



UNIVERSIDAD DE TALCA

Instituto de Ciencias Biológicas

Programa de Doctorado en Ciencia Mención Ingeniería Genética Vegetal

**“Evaluación de la participación de *RabGDII* de *Solanum chilense* en el tráfico vesicular y en la tolerancia al estrés salino en *Arabidopsis thaliana*”**

**“Involvement of *RabGDII* from *Solanum chilense* in endocytic trafficking and tolerance to salt stress in *Arabidopsis thaliana*”**

**ALEX DAVID SAN MARTIN DAVISON**

Doctor en Ciencias  
Mención Ingeniería Genética Vegetal

**2020**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022

**Candidato a Doctor** : Alex David San Martin Davison  
**Fecha inicio de Tesis** : Marzo de 2013  
**Fecha termino de Tesis:** : Marzo de 2018

**Profesor Guía:** Dr. Simón Ruiz-Lara  
Instituto de Ciencias Biológicas  
Universidad de Talca  
2 Norte 685, Casilla 747, Talca  
[sruiz@utalca.cl](mailto:sruiz@utalca.cl)

**Integrantes Comisión de Evaluación**

Dra. Lorena Norambuena Morales  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

Dra. Andrea Vega Contreras.  
Departamento de Genética Molecular y Microbiología  
Pontificia Universidad Católica de Chile

Dr. Carlos Figueroa Lamas  
Instituto de Ciencias Biológicas  
Universidad de Talca

*A mi amada esposa.*

## INDICE GENERAL

INDICE GENERAL .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
INDICE DE TABLAS .....	VIII
ABREVIACIONES .....	IX
RESUMEN.....	1
SUMMARY .....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
I.1 Generalidades sobre el estrés salino y estrategias de tolerancia.....	6
I.2 Tráfico vesicular intracelular.....	8
I.3 Relación de la respuesta endocítica y el estrés salino en plantas .....	10
I.4 Pequeñas GTPasas y su papel durante el tráfico vesicular .....	12
I.5 Participación de RabGDI durante el tráfico vesicular .....	14
I.6 Tráfico vesicular y estrés abiótico .....	16
I.7 RabGDI de <i>Solanum chilense</i> y su participación en la tolerancia a estrés abiótico ..	18
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	21
II.1 Hipótesis.....	22
II.2 Objetivos .....	23
II.2.2 Objetivos específicos: .....	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
III.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.....	26
III.2 Ensayos de Salinidad .....	26
III.3 Tratamiento de salinidad en plantas de <i>Solanum chilense</i> .....	27
III.4 Determinación de la variación de parámetros eco-fisiológicos.....	27
III.5 Extracción de y purificación de ARN.....	27
III.6 Síntesis de ADNc.....	28
III.7 Análisis de la expresión génica. ....	28
III.8 Reacción de polimerasas en cadena (PCR) y clonamiento de las secuencias amplificadas.....	31
III.9 Aislamiento y purificación de ADN plasmidial. ....	32
III.10 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.....	32

