto a los genes involucrados en esta respuesta específica, durante la ejecución de este estudio se logró identificar y caracterizar en *Solanum chilense*, un gen que entre los que codifican para subtilisinas, presentó la más alta homología a *AtSDD1*. Este gen se ha asociado a la densidad y distribución estomática en las hojas de *Arabidopsis thaliana* (Berger y Altman, 2000). En función de esta identidad de secuencia se denominó *SchSDD1-like*. En este trabajo se demostró que *SchSDD1-like* se induce en respuesta a estímulos abióticos como salinidad y sequía (**Figura 17** y **Figura 19**) y que el aumento en su expresión correlaciona con la represión de los putativos homólogos de *SPCH* y de *MUTE* de *A. thaliana* que son genes reguladores positivos del desarrollo estomático. Consecuentemente con esto, se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaron de manera constitutiva el gen *SchSDD1-like* las cuales mostraron una disminución marcada de la abundancia estomática en sus hojas y un comportamiento significativamente más tolerante frente a condiciones de deshidratación y déficit hídrico (sequía), todo esto avalado por los parámetros fisiológicos determinados. Esta respuesta fue asociada con la participación en la modulación del número de estomas de *SchSDD1-like*, siendo esto confirmado por la complementación génica de la mutante de *Arabidopsis* *sdd1-3*, así como también por la represión transcripcional de los genes

AtSPCH, *AtMUTE* y *AtFAMA* todos ellos reguladores positivos del desarrollo de estomas en *Arabidopsis* en las plantas transgénicas.

X.2 La proteína SDD1-like de tomate mantiene características propias de la familia de las subtilisinas

X.2.1 Antecedentes generales de la familia de serino proteasas presentes en plantas y su relación con *SchSDD1-like*

La proteólisis completa y también la específica, son mecanismos complementarios que actúan de manera concertada junto con otras modificaciones post-traduccionales para controlar varios aspectos de la fisiología celular y del desarrollo de la planta. Sin embargo, por razones históricas, la atención se ha concentrado principalmente en aspectos fisiológicos de relevancia agrícola, como lo son la degradación de proteínas de reserva durante la germinación de las semillas o la movilización de proteínas durante la senescencia foliar para la redistribución del nitrógeno hacia órganos reproductivos (Huffaker, 1990; Schaller, 2004). Actualmente, la degradación selectiva de proteínas ha tomado particular relevancia, ya que se le ha asociado con aspectos específicos del desarrollo de la planta, así como también en la respuesta a factores bióticos y abióticos, entre varios otros, todos ellos relacionados con el sistema de degradación mediante el proteosoma ubiquitina-26S (Ub-26S) (Citovsky *et al.*, 2009); a tal punto que el 6% del proteoma de *Arabidopsis* (1600 genes) está involucrado en esta ruta de degradación (Vierstra, 2009). Además de la proteólisis dependiente de ubiquitina, hay 695 proteasas adicionales en *Arabidopsis* que también pueden participar del recambio y tráfico de proteínas, regulación de la actividad proteica mediante procesamiento sitio-específico, etc (Schaller, 2004; Rawlings *et al.*, 2010). Interesantemente, este grupo de proteasas incluye miembros localizados en organelos y en el apoplasto, compartimentos en los cuales el procesamiento Ub-26S no está presente, volviéndose parte de un sistema regulador complementario de alta relevancia (Schaller *et al.*, 2011).

Entre estas proteasas, la familia denominada serino proteasas tipo subtilisina, denominadas subtilisinas (SBT), es uno de los más numerosos y puede ser comparada en términos de complejidad y relevancia en la regulación del desarrollo, con elementos del sistema Ub-26S. Las SBT pertenecen a la familia de serino peptidasas cuyo sitio catalítico comprende el arreglo específico: Aspártico, Histidina y Serina, denominado “triada catalítica” (Polgar, 2005). Los miembros de este grupo constituyen la familia S8, a la cual pertenecen dos subfamilias: La S8A ó subtilisinas y la S8B o kexinas (Rawlings *et al.*,

2010). A la fecha, solo miembros de la subfamilia S8A han sido identificadas y purificadas en plantas, específicamente las relacionadas con la pirolisina (Siezen y Leunissen, 1997; Antão y Malcata, 2005). Recientemente con el surgimiento de las tecnologías de secuenciación masiva y proyectos genoma, ha quedado en evidencia lo transversal de la presencia de subtilasas en el reino vegetal, existiendo en musgos (23 genes en *Physcomitrella patens*) hasta en *Populus trichocarpa* (90 genes; <http://www.phytozome.net/>). En *Arabidopsis* existen 56 miembros pertenecientes a esta subfamilia (Rautengarten *et al.*, 2005), 63 en arroz (Tripathi y Sowdhamini, 2006) y a la fecha 15 miembros caracterizados en tomate (Meichtry *et al.*, 1999). La mayoría de estas enzimas son endopeptidasas de amplio espectro y de localización extracelular (Beers *et al.*, 2004; Schaller *et al.*, 2011).

Desde el punto de vista estructural, además de la triada catalítica, la mayoría de las subtilasas son sintetizadas como pre-proenzimas que son translocadas a la membrana celular guiadas por un péptido señal (pre-péptido) y finalmente procesadas hacia su forma activa luego de procesar el pro-péptido (Antão y Malcata, 2005). Presente dentro de su secuencia se encuentra el dominio asociado a proteasa (PA) el que se piensa está involucrado en mediar la interacción entre la enzima y el sustrato (Mahon y Bateman, 2000). Tal como lo muestra la **Figura 11A**, el análisis estructural de la secuencia aminoacídica deducida de SchSDD1-like, mostró que en esta proteína se conservan todos los elementos característicos de las subtilisinas, especialmente la “triada catalítica” en el orden Asp-His-Ser (región D, H y S, respectivamente). Considerando que el criterio para la clasificación por familia es la presencia de, a lo menos, dos residuos característicos del sitio activo en un orden específico (<http://prosite.expasy.org/PDOC00125>), permiten clasificar esta proteína como una serino-proteasa del tipo subtilisina con una probabilidad del 100%, siendo la primera proteína de este tipo descrita a la fecha en *S. chilense*. Particularmente, un motivo característico en la región S de las subtilisinas en torno a la serina catalítica es Gly-Thr-**Ser**-Xaa-Xaa-Xbb-Pro (donde Xaa es un aminoácido alifático y Xbb es uno pequeño) (Rawlings *et al.*, 2010). En el caso de SchSDD1-like, el motivo predicho es Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Cys-Pro, siendo Metionina y Alanina aminoácidos alifáticos y Cisteína que posee un grupo lateral poco voluminoso (Heldt y Heldt, 2005). Esta conformación estructural de SchSDD1-like sugiere con alta probabilidad que esta proteína pertenece a la familia de SBT de plantas.

Además, como se observa a partir de los análisis de la estructura primaria deducida, SchSDD1-like es una pre-pro-enzima de secreción, al igual que la mayoría de las subtilasas de plantas, cuyo péptido señal de 22 residuos aminoacídicos indica que tiene como destino primario predicho el retículo

endoplásmico (**Figura 11B**). Posterior procesamiento debe realizarse para obtener una enzima madura en la localización celular requerida. En animales, existe suficiente información respecto al subsecuente procesamiento de los zimógenos en el retículo y su importancia en la maduración de la enzima y destino final (Steiner, 1998; Anderson *et al.*, 2002; Nour *et al.*, 2003). El prodominio ubicado en la región N-terminal actúa como una chaperona intramolecular que asegura el correcto plegamiento de la enzima e inhibe una actividad proteolítica prematura y su eliminación es un evento necesario para su salida del retículo endoplásmico (Shinde y Inouye, 1993; Kojima *et al.*, 1997). La maduración de la enzima ocurre mediante la escisión del prodominio en el punto de unión con el dominio catalítico en un paso autocatalítico intramolecular. Este sitio de procesamiento está caracterizado por un par de residuos de treonina en el lado carboxilo del enlace escindible. Recientemente, ha sido reportado que en SolycSBT3 la eliminación del propeptido ocurre mediante autoprocésamiento (Cedzich *et al.*, 2009). Interesantemente, la secuencia de aminoácidos presentes en el N-terminal de la proteína SolycSBT3 madura es conservada en la mayoría de las subtilasas de plantas. Los aminoácidos en las posiciones +1 y +2 son siempre treoninas, lo que sugiere que el procesamiento en estas proteasas probablemente ocurra autocatalíticamente (Nakagawa *et al.*, 2010). Al igual que lo publicado en *Solanum lycopersicum*, SchSDD1-like también comienza con un par de treoninas en su N-terminal maduro sugiriendo un procesamiento similar (**Figura 11B**).

Otro antecedente adicional que apoyaría la hipótesis de que efectivamente la proteína SchSDD1-like pudiese ser una SBT es la presencia del dominio asociado a proteasas (PA) presente en la región aminoacídica de SchSDD1-like, el cual es otra característica distintiva de las subtilasas, y que comprende la secuencia entre el residuo 276 al 348 (**Figura 11A**). Este motivo es una inserción típica entre la Histidina y la Serina de la triada catalítica, que está presente en las subtilisinas de plantas que las distingue también de las subtilisinas de la familia S8B, y que posiblemente está involucrado en el reconocimiento intramolecular del sustrato siendo crítico para la interacción enzima-sustrato como ha sido demostrado en la subtilasa SK11 de *Lactobacillus lactis* (Bruinenberg *et al.*, 1994; Cedzich *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha propuesto que el dominio PA interactúa con el sustrato y lo lleva directamente al sitio catalítico de la enzima exponiendo los enlaces a procesar del sustrato (Mahon y Bateman, 2000). Al parecer en plantas, este sitio también puede mediar el procesamiento autocatalítico del prodominio en el sitio de unión al dominio catalítico. Este sitio parece ser caracterizado por un par de Treoninas en el lado carboxilo del enlace a romper, las cuales están presentes en otras subtilasas

purificadas de tejidos vegetales (Patel *et al.*, 2007). Este motivo Thr-Thr en el N-terminal está conservado en todas las subtilasas conocidas de tomate (Tornero *et al.*, 1996; Meichtry *et al.*, 1999) y en 54 de los 56 genes de subtilasas presentes en *Arabidopsis* que tienen dominio PA (Rautengarten *et al.*, 2005). Por tanto, considerando que el motivo Thr-Thr y el dominio PA están presentes en la proteína SchSDD1-like, lo cual según la cercanía filogenética de *S. chilense* con *S. lycopersiucm* era esperable, es posible que el dominio PA de SchSDD1-like, además de participar en la interacción con el sustrato, estaría involucrado en el procesamiento proteolítico y maduración de la enzima, similar a lo reportado en SolycSBT3 (Cedzich *et al.*, 2009).

El análisis de localización subcelular realizado *in silico* sobre la secuencia de aminoácidos predicha para SchSDD1-like, predijo que la proteína es de secreción y de ubicación asociada a la pared celular. Estos resultados coinciden con las características generales de secreción de la familia SBT y con lo predicho para la mayor parte de las subtilasas presentes en *Arabidopsis*, las cuales son parte de la ruta secretora con un paso obligatorio de procesamiento por el retículo endoplásmico (Rautengarten *et al.*, 2005). Respecto a la ubicación específica de su sitio de acción, los datos experimentales de localización subcelular solo están disponibles a la fecha para *AtSDD1* y *AtARA12*, los cuales están de acuerdo con la predicción obtenida ya que ambas son exportadas al apoplasto (Von Groll *et al.*, 2002; Hamilton *et al.*, 2003). Específicamente, en la predicción realizada para SchSDD1-like, los resultados corroboran lo observado en *Arabidopsis* por von Groll *et al.* (2002), en cuyo trabajo mediante la fusión de GFP a SDD1 se detectó la proteína en el apoplasto, razón por la que los autores sugieren que podría estar asociada a la membrana plasmática. Sin embargo, a pesar de la coincidencia empírica reportada para con estas SBT's y SchSDD1-like, es necesario validar experimentalmente la destinación subcelular de la proteína de *S. chilense* y así establecer con precisión su ubicación y confirmar la predicción obtenida.

Del mismo modo, la presencia de los sitios D, H, N y S, además del dominio PA permitió agrupar filogenéticamente a la proteína SchSDD1-like, así como a su homólogo de tomate cultivado SolycSDD1-like, junto con conocidas serino proteasas como *AtSDD1* y cucumisina (**Figura 12 y 13**), los cuales han sido clasificados dentro del subgrupo SBT1 de proteínas SBT en *Arabidopsis* (Rautengarten *et al.*, 2005). En consecuencia, estos resultados indican la conservación de este subgrupo de proteínas en *S. chilense*, sugiriendo que esta proteína podría estar actuando como proteasa en tomate silvestre. Aun cuando la relación filogenética manifiesta una gran prevalencia de las subtilasas en plantas, escaso

es el conocimiento de su función. Sin embargo, en el caso de *SchSDD1-like* debido a su alta homología con SDD1 de *A. thaliana* podría estar jugando un papel en el desarrollo de estomas en las hojas de las plantas de *S. chilense*.

X.3 *SchSDD1-like* presenta un patrón de expresión órgano-específico similar a *AtSDD1*

Con el propósito de investigar la(s) posible(s) función(es) de *SchSDD1-like*, se analizó su perfil transcripcional órgano-específico. Como muestra la **figura 14**, la expresión génica fue diferencial para todos los tejidos analizados, principalmente en raíz, hoja y flores. En raíces, transcritos de *SchSDD1-like* no fueron encontrados en niveles detectables, indicando que la expresión y función de este gen está asociados a tejidos aéreos, lo que es concordante con una supuesta actividad en desarrollo de estomas, toda vez que en raíces generalmente no existe presencia de complejos estomáticos (Wallis, 1983).

En tallo, se detectó la presencia del transcrito aunque a un nivel muy por debajo que en los otros órganos analizados. Interesantemente, de todas las subtilisinas de tomate descritas a la fecha, a excepción de *SolycP69A* y *SolycP69B*, ninguna ha sido descrita en tallo. Estos dos genes que codifican para subtilisinas, se inducen fuertemente en tallos y hojas de tomates infectadas con viroides (Tornero *et al.*, 1996); lo cual sugiere algún posible papel de *SchSDD1-like* en la respuesta a estrés biótico. Por otra parte, *AtSDD1* (subtilisina implicada en el desarrollo de estomas) también está representado en tallos, aunque su nivel de expresión es menor a lo observado en hojas (Berger y Altman, 2000). Esto se condice con la menor densidad estomática observada en tallos de plantas silvestres de *Arabidopsis* respecto a otros órganos (Berger y Altman, 2000). En *Arabidopsis*, SDD1 actúa río arriba en la misma ruta genética del receptor TMM en hojas; sin embargo, TMM tiene un comportamiento distinto dependiendo del órgano. Es así que TMM es un regulador negativo del desarrollo de estomas en hojas, pero positivo en tallos (Geisler *et al.*, 1998). Análisis genéticos han demostrado que TMM promueve la conversión de células M en GMC mediante su participación en la mantención de la identidad del linaje estomático (Bhave *et al.*, 2009). Además, el estudio de las mutantes *tmm-1* y *sdd1-2*, mostró que a diferencia de lo observado en hojas, TMM sería epistático a SDD1 y la función de SDD1 en la regulación del número de estomas en tallos, estaría enfocada específicamente a la determinación de la cantidad de células que expresan TMM como marcador de identidad del meristemoide en este órgano

en *Arabidopsis* (Bhave, 2007). Por tanto, considerando la probable función de AtSDD1 en tallos, es interesante destacar la expresión en tallos de *SchSDD1-like* pudiendo tener una función similar a AtSDD1 o similar a *SolycP69A/B* en tallos de *S. chilense* no pudiéndose descartar que pudiese tener incluso ambas funciones, aunque esta hipótesis requiere más detalle de exploración, considerando además que esta investigación no se concentró en el desarrollo de estomas en órganos distintos a hojas.

