

ANÁLISIS FUNCIONAL DE UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN bZIP INVOLUCRADO EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO EN TOMATE

**SANDRA DEL CARMEN ORELLANA VERDEJO
DOCTOR EN CIENCIAS, MENCIÓN GENÉTICA VEGETAL**

RESUMEN

La regulación de la expresión génica es una de las respuestas utilizadas por las plantas para activar mecanismos de tolerancia a estrés abiótico. Algunos de los genes que se inducen por estrés son factores de transcripción que participan en puntos claves de vías de transducción de señales. En plantas, los factores de transcripción bZIP tipo AREB/ABF participan en la regulación de la expresión génica asociada con procesos de respuesta a estrés abiótico como sequía y salinidad y constituyen los principales factores de la señalización dependiente de la fitohormona ácido abscísico (ABA). Durante el desarrollo de esta tesis con el fin de incrementar el conocimiento acerca de las respuestas de los cultivos a estrés abiótico como sequía y salinidad, se identificaron dos factores de transcripción bZIP de tomate (*Solanum lycopersicum*), denominados SIAREB1 y SIAREB2. Las secuencias aminoacídicas de ambas proteínas comparten una alta homología con secuencias de otros miembros de esta subfamilia de factores de transcripción en diversas especies de cereales y en *Arabidopsis thaliana*. Análisis experimentales demostraron que la expresión de los genes codificantes de ambos factores de transcripción es inducida en respuesta a deshidratación, estrés salino y ABA, tanto en tejido foliar como radicular, aunque el gen SIAREB1 presentó una mayor acumulación en los niveles de transcritos que SIAREB2. Para investigar la posible función de estos factores de transcripción en respuesta a estrés abiótico, se generaron plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan constitutiva y ectópicamente SIAREB1 y plantas transgénicas antisentido SIAREB1 con niveles reducidos de transcritos de este gen. Las líneas sobreexpresoras exhibieron un incremento en su tolerancia frente a estrés salino comparado con plantas wild-type y plantas antisentido. Estos resultados provienen de la evaluación de parámetros fisiológicos como contenido relativo de agua (RWC), funcionamiento del fotosistema II e indicadores de daño tales como peroxidación de lípidos de membrana. Para identificar genes posiblemente regulados por este factor de transcripción y que podrían estar relacionados con la mayor tolerancia a estrés abiótico de las líneas que sobreexpresan SIAREB1, se analizaron y compararon los perfiles transcripcionales de plantas wild-type y una línea transgénica que sobreexpresa SIAREB1, mediante tecnología

de microarreglos. Los resultados revelaron un total de 280 genes con expresión diferencial entre tejido foliar de plantas wild-type y plantas que sobreexpresan SIAREB1 y 75 genes en tejido radicular. De los 280 genes, 230 son inducidos en hojas de plantas que sobreexpresan SIAREB1, entre los cuales se detectaron genes asociados con respuestas tanto a estrés abiótico como a estrés biótico. Ejemplo de ello, corresponde a genes codificantes de proteínas relacionadas con estrés oxidativo, proteínas de transferencia de lípidos, reguladores transcripcionales y proteínas abundantes de embriogénesis tardía. Además, se identificaron genes codificantes de proteínas comúnmente asociadas con respuesta de defensa a estrés biótico, tales como proteínas relacionadas con patogénesis, inhibidores de proteasas y enzimas catabólicas. Los resultados de este trabajo sugieren que el factor de transcripción SIAREB1 es un regulador clave en la transcripción de genes involucrados en cascadas de transducción de señales mediadas por ABA y que participan en respuesta a estrés abiótico como el estrés salino y posiblemente en respuesta a estrés biótico.

ABSTRACT

Gene expression regulation is one of the responses used by plants to activate mechanisms of abiotic stress tolerance. Some of the genes that are induced by stress are transcription factors that act as key regulatory end points of signal transduction cascades. In plants, the AREB/ABF group of bZIP transcription factors regulates gene expression associated to responses to abiotic stress such as drought and salinity and constitutes the principal factors of the signaling pathways dependent on the phytohormone abscisic acid (ABA). During the development of this thesis in order to get more insight into cultivated plants responses to abiotic stress such as drought and salinity, two bZIP transcription factors are identified in tomato (*Solanum lycopersicum*), designated SIAREB1 and SIAREB2. The amino acid sequences of both proteins share high homology with sequences of other members of this subfamily of transcription factors, in diverse cereal species and *Arabidopsis thaliana*. Experimental analyses demonstrated that the expression of the genes encoding both transcription factors is induced in response to dehydration, salt stress and ABA both in leaf and root tissues, though the SIAREB1 gene showed higher accumulation of transcripts than SIAREB2. To investigate the possible function of these transcription factors, were generated SIAREB1-overexpressing transgenic tomato plants and SIAREB1-down-regulating transgenic plants. The SIAREB1-over-expressing sense lines exhibited increased tolerance to salt stress compared to wild-type plants and SIAREB1-down-regulating transgenic plants. Stress tolerance was assessed by means of the evaluation of physiological parameters such as relative water content (RWC), efficiency of the photosynthetic apparatus and indicators of damage such as membrane lipoperoxidation. Transcriptional profiles of wild-type plants and one transgenic line overexpressing- SIAREB1 were analyzed and compared by means of microarray technology, in order to identify possible genes regulated by this transcription factor and related to the higher stress tolerance of the over-expressing lines. The results revealed a total of 280 differential expressed genes in leaf tissue and 75 genes in root tissue when comparing wild-type plants with a SIAREB1 over-expressing line. Out of the 280 genes, 230 are induced in leaves of the overexpressing line. The genes are associated with responses to abiotic stress, for instance genes encoding for proteins related to oxidative stress, lipid transfer proteins, transcriptional regulators and late embryogenesis-abundant proteins. In addition, genes encoding for proteins commonly associated with response of defense or biotic stress were identified, such as pathogenesis related proteins, proteinase inhibitors and

catabolic enzymes. The results of this work suggest that the SIAREB1 transcription factor is a key regulator of the transcription of genes involved in ABA-mediated signal transduction cascades and that it participates in responses to abiotic stress such as salinity and possibly in response to biotic stresses.