III.11	Generación de construcciones genéticas para transformación estable de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	32
III.12	Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	33
III.13	Ensayos de complementación de levadura.	34
III.14	Análisis de la tolerancia al estrés salino en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	36
III.15	Predicción de estructura mediante modelamiento por homología.	36
III.16	Simulación de acoplamiento molecular Proteína-proteína.	37
III.17	Interacción in vivo entre SchRabGDI1 y SchRabG3e mediante complementación bimolecular de la fluorescencia BiFC.	38
III.18	Determinación de la internalización de FM4-64.	39
III.19	Análisis de la distribución intracelular del sodio (Na <sup>+</sup> ) en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> sometidas a estrés salino.	40
III.20	Detección de especies reactivas de oxígeno (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).	41
III.21	Análisis químicos.	41
III.22	Análisis Estadísticos.	42
IV.	RESULTADOS	43
IV.1	Identificación del gen codificante para el inhibidor de la disociación de GDP <i>SchRabGDI1</i> de <i>Solanum chilense</i> .	44
IV.2	<i>RabGDI1</i> de <i>Solanum chilense</i> incrementa su perfil de expresión relativa durante el estrés salino.	48
IV.3	<i>SchRabGDI1</i> codifica una proteína del tipo RabGDI.	53
IV.4	RabGDI1 de <i>Solanum chilense</i> interactúa in vivo con la proteína SchRabG3e.	55
IV.5	La expresión heteróloga de <i>RabGDI1</i> de <i>Solanum chilense</i> incrementa la tolerancia al estrés salino en <i>Arabidopsis</i> .	61
IV.6	La expresión heteróloga de <i>SchRabGDI1</i> induce un incremento en la internalización de FM4-64 en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> .	65
IV.7	La expresión heteróloga de <i>SchRabGDI1</i> induce un incremento en la compartimentación de sodio en raíces de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> .	67
V.	DISCUSION	69
V.1	<i>RabGDI1</i> de <i>Solanum chilense</i> codifica para una proteína funcional del tipo inhibidor de la disociación de GDP y es inducida por el estrés salino.	70
V.2	La expresión ectópica <i>SchRabGDI1</i> confiere tolerancia al estrés salino en <i>Arabidopsis</i> .	72

V.3	SchRabGDI1 participa en la regulación la vía endocítica y la distribución del sodio intracelular.....	73
V.4	La acumulación de transcritos de <i>SchRabGDI1</i> durante el estrés salino se correlaciona con la endocitosis masiva y una mayor tolerancia al estrés salino en <i>Solanum chilense</i> . .....	74
VI.	CONCLUSIONES.....	77
VII.	LITERATURA CITADA .....	79
	BIBLIOGRAFÍA.....	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de las principales vías conocidas en la respuesta al estrés salino.....	7
Figura 2: Representación del ciclo de las RabGTPasas.....	16
Figura 3: Relaciones filogenéticas entre RabGDI1 de <i>Solanum chilense</i> y otras proteínas del tipo RabGDI.....	45
Figura 4: Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida de SchRabGDI1 aislada desde <i>S. chilense</i> y de otras RabGDI homólogas en plantas.....	47
Figura 5: Perfil de expresión génica de <i>SchRabGDI1</i> en tejido vegetativo y reproductivo de <i>Solanum chilense</i> .....	49
Figura 6: Evaluación de parámetros fisiológicos bajo condiciones de estrés salino en plantas de <i>S. chilense</i> .....	50
Figura 7: Análisis de la abundancia relativa de transcritos de <i>SchRabGDI1</i> en plantas de <i>Solanum chilense</i> sometidas a estrés salino.....	52
Figura 8: Ensayo de complementación de la cepa mutante de levadura <i>sec19-1</i> con <i>SchRabGDI1</i> .....	54
Figura 9: Representación in silico de la plataforma de interacción entre SchRabGDI1 y SchRabG3e.....	56
Figura 10: Simulación del acoplamiento molecular dado entre SchRabGDI1, SchRabG3e y proteínas de fusión para la complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC).....	57
Figura 11: Determinación de la Complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) entre SchRabGDI1 y SchRabG3e, en células epidérmicas de hojas de tabaco.....	59
Figura 12: Controles para la determinación de la Complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) entre SchRabGDI1 y SchRabG3e en células epidérmicas de hojas de tabaco.....	60
Figura 13: Evaluación de la presencia y la abundancia relativa de los transcritos de <i>SchRabGDI1</i> en el genotipo control (WT), así como en dos líneas transgénicas independientes de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	61