Respecto a hojas, se realizó una evaluación transcripcional en dos estadios de desarrollo, con el propósito de caracterizar en detalle la posible función de *SchSDD1-like* en este órgano. De manera notable, una gran diferencia en la acumulación del transcrito de este gen se observó entre hoja joven (3-5 cms en expansión) y madura (completamente expandida) (**figura 14**). Considerando los perfiles transcripcionales, claramente la expresión de *SchSDD1-like* está asociada a hojas, y mayoritariamente a hojas en desarrollo, lo que asociaría aún más su posible participación en procesos fisiológicos característicos de este estadio de desarrollo. Estos resultados están en concordancia a lo observado con *SDD1* de *Arabidopsis* (Berger y Altman, 2000), y a lo reportado para los homólogos de *SDD1* en *I. tinctoria* L. (*LiSDD1*) (Xiao *et al.*, 2009) y maíz (Liu *et al.*, 2015), lo que sugiere que *SchSDD1-like* tenga una posible participación en el control de la abundancia estomática. En el caso de *Arabidopsis*, *SDD1* está predominantemente expresando en la epidermis de hojas en desarrollo, específicamente en células M y GMC, aunque también fue detectada una débil expresión en células del mesófilo de la roseta y en todas las capas celulares del meristema apical (SAM). La detección de la presencia de *SDD1* disminuyó a medida que progresó la madurez foliar, prácticamente no detectándose en hojas completamente expandidas (Von Groll *et al.*, 2002). Esto indica lo delimitada de la actividad de AtSDD1 en hojas en desarrollo y en la abundancia estomática desde el punto de vista de expresión célula-específica. La expresión célula-específica de *SchSDD1-like* en hojas en desarrollo de *S. chilense* es un aspecto a ser estudiado, ya que no fue un objetivo abordado en esta tesis.

Por otra parte, el nivel de expresión detectado del gen *SchSDD1-like* en hoja madura, flores y botones florales - aunque más bajo que en hojas jóvenes-, sugiere que este gen en *S. chilense*, podría participar en otras rutas moleculares del desarrollo vegetal. Además podría indicar que la expresión de *SchSDD1-like* se caracteriza por un patrón de expresión específico para cada órgano analizado, incluso para el caso de hojas y flores, dependiente del estadio de desarrollo que se considere, sugiriendo un estrecho control de la regulación de la expresión y función de estas proteasas durante el desarrollo de

la planta. En el caso particular de hoja madura, es importante considerar que Lake *et. al* (2001) demostró en plantas de *Arabidopsis* sometidas a distintas concentraciones de CO₂ e intensidad lumínica, que son las hojas maduras las que perciben los cambios en las condiciones ambientales y que mediante una señal móvil son capaces de transmitir dichas variaciones en el entorno para propiciar cambios fenotípicos en las hojas en desarrollo. En *S. chilense*, los cambios fenotípicos se reflejaron en alteraciones en la abundancia estomática en las hojas nuevas cuando las plantas fueron sometidas a estrés salino (Tapia, 2005). Respecto a señales móviles, se ha propuesto que pudiese ser el regulador positivo del desarrollo de estomas llamado *STOMAGEN/EPFL9*, el cual se sintetiza en el mesófilo y actúa sobre la epidermis, requiriendo *TMM* para su acción (Sugano *et al.*, 2010). Por tanto, se ha sugerido que *AtSDD1* pudiese degradar a *STOMAGEN* para evitar su actividad positiva y de esta manera controlar la abundancia estomática en las hojas nuevas (Shimada *et al.*, 2011). Adicionalmente, Messdaghi y Dietz (2000) reportaron en tabaco que la actividad serino proteasa extracelular disminuye a medida que maduran las hojas, lo que es coincidente con lo detectado en tomate silvestre mediante qPCR en esta investigación (**figura 14**). Interesantemente, Gómez *et. al* (1995) propuso una estrecha relación entre la actividad de las proteasas apoplásticas y peróxido de hidrogeno (H₂O₂). Este H₂O₂ es probablemente generado por la NADH oxidasa apoplástica (Frahry y Schopfer, 2001). Gómez *et. al* (1995) encontró que proteínas apoplásticas de hipocotilos en crecimiento de *Phaseolus vulgaris* fueron menos susceptibles a la digestión proteolítica que proteínas desde plantas completamente desarrolladas. Notablemente, el nivel de H₂O₂ se incrementa a medida que la planta envejece (Golldack *et al.*, 2003). De hecho, la susceptibilidad de las proteínas apoplásticas de los hipocotilos en crecimiento aumento cuando fueron tratadas con H₂O₂ sugiriendo que el peróxido de hidrogeno oxida las proteínas apoplásticas incrementando la susceptibilidad a las proteasas (Gómez *et al.*, 1995). En conjunto estos datos, permite hipotetizar que la generación de H₂O₂ en el apoplasto provoca daño por especies reactivas de oxígeno (ROS) en las proteínas de este espacio, lo que conlleva a un aumento de la degradación proteolítica de estas proteínas, una función clásica de las serino-proteasas tipo subtilisinas. Incluso, la degradación proteolítica de la NADH oxidasa apoplástica pudiese ser un mecanismo de control de los niveles de H₂O₂, siendo las subtilisinas un determinante molecular clave de estos pasos de control (Golldack *et al.*, 2003). Dadas estas consideraciones, la presencia de SchSDD1-like en hojas maduras podría estar relacionada con alguna participación en los estadios iniciales de la senescencia

y/o en la maquinaria de percepción de las señales ambientales con la concomitante regulación y control de la densidad estomática en hojas nuevas en plantas de *S. chilense*.

El perfil de expresión obtenido en flores también indica que la expresión en este órgano, es dependiente del estado de desarrollo. Gollmack *et. al* (2003), reportó la expresión de las subtilasas *AtARA12* (*At-SLP1*), *At-SLP2* y *At-SLP3*, los homólogos en *Arabidopsis* de *SolycSBT1*, *SolycSBT2* y *SolycTMP*, respectivamente, en el receptáculo floral. Otro tipo de proteasas han sido caracterizadas en tejido floral. Es así como *Cardosina A*, una aspártico proteasa de *Cynara cardunculus*, fue detectada en pistilos inmaduros, sugiriendo un posible papel en el desarrollo y crecimiento de esta estructura (Ramalho-Santos *et al.*, 1997). La cisteína proteasa *SmCP* exhibió una expresión dominante en flores en desarrollo, también en xilema, células epidermales y óvulos en *Solanum melongena* especulándose con algún posible papel de esta proteasa en xilogénesis y desarrollo de óvulos (Xu y Chye, 1999). *SolycTMP* ha sido reportada en anteras, planteándose una posible participación de esta subtilasa de tomate en microesporogénesis; sin embargo, su represión mediante técnicas de antisentido no mostró ninguna anomalía fenotípica, lo que indica probables redundancias o compensaciones funcionales por otras subtilasas (Riggs *et al.*, 2001). Es factible que este pudiese ser el caso de *SchSDD1-like*, incluso no es descartable tampoco para *AtSDD1*. Sin embargo, mientras no sean identificados los sustratos específicos de estas enzimas, no será posible determinar su función *in vivo* en los distintos órganos en que se expresan.

En general, la mayor inducción de este gen ocurrió en hojas y específicamente, en hoja joven disminuyendo en hoja madura, por tanto, es posible que *SchSDD1-like* tiene una probable función en eventos asociados con el inicio del desarrollo foliar en *S. chilense*. Sin embargo, considerando las características de los miembros de la familia de las serino-proteasas a la que pertenece *SchSDD1-like*, los cuales son endopeptidasas de amplio espectro de sustratos (Schaller *et al.*, 2011), no es posible descartar su participación en otros procesos órgano-específicos.

X.4 Regulación diferencial de los genes *SchSDD1-like* y *AtSDD1* por estrés abiótico y ABA

Además de la función en diversos procesos de desarrollo de la planta, también ha sido reportada la participación de subtilasas en eventos involucrados en la repuesta frente a estrés abiótico (y también biótico) (Schaller *et al.*, 2011). Es así como Liu *et. al.* (2007b), demostró en *Arabidopsis* la

participación de AtSBT6.1 (AtS1P) en la ruta de señalización activada bajo estrés del retículo endoplasmático generado por salinidad. Esta ruta de señalización se denomina *respuesta de proteínas no plegadas* (UPR) (Rutkowski y Kaufman, 2004) e involucra el procesamiento proteolítico del factor de transcripción bZIP28. Cuando las proteínas mal plegadas se acumulan, bZIP28 se mueve al Golgi donde es procesado por AtSBT6.1 para liberar el dominio bZIP el cual se trasloca al núcleo para activar la respuesta génica en respuesta al estrés. Además de la participación en la respuesta UPR, AtSBT6.1 participa en el inicio de la respuesta a estrés salino en *Arabidopsis* procesando otro factor de transcripción bZIP asociado a membrana, denominado bZIP17, el cual funciona como un sensor/transductor de señal en respuesta a estrés salino. Una vez procesado, su dominio bZIP es trasladado al núcleo para iniciar la respuesta génica bajo esta condición (Liu *et al.*, 2007b). Por otra parte, ha sido demostrada la participación de AtSBT6.2 en la degradación de proteínas oxidadas producidas en plantas de *Arabidopsis* expuestas a Cadmio (Polge *et al.*, 2009). De manera destacable, en todos estos trabajos, la investigación estuvo concentrada en la actividad proteasa de estas subtilasas y no en algún cambio en su expresión génica. En este sentido, fundamentado en la participación funcional de las proteasas en procesos de recambio de proteínas, movilización de nutrientes y otros, se ha planteado la idea de que señales de estrés ambiental podrían regular de manera diferencial la expresión génica de las subtilasas (Schaller *et al.*, 2011). Considerando que salinidad y sequía comparten eventos fisiológicos comunes en las primeras etapas del estrés, se procedió a evaluar el perfil transcripcional de *SchSDD1-like* bajo salinidad y sequía (**figura 17 y 19**). Paralelamente, con la idea de poder comparar el comportamiento transcripcional de los posibles homólogos, se procedió a realizar el mismo análisis en *AtSDD1*. A la fecha, no se encuentra en la literatura algún estudio respecto a la evaluación de la expresión génica de *SDD1* de *Arabidopsis* en respuesta a estrés abiótico. A pesar de esto, los antecedentes disponibles presuponen que este gen debiese responder ante algunas variables ambientales abióticas (Schlüter *et al.*, 2003; Yoo *et al.*, 2009). Esta evaluación pretendía establecer similitudes y/o diferencias que permitieran fundamentar alguna semejanza funcional, más allá que lo observado a nivel de secuencia y análisis *in silico*. Por lo tanto, se evaluó el patrón de expresión de *SchSDD1-like* y *AtSDD1* en hojas de plantas de tomate silvestre y *Arabidopsis*, respectivamente, bajo estrés por salinidad, sequía y aplicación exógena de la hormona ABA.

Al analizar la respuesta transcripcional del gen *SchSDD1-like* bajo estrés salino, este mostró una inducción sostenida durante todo el tiempo del ensayo, observándose la máxima inducción a las 12h, para comenzar a disminuir y exhibir un segundo peak a las 72h (**figura 17**). Este resultado está en concordancia con lo observado por Tapia (2005) en plantas de *S. chilense* expuestas a alta salinidad, cuyas hojas nuevas mostraron una menor SD. Así mismo, un microarreglo de dichas plantas, indicó que uno de los genes altamente inducidos bajo estas condiciones era un miembro de la familia de subtilisinas. De manera relevante, resultados depositados en la base de datos **Arabidopsis eFP Browser** de BAR (<http://bar.utoronto.ca/>; (Winter *et al.*, 2007) también indican que *AtSDD1* es inducido en respuesta a estrés salino, lo que supone una relación funcional entre *SchSDD1-like* y *AtSDD1*. Los estudios de expresión génica de miembros de la familia de subtilisinas bajo condiciones de estrés son escasos. Sin embargo, recientemente, Cao *et. al* (2014) realizó un amplio estudio acerca de la familia de subtilisinas en *vid*, en el cual reportó cambios en los niveles de mRNA de varias subtilisinas después de tratamiento salino en esta planta. En *Arabidopsis*, la serino proteasa AtPAP1 (prolina aminopeptidasa) y la proteasa cloroplástica AtDegP2, presentaron una inducción en su expresión bajo condiciones de salinidad y déficit hídrico (Haussuhl *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque ambas son serino proteasas, ninguna pertenece a la familia de subtilisinas.

Al analizar el perfil transcripcional de *SchSDD1-like* bajo sequía, se observó una significativa inducción al tercer día luego de dejar de regar. Sorprendentemente, los siguientes puntos de evaluación, es decir, al día 4 y 6, el gen se reprimió de manera importante, presentado un comportamiento bifásico bajo sequía. En el caso de *AtSDD1* (**figura 7**), los niveles de transcrito bajo sequía exhibieron un comportamiento muy similar a lo observado en *SchSDD1-like*. Es así como se observó una significativa inducción al día 3 de iniciado el tratamiento de detención de riego y una disminución el día 8, también exhibiendo un comportamiento bifásico bajo estas condiciones. Al respecto, Yoo *et. al* (2010) relacionó la participación de *AtSDD1* con la respuesta frente a déficit hídrico. El análisis de la mutante *gtl1* (*GT-2-like 1*) de *Arabidopsis*, exhibió un aumento en el uso eficiente de agua y por tanto, una mejora en la tolerancia a la sequía, mediante una disminución en la tasa de transpiración sin esto tener un impacto en la producción de biomasa. La disminución de la transpiración fue atribuida a la regulación negativa de *SDD1* por *GTL1*, debido a que el aumento en la expresión de *SDD1* redujo en un 25% la densidad estomática de las plantas *gtl1*. Esto permitió a los autores situar a *SDD1* como un nodo integrador entre el desarrollo estomático y la regulación ambiental de la

producción estomática y el intercambio gaseoso. Adicionalmente, trabajos realizados con los posibles ortólogos de *AtSDD1* en otras plantas han presentado resultados interesantes. Es así como, *liSDD1* aislada de la hierba tradicional china *Isatis tinctoria* mostró compartir las características básicas de las subtilisinas que presenta *AtSDD1*. La expresión de *liSDD1* fue constitutiva en raíz, tallo y especialmente en hojas y el tratamiento con sequía durante una semana redujo significativamente su expresión, indicando su participación en las rutas de respuesta a estrés en esta planta (Xiao *et al.*, 2009). En maíz, la evaluación transcripcional de *ZmSDD1* en hojas de plantas sometidas a tratamiento “simulado” de sequía (PEG 15%) exhibieron el mismo comportamiento que *liSDD1* después de 7 días de tratamiento (Liu *et al.*, 2015). Estos resultados son coincidentes con lo observado en *SchSDD1-like* y en *AtSDD1* bajo sequía en tiempos similares (**figura 19** y **figura 7**, respectivamente); sin embargo, ambos resultados reportados no indicaron una inducción como los observados en esta investigación, toda vez que no se realizaron evaluaciones a tiempos tempranos, no permitiendo descartar entonces este comportamiento transcripcional en estas especies. Por su parte, en plántulas de 2 genotipos de álamo (*Populus balsamifera*) sometidas a 30 días de sequía, los transcritos de *SDD1* no exhibieron significativa variación durante el transcurso del ensayo. Sin embargo, si se apreció una diferencia considerable entre genotipos (genotipo AP-1005 > AP-1006) (Hamanishi *et al.*, 2012). Esto pudiese indicar que el comportamiento transcripcional de los homólogos de *SDD1* y/o de sus posibles sustratos, incluso de la ruta de señalización de desarrollo de estomas, es dependiente de la especie, aun observándose diferencias entre distintos genotipos en la misma especie, como en el caso de álamo. Esta aseveración se ve respaldada en diversos resultados encontrados en la literatura, que permiten concluir que la abundancia estomática en respuesta a la sequía depende de la planta y de la severidad del déficit hídrico impuesto. Es así como Quarrie y Jones (1977) y Silva *et al.* (2009), encontraron una evidente reducción en la cantidad de estomas en hojas de trigo y en arboles de umbú, respectivamente. Por contraste, un aumento en la densidad estomática fue observada en gramíneas bajo moderado estrés hídrico, aunque el incremento fue revertido a medida que aumentó la severidad del estrés (Xu y Zhou, 2008). Por el contrario, no se observaron variaciones en el número de estomas bajo sequía en maní (Clifford *et al.*, 1995). A pesar de estas respuestas dispares entre especies, la relativa similitud transcripcional observada bajo condiciones de estrés entre *SchSDD1-like* y *AtSDD1* sugiere que podrían cumplir funciones similares en condiciones normales y de estrés.

