

# I. ÍNDICE DE MATERIAS

	<b>Página</b>
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>

	<b>Página</b>
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

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

	<b>Página</b>
<b>Figura 16.</b> 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
<b>Figura 17.</b> Perfil de expresión de <i>SchSDD1-like</i> en plantas wild-type de <i>S. chilense</i> expuestas a estrés salino	56
<b>Figura 18.</b> Evaluación de parámetros fisiológicos y moleculares bajo condiciones de estrés por sequía en plantas de <i>S. chilense</i>	57
<b>Figura 19.</b> Perfil de expresión de <i>SchSDD1-like</i> en plantas wild-type de <i>S. chilense</i> expuestas a sequía	59
<b>Figura 20.</b> Perfil de expresión de los posibles genes maestros del desarrollo estomático en plantas wild-type de <i>S. chilense</i> expuestas a sequía.	59
<b>Figura 21.</b> Perfil de expresión de <i>SchSDD1-like</i> en plantas wild-type de <i>S. chilense</i> tratadas con ABA exógeno	61
<b>Figura 22.</b> 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
<b>Figura S1-II.</b> Evolución del fenotipo durante el estrés por sequía en plantas de <i>S. chilense</i>	63
<b>Figura 23.</b> 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
<b>Figura 24.</b> 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
<b>Figura 25.</b> 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
<b>Figura 26.</b> qPCR de genes implicados en el desarrollo de estomas en plantas mutante <i>sdd1-3</i> de <i>Arabidopsis</i>	67
<b>Figura 27.</b> 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
<b>Figura 28.</b> Expresión ectópica del gen <i>SchSDD1-like</i> aislado de <i>S. chilense</i> en <i>Arabidopsis</i>	69

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

### III. ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados en esta investigación	<b>30</b>



## 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- $\beta$ -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