Figura 14: Análisis de plantas heterólogas de <i>Arabidopsis</i> que expresan <i>SchRabGDII</i> sometidas a estrés salino.....	62
Figura 15: Detecciones del anión superóxido ( $O_2^-$ ) en plantas control y transgénicas que expresan constitutivamente <i>SchRabGDII</i> en condiciones de estrés salino.....	63
Figura 16: Contenido total de sodio ( $Na^+$ ) en hojas y raíces de <i>A. thaliana</i> .....	65
Figura 17: Internalización de FM4-64 en células de la raíz de plantas control y transgénicas que expresan constitutivamente <i>SchRabGDII</i> .....	66
Figura 18: Localización subcelular y comparación de los contenidos de sodio entre líneas transgénicas ( <i>SchRabGDII</i> ) y plantas control (WT) en raíces de <i>Arabidopsis</i> mediante la sonda fluorescente Sodium Green..	68

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados en esta tesis .....	30
--	----

## ABREVIACIONES

ha	hectáreas
°C	grados Celsius
<i>Col-0</i>	Columbia-0
Wt	Plantas silvestres, no transformadas
MP	Membrana plasmática
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BiFC	Complementación bimolecular de la fluorescencia
GDI	Inhibidor de la disociación de GDP
GEF	Factor intercambiador de guanidina
GAP	Proteína activadora de GTPasa
RAB	RAs related in brain
REP	Rab escort protein
NBT	Nitroblue tetrazolium
GGT	Geranyl geranyl transferasa
PLC	Fosfolipasa C
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
SOS	Salt overly sensitive
HKT	Transportador histidina quinasa
NHX	Intercambiador ion Sodio/Protón
NADPH	NAD fosfato deshidrogenasa
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ORF	Marco de lectura abierto
CaMV35S	Virus del mosaico de la coliflor 35S
IP3	Inositol 3 fosfato
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
Na <sup>+</sup>	Sodio
K <sup>+</sup>	Potasio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
Pn	Fotosíntesis neta
E	Transpiración
Gs	Conductancia estomática
VPD	Déficit de presión de vapor
μl	microlitro
mM	milimolar
μg	microgramo
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo Real

dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfato
± ES	Error estándar
MS	Murashige & Skoog
NCBI	National Center for Biotechnology Inforamtion
DNAsaI	Desoxirribonucleasa I

## RESUMEN

Bajo situaciones de estrés las plantas desarrollan estrategias que le permiten incrementar sus niveles basales de tolerancia. Algunas de las estrategias identificadas contemplan la activación de genes implicados en las vías de tráfico vesicular, este argumento encuentra sustento en investigaciones que demuestran un aumento en las dinámicas endocíticas cuando las plantas se someten a estrés salino. Adicionalmente se ha comprobado que la expresión constitutiva de algunos genes del tráfico vesicular en plantas modelo mostraron resultados satisfactorios en el incremento de la tolerancia a la salinidad.

Investigaciones preliminares en la especie de tomate silvestre *Solanum chilense* (Dunal) Reiche, tolerante a la salinidad, han permitido la identificación de un transcrito que es inducido en respuesta al estrés salino. Análisis informáticos revelaron que la secuencia nucleotídica de este transcrito poseía un alto grado de identidad con el gen que codifica para la proteína del inhibidor de la disociación de GDP (*GDI*), del tipo Rab-GDI y debido a su homología con el gen de *Arabidopsis* (*AtGDII*), se denominó *Solanum chilense RabGDII* (*SchRabGDII*). La funcionalidad de esta proteína se relaciona con los procesos de tráfico vesicular, permitiendo la extracción de las RabGTPasas desde la membrana de destino y luego manteniéndolas solubles en el citoplasma, como una reserva, para un próximo movimiento de vesículas.