En *Arabidopsis thaliana*, *AtSDD1*, *TMM*, *ER*, *YODA* y *MAPK3/6* regulan de manera negativa el desarrollo de estomas (Pillitteri y Torii, 2012); ejerciendo un efecto inhibitorio sobre los factores de transcripción del tipo bHLH que forman parte de la ruta canónica de producción estomática en *Arabidopsis* (Pillitteri y Torii, 2007). Recientemente, Castilhos *et al.* (2014), utilizando resultados depositados en la base de datos **Genevestigator** (www.genevestigator.com), reportó la represión génica bajo condiciones de sequía de *AtSPCH* y *AtMUTE*, no existiendo información disponible para *AtFAMA*. Considerando este antecedente, se procedió a evaluar la actividad transcripcional de estos tres genes en *Arabidopsis* bajo sequía y compararlos con lo observado en los posibles homólogos en *S. chilense*, para así relacionarlo con el perfil de expresión génica de *AtSDD1* y *SchSDD1-like*, respectivamente. Los datos de expresión mediante qPCR se indican en la **figura 20** para los bHLH de *S. chilense* y en la **figura 8** para *Arabidopsis*. Los resultados observados en los factores de transcripción *SchSPCH-like* y *SchMUTE-like* indican una clara represión bajo condiciones de estrés, aunque la disminución en la expresión génica en *SchSPCH-like* es más rápida que en *SchMUTE-like*. Sin embargo, al día 4 de tratamiento, ambos genes están reprimidos, manteniéndose así hasta el final del ensayo. Interesantemente, *SchFAMA-like* no mostró variaciones significativas en su expresión génica durante todo el tiempo del ensayo, lo que pudiese indicar que la modulación bajo condiciones de estrés en tomate silvestre, es ejercida sobre los 2 primeros factores de transcripción de la ruta de desarrollo de estomas, fundamentalmente sobre el primero de ellos, cuya función reportada en *Arabidopsis* es la primera división asimétrica del linaje estomático, conocida como división de entrada (Bergmann y Sack, 2007). Una posibilidad es que el efecto represor “tardío” de *SchMUTE-like*, comparado con *SchSPCH-like* de cuenta de un punto de control adicional que asegure una disminución efectiva y necesaria de la abundancia estomática en las hojas nuevas de *S. chilense* (**figura 20**). Interesantemente en álamo, Hamanishi *et al.* (2012) encontró que el único de los bHLH que se reprimió durante un experimento de sequía fue *FAMA*, observándose un menor número de estomas en las hojas que se desarrollaron durante el estrés, lo cual es consistente con la función de este gen en *Arabidopsis*, sugiriendo un papel central de este gen en el control del desarrollo estomático en *Populus* bajo condiciones de sequía. Por su parte, los tres bHLH se ven reprimidos en *Arabidopsis* sometidas a estrés por sequía (**figura 8**). Este resultado es consistente con lo reportado en la literatura basándose en los resultados depositados en base de datos (Castilhos *et al.*, 2014) y con lo recientemente reportado por Tricker *et al.* (2012) en que plantas de *Arabidopsis* expuestas a una condición estresante de baja

humedad relativa ($45\pm 5\%$), los niveles de transcritos de *SPCH* y *FAMA* se vieron significativamente reducidos provocando menor densidad estomática en las hojas nuevas de dichas plantas. Por tanto, a diferencia de lo observado en *S. chilense* y *Populus*, en *Arabidopsis* al parecer los tres genes son parte de la integración entre el desarrollo estomático y la respuesta frente a condiciones ambientales como la sequía. Como hipótesis alternativa, el efecto directo sobre *SPCH* y sus homólogos, pudiese tener un efecto represor sobre los siguientes factores de transcripción, toda vez que ellos actúan de manera secuencial en el desarrollo de estomas, aunque a la luz de los resultados aquí presentados y lo reportado en la literatura, esto sería plausible solo en *S. chilense* y en *Arabidopsis*, no así en álamo. A pesar de esto, mayor progreso experimental debe realizarse en esta área para plantear el posible mecanismo de control de los bHLH estomáticos frente a condiciones de estrés abiótico en general. Independiente de lo anterior, los niveles de expresión de *SchSPCH-like*, *SchMUTE-like* y *SchFAMA-like*, sugieren que la expresión de *SchSDD1-like* puede controlar la expresión de estos genes asociados con el desarrollo de estomas. Estos resultados sugieren que *S. chilense* y *Arabidopsis* podrían compartir una ruta de señalización similar para el desarrollo de estomas.

La fitohormona ABA juega un papel importante en la maduración de la semilla y la dormancia y en la adaptación a una variedad de estrés ambientales. Una de las funciones importantes de ABA es acelerar el cierre estomático (Qin y Zeevaart, 2002; Melhorn *et al.*, 2008). Adicionalmente, ha sido reportado que plantas de *Tradescantia virginiana* tratadas con ABA presentaron una mayor densidad estomática en la epidermis, respecto al control (Franks y Farquhar, 2001). De manera reciente, Tanaka *et al.* (2013) realizando análisis sobre una serie de plantas de *Arabidopsis* mutantes en el metabolismo de ABA, demostró que esta fitohormona reduce el número de células epidermales que ingresan al linaje estomático y por tanto, provoca una disminución de la densidad estomática de las nuevas hojas de *Arabidopsis*. En esta tesis, la aplicación exógena de ABA ($100\mu\text{M}$) indujo de manera significativa a *SchSDD1-like* y a *AtSDD1* (**figura 21** y **figura 9**, respectivamente). Comparativamente, la respuesta del gen homólogo en tomate silvestre, es mucho más rápida que lo observado en *Arabidopsis*. En lo específico, ya a la hora de iniciado el tratamiento *SchSDD1-like* presenta una inducción significativa respecto al control tratado con agua siendo sostenida hasta las 4h, alcanzando su nivel máximo a las 12h luego de la aplicación de ABA. En cambio *AtSDD1*, no se observó variación en los niveles de transcrito hasta las 6h de iniciado el tratamiento, momento en el cual hay una inducción significativa de la expresión del gen mantenida hasta las 12h. En tiempos posteriores, a diferencia de lo observado en

S. chilense, *AtSDD1* los niveles de expresión fueron comparables al control. Considerando que ABA está involucrado en la respuesta a estrés y que la aplicación exógena de esta hormona tiene por resultado “adelantar” temporalmente esa respuesta, los resultados obtenidos son coincidentes con lo visualizado en *S. chilense* bajo condiciones de sequía y estrés salino y en *Arabidopsis* en sequía. Es probable que los efectos represores observados en *SchSDD1-like* y *AtSDD1* observados en los tiempos tardíos del ensayo de sequía, se deba probablemente a un hipotético control negativo de la expresión dependiente de ABA considerando que la inducción y señalización por ABA se mantiene en los marcadores moleculares en condiciones de sequía *SchAREB1* y *AtRD29A* (**figura 22** y **figura 10**). De manera indirecta, es posible que algún factor de transcripción que controle la expresión de *AtSDD1* que se reprime inicialmente por ABA (o por sequía), vuelva a niveles de expresión comparables al estado inicial o a una inhibición paulatina de la represión. El único represor de *AtSDD1* reportado a la fecha es *GTL2-like1*, el cual disminuye su represión bajo condiciones de déficit hídrico (Yoo *et al.*, 2010). Los datos depositados en **Arabidopsis eFP Browser** indican que *AtGTL2-like1* se reprime por ABA y en ensayos por sequía; y en este último caso, al cabo de 6h de tratamiento, los valores de expresión son similares al control lo que podría sustentar la hipótesis propuesta. Recientemente, otros miembros de esta familia de factores de transcripción involucrados en la tolerancia a estrés salino han sido descritos en *Arabidopsis* (Park *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2014b), lo que aumenta las posibilidades de la participación de este tipo de factores de transcripción en los mecanismos de respuesta frente a estrés. Es interesante proponer este mecanismo de control, ya que debe existir un equilibrio entre la cantidad de estomas suficientes y necesarios para asegurar la viabilidad de la planta. Si la activación de la ruta de control negativo de estomas estuviese permanentemente activada bajo estrés, por ejemplo, mediante la inducción sostenida de *SchSDD1-like/AtSDD1*, existiría la posibilidad de que el número de estomas fuese tan bajo, que la captación de CO₂ y la fijación del carbono atmosférico durante la fotosíntesis no pudiera satisfacer los requerimientos metabólicos de la planta, poniendo en riesgo la sobrevivencia del organismo vegetal; por lo tanto, tiene sentido la disminución en la expresión de estos genes, después de un alto nivel de expresión como respuesta inicial. A la fecha, en *Arabidopsis* solo mutantes de los bHLH han sido reportados carentes de estomas, siendo muy difíciles de mantener en condiciones experimentales, incluso la planta mutante homocigota *spch-1* es pequeña e infértil (MacAlister *et al.*, 2007). Paralelamente, y continuando con la hipótesis propuesta acerca de una posible ruta de señalización común del desarrollo de estomas en *S. chilense* y *Arabidopsis*, se analizó el perfil

transcripcional de los bHLH en ambas especies bajo tratamiento con ABA. La **figura 22** muestra los resultados para los posibles homólogos en *S. chilense*. Coincidentemente con lo observado bajo condiciones de sequía en esta especie, solo *SchSPCH-like* y *SchMUTE-like* se reprimen bajo tratamiento con ABA, visualizándose este comportamiento a la 1h de iniciado el ensayo en ambos casos. Durante todos los tiempos evaluados, el perfil de expresión génica es oscilante aunque a las 12h y 24h ambos están reprimidos, lo que coincide con una inducción significativa de *SchSDD1-like* (**figura 21**). Al igual que en el ensayo por sequía, *SchFAMA-like* no presentó variaciones en su expresión génica, lo que refuerza la idea de que son *SchSPCH-like* y *SchMUTE-like* los puntos de modulación en la ruta canónica de desarrollo de estomas en *S. chilense*. En el caso de *Arabidopsis*, la **figura 10** muestra que los 3 genes responden reprimiéndose frente al tratamiento. Interesantemente, *AtSPCH* muestra un perfil de expresión génica similar a su homólogo en *S. chilense*, siendo significativa a las 12h, lo que coincide con una inducción significativa de *AtSDD1* (**figura 9**). Respecto a *AtMUTE* y *AtFAMA*, la represión es significativa a tiempos más tempranos a la inducción observada de *AtSDD1*. Es probable que la represión por ABA de estos genes sea en tiempos tempranos, independientes de *AtSDD1*. Esto permite sugerir que el efecto del ABA sobre la respuesta a estrés tenga dos componentes: uno fisiológico que involucra el cierre estomático el cual se ha reportado que es tan rápido como a los 5 minutos (Tanaka *et al.*, 2005), y uno genético más tardío que involucraría una represión de *AtMUTE/AtFAMA* para detener el progreso del desarrollo estomático prevalente, para luego reprimirse también *AtSPCH* y detener el proceso de generación de estomas desde la entrada al linaje estomático. De manera general, los resultados obtenidos en *Arabidopsis*, están en concordancia con lo reportado por Tanaka *et al.* (2013) en que a medida que los niveles endógenos de ABA aumentan, los niveles de expresión de *AtSPCH* y *AtMUTE* disminuyen. De manera relevante, los resultados obtenidos en esta investigación muestran que los niveles de *SPCH*, *MUTE* y *FAMA* en *Arabidopsis*; y *SPCH* y *MUTE* en *S. chilense*, se ven reprimidos en condiciones de sequía y tratamiento de ABA, mostrando un comportamiento inverso a *SDD1* en las mismas condiciones, sugiriendo que *SchSDD1-like/AtSDD1* puede controlar la expresión de estos genes asociados con el desarrollo de estomas, lo que explicaría la disminución de la densidad estomática reportada en las hojas nuevas en *S. chilense* (Tapia, 2005) y en *Arabidopsis* (Tricker *et al.*, 2012). Así mismo, esto también indicaría que *Arabidopsis* y *S. chilense* compartirían una ruta de señalización común para el desarrollo de estomas.

