



## **IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A MECANISMOS MOLECULARES DE TOLERANCIA A COBRE EN POPULUS SPP**

**FERNANDO PATRICIO GUERRA GUERRERO**

**MENCIÓN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL**

### **RESUMEN**

El cobre (Cu) es un microelemento esencial para el desarrollo de las plantas, sin embargo, en altas concentraciones produce efectos negativos que limitan su crecimiento y sobrevivencia. El estudio de los genes que regulan los mecanismos de tolerancia y acumulación de Cu en las plantas es importante para el mejoramiento genético enfocado a la fitorremediación de terrenos contaminados con este metal. Especies forestales como los Alamos (*Populus spp*) presentan un potencial significativo en el campo de la fitorremediación y constituyen un interesante modelo de estudio para la investigación con fines biotecnológicos, toda vez que se ha determinado la secuencia completa del genoma de *Populus trichocarpa* y que existen plataformas tecnológicas para la transformación genética de estas especies. A pesar de ello, la información referente a los mecanismos moleculares asociados a la respuesta de los Alamos frente a la exposición a metales pesados es escasa. A través de esta tesis se estudió la respuesta de diferentes Alamos bajo estrés por exceso de Cu, con el propósito de identificar probables mecanismos moleculares asociados a la tolerancia a este metal. Plantas provenientes de distintas especies de Alamos, con diferente tolerancia al estrés por Cu fueron cultivadas en sistemas hidropónicos por cuatro semanas y tratadas con Cu (10, 30 y 60  $\mu\text{M}$ ), en experimentos que involucraron distintos tiempos de exposición (12, 24 y 72 h). El análisis de la distribución del Cu en las plantas indicó una acumulación significativa en las raíces. Por esta razón, el RNA obtenido de estos órganos fue estudiado mediante arreglos de cDNA de 4.6 y 15 k, a fin de determinar variaciones en la acumulación de transcritos. Tales análisis permitieron identificar una serie de transcritos acumulados diferencialmente, tanto de manera general, como

especifica para los distintos factores evaluados. La mayor parte de los transcritos codifican proteínas de defensa contra el estrés biótico, proteínas del sistema antioxidativo, relacionadas con la homeostasis de metales, el control del flujo hídrico y la formación de pared celular, entre otros. La expresión de transcritos de enzimas relacionadas con vías de señalización que involucran MAP quinasas, calcio y etileno, también fue alterada bajo condiciones de estrés por Cu. En términos generales, los resultados sugieren la presencia de un mecanismo primario de tolerancia basado en la exclusión de Cu, asociado a una respuesta general contra el estrés oxidativo.

## ABSTRACT

Copper (Cu) is an essential microelement for plants, however, high concentrations of this metal produces negative effects limiting their growth and survival. The study of genes regulating mechanisms involved in Cu accumulation and tolerance is important for the plant genetic improvement focused on phytoremediation of Cu-contaminated soils. Poplars (*Populus spp*) have a significant potential for phytoremediation applications and they are an interesting model for biotechnological research because the knowledge of the complete genome sequence from *Populus trichocarpa* and the availability of genetic transformation platforms for these species. However, information about the poplar response to exposure to heavy metals is rather scarce. In this thesis, the poplar response to Cu stress was studied in order to identify some possible molecular mechanisms underlying the Cu tolerance. Plants from poplar species with different tolerance level to Cu stress were grown in hydroponic systems during four weeks and treated with Cu (10, 30 y 60  $\mu$ M) in different time-course experiments (12, 24 and 72 h of stress exposure). Since the analysis of Cu distribution in plant tissues showed a significant accumulation in roots, total RNA was isolated from this tissue and analyzed with 4.6 and 15 k cDNA-arrays for determining alterations in transcripts accumulation. Expression analysis identified a series of differentially accumulated transcripts in both, general and specific manner under the different stress conditions. Most of the transcripts encode proteins related to defense against biotic stress, antioxidant mechanisms, metal homeostasis, water flux control and cell wall formation. Expression of genes coding for proteins involved in signaling, such as MAP kinases, calcium and ethylene-related enzymes were also altered under Cu exposition. In general terms, the results suggest the action of a primary mechanism based on the Cu exclusion, associated to a general response against to oxidative stress.