Para desarrollar esta investigación se propusieron los siguientes objetivos; (1) determinar el perfil transcripcional órgano específico de *SchRabGDII* y durante el estrés salino, (2) identificar las características estructurales y filogenéticas de la proteína codificada por *SchRabGDII*. (3) determinación de la identidad funcional del producto génico de *SchRabGDII*. (4) determinar la capacidad de interacción de *SchRabGDII* y una RabGTPasa involucrada en el tráfico de membranas entre el endosoma y la vacuola. (5) determinar el efecto de la expresión heteróloga de *SchRabGDII* sobre los parámetros fisiológicos en plantas transgénicas de *A. thaliana* durante el estrés salino. Adicionalmente, se (6) determino el efecto de la expresión heteróloga de este gen sobre la endocitosis en condiciones no estresantes y sobre la (7) distribución intracelular del sodio en raíces de plantas de *A. thaliana* control y heterólogas para *SchRabGDII* durante el estrés salino.

Nuestros resultados muestran que *SchRabGDI1* tiene un mayor nivel de acumulación de transcritos en tejido radicular y que comparte las características filogenéticas y los dominios estructurales característicos presente en este grupo de proteínas. Además, la complementación de la levadura mutante *sec19-1* con *SchRabGDI1* permitió corregir el fenotipo termosensible, demostrando la actividad funcional de SchRabGDI1. Mediante los estudios de BiFC se logró comprobar que SchRabGDI1 es capaz de interactuar *in-vivo* con una RabGTPasa clave de la ruta endosoma-vacuola. Adicionalmente, la sobreexpresión de *SchRabGDI1* evidencio una mejora en parámetros fisiológicos como, la disminución en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs), mayor peso fresco de las plántulas, lo cual estaba acompañado de un aumento en la tasa de endocitosis y un aumento en el contenido de Na<sup>+</sup> en sus vacuolas comparado a lo exhibido por las plantas silvestres, bajo las mismas condiciones de estrés salino.

Este trabajo aporta nuevas evidencias acerca del papel del tráfico vesicular intracelular, y su participación durante el estrés salino, en relación con la expresión heteróloga de *SchRabGDI1* en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

## SUMMARY

Under stress situations, plants develop strategies which allow them to increase their basal tolerance levels. Some strategies include the activation of genes involved in the vesicular traffic routes. This argument is supported by researches that show an increase in vesicular dynamics when plants are subjected to salt stress. Additionally, it has been proved that the constitutive expression of some vesicular trafficking genes in model plants showed satisfactory results in the increasing of salt tolerance.

Previous researches (of our team) on the wild tomato species *Solanum chilense* (Dunal) Reiche, high tolerant to salinity, have permitted the identification of a transcript which it is induced in response to salt stress. Databases analysis revealed that the nucleotide sequence of this transcript had a high identity degree with the gene that codifies for a GDP dissociation inhibitor (*GDI*) protein, of Rab-GDI type and due to its homology with the gene of *Arabidopsis* (*AtGDII*), it was named SchRabGDI1. The functionality of this codified protein is related to the vesicular trafficking processes, allowing the RabGTPases extraction from the target membrane and afterwards keeping them soluble in cytoplasm, like a reservoir, for a future vesicles movement.

To carry out this research, following objectives were set: (1) to determinate organ-specific transcriptional profile and (2) to identify the structural and phylogenetic characteristics of the codified protein by *SchRabGDII*. (3) to determine the functional identity of *SchRabGDII* gene product. (4) to determinate the *in vivo* interaction capacity of SchRabGDI1 and a RabGTPase involved in membrane trafficking between the endosome and the vacuole. (5) to determine the variation of physiological parameters in *SchRabGDII* *A. thaliana* heterologous plants during salt stress. In addition it was (6) determined the effect of heterologous expression of this gene on endocytosis under non-stressful conditions and on the (7) intracellular distribution of sodium in roots of *A. thaliana* control and *SchRabGDII* heterologous plants during salt stress

Our results show that *SchRabGDII* has a higher-level accumulation of transcripts in root tissue and it shares the phylogenetic characteristics and characteristic structural domains

present in this group of proteins. Furthermore, the complementation of mutant yeast *sec19-1* strain with *SchRabGDI1* allowed to correct the thermosensitive phenotype, demonstrating the functional activity of SchRabGDI1. Due to the BiFC studies, it was possible to verify that SchRabGDI1 can interact in-vivo with a SchRabGTPasa, key protein of the endosome-vacuole pathway. Additionally, the overexpression of *SchRabGDI1* showed an improvement in physiological parameters such as the decrease in the accumulation of reactive oxygen species (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), higher seedlings fresh weight together with an increase in the endocytosis rate and increase in the of Na<sup>+</sup> content in its vacuoles compared to what control plants exhibited under the same conditions of salt stress.