Para comprender con mayor detalle la respuesta frente a sequía y ABA por parte de los genes evaluados en *Arabidopsis* y de esta manera tener alguna aproximación de los posibles elementos presentes en los promotores de los respectivos homólogos en *S. chilense*, considerando la respuesta similar observada en los genes ante ambas condiciones, se realizó un estudio bioinformático de las 2000 pares de bases antes del ATG de los genes de *Arabidopsis*. El análisis *in silico* de la región río arriba del gen *AtSDD1* indicó que posee una serie de elementos asociados a la respuesta a deshidratación y ABA: ABRE, CBF/DREB, MYB y MYC. Los dos principales elementos en *cis* encontrados en promotores inducibles por sequía, salinidad y frío, son ABRE (*ABA-responsive element*) y DRE/CRT (*Dehydration-responsive element/C-Repeat*), y ambos han sido reportados en la activación de la expresión génica en respuesta a estrés (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). Los elementos ABRE encontrados en la región promotora de los genes analizados, es la principal secuencia en *cis* involucrada en la inducción génica mediada por ABA, el cual es reconocido por proteínas del tipo AREB/ABF para activar la transcripción de los genes de respuesta a la fitohormona (Uno *et al.*, 2000). Por su parte, el motivo DRE encontrado está presente en la región promotora de los genes blanco activados por los factores de transcripción del tipo CBF/DREB1, los cuales son codificados por genes de rápida inducción por frío (Kasuga *et al.*, 1999; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005). Interesantemente, ha sido reportado que la sobreexpresión de genes que codifican para proteínas CBF/DREB1, lograron conferir tolerancia al frío, sequía y salinidad, revelando su participación general en la respuesta a estrés por déficit hídrico (Liu *et al.*, 1998). La presencia de todos estos elementos de respuesta encontrados en *SDD1*, dan cuenta de la inducción por sequía y ABA observados para el gen bajo estos tratamientos. Adicionalmente, las secuencias reconocidas por factores de transcripción MYC y MYB detectadas en el promotor de *SDD1*, fueron descritas en el promotor del gen *RD22* el cual es inducible por ABA. Interesantemente, la síntesis de las proteínas MYC y MYB depende de la acumulación gradual de ABA, lo que revela que su participación está relacionada con la respuesta en eventos tardíos del estrés (Abe *et al.*, 2003). Esta última característica, permite sugerir que sea, en parte, responsable de la inducción a las 6h después de iniciado el tratamiento con ABA, a diferencias de lo observado en *MUTE* y *FAMA*, que se inducen más rápido. Por otra parte, una alta cantidad de sitios GT, reconocidos por los factores de transcripción denominados GT-2 (Zhou, 1999), los cuales fueron identificados en los promotores de genes regulados por luz, tal como el gen que codifica para la subunidad pequeña de la RUBISCO de arveja (Green *et al.*, 1987), recientemente ha sido reportada su

participación en la tolerancia a estrés abiótico en *Arabidopsis* (Xie *et al.*, 2009). En ese contexto, Yoo *et al.* (2010), encontró evidencias que le permitieron plantear que bajo condiciones de riego normal, *GTL1* trans-reprime a *SDD1* en *Arabidopsis*, resultando una regulación positiva del número de estomas. Sin embargo, bajo estrés por déficit hídrico, *GTL1* se reprime, provocando la inducción de *SDD1* y con esto, un control negativo del desarrollo estomático, reduciéndose el número de estomas en las hojas para reducir la transpiración y así, aumentar el uso eficiente de agua en la planta bajo condiciones de estrés. Este modelo de regulación, sitúa a *SDD1* como un gen integrador entre las condiciones ambientales prevalentes durante el ciclo vital de la planta y la modulación del desarrollo estomático como un mecanismo de plasticidad fenotípica para hacer frente al estrés. Por tanto, es posible que el tratamiento de sequía y ABA aplicado, reprimieran la expresión génica de *GTL1*, inhibiendo la represión sobre *SDD1* bajo ambas condiciones, lo que se correlacionaría con la inducción observada de *AtSDD1* (**figura 7 y 9**). La presencia de un gran set de elementos de respuesta en *cis*, indican una regulación altamente compleja y probablemente sinérgica frente a condiciones de estrés.

Por otra parte, también se analizó del mismo modo las regiones promotoras de los 3 genes bHLH reguladores positivos del desarrollo estomático de *Arabidopsis*. Secuencias ABRE y MYC se encontraron en las tres regiones promotoras. Sumado a estos motivos, todas ellas contienen elementos LTRECOREATCOR15, los cuales median la respuesta a bajas temperaturas y a deshidratación en forma independiente de ABA (Shinozaki *et al.*, 2003). En conjunto, estas secuencias están involucradas en la respuesta mediada por deshidratación y ABA, las que pueden estar relacionadas con la inducción o represión de determinados genes dependiendo del factor de transcripción que participe en el reconocimiento del elemento en *cis* (Shinozaki *et al.*, 2003). En función de los resultados obtenidos, en los cuales los *SPCH*, *MUTE* y *FAMA* se reprimen bajo sequía y ABA, es posible proponer que están sometidos al efecto de algún represor transcripcional no determinado, cuya actividad y/o expresión se ve inducida en estas condiciones. Una hipótesis alternativa, es que las señales mediadas por la actividad y/o inducción de la expresión génica de *SDD1* –u otro represor del desarrollo estomático, sean suficientes para reprimir transcripcionalmente a estos genes de la ruta canónica del desarrollo estomático en *Arabidopsis*. En este sentido, el elemento GT se encontró altamente representado en todas las secuencias; motivo que está involucrado en la represión transcripcional de *SDD1* (Yoo *et al.*, 2010). Estos mismos autores, proponen que posiblemente otros miembros de la familia GT-2 que están estrechamente relacionados con *GTL1*, pueden tener funciones similares como represor transcripcional

de *SDD1*. Esto podría ser aplicado a otros genes del desarrollo estomático, respaldando la hipótesis propuesta: Si *GTL1* reprime la expresión de *SDD1* y esta represión se ve inhibida bajo estrés, la concomitante inducción génica de *SDD1* podría ser suficiente para activar la ruta de control negativo del desarrollo de estomas y también reprimir la transcripción de *SPCH*, *MUTE* y *FAMA*; u otros miembros de la familia *GLT1* podría reprimir directamente a estos genes. Cualquiera de estas hipótesis, explicaría, a lo menos parcialmente, la represión génica observada en estos 3 genes bajo los tratamientos evaluados (**figura 8 y 10**). Otra secuencia que significativamente está representada, es el motivo de 9 nucleótidos denominado ATH-5. ATH-5 es un factor de transcripción que experimentalmente se ha reportado como un regulador positivo de la sensibilidad a ABA, mediando el efecto inhibitorio de ABA sobre el crecimiento de la plántula (Johannesson *et al.*, 2003). Esto indica que los genes que presenten esta secuencia en la región promotora, estarán sometidos a una regulación negativa mediada por ABA y su sensibilidad a la presencia de la fitohormona posiblemente dependerá de la cantidad de elementos ATH-5 que contengan. De esta manera, de los 3 genes reguladores positivos del desarrollo estomático, *FAMA* es el que presenta la mayor cantidad de elementos ATH-5 (12x), lo que se correlaciona con la rápida represión bajo tratamiento con ABA (**figura 10**). *MUTE* y *SPCH* presentan una menor cantidad de elementos ATH-5, lo que explicaría la cinética más lenta respecto a *FAMA* en reprimirse bajo tratamiento con ABA. *AtSDD1* también presenta sitios ATH-5, sin embargo, son solo 2, lo que sugiere un menor efecto represor de ABA sobre este gen. Este efecto represor de ABA, probablemente se vea aumentado a medida que ABA se acumula en la planta producto del estrés, lo que explicaría la represión que se observa en plantas de *Arabidopsis* bajo sequía a los 8 días post-tratamiento (**figura 7**). A pesar de esto, la posible combinación funcional entre ABRE, DRE, GT, ATH-5; entre otros, debe ser estudiada con mayor detalle.

En conjunto, la presencia de una serie de elementos de respuesta a ABA y estrés abiótico, puede dar cuenta del comportamiento transcripcional observado en los genes de la ruta de desarrollo de estomas evaluados en *Arabidopsis*, lo cual permite suponer una presencia común de tales secuencias regulatorias en las regiones promotoras de los homólogos de *S. chilense*. Cabe señalar que la existencia de varios otros elementos *cis* potencialmente involucrados en la respuesta a ABA y estrés abiótico, indica que el estudio de procesos complejos, tales como la aclimatación o tolerancia a estrés, puede basarse en la identificación de combinación o combinaciones de elementos *cis* (Lindlof *et al.*, 2009), por lo tanto, contar con un conjunto de secuencias reguladoras puede resultar en un control de la

transcripción extremadamente complicado. Los datos *in silico* obtenidos, respaldan los antecedentes previos que indican que la densidad estomática es modulada por factores ambientales.

X.5 *SchSDD1-like* está involucrado en la regulación de la densidad estomática y en su patrón de distribución en las hojas

Todos las evidencias obtenidas indicarían que el gen *SchSDD1-like* sería el homólogo funcional del gen *SDD1* de *Arabidopsis*. Con la idea de confirmar este postulado, plantas mutantes *sdd1-3* fueron complementadas con el gen *SchSDD1-like*. El resultado de este ensayo, permitió obtener varias líneas complementadas con diferente nivel de expresión del transgen (**figura 23**), las cuales exhibieron una significativa reducción del número de estomas comparada con la planta *sdd1-3* (**figura 24**, **figura 25** y **figura S1-III**). La **figura 24** muestra el fenotipo epidermal de la mutante, la cual presenta una altísima densidad estomática comparada con la planta silvestre, además de presentar estomas agrupados (*clusters*), esto es, violando la regla del “espaciamiento de una célula”. De manera notable, la planta mutante y las plantas complementadas no exhibieron ningún otro fenotipo detectable en el desarrollo, lo que refuerza la idea que *SchSDD1-like* actúa específicamente en el desarrollo estomático en *S. chilense*, de manera similar a lo reportado para *AtSDD1* (Berger y Altman, 2000). Sin embargo, tal como lo consigna la **figura 24C y D**, si bien existe una significativa reducción del número de estomas en las hojas de las plantas complementadas, el fenotipo de estomas agrupados no desapareció por completo. Considerando que esto puede ser un efecto secundario de la expresión constitutiva del transgen en las plantas complementadas, el resultado fenotípico permite plantear que *SchSDD1-like* es el putativo ortólogo del gen *SDD1* de *Arabidopsis*.

Nuevamente para desafiar la hipótesis entre la expresión de los bHLH y la disminución de la densidad estomática, se examinaron en las plantas complementadas bajo condiciones de crecimiento normal, los niveles de mRNA de estos factores de transcripción. La **figura 26** indica que claramente la alta abundancia estomática observada en la planta mutante *sdd1-3* se relaciona con los altos niveles de expresión de *SPCH*, *MUTE* y *FAMA* en sus hojas nuevas, comparados con la planta silvestre. Esto indica que la ruta de control negativo del desarrollo de estomas, está desregulada en la planta mutante evidenciando que *AtSDD1* ejerce un control sobre la expresión de los bHLH. Validando lo anterior, la **figura 27** muestra que la complementación de la planta mutante *sdd1-3* redujo de manera significativa los niveles de expresión de los 3 genes bHLH de manera proporcional a la expresión del transgen,

demostrando el efecto regulador negativo de *SchSDD1-like* sobre la expresión genica de *SPCH*, *MUTE* y *FAMA*. Así mismo, esto reforzaría la idea de que *Arabidopsis* y *S.chilense* comparten una ruta de señalización común para el desarrollo de estomas. Sin embargo, considerando que estos tres genes actúan de manera secuencial durante el desarrollo de estomas y que la expresión de *MUTE* y *FAMA* depende de la expresión de *SPCH* (MacAlister *et al.*, 2007), queda pendiente por demostrar si el efecto es solo sobre *SPCH* o actúa reprimiendo a los 3 genes de manera independiente.

Según el modelo actual de control del desarrollo estomático en *Arabidopsis*, la ruta de señalización TMM/ERf-YODA-MAPK actúa de manera negativa sobre los factores de transcripción bHLH que controlan las etapas secuenciales involucradas en la formación de los complejos estomáticos (Bergmann *et al.*, 2004; Shpak *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007b). El paso de fosforilación de *SPCH* por MPK3/6 ha sido demostrado como el evento que controla la entrada al linaje estomático, además de conectar la ruta de las MAPK con los reguladores transcripcionales del desarrollo de estomas (Lampard *et al.*, 2008). Las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, tienen la potencialidad de cambiar las propiedades de las proteínas, entre ellas, su actividad, localización subcelular, afinidad por otras proteínas o por el DNA (Dong y Bergmann, 2010). Kanaoka *et al.* (2008), demostró experimentalmente que la afinidad del heterodímero que forma *SPCH* con los bHLH ICE1(SCRM)•SCRM2, los cuales dirigen la acción secuencial de *SPCH*, *MUTE* y *FAMA*, es débil. Sin embargo, la proteína mutante *scrm-D* (ICE1_{R236H}), tiene una mayor afinidad por *SPCH* y presenta un fenotipo de exceso de estomas, similar al observado en plantas que expresan *SPCH* sin su dominio de fosforilación (MPKTD), indicando una actividad constitutiva de *SPCH*. Por lo tanto, si la actividad de *SPCH* requiere la asociación con SCRM•SCRM2 y la fosforilación es una señal inhibitoria de la actividad transcripcional de *SPCH* (Lampard *et al.*, 2008), es posible que una activación permanente de la ruta de control negativo produzca una fosforilación permanente de *SPCH* desestabilizando el heterodímero, la degradación de *SPCH* y la consecuente disminución del conjunto de células que terminará siendo estomas maduros. Evidentemente, estos eventos deben ser rigurosamente evaluados experimentalmente. Interesantemente, se ha reportado que *SPCH* se une directamente a su propio promotor y a los promotores de ICE1/SCRM y SCRM2 para inducir su expresión (Kanaoka *et al.*, 2008; Lau *et al.*, 2014), poniendo en evidencia una retroalimentación positiva de la regulación génica de este circuito molecular necesaria para generar la asociación *SPCH*/SCRM activa y dirigir la entrada al linaje celular. Asimismo, *SPCH* se une directamente al propio promotor de *MUTE* (Lau *et al.*, 2014). Estos

antecedentes permiten especular que la activación de la ruta de control negativo de la abundancia estomática, inducida por la expresión constitutiva de *SchSDD1-like*, provoca una actividad permanente de las MAPK3/6 aumentando los niveles de SPCH fosforilado. El aumento de SPCH fosforilado, induce su degradación, lo cual trae como consecuencia una disminución de los niveles de transcrito de SPCH, ICE1/SCRM, SCRM2 y MUTE. Y si, aunque no ha sido demostrado hasta la fecha, FAMA fuese blanco molecular de SPCH y/o MUTE, entonces una disminución de la actividad transcripcional de ambos, produciría una disminución en la cantidad de transcritos de FAMA. Este “modelo” de regulación transcripcional sugerido, se ve respaldado por los resultados de expresión génica observados en la planta mutante *sdd1-3* de *Arabidopsis*, la cual no presenta la proteína SDD1 funcional, y que exhibe una elevada cantidad de mRNA de *SPCH*, *MUTE* y *FAMA*, respecto a la planta wild-type (**Figura 26**) y una alta densidad estomática. Del mismo modo, las plantas silvestres que sobreexpresan el gen *SchSDD1-like*, presentan una represión transcripcional de los genes reguladores positivos del desarrollo de estomas (**Figura 31** y **37**), evidenciándose que las señales producidas como consecuencia de la actividad de *SchSDD1-like*, y probablemente también de *AtSDD1*, regulan transcripcionalmente genes río abajo involucrados en el desarrollo de estomas. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis, no permiten descartar la participación de otros genes que estén involucrados de manera directa o indirecta en la regulación de la expresión génica de *SPCH*, *MUTE* y *FAMA*.

X.6 La reducción de la densidad estomática producto de la sobreexpresión de *SchSDD1-like* aumenta la tolerancia a la deshidratación en plantas de *Arabidopsis* y tomate

El estrés hídrico, junto con la salinidad y las bajas temperaturas, son los principales factores medioambientales que afectan considerablemente la productividad, el rendimiento y la calidad de los diferentes cultivos de interés agronómico. El avance del conocimiento sobre la regulación génica en respuesta a estrés, ha permitido en algunos casos, entender a nivel transcripcional los mecanismos de adaptación y aclimatación de las plantas que enfrentan dichas condiciones adversas. En este contexto, la expresión de *SchSDD1-like* se vio inducida por salinidad, sequía y ABA. Por tanto, este gen fue sobreexpresado en *Arabidopsis* para evaluar su posible papel en conferir tolerancia a la deshidratación. Con la misma idea, *SchSDD1-like* fue expresado de manera constitutiva en plantas de tomate cultivado,

considerando además la alta cercanía filogenética entre *S. chilense* y *S. lycopersicum*, y el potencial uso biotecnológico de *SchSDD1-like* en un cultivo de interés comercial.