This research provides with new evidence about the role of intracellular vesicular trafficking, as well as its participation during saline stress, in relation to the heterologous expression of *SchRabGDI1* in the *Arabidopsis thaliana* model plant.

## **I. INTRODUCCIÓN**

## I.1 Generalidades sobre el estrés salino y estrategias de tolerancia

La disminución de las tierras para uso agrícola es el resultado de un incremento sostenido en la baja disponibilidad de agua y la salinización (sodificación) de los suelos, lo cual constituye un problema a nivel mundial. Se estima que alrededor de 1125 millones de hectáreas de terreno en el mundo están afectadas por esta condición, de las cuales aproximadamente 76 millones son por acción directa de la influencia humana (Hossain, 2019) . Siendo las sales derivadas del  $\text{Na}^+$ , debido a su abundancia relativa, quienes contribuyen mayormente (Rengasamy, 2006). El efecto directo de este estrés sobre los cultivos es la inhibición del crecimiento, que finalmente conduce a una baja productividad (Tester and Davenport, 2003). La salinidad somete a la planta a dos tipos de estrés, uno de tipo osmótico y otro de tipo iónico. Hasta ahora no es claro cuál(es) son el o los receptores o sensores implicados en la percepción de este estrés. Sin embargo, se conoce que bajo una condición de hiperosmolaridad la célula experimenta cambios bioquímicos y morfológicos (Los and Murata, 2004). Entre estos cambios se cuentan, por ejemplo; variaciones en los niveles de ácido abscísico (ABA), inositol-3-fosfato ( $\text{IP}_3$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y la alteración en la fluidez de la membrana plasmática entre otros. Esta última tendría directa relación con cambios estructurales sobre receptores de estrés (Los and Murata, 2004; Zhang et al., 2006), que a su vez activaran una vía de transducción de señales, como la de la fosfolipasa C (PLC) o proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)(Zhu, 2012).

Investigaciones realizadas en diversos modelos vegetales han mostrado que existe un rápido incremento en los niveles de  $\text{IP}_3$  en respuesta al estrés hiperosmótico (Dewald et al., 2001; Drobak and Watkins, 2000). Este incremento permitirá movilizar el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en la vacuola hacia el citoplasma. La propagación del estímulo vía  $\text{Ca}^+$  activará entre otros a la vía Salt Overly Sensitive (SOS) cuyas funciones principales son; la excreción del  $\text{Na}^+$  citoplasmático mediante el transportador SOS1, la estimulación o supresión de la actividad de transportadores vacuolares, tales como: protón ATPasas ( $\text{H}^+$ -ATPasas), la bomba de protones  $\text{H}^+$ -Pirofosfatasa ( $\text{H}^+$  -PPasa), intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  como NHX. Por otra parte, el  $\text{Ca}^{2+}$  modula indirectamente la composición proteica de la membrana plasmática a través de la regulación negativa de la transcripción de los genes que codifican para los transportadores de

Na<sup>+</sup> (HKT1) y de manera positiva para los transportadores de potasio (K<sup>+</sup>) (Zhu, 2012). Asimismo, la vía SOS está involucrada en la modulación de diversas bombas o canales, entre ellos; canal rectificador de entrada de K<sup>+</sup> (KIRC), transportador de histidina quinasa (HKT) que puede funcionar como transportador selectivo de K<sup>+</sup> o de Na<sup>+</sup> de acuerdo si es tipo I o II, respectivamente (Horie et al., 2009); canales de cationes no específico (NSCC) (Demidchik and Tester, 2002), canal rectificador de salida de K<sup>+</sup> (KORC) (Chen et al., 2007), antiportador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (SOS1) (Shi et al., 2003), intercambiador vacuolar de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHX) (Blumwald, 2000) y el antiportador Ca<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (CAX1) (Mahajan et al., 2006). En la figura 1 se puede observar una representación esquemática que reúne los principales sistemas antes descritos para organismos vegetales.