En *Arabidopsis*, dos líneas transgénicas independientes que sobreexpresaron el gen *SchSDD1-like* fueron escogidas para los análisis. Como muestra la **figura 28**, el análisis mediante qPCR indica que la línea transgénica 1 presentó el mayor nivel de expresión del transgen y la línea 2 el menor. Considerando entonces la similitud entre *SchSDD1-like* y *AtSDD1* a nivel de secuencia, expresión órgano-específica y modulación transcripcional sobre los bHLH involucrados en el control del desarrollo estomático, se analizó el efecto de la sobreexpresión de *SchSDD1-like* sobre la abundancia estomática en las hojas de *Arabidopsis*. Efectivamente, tal como lo indica la **figura 29** y la **figura 30** (también la **figura S3-III**), las plantas sobreexpresoras presentan una significativa disminución en la densidad estomática de la epidermis abaxial de las hojas de *Arabidopsis*, observándose además que dicha disminución es proporcional al nivel de expresión del transgen. Cabe señalar, que estas líneas transgénicas, las cuales presentaron una disminución de un 34% (línea 1) y de un 18% (línea 2) en la densidad estomática respecto a la planta silvestre, no exhibieron ningún otro fenotipo detectable en el desarrollo, sugiriendo que la sobreexpresión de *SchSDD1-like* específicamente afecta el desarrollo estomático.

En tomate cultivado, cuatro fueron las líneas transgénicas independientes que sobreexpresaron el gen *SchSDD1-like* escogidas para los análisis. Como muestra la **figura 34**, el análisis mediante qPCR indica que la línea transgénica 1 presentó el mayor nivel de expresión del transgen y la línea 7 el menor. Considerando el resultado obtenido de la sobreexpresión del gen *SchSDD1-like* en *Arabidopsis*, se analizó el efecto sobre la abundancia estomática en las hojas completamente expandidas de las plantas transgénicas de tomate. La **figura 35** y la **figura 36**, muestran que las *P_{35S}:SchSDD1-like* de tomate presentan una significativa disminución en la densidad estomática de la epidermis abaxial de sus hojas, comparadas con las de la planta silvestre. Cabe señalar, que estas líneas transgénicas, las cuales presentaron un rango de disminución en la densidad estomática respecto a la planta silvestre, que va desde un 64% (línea 1) hasta un 48% (línea 7), no exhibieron ningún otro fenotipo detectable en el desarrollo de manera similar a lo observado en las plantas sobreexpresoras de *Arabidopsis*, ratificando que la sobreexpresión de *SchSDD1-like* afecta solo el desarrollo estomático.

Tanto en *Arabidopsis* como en tomate, los valores obtenidos de densidad estomática no están en directa proporcionalidad a los niveles de expresión del transgen. Esto probablemente está en

relación con la ruta de señalización mediante receptor-ligando, (interacción que presenta, en general, una de cinética de saturación (Hulme y Trevethick, 2010)), involucrada en el control negativo de la abundancia estomática. Como el putativo ligando procesado por AtSDD1 debe ser reconocido por el receptor AtTMM y AtERECTA, es probable que la ruta alcance un punto de saturación y a pesar de tener una gran cantidad de la proteína AtSDD1 disponible (y posiblemente de su ligando), esta no se vea reflejada en un mayor nivel de inducción de la ruta y en la correspondiente disminución en la cantidad de estomas en la epidermis foliar. Por otra parte, la epidermis de las plantas sobreexpresoras exhiben células del pavimento y estomas de mayor tamaño respecto a las mismas células en la planta silvestre (**figura 30** y **figura 36**). Respecto a las células del pavimento, estas se definen como una célula diferenciada que proviene directamente de una célula protodermal o de una MMC, siendo estas últimas las que contribuyen en mayor cuantía (>50%) al número de células del pavimento (Geisler *et al.*, 2000). Las células del pavimento provenientes de una célula protodermal no diferenciada son más grandes que las derivadas de una MMC (Hara *et al.*, 2009); por tanto, es posible que la sobreexpresión de *SchSDD1-like* impida el ingreso de las células al linaje estomático. En cuanto al mayor tamaño observado de los estomas, recientemente ha sido demostrado en *Arabidopsis* que existe una relación inversa entre el tamaño y la densidad estomática (Doheny-Adams *et al.*, 2012); lo que se traduce en una significativa disminución en la conductancia estomática y en la asimilación de CO₂ respecto a la planta silvestre (Franks *et al.*, 2015). Sin embargo, de manera notable, las plantas con menor densidad de estomas, presentan un uso eficiente del agua significativamente mayor a las plantas silvestres y a las mutantes con alta densidad estomática. Es probable que exista un mecanismo que permita compensar la menor presencia de estomas, ajustando el tamaño y/o la apertura del poro estomático y de esta manera evitar comprometer la viabilidad de la planta. Es probable que la sobreexpresión de *SchSDD1-like* en *Arabidopsis* para disminuir la densidad estomática en sus hojas, genere el efecto opuesto en el tamaño. De esta manera, la ruta que controla la densidad y el tamaño de los estomas parece estar relacionada. Sin embargo, si la señalización que involucra a *AtSDD1* (o a *SchSDD1-like*) influye directa o indirectamente sobre el tamaño de los estomas, debe ser estudiada con mayor detalle.

Considerando que la inducción de *SchSDD1-like* bajo estrés, coincide con una disminución en los niveles de expresión de los bHLH en tales condiciones y que la sobreexpresión del mismo gen en *Arabidopsis* y tomate, redujo la cantidad de estomas en las plantas transgénicas, fue posible plantear la hipótesis que la reducción del número de estomas observado, respondía a una alteración en la

expresión génica de los reguladores positivos del desarrollo estomático en estas plantas. Para probar esta hipótesis, se examinaron en las plantas transgénicas bajo condiciones de crecimiento normal, los niveles de mRNA de los factores de transcripción claves que participan en la ruta canónica de desarrollo estomático en *Arabidopsis*. Tal como lo indica la **figura 31**, los niveles de expresión de *AtSPCH*, *AtMUTE* y *AtFAMA* están reprimidos de manera significativa en las plantas transgénicas, cuya extensión está correlacionada con los niveles de expresión de *SchSDD1-like*. En este sentido, Yang *et al.* (2011) observó que plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaron el gen WIN1/SHN1, involucrado en la biosíntesis de las ceras cuticulares, presentaron una menor abundancia estomática, que se correspondió con una disminución en los niveles de expresión de *AtSPCH*, *AtMUTE*, y en menor proporción, *AtFAMA*. De esta manera, es posible sugerir que la disminución de la densidad estomática en las hojas de las líneas transgénicas, responde al efecto represor que ejerce *SchSDD1-like* sobre los genes que forman parte de la ruta canónica de desarrollo de estomas, además de limitar probablemente, el número de células que ingresan al linaje estomático. El mismo análisis realizado en tomate, mostró que todas las líneas transgénicas exhibieron una significativa reducción de los niveles de mRNA de *SolycSPCH-like*; y la línea #1 y #7 mostraron similar resultado para el gen *SolycMUTE-like*. Interesantemente, los niveles de transcritos de *SolycFAMA-like* no mostraron variaciones significativas (**Figura 37**). Estos resultados indican que en tomate, el control del desarrollo estomático es principalmente modulando la actividad transcripcional de los primeros eventos del desarrollo estomático, esto es, regulando la expresión de los homólogos de *SPCH* y *MUTE*. Posiblemente, el prácticamente inalterable perfil transcripcional de *SolycFAMA-like* se deba a que este gen no es un blanco molecular de las señales gatilladas por la expresión de *SchSDD1-like*. Estas evidencias confirman lo observado bajo sequía y aplicación exógena de ABA (**figura 20** y **figura 22**), en los cuales los genes reguladores positivos del desarrollo estomático en tomate modulados por estas condiciones, fueron *SchSPCH-like* y *SchMUTE-like*.

Recientemente se ha sugerido que una menor densidad estomática confiere una mayor tolerancia a la sequía (Yoo *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2012). Consistente con estos estudios, las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaron el gen *SchSDD1-like*, las cuales presentaron una disminución en la densidad estomática en sus hojas, exhibieron una menor tasa de pérdida de agua (**figura 32**), lo que indica que las plantas sobreexpresoras y la línea complementada evaluada, tienen un significativo aumento en la capacidad de retención del agua disponible; lo cual

estuvo en correspondencia con el nivel de expresión del transgen en las diferentes líneas transgénicas. La tasa de pérdida de agua es un parámetro importante que refleja el estado hídrico de la planta y se ha utilizado como un indicador confiable de la tolerancia a la sequía en plantas (Dhanda y Sethi, 1998; Song *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Tamirisa *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014a). Similar a lo observado en las plantas transgénicas de *Arabidodopsis*, las plantas de tomate que sobreexpresan el gen *SchSDD1-like*, también presentaron una menor densidad estomática respecto a la planta de tomate no transformada (**figura 35** y **figura 36**), y consecuentemente exhibieron una menor tasa de pérdida de agua, sin existir diferencias significativas en este parámetro entre las líneas transgénicas, a pesar de los distintos niveles de expresión del transgen (**figura 34**), reflejando probablemente también, que la vía de control negativo del desarrollo de estomas en tomate, está sometida, tanto a una dependencia de la presencia de un receptor, probablemente el homólogo de *TMM*, y a la respectiva saturación del mismo (Hulme y Trevethick, 2010). Por su parte, ha sido reportado que plantas de tomate mutantes con deficiencia en el metabolismo del ABA y que presentan menores concentraciones endógenas de la hormona, presentaron una mayor tasa de transpiración asociada a más estomas en sus hojas y tendientes a permanecer abiertos. Estas plantas presentaron un fenotipo marcadamente marchito (Jordá *et al.*, 2000). Este antecedente, pone de manifiesto que el control de la pérdida de agua en una planta de interés agronómico bajo condiciones de déficit hídrico, permitiría disminuir la posibilidad de desmedro en el rendimiento vegetal. En ese sentido, los resultados obtenidos en esta investigación utilizando el gen *SchSDD1-like* como aproximación biotecnológica para mejorar la tolerancia a la deshidratación, son promisorios y deben ser confirmados en ensayos de sequía en condiciones de campo. Muy recientemente, Liu *et al.* (2015), reportó que la sobreexpresión del gen *ZmSDD1* en plantas de maíz, condujo a una menor densidad estomática en las hojas y un aumento en la tolerancia a la sequía. Sin embargo, en este trabajo no se realizaron experimentos funcionales para demostrar la función específica de *ZmSDD1* en el desarrollo estomático ni la evaluación del efecto de la sobreexpresión de *ZmSDD1* sobre los putativos homólogos de *SPCH*, *MUTE* y *FAMA* de maíz. Los datos de Liu *et al.* (2015), están en concordancia con los resultados mostrados en la **figura 32** y **figura 38**, y confirman el papel represor de la abundancia estomática de *SchSDD1-like* (y sus homólogos), lo que explica el incremento observado en la capacidad para retener agua comparada con la planta silvestre. De manera relevante, hasta la fecha, este el primer gen descrito de una subtilisina de *S. chilense* involucrado en el control de la densidad estomática.

El déficit hídrico puede inducir una serie de respuestas fisiológicas en las plantas (Seki *et al.*, 2007). Por tanto, con la idea de explorar los posibles mecanismos responsables que pudieran dar cuenta de un aumento en la tolerancia a la sequía en las plantas que sobreexpresaron el gen *SchSDD1-like* y que presentaron una menor densidad estomática en su hojas, varios experimentos fueron realizados durante 8 días de privación de riego en estas plantas transgénicas, para monitorear cambios en algunos procesos fisiológicos asociados con la respuesta a estrés. Además de la ya descrita menor pérdida de agua encontrada en las plantas transgénicas, bajos niveles de MDA fueron observados en las líneas transgénicas bajo sequía comparado con la planta WT (**figura 33A**), lo que sugiere que bajos niveles también de peroxidación de lípidos existen en las plantas transgénicas. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas durante la sequía, salinidad y estrés por temperatura, causan daño oxidativo (Miller *et al.*, 2010), lo que se condice con una mayor acumulación de MDA debido a un incremento en los radicales libres, conduciendo a daño en las membranas celulares.

Aunque actualmente existen trabajos reportados en los cuales la transferencia de un único gen inducible por estrés, ha permitido la aumentar la tolerancia en plantas (Xie *et al.*, 2012; Tamirisa *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015), resulta claro que el gen transferido, en este caso *SchSDD1-like*, debe estar involucrado en la modulación de una ruta de transducción de señales que regula la expresión de genes blanco río abajo. Considerado que *SchSDD1-like*, así como *AtSDD1*, no codifica para un factor de transcripción, el control de la expresión de los genes de respuesta a estrés, es de manera indirecta. En este estudio, la expresión del gen *AtRD29A* fue significativamente inducida en las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *SchSDD1-like* (**figura 33B**). El estrés osmótico causado por la baja disponibilidad de agua, incrementa los niveles de ABA, lo cual a su vez induce la expresión de genes de respuesta a estrés dependientes de ABA, entre los que se encuentra *RD29A*, los cuales se ha reportado que son blancos de MPK's en *Arabidopsis* (Hua *et al.*, 2006), las cuales también son activadas por NaCl, ABA, frío e hiperosmolaridad, siendo este comportamiento conservado en plantas, levaduras y células animales (de Nadal *et al.*, 2002). Al respecto, Hua *et al.* (2006) demostró la activación de *AtMPK3* mediante NaCl, manitol y ABA, consistentemente con lo observado en reportes previos (Jonak, 2002). Al respecto, recientemente Li *et al.* (2014) demostró que la *MAPK3* de *Solanum pimpinelifolium* (*SpMPK3*) rápidamente aumenta su expresión en estas plantas de tomate expuestas a sequía, salinidad y frío; y su sobreexpresión en *Arabidopsis* confería un aumento en la tolerancia a estrés osmótico y percepción a tratamientos con ABA. Notablemente, las plantas transgénicas