La acción concertada de estos sistemas permitirá incrementar la tolerancia al estrés salino, cuya función primordial es reducir el contenido de Na<sup>+</sup> citoplasmático y así mantener una elevada relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>, lo cual es fundamental para la mantención de la homeostasis celular.

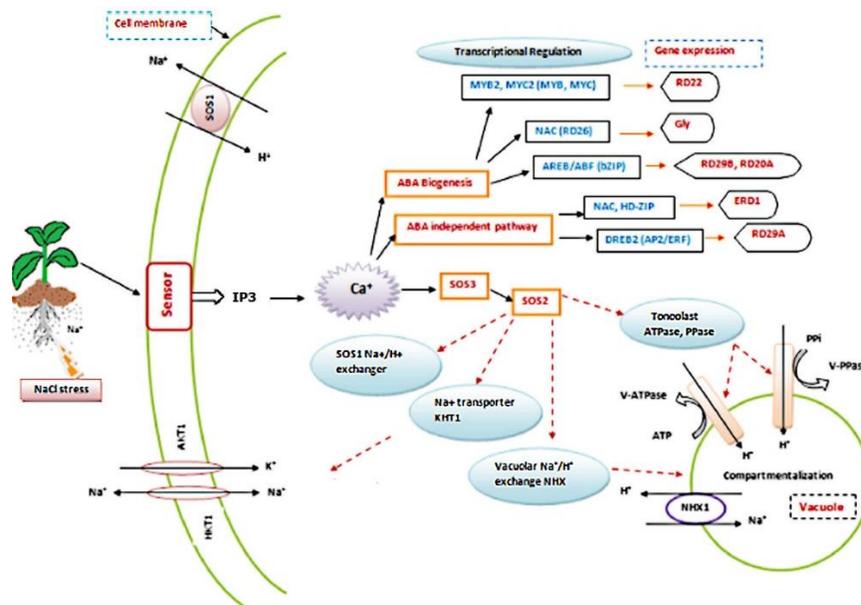


Figura 1: **Representación esquemática de las principales vías conocidas en la respuesta al estrés salino.** En la membrana plasmática existen sensores que perciben el exceso de sodio, estos inducen la liberación de IP<sub>3</sub> incrementando el nivel de calcio citoplasmático. Esto activa el complejo SOS3-SOS2 fosforilando al antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> SOS1, lo que permite un eflujo de Na<sup>+</sup> al extracelular. SOS2 puede regular la actividad del antiportador NHX1 y la V-H<sup>+</sup>-ATPasa acumulando sodio en la vacuola. El exceso de Na<sup>+</sup> estimula la síntesis y acumulación de ABA, lo que resulta en la activación de las vías dependientes e independientes de ABA. (Muchate and Nikalje, 2016)

En consecuencia, todos estos mecanismos de respuesta a estrés son activados para restablecer la homeostasis celular, permitiendo el recambio, protección y reparación de las moléculas que hayan resultado dañadas durante el estrés. Dichos eventos requieren la eliminación de las moléculas existentes desde los diferentes compartimentos celulares y su posterior sustitución por otros nuevos. Esto incluye el transporte del material desde y hacia los compartimentos específicos implicados en el reciclaje y la degradación de macromoléculas, para lo cual es necesaria la participación de un eficiente sistema de tráfico de vesículas intracelulares (Levine, 2002). Sin embargo, el conocimiento actual es aún limitado respecto del tráfico vesicular intracelular y su asociación al estrés abiótico. Por lo tanto, la generación de nuevo conocimiento sobre los diferentes constituyentes involucrados en el mecanismo molecular del tráfico vesicular bajo condiciones de estrés abiótico es relevante para futuros trabajos de mejoramiento genético en plantas de interés agronómico.