sobreexpresoras de *SpMPK3* presentaron una inducción significativamente mayor respecto a las plantas WT de algunos genes inducibles por estrés, siendo *AtRD29A* uno de ellos, lo que permitió a los autores señalar que *SpMPK3* actuaría regulando positivamente a *RD29A*. Por otra parte, las plantas de maíz sobreexpresoras de *ZmSDD1* presentaron un nivel de expresión mayor de *ZmMPK3* que las plantas no transformadas, lo que indica que no tan solo hay un aumento de su actividad quinasa, sino que también un cambio en su expresión génica; y lo que es más interesante aún, que este cambio es provocado por *ZmSDD1* (Liu *et al.*, 2015). Interesantemente, la ruta de control negativo del desarrollo de estomas en *Arabidopsis* incluye una cascada de señalización MAP quinasas, siendo *AtMPK3* parte de esta ruta, quien junto con *AtMPK6*, son dos MAP quinasas que además de ser parte del desarrollo estomático, responden a factores ambientales (Wang *et al.*, 2007b). Las MAP quinasas que completan la ruta de control estomático son YDA, MKK4 y MKK5. La **figura 33B** indica que las plantas transgénicas presentaron un nivel de expresión de *AtRD29A* mayor que las WT antes de iniciar el tratamiento de sequía, lo que da cuenta de un nivel de estrés “basal” de las plantas. Esto podría deberse a que una moderada disminución en la densidad estomática, causa una disminución proporcional, incluso no significativa en la captación de CO₂, lo cual es factible considerando que las plantas WT y las transgénicas no presentaron diferencias evidentes en el desarrollo, pero suficiente para gatillar una señal endógena de estrés, que induzca genes de respuesta a tal condición, entre ellos, *AtRD29A*, lo que redundaría en un aumento en la tolerancia al estrés, lo cual se ve respaldado por los resultados obtenidos aquí (**figura 32 y 33**). Al respecto, ha sido reportado que plantas transgénicas de maíz que presentaron una menor densidad estomática, presentaron una disminución en el punto de compensación de CO₂ (equilibrio entre el CO₂ asimilado por fotosíntesis y desprendido por respiración), el cual fue compensado por un aumento en la actividad de la enzima fosfo-enol-piruvato-carboxilasa (PEPCasa), la cual es una enzima clave en la ruta de asimilación de CO₂ en plantas C4 como el maíz; permitiendo a las plantas aumentar su tasa fotosintética bajo condiciones de estrés por sequía, tolerándolo (Liu *et al.*, 2014). Por otra parte, en las plantas C3 la tasa de asimilación de CO₂ se satura a medida que aumenta la conductancia estomática, debido a limitaciones denominadas “no estomáticas”, tales como la regeneración de la RuBisCO (Farquhar y Sharkey, 1982). Sin embargo, Yoo *et al.* (2009) demostró que en los mismos rangos de conductancia estomática, la transpiración incrementa linealmente, por lo tanto, una disminución moderada en la densidad estomática reducirá las transpiración significativamente sin afectar la asimilación de CO₂ y aumentando el uso eficiente del

agua, lo cual fue efectivamente observado en las plantas mutantes *gtl1*, las cuales tenían un menor número de estomas, mostrándose más tolerantes a la sequía (Yoo *et al.*, 2010). Considerando que el fenotipo de las hojas de las plantas sobreexpresoras de *SchSDD1-like* (figura 24 y 30) es similar al reportado para *gtl1*, es posible que una situación análoga se esté dando en estas plantas transgénicas. Interesantemente, el control de la abundancia estomática es un proceso altamente regulado, considerando que una reducción mayor en la cantidad de estomas en las hojas podría reducir significativamente la captación de CO₂ y la acumulación de biomasa. Consistente con esta hipótesis, plantas *35S::AtSDD1* en *Arabidopsis* (C24) disminuyeron en un 60% su densidad estomática lo que redujo en un 20% la tasa de asimilación de CO₂ (Büßis *et al.*, 2006).

Finalmente, para sobrevivir en condiciones ambientales adversas, las plantas han desarrollado mecanismos flexibles para alterar su estado fisiológico en respuesta al estrés abiótico. Sin embargo, no solo cambios fisiológicos son empleados por las plantas para evitar la desecación, sino que también cambios fenotípicos y alteraciones en los programas de desarrollo, los que dan cuenta de una plasticidad fenotípica en respuesta a las condiciones ambientales imperantes durante el desarrollo. En conjunto, la disminución del número de estomas desarrollados en las hojas, además de variaciones en los parámetros fisiológicos y moleculares fueron detectados en las plantas transgénicas *P_{35S}::SchSDD1-like* resultaron ser beneficiosos para responder a la sequía.

En conclusión, el gen *SDD1-like* que codifica para una subtilisina en *Solanum chilense*, el cual presenta una localización predicha en el apoplasto, fue caracterizado bajo condiciones de estrés abiótico. El análisis filogenético indicó que es el gen que más se relaciona con *AtSDD1*, el cual codifica para una serino proteasa involucrada en el control de la densidad y distribución de estomas en las hojas de *Arabidopsis*. Considerando su comportamiento bajo condiciones de estrés, su sobreexpresión en plantas de *Arabidopsis thaliana* y *S. lycopersicum* cv. "Moneymaker", redujo significativamente la densidad estomática en las hojas de las plantas transgénicas, así como fue capaz de revertir el fenotipo de excesiva abundancia estomática de la mutante *sdd1-3*, lo que permitió establecer que es el putativo ortólogo de *AtSDD1*. Esta disminución se relacionó con una represión de los genes claves de la ruta canónica de desarrollo estomático de *Arabidopsis* y los putativos ortólogos de tomate. Bajo estrés por deshidratación, las plantas transgénicas de *Arabidopsis* y tomate, exhibieron un aumento en la tolerancia a tal condición debido a una menor tasa de pérdida de agua y, en *Arabidopsis*, una respuesta integrada por una disminución de la cantidad de lípidos peroxidados y la inducción de genes de

respuesta a estrés. Estos resultados aumentan el conocimiento de las funciones de las proteasas en especies vegetales y en específico en miembros del género *Solanum*, y su participación en los mecanismos de respuesta frente a estrés permitiendo su adaptación en condiciones ambientales desfavorables, señalando posibles estrategias para la protección de las plantas en condiciones de estrés. Así mismo, las conclusiones obtenidas a partir de lo observado en la planta experimental modelo *Arabidopsis thaliana*, provee un gen candidato para uso en el mejoramiento biotecnológico de plantas de interés agroeconómico como tomate, papa, arroz o trigo, entre otros.

XI. CONCLUSIONES

1. El gen *SchSDD1-like* codifica una subtilisina asociada fundamentalmente a procesos de desarrollo foliar en *Solanum chilense*.
2. *AtSDD1* y *SchSDD1-like* son genes ortólogos, modulan negativamente la densidad estomática en las hojas de las plantas de *Arabidopsis* y tomate, regulando la expresión de los genes *SPCH*, *MUTE* y *FAMA*, reguladores positivos del desarrollo de estomas.
3. *AtSDD1* y *SchSDD1-like* son genes inducibles por estrés abiótico y tratamiento con ABA.
4. La sobreexpresión de *SchSDD1 like* en *Arabidopsis* y en tomate aumentan la tolerancia al déficit hídrico, mediante la reducción de la densidad estomática en las hojas de estas plantas.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K.** 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, **15**, 63-78.
- Abrash, E. B. & Bergmann, D. C.** 2009. Asymmetric Cell Divisions: A View from Plant Development. *Developmental Cell*, **16**, 783-796.
- Abrash, E. B. & Bergmann, D. C.** 2010. Regional specification of stomatal production by the putative ligand CHALLAH. *Development*, **137**, 447-455.
- Abrash, E. B., Davies, K. A. & Bergmann, D. C.** 2011. Generation of Signaling Specificity in Arabidopsis by Spatially Restricted Buffering of Ligand-Receptor Interactions. *The Plant Cell*, **23**, 2864-2879.
- Ahmet, O., Umit, S., Naile, G. & Adnan, K.** 2014. The effect of different nursery conditions on some of the leaf and stomata characteristics in Chestnuts *Journal of Applied Botany and Food Quality*, **87**, 190-195.
- Ahuja, I., de Vos, R. C. H., Bones, A. M. & Hall, R. D.** 2010. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science*, **15**, 664-674.
- Anderson, E. D., Molloy, S. S., Jean, F., Fei, H., Shimamura, S. & Thomas, G.** 2002. The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J Biol Chem*, **277**, 12879-90.
- Antão, C. M. & Malcata, F. X.** 2005. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry*, **43**, 637-650.
- Baker, S. S., Wilhelm, K. S. & Thomashow, M. F.** 1994. The 5'-region of Arabidopsis thaliana cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol Biol*, **24**, 701-13.
- Battisti, D. S. & Rosamond, N. L.** 2009. Historical Warnings of Future Food Insecurity with Unprecedented Seasonal Heat. *Science*, **323**, 240-244.
- Beers, E. P., Jones, A. M. & Dickerman, A. W.** 2004. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. *Phytochemistry*, **65**, 43-58.
- Berger, D. & Altman, T.** 2000. A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in Arabidopsis thaliana. *Genes & Development*, **14**, 1119-1131.
- Bergmann, D. C., Lukowitz, W. & Somerville, C. R.** 2004. Stomatal Development and Pattern Controlled by a MAPKK Kinase. *Science*, **304**, 1494-1497.
- Bergmann, D. C. & Sack, F. D.** 2007. Stomatal Development. *Annual Review of Plant Biology*, **58**, 163-181.
- Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V. & Sharma, K. K.** 2007. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports*, **27**, 411-424.
- Bhave, N., Velej, K., Nadeau, J., Lucas, J., Bhave, S. & Sack, F.** 2009. TOO MANY MOUTHS promotes cell fate progression in stomatal development of Arabidopsis stems. *Planta*, **229**, 357-367.
- Bhave, N. S.** 2007. *Functions and relationships of the TMM and SDD1 genes in arabidopsis stomatal development*. The Ohio State University.
- Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S.** 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal Molecular Biology*, **294**, 1351-1362.

- Blum, A.** 2005. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*, **56**, 1159.
- Boyer, J. S.** 1982. Plant productivity and environment. *Science*, **218**, 443-448.
- Brownlee, C.** 2001. The long and the short of stomatal density signals. *Trends in Plant Science*, **6**, 441-442.
- Bruinenberg, P. G., de Vos, W. M. & Siezen, R. J.** 1994. Prevention of C-terminal autoprocessing of Lactococcus lactis SK11 cell-envelope proteinase by engineering of an essential surface loop. *Biochem J*, **302 (Pt 3)**, 957-63.
- Büssis, D., von Groll, U., Fisahn, J. & Altmann, T.** 2006. Stomatal aperture can compensate altered stomatal density in Arabidopsis thaliana at growth light conditions. *Functional Plant Biology*, **33**, 1037.
- Cao, J., Han, X., Zhang, T., Yang, Y., Huang, J. & Hu, X.** 2014. Genome-wide and molecular evolution analysis of the subtilase gene family in Vitis vinifera. *BMC Genomics*, **15**, 1116.
- Carpenter, K.** 2005. Stomatal architecture and evolution in basal angiosperms. *Am. J. Bot.*, **92**, 1595-1615
- Casson, S. & Gray, J.** 2008. Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist*, **178**, 9-23.
- Casson, S. & Hetherington, A.** 2010. Environmental regulation of stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology*, **13**, 90-95.
- Castilhos, G., Lazzarotto, F., Spagnolo-Fonini, L., Bodanese-Zanettini, M. H. & Margis-Pinheiro, M.** 2014. Possible roles of basic helix-loop-helix transcription factors in adaptation to drought. *Plant Science*, **223**, 1-7.
- Cedzich, A., Huttenlocher, F., Kuhn, B. M., Pfanstiel, J., Gabler, L., Stintzi, A. & Schaller, A.** 2009. The Protease-associated Domain and C-terminal Extension Are Required for Zymogen Processing, Sorting within the Secretory Pathway, and Activity of Tomato Subtilase 3 (SISBT3). *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 14068-14078.
- Citovsky, V., Zaltsman, A., Kozlovsky, S. V., Gafni, Y. & Krichevsky, A.** 2009. Proteasomal degradation in plant-pathogen interactions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **20**, 1048-1054.
- Clifford, S. C., Black, C. R., Roberts, J. A., Stronach, I. M., Singleton-Jones, P. R., Mohamed, A. D. & Azam-Ali, S. N.** 1995. The effect of elevated atmospheric CO₂ and drought on stomatal frequency in groundnut (Arachis hypogaea(L.)). *Journal of Experimental Botany*, **46**, 847-852.
- Clough, S. J. & Bent, A. F.** 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, **16**, 735-743.
- Cominelli, E. & Tonelli, C.** 2010. Transgenic crops coping with water scarcity. *New Biotechnology*, **27**, 473-477.
- Croxdale, J.** 2000. Stomatal Patterning in Angiosperms. *Am. J. Bot.* August, **87**, 1069-1080.
- Cushman, J. C. & Bohnert, H. J.** 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**, 117-124.
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R. & Abrams, S. R.** 2010. Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 651-679.
- Chaerle, L., Saibo, N. & Van Der Straeten, D.** 2005. Tuning the pores: towards engineering plants for improved water use efficiency. *Trends in Biotechnology*, **23**, 308-315.

- Chang, W.-C., Lee, T.-Y., Huang, H.-D., Huang, H.-Y. & Pan, R.-L.** 2008. PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics*, **9**, 561-561.
- Chaves, M. M., Moroco, J. P. & Pereira, J. S.** 2003. Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, **30**, 239 - 264
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B., Hong, X., Agarwal, M. & Zhu, J.** 2003. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes & Development*, **17**, 1043-1054.
- Chou, K.-C. & Shen, H.-B.** 2010. Plant-mPLoc: A Top-Down Strategy to Augment the Power for Predicting Plant Protein Subcellular Localization. *PLoS ONE*, **5**, e11335.
- Christmann, A., Hoffmann, T., Teplova, I., Grill, E. & Müller, A.** 2005. Generation of Active Pools of Abscisic Acid Revealed by In Vivo Imaging of Water-Stressed Arabidopsis. *Plant Physiology*, **137**, 209-219.
- de Nadal, E., Alepuz, P. M. & Posas, F.** 2002. Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep*, **3**, 735-40.
- Delgado, D., Alonso-Blanco, C., Fenoll, C. & Mena, M.** 2011. Natural variation in stomatal abundance of Arabidopsis thaliana includes cryptic diversity for different developmental processes. *Annals of Botany*, **107**, 1247-1258.
- Delgado, D., Ballesteros, I., Mena, M. & Fenoll, C.** 2012. Roles of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 10 in Arabidopsis stomata development. *Plant Signaling & Behavior*, **7**, 990-993.
- Dhanda, S. S. & Sethi, G. S.** 1998. Inheritance of excised-leaf water loss and relative water content in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Euphytica*, **104**, 39-47.
- Dionisio-Sese, M. L. & Tobita, S.** 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, **135**, 1-9.
- Dodson, G. & Wlodawer, A.** 1998. Catalytic triads and their relatives. *Trends in Biochemical Sciences*, **23**, 347-352.
- Doheny-Adams, T., Hunt, L., Franks, P. J., Beerling, D. J. & Gray, J. E.** 2012. Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **367**, 547-555.
- Dong, J. & Bergmann, D. C.** 2010. Stomatal Patterning and Development. *Current Topics in Developmental Biology*, **91**, 267-297.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H.** 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols*, **2**, 953-971.
- FAO.** 2007. *Water at a Glance*. [Online]. Available: <http://www.fao.org/nr/water/art/2007/glance/index.html>.
- Farquhar, G. & Sharkey, T.** 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*, 317-345.
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J. D., Saha, S., Tecle, I. Y., Strickler, S. R., Bombarely, A., Fisher-York, T., Pujar, A., Foerster, H., Yan, A. & Mueller, L. A.** 2015. The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Research*, **43**, D1036-D1041.
- Fillatti, J. J., Kiser, J., Rose, R. & Comai, L.** 1987. Efficient Transfer of a Glyphosate Tolerance Gene into Tomato Using a Binary Agrobacterium Tumefaciens Vector. *Nat Biotech*, **5**, 726-730.

- Frahry, G. & Schopfer, P.** 2001. NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analyzed with a tetrazolium-based assay. *Planta*, **212**, 175-83.
- Franks, P. J. & Farquhar, G. D.** 2001. The effect of exogenous Abscisic acid on stomatal development, stomatal mechanics, and leaf gas exchange in *Tradescantia virginiana*. *Plant Physiology*, **125**, 935-942.
- Franks, P. J., W. Doheny-Adams, T., Britton-Harper, Z. J. & Gray, J. E.** 2015. Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *New Phytologist*, n/a-n/a.
- Ganji Arjenaki, F., Jabbari, R. & Morshedi, A.** 2012. Evaluation of Drought Stress on Relative Water Content, Chlorophyll Content and Mineral Elements of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Varieties *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, **4**, 726-729.
- Geisler, M., Nadeau, J. & Sack, F.** 2000. Oriented Asymmetric Divisions That Generate the Stomatal Spacing Pattern in *Arabidopsis* Are Disrupted by the too many mouths Mutation *Plant Cell*, **12**, 2075-2086.
- Geisler, M., Yang, M. & Sack, F. D.** 1998. Divergent regulation of stomatal initiation and patterning in organ and suborgan regions of the *Arabidopsis* mutants too many mouths and four lips. *Planta*, **205**, 522-530.
- Ghanem, M. E., Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Romero-Aranda, R., Dodd, I. C., Lutts, S. & Pérez-Alfocea, F.** 2008. Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Experimental Botany*, **59**, 3039-3050.
- Golldack, D., Vera, P. & Dietz, K.-J.** 2003. Expression of subtilisin-like serine proteases in *Arabidopsis thaliana* is cell-specific and responds to jasmonic acid and heavy metals with developmental differences. *Physiologia Plantarum*, **118**, 64-73.
- Gómez, L. D., Casano, L. M. & Trippi, V. S.** 1995. Effect of Hydrogen Peroxide on Degradation of Cell Wall Associated Proteins in Growing Bean Hypocotyls. *Plant and Cell Physiology*, **36**, 1259-1264.
- Gray, J. E. & Hetherington, A. M.** 2004. Plant Development: YODA the Stomatal Switch. *Current Biology*, **14**, R488-R490.
- Gray, J. E., Holroyd, G. H., van der Lee, F. M., Bahrami, A. R., Sijmons, P. C., Woodward, F. I., Schuch, W. & Hetherington, A. M.** 2000. The HIC signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature*, **408**, 713-716.
- Green, P. J., Kay, S. A. & Chua, N. H.** 1987. Sequence-specific interactions of a pea nuclear factor with light-responsive elements upstream of the *rbcS-3A* gene. *Embo j*, **6**, 2543-9.
- Group, M., Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Ellis, B. E., Morris, P. C., Innes, R. W., Ecker, J. R., Scheel, D., Klessig, D. F., Machida, Y., Mundy, J., Ohashi, Y. & Walker, J. C.** 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, **7**, 301-308.
- Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Hamanishi, E. T., Thomas, B. R. & Campbell, M. M.** 2012. Drought induces alterations in the stomatal development program in *Populus*. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 4959-71.
- Hamilton, J. M. U., Simpson, D. J., Hyman, S. C., Ndimba, B. K. & Slabas, A. R.** 2003. Ara12 subtilisin-like protease from *Arabidopsis thaliana*: purification, substrate specificity and tissue localization. *Biochemical Journal*, **370**, 57-67.

- Hara, K., Kajita, R., Torii, K. U., Bergmann, D. C. & Kakimoto, T. 2007. The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes & Development*, **21**, 1720-1725.
- Hara, K., Yokoo, T., Kajita, R., Onishi, T., Yahata, S., Peterson, K. M., Torii, K. U. & Kakimoto, T. 2009. Epidermal Cell Density is Autoregulated via a Secretory Peptide, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 in Arabidopsis Leaves. *Plant and Cell Physiology*, **50**, 1019-1031.
- Haussuhl, K., Andersson, B. & Adamska, I. 2001. A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J*, **20**, 713-22.
- Hedstrom, L. 2002. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews*, **102**, 4501-4524.
- Heim, M. A. 2003. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family in Plants: A Genome-Wide Study of Protein Structure and Functional Diversity. *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 735-747.
- Heldt, H. W. & Heldt, F. 2005. *Plant Biochemistry* Burlington, Academic Press.
- Hervé, P. & Serraj, R. 2009. Gene technology and drought: A simple solution for a complex trait? *African Journal of Biotechnology*, **8**, 1740-1749.
- Hetherington, A. & Woodward, F. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*, **424**, 901-908.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. & Korenaga, T. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research*, **27**, 297-300.
- Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. 1950. *The water-culture method for growing plants without soil*.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J. & Nakai, K. 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, **35**, W585-W587.
- Hua, Z. M., Yang, X. & Fromm, M. E. 2006. Activation of the NaCl- and drought-induced RD29A and RD29B promoters by constitutively active Arabidopsis MAPKK or MAPK proteins. *Plant Cell Environ*, **29**, 1761-70.
- Huffaker, R. C. 1990. Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytol*, **116**, 199-231.
- Hulme, E. C. & Trevethick, M. A. 2010. Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *British Journal of Pharmacology*, **161**, 1219-1237.
- Hunt, L. & Gray, J. E. 2009. The Signaling Peptide EPF2 Controls Asymmetric Cell Divisions during Stomatal Development. *Current Biology*, **19**, 864-869.
- Jaleel, C., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, R. & Panneerselvam, R. 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology*, **11**, 100-105
- Jia, W. & Zhang, J. 2008. Stomatal movements and long-distance signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, **3**, 772-777.
- Johannesson, H., Wang, Y., Hanson, J. & Engstrom, P. 2003. The Arabidopsis thaliana homeobox gene ATHB5 is a potential regulator of abscisic acid responsiveness in developing seedlings. *Plant Mol Biol*, **51**, 719-29.
- Jonak, C. 2002. Complexity, Cross Talk and Integration of Plant MAP Kinase Signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 415-424.
- Jones, R., Ougham, H., Thomas, H. & Waaland, S. 2011. Environmental interactions. *The Molecular Life of Plants*. Wiley-Blackwell.
- Jones, S. 2004. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology*, **5**.
- Jordá, L., Conejero, V. & Vera, P. 2000. Characterization of P69E and P69F, Two Differentially Regulated Genes Encoding New Members of the Subtilisin-Like Proteinase Family from Tomato Plants. *Plant Physiology*, **122**, 67-74.

- Kanaoka, M. M., Pillitteri, L. J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N. L., Takabayashi, J., Zhu, J. K. & Torii, K. U. 2008. SCREAM/ICE1 and SCREAM2 Specify Three Cell-State Transitional Steps Leading to Arabidopsis Stomatal Differentiation. *The Plant Cell Online*, **20**, 1775-1785.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, **17**, 287-291.
- Kim, T.-H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N. & Schroeder, J. I. 2010. Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, **61**, 561-591.
- Kojima, S., Minagawa, T. & Miura, K. 1997. The propeptide of subtilisin BPN' as a temporary inhibitor and effect of an amino acid replacement on its inhibitory activity. *FEBS Lett*, **411**, 128-32.
- Kondo, T., Kajita, R., Miyazaki, A., Hokoyama, M., Nakamura-Miura, T., Mizuno, S., Masuda, Y., Irie, K., Tanaka, Y., Takada, S., Kakimoto, T. & Sakagami, Y. 2009. Stomatal Density is Controlled by a Mesophyll-Derived Signaling Molecule. *Plant and Cell Physiology*, **51**, 1-8.
- Lake, J. A., Quick, W. P., Beerling, D. J. & Woodward, F. I. 2001. Plant development: Signals from mature to new leaves. *Nature*, **411**, 154-154.
- Lampard, G. R., Lukowitz, W., Ellis, B. E. & Bergmann, D. C. 2009. Novel and Expanded Roles for MAPK Signaling in Arabidopsis Stomatal Cell Fate Revealed by Cell Type-Specific Manipulations. *The Plant Cell*, **21**, 3506-3517.
- Lampard, G. R., MacAlister, C. A. & Bergmann, D. C. 2008. Arabidopsis Stomatal Initiation Is Controlled by MAPK-Mediated Regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science*, **322**, 1113-1116.
- Lau, O. S. & Bergmann, D. C. 2012. Stomatal development: a plant's perspective on cell polarity, cell fate transitions and intercellular communication. *Development*, **139**, 3683-3692.
- Lau, O. S., Davies, K. A., Chang, J., Adrian, J., Rowe, M. H., Ballenger, C. E. & Bergmann, D. C. 2014. Direct roles of SPEECHLESS in the specification of stomatal self-renewing cells. *Science*, **345**, 1605-1609.
- Lawson, T. 2009. Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytologist*, **181**, 13-34.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P. & Rombauts, S. 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, **30**, 325-327.
- Li, C., Chang, P. P., Ghebremariam, K. M., Qin, L. & Liang, Y. 2014. Overexpression of tomato SpMPK3 gene in Arabidopsis enhances the osmotic tolerance. *Biochem Biophys Res Commun*, **443**, 357-62.
- Lindlof, A., Brautigam, M., Chawade, A., Olsson, O. & Olsson, B. 2009. In silico analysis of promoter regions from cold-induced genes in rice (*Oryza sativa* L.) and Arabidopsis thaliana reveals the importance of combinatorial control. *Bioinformatics*, **25**, 1345-8.
- Liu, J. X., Srivastava, R., Che, P. & Howell, S. H. 2007a. An endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. *Plant Cell*, **19**, 4111-9.
- Liu, J. X., Srivastava, R., Che, P. & Howell, S. H. 2007b. Salt stress responses in Arabidopsis utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *The Plant Journal*, **51**, 897-909.
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain

- separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell*, **10**, 1391-406.
- Liu, Y., Han, L., Qin, L. & Zhao, D.** 2014. Saccharomyces cerevisiae gene TPS1 improves drought tolerance in Zea mays L. by increasing the expression of SDD1 and reducing stomatal density. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **120**, 779-789.
- Liu, Y., Qin, L., Han, L., Xiang, Y. & Zhao, D.** 2015. Overexpression of maize SDD1 (ZmSDD1) improves drought resistance in Zea mays L. by reducing stomatal density. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **122**, 147-159.
- Logemann, E., Birkenbihl, R. P., Ülker, B. & Somssich, I. E.** 2006. An improved method for preparing Agrobacterium cells that simplifies the Arabidopsis transformation protocol. *Plant Methods*, **2**, 16-16.
- Loyola, J., Verdugo, I., González, E., Casaretto, J. A. & Ruiz-Lara, S.** 2012. Plastidic isoprenoid biosynthesis in tomato: physiological and molecular analysis in genotypes resistant and sensitive to drought stress. *Plant Biology*, **14**, 149-156.
- MacAlister, C. A. & Bergmann, D. C.** 2011. Sequence and function of basic helix-loop-helix proteins required for stomatal development in Arabidopsis are deeply conserved in land plants. *Evolution & Development*, **13**, 182-192.
- MacAlister, C. A., Ohashi-Ito, K. & Bergmann, D. C.** 2007. Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature*, **445**, 537-540.
- Maggio, A., Raimondi, G., Martino, A. & De Pascale, S.** 2007. Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environmental and Experimental Botany*, **59**, 276-282.
- Mahajan, S. & Tuteja, N.** 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **444**, 139-158.
- Mahon, P. & Bateman, A.** 2000. The PA domain: A protease-associated domain. *Protein Science*, **9**, 1930-1934.
- Meichtry, J., Amrhein, N. & Schaller, A.** 1999. Characterization of the subtilase gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Molecular Biology*, **39**, 749-760.
- Melhorn, V., Matsumi, K., Koiwai, H., Ikegami, K., Okamoto, M., Nambara, E., Bittner, F. & Koshiba, T.** 2008. Transient expression of AtNCED3 and AAO3 genes in guard cells causes stomatal closure in *Vicia faba*. *Journal of Plant Research*, **121**, 125-131.
- Meng, X., Wang, H., He, Y., Liu, Y., Walker, J. C., Torii, K. U. & Zhang, S.** 2012. A MAPK Cascade Downstream of ERECTA Receptor-Like Protein Kinase Regulates Arabidopsis Inflorescence Architecture by Promoting Localized Cell Proliferation. *The Plant Cell*, **24**, 4948-4960.
- Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. & Mittler, R. O. N.** 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, **33**, 453-467.
- Mishra, G.** 2006. A Bifurcating Pathway Directs Abscisic Acid Effects on Stomatal Closure and Opening in Arabidopsis. *Science*, **312**, 264-266.
- Murre, C., McCaw, P. S. & Baltimore, D.** 1989. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. **56**, 777-783.
- Nadeau, J.** 2003. Stomatal development: cross talk puts mouths in place. *Trends in Plant Science*, **8**, 294-299.
- Nadeau, J. & Sack, F.** 2002a. Control of stomatal distribution on the Arabidopsis leaf surface. *Science*, **296**, 1697-1700.

- Nadeau, J. A. 2009. Stomatal development: new signals and fate determinants. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 29-35.
- Nadeau, J. A. & Sack, F. D. 2002b. Stomatal Development in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, **17**, 1.
- Nakagawa, M., Ueyama, M., Tsuruta, H., Uno, T., Kanamaru, K., Mikami, B. & Yamagata, H. 2010. Functional Analysis of the Cucumisin Propeptide as a Potent Inhibitor of Its Mature Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 29797-29807.
- Nevo, E. & Chen, G. 2010. Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, Cell & Environment*, **33**, 670-685.
- Nour, N., Basak, A., Chretien, M. & Seidah, N. G. 2003. Structure-function analysis of the prosegment of the proprotein convertase PC5A. *J Biol Chem*, **278**, 2886-95.
- Ohashi-Ito, K. & Bergmann, D. C. 2006. Arabidopsis FAMA Controls the Final Proliferation/Differentiation Switch during Stomatal Development. *The Plant Cell Online*, **18**, 2493-2505.
- Orellana, S., Yañez, M., Espinoza, A., Verdugo, I., González, E., Ruiz-Lara, S. & Casaretto, J. A. 2010. The transcription factor SIAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant, Cell & Environment*, **33**, 2191-2208.
- Park, H. C., Kim, M. L., Kang, Y. H., Jeon, J. M., Yoo, J. H., Kim, M. C., Park, C. Y., Jeong, J. C., Moon, B. C., Lee, J. H., Yoon, H. W., Lee, S. H., Chung, W. S., Lim, C. O., Lee, S. Y., Hong, J. C. & Cho, M. J. 2004. Pathogen- and NaCl-induced expression of the S_{CaM}-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol*, **135**, 2150-61.
- Patel, A. K., Singh, V. K. & Jagannadham, M. V. 2007. Carnein, a serine protease from noxious plant weed Ipomoea carnea (morning glory). *J Agric Food Chem*, **55**, 5809-18.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Meth*, **8**, 785-786.
- Peterson, K. M., Rychel, A. L. & Torii, K. U. 2010. Out of the Mouths of Plants: The Molecular Basis of the Evolution and Diversity of Stomatal Development. *The Plant Cell Online*, **22**, 296-306.
- Pillitteri, L. J., Peterson, K. M., Horst, R. J. & Torii, K. U. 2011. Molecular Profiling of Stomatal Meristemoids Reveals New Component of Asymmetric Cell Division and Commonalities among Stem Cell Populations in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **23**, 3260-3275.
- Pillitteri, L. J., Sloan, D. B., Bogenschutz, N. L. & Torii, K. U. 2007. Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature*, **445**, 501-505.
- Pillitteri, L. J. & Torii, K. U. 2007. Breaking the silence: three bHLH proteins direct cell-fate decisions during stomatal development. *BioEssays*, **29**, 861-870.
- Pillitteri, L. J. & Torii, K. U. 2012. Mechanisms of Stomatal Development. *Annual Review of Plant Biology*, **63**, 591-614.
- Pires, N. & Dolan, L. 2009. Origin and Diversification of Basic-Helix-Loop-Helix Proteins in Plants. *Molecular Biology and Evolution*, **27**, 862-874.
- Polgar, L. 2005. The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **62**, 2161-72.
- Polge, C., Jaquinod, M., Holzer, F., Bourguignon, J., Walling, L. & Brouquisse, R. 2009. Evidence for the Existence in Arabidopsis thaliana of the Proteasome Proteolytic Pathway: ACTIVATION IN RESPONSE TO CADMIUM. *J Biol Chem*, **284**, 35412-24.

- Popescu, S. C., Popescu, G. V., Bachan, S., Zhang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. & Dinesh-Kumar, S. P. 2008. MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes & Development*, **23**, 80-92.
- Post-Beittenmiller, D. 1996. BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY OF WAX PRODUCTION IN PLANTS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**, 405-430.
- Qin, X. & Zeevaart, J. A. 2002. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana glauca* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol*, **128**, 544-51.
- Quarrie, S. A. & Jones, H. G. 1977. Effects of Abscisic acid and water stress on development and morphology of wheat. *Journal of Experimental Botany*, **28**, 192-203.
- Ramallo-Santos, M., Pissarra, J., Verissimo, P., Pereira, S., Salema, R., Pires, E. & Faro, C. J. 1997. Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta*, **203**, 204-12.
- Rautengarten, C., Steinhäuser, D., Büssis, D., Stintzi, A., Schaller, A., Kopka, J. & Altmann, T. 2005. Inferring Hypotheses on Functional Relationships of Genes: Analysis of the *Arabidopsis thaliana* Subtilase Gene Family. *PLoS Computational Biology*, **1**, e40.
- Raven, J. 2002. Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytologist*, **153**, 371-386.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, **38**, D227-D233.
- Riggs, C. D., Zeman, K., DeGuzman, R., Rzepczyk, A. & Taylor, A. A. 2001. Antisense inhibition of a tomato meiotic proteinase suggests functional redundancy of proteinases during microsporogenesis. *Genome*, **44**, 644-650.
- Rodríguez, M. C. S., Edsgård, D., Hussain, S. S., Alquezar, D., Rasmussen, M., Gilbert, T., Nielsen, B. H., Bartels, D. & Mundy, J. 2010. Transcriptomes of the desiccation-tolerant resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *The Plant Journal*, **63**, 212-228.
- Rose, R., Schaller, A. & Ottmann, C. 2010. Structural features of plant subtilases. *Plant Signaling & Behavior*, **5**, 180-183.
- Rutkowski, D. T. & Kaufman, R. J. 2004. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*, **14**, 20-8.
- Rychel, A. L., Peterson, K. M. & Torii, K. U. 2010. Plant twitter: ligands under 140 amino acids enforcing stomatal patterning. *Journal of Plant Research*, **123**, 275-280.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Sambrook, J. & Russell, D. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*.
- Santrucek, J., Vrablova, M., Simkova, M., Hronkova, M., Drtinova, M., Kveton, J., Vrabl, D., Kubasek, J., Mackova, J., Wiesnerova, D., Neuwirthova, J. & Schreiber, L. 2014. Stomatal and pavement cell density linked to leaf internal CO₂ concentration. *Annals of Botany*, **114**, 191-202.
- Schaller, A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, **220**, 183-197.
- Schaller, A., Stintzi, A. & Graff, L. 2011. Subtilases - versatile tools for protein turnover, plant development, and interactions with the environment. *Physiologia Plantarum*, **145**, 52-66.
- Schenck, C. A., Nadella, V., Clay, S. L., Lindner, J., Abrams, Z. & Wyatt, S. E. 2013. A proteomics approach identifies novel proteins involved in gravitropic signal transduction. *American Journal of Botany*, **100**, 194-202.

- Schlüter, U., Muschak, M., Berger, D. & Altman, T.** 2003. Photosynthetic performance of an Arabidopsis mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 867-874.
- Schroeder, J. I., Allen, G., Hugouvieux, V., Kwak, J. & Waner, D.** 2001. Guard Cell Signal Transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**, 627-658.
- Schuppler, U., He, P.-H., John, P. C. & Munns, R.** 1998. Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves *Plant Physiology*, **117**, 667-678.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K. & Shinozaki, K.** 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 296-302.
- Serna, L.** 2011. Stomatal development in Arabidopsis and grasses: differences and commonalities. *The International Journal of Developmental Biology*, **55**, 5-10.
- Serna, L.** 2014. The role of brassinosteroids and abscisic acid in stomatal development. *Plant Science*, **225**, 95-101.
- Serna, L. & Fenoll, C.** 2000. Stomatal development in Arabidopsis: how to make a functional pattern. *Trends in Plant Science*, **5**, 458-460.
- Shao, H.-B., Chu, L.-Y., Jaleel, C. A. & Zhao, C.-X.** 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, **331**, 215-225.
- Shimada, T., Sugano, S. S. & Hara-Nishimura, I.** 2011. Positive and negative peptide signals control stomatal density. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **68**, 2081-2088.
- Shinde, U. & Inouye, M.** 1993. Intramolecular chaperones and protein folding. *Trends in Biochemical Sciences*, **18**, 442-446.
- Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K.** 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 221-227.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Seki, M.** 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, **6**, 410-7.
- Shpak, E., McAbee, J., Pillitteri, L. & Torii, K.** 2005. Stomatal Patterning and Differentiation by Synergistic Interactions of Receptor Kinases. *Science*, **309**, 290-293.
- Siezen, R. J. & Leunissen, J. A.** 1997. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, **6**, 501-523.
- Silva, E. C., Nogueira, R. J. M. C., Vale, F. H. A., Araújo, F. P. d. & Pimenta, M. A.** 2009. Stomatal changes induced by intermittent drought in four umbu tree genotypes. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **21**, 33-42.
- Simpson, S. D., Nakashima, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K.** 2003. Two different novel cis-acting elements of erd1, a clpA homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J*, **33**, 259-70.
- Smirnoff, N.** 1998. Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*, **9**, 214-219.
- Song, S., Chen, Y., Zhao, M. & Zhang, W.-H.** 2012. A novel Medicago truncatula HD-Zip gene, MthB2, is involved in abiotic stress responses. *Environmental and Experimental Botany*, **80**, 1-9.
- Steiner, D. F.** 1998. The proprotein convertases. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2**, 31-39.
- Streck, N.** 2003. Stomatal response to water vapor pressure deficit: an unsolved issue. *Rev Bras Agric.*, **9**, 317-322.
- Sugano, S. S., Shimada, T., Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M. & Hara-Nishimura, I.** 2010. Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. *Nature*, **463**, 241-244.

- Sun, X., Wang, F., Cai, H., Zhao, C., Ji, W. & Zhu, Y. 2013. Functional characterization of an Arabidopsis prolyl aminopeptidase AtPAP1 in response to salt and drought stresses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **114**, 325-338.
- Tamirisa, S., Vudem, D. R. & Khareedu, V. R. 2014. Overexpression of pigeonpea stress-induced cold and drought regulatory gene (CcCCR) confers drought, salt, and cold tolerance in Arabidopsis. *J Exp Bot*, **65**, 4769-81.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*.
- Tanaka, Y., Nose, T., Jikumaru, Y. & Kamiya, Y. 2013. ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in Arabidopsis leaves. *The Plant Journal*, **74**, 448-457.
- Tanaka, Y., Sano, T., Tamaoki, M., Nakajima, N., Kondo, N. & Hasezawa, S. 2005. Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **138**, 2337-43.
- Tapia, G., Verdugo, I., Yañez, M., Ahumada, I., Theoduloz, C., Cordero, C., Poblete, F., González, E. & Ruiz-Lara, S. 2005. Involvement of Ethylene in Stress-Induced Expression of the TLC1.1 Retrotransposon from *Lycopersicon chilense* Dun. *Plant Physiology*, **138**, 2075-2086.
- Tapia, G. M. 2005. *Estudio de los procesos fotosintéticos, del metabolismo de azúcares y la expresión génica durante la aclimatación a estrés salino y sequía en Lycopersicon chilense*. Tesis Doctoral, Universidad de Talca.
- The Tomato Genome, C. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, **485**, 635-641.
- Tornero, P., Conejero, V. & Vera, P. 1996. Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 6332-7.
- Torres-Schumann, S., Godoy, J. & Pintor-Toro, J. 1992. A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Molecular Biology*, **18**, 749-757.
- Tricker, P. J., Gibbings, J. G., Rodríguez Lopez, C. M., Hadley, P. & Wilkinson, M. J. 2012. Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 3799-3813.
- Tripathi, L. & Sowdhamini, R. 2006. Cross genome comparisons of serine proteases in Arabidopsis and rice. *BMC Genomics*, **7**, 1-31.
- Umbrasaite, J., Schweighofer, A., Kazanaviciute, V., Magyar, Z., Ayatollahi, Z., Unterwurzacher, V., Choopayak, C., Boniecka, J., Murray, J. A. H., Bogre, L. & Meskiene, I. 2010. MAPK Phosphatase AP2C3 Induces Ectopic Proliferation of Epidermal Cells Leading to Stomata Development in Arabidopsis. *PLoS ONE*, **5**, e15357.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11632-7.
- Vasquez-Robinet, C., Mane, S. P., Ulanov, A. V., Watkinson, J. I., Stromberg, V. K., De Koeber, D., Schafleitner, R., Willmot, D. B., Bonierbale, M., Bohnert, H. J. & Grene, R. 2008. Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 2109-2123.

- Vavasseur, A. & Raghavendra, A. S. 2005. Guard cell metabolism and CO₂ sensing. *New Phytologist*, **165**, 665-682.
- Vierstra, R. D. 2009. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 385-397.
- Vinocur, B. & Altman, A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, **16**, 123-132.
- Von Groll, U., Berger, D. & Altmann, T. 2002. The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during Arabidopsis stomatal development. *Plant Cell*, **14**, 1527-39.
- Walles, B. 1983. Fahn, A. 1982. Plant anatomy (3rd ed.). ISBN 0-08-0280293. Pergamon, Oxford. *Nordic Journal of Botany*, **3**, 492-492.
- Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J. C. & Zhang, S. 2007a. Stomatal Development and Patterning Are Regulated by Environmentally Responsive Mitogen-Activated Protein Kinases in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, **19**, 63-73.
- Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J. C. & Zhang, S. 2007b. Stomatal Development and Patterning Are Regulated by Environmentally Responsive Mitogen-Activated Protein Kinases in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **19**, 63-73.
- Wang, J., Ding, B., Guo, Y., Li, M., Chen, S., Huang, G. & Xie, X. 2014a. Overexpression of a wheat phospholipase D gene, TaPLD α , enhances tolerance to drought and osmotic stress in Arabidopsis thaliana. *Planta*, **240**, 103-115.
- Wang, W., Vinocur, B. & Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, **218**, 1-14.
- Wang, X. H., Li, Q. T., Chen, H. W., Zhang, W. K., Ma, B., Chen, S. Y. & Zhang, J. S. 2014b. Trihelix transcription factor GT-4 mediates salt tolerance via interaction with TEM2 in Arabidopsis. *BMC Plant Biol*, **14**, 339.
- Warnock, S. J. 1991. Natural Habitats of Lycopersicon Species. *HortScience*, **26**, 466-471.
- Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M. & al., e. 1991. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*, **251**, 761-66
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V. & Provart, N. J. 2007. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, **2**, e718.
- Witcombe, J. R., Hollington, P. A., Howarth, C. J., Reader, S. & Steele, K. A. 2008. Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **363**, 703-716.
- Woodward, F. 1987. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre-industrial levels. *Nature*, **327**, 617-8.
- Woodward, F. I., Lake, J. A. & Quick, W. P. 2002. Stomatal development and CO₂: ecological consequences. *New Phytologist*, **153**, 477-484.
- Xiao, Y., Yu, X., Chen, J., Di, P., Chen, W. & Zhang, L. 2009. liSDD1, a gene responsive to autopolyploidy and environmental factors in *Isatis indigotica*. *Molecular Biology Reports*, **37**, 987-994.
- Xie, C., Zhang, R., Qu, Y., Miao, Z., Zhang, Y., Shen, X., Wang, T. & Dong, J. 2012. Overexpression of MtCAS31 enhances drought tolerance in transgenic Arabidopsis by reducing stomatal density. *New Phytologist*, **195**, 124-135.
- Xie, Z. M., Zou, H. F., Lei, G., Wei, W., Zhou, Q. Y., Niu, C. F., Liao, Y., Tian, A. G., Ma, B., Zhang, W. K., Zhang, J. S. & Chen, S. Y. 2009. Soybean Trihelix transcription factors GmGT-2A and

- GmGT-2B improve plant tolerance to abiotic stresses in transgenic Arabidopsis. *PLoS ONE*, **4**, e6898.
- Xu, F. X. & Chye, M. L.** 1999. Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal. *Plant J*, **17**, 321-7.
- Xu, Z. & Zhou, G.** 2008. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 3317-3325.
- Xue, G. P.** 2002. Characterisation of the DNA-binding profile of barley HvCBF1 using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA-binding activity. *Nucleic Acids Res*, **30**, e77.
- Xue, G. P.** 2003. The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature. *Plant J*, **33**, 373-83.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K.** 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*, **10**, 88-94.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K.** 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 781-803
- Yang, J., Isabel Ordiz, M., Jaworski, J. G. & Beachy, R. N.** 2011. Induced accumulation of cuticular waxes enhances drought tolerance in Arabidopsis by changes in development of stomata. *Plant Physiology and Biochemistry*, **49**, 1448-1455.
- Yang, M. & Sack, F. D.** 1995. The too many mouths and four lips Mutations Affect Stomatal Production in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **7**, 2227-2239.
- Yañez, M., Caceres, S., Orellana, S., Bastias, A., Verdugo, I., Ruiz-Lara, S. & Casaretto, J. A.** 2009. An abiotic stress-responsive bZIP transcription factor from wild and cultivated tomatoes regulates stress-related genes. *Plant Cell Reports*, **28**, 1497-507.
- Yoo, C. Y., Pence, H. E., Hasegawa, P. M. & Mickelbart, M. V.** 2009. Regulation of Transpiration to Improve Crop Water Use. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **28**, 410-431.
- Yoo, C. Y., Pence, H. E., Jin, J. B., Miura, K., Gosney, M. J., Hasegawa, P. M. & Mickelbart, M. V.** 2010. The Arabidopsis GTL1 Transcription Factor Regulates Water Use Efficiency and Drought Tolerance by Modulating Stomatal Density via Transrepression of SDD1. *The Plant Cell*, **22**, 4128-4141.
- Zhang, L., Zhao, G., Xia, C., Jia, J., Liu, X. & Kong, X.** 2012. A wheat R2R3-MYB gene, TaMYB30-B, improves drought stress tolerance in transgenic Arabidopsis. *J Exp Bot*, **63**, 5873-85.
- Zhao, L. & Sack, F.** 1999. Ultrastructure of stomatal development in Arabidopsis (Brassicaceae) leaves. *Am. J. Bot.*, **86**, 929-939.
- Zhou, D. X.** 1999. Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors. *Trends Plant Sci*, **4**, 210-214.
- Zhu, J.-K.** 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, **6**, 66-71.