## **I.2 Tráfico vesicular intracelular**

En la célula, diversos elementos tales como proteínas y oligosacáridos son sintetizados lejos de su lugar de destino final. Para mover cada uno de estos componentes, las plantas al igual que otros organismos eucariontes poseen un complejo sistema secretorio. El cual se compone por el retículo endoplasmático, complejo de Golgi, la vacuola y la membrana plasmática. De esta manera, la comunicación entre los distintos compartimentos subcelulares es realizada a través de vesículas en las que se movilizan proteínas, lípidos y polisacáridos (Levine, 2002). La formación de la vesícula comienza con el reclutamiento de las proteínas de recubrimiento en el sitio de formación de la pre-vesícula, donde además, existe una gran cantidad de moléculas cargo. Los procesos de formación de la vesícula desde el compartimento donador y su posterior fusión con la membrana blanco son procesos vitales para asegurar la correcta entrega de los componentes celulares transportados (Saito and Ueda, 2009). Todo el proceso involucra un gran número de proteínas, sin embargo dos clases de pequeñas GTPasas cumplen un papel clave, las Sar1/Arf (formación) y Rab/Ypt (anclaje) (Takai et al., 2001; Jurgens, 2004). Así, la formación de la vesícula comienza con la activación de las proteínas

Sar1/Arf, quienes acuerdo al organelo involucrado, reclutan a las proteínas de recubrimiento COPI o COPII. Las proteínas Arf permiten la unión de las proteínas COPI en las vesículas del Complejo de Golgi y en el caso de las proteínas Sar1, participarían activando y reclutando a las proteínas COPII desde el Retículo Endoplasmático (RE) (Jurgens, 2004).

En cuanto a la fusión de las vesículas en la membrana blanco, las principales proteínas involucradas son las Rab/Ypt y las SNARE. Las RabGTPasas han sido descritas en el fenómeno de direccionamiento orgánulo-especifico de las vesículas, así como en los eventos finales del tráfico, cuando se produce la fusión de la vesícula con la membrana objetivo. Investigaciones realizadas con genes que codifican para proteínas del tipo RabGTPasas, mediante sobreexpresión, demostraron un incremento en la tolerancia al estrés abiótico (Mazel et al., 2004; Bolte et al., 2004; Peng et al., 2014; Asaoka Rin et al., 2012; Agarwal et al., 2008). Por su parte, las proteínas SNARE han demostrado actuar en cooperación con las GTPasas Rab/Ypt aumentando la especificidad de unión y del anclaje de las vesículas (Assaad, 2001).

Tradicionalmente estas proteínas se categorizaban como v-SNARE (vesicle) o t-SNARE (target). Sin embargo, este sistema no es aplicable a todos los eventos de tráfico vesicular. Por esto, la clasificación actual se basa en la secuencia de aminoácidos presentes en el dominio SNARE. Así, dependiendo si el residuo conservado de dicho dominio es glutamina (Q) o arginina (R), pueden ser clasificadas como Q- o R-SNARE. Generalmente t-SNARE corresponde a Q-SNARE y v-SNARE corresponde a R-SNARE (Fasshauer et al., 1998). La fusión entre la vesícula y la membrana aceptora es posible debido a la interacción de los dominios conservados Q- y R- SNARE (Sanderfoot and Raikhel, 1999). Entre las funciones más importantes de las SNARE vegetales encontramos la participación en procesos fisiológicos como la citocinesis (Lauber et al., 1997; Lukowitz et al., 1996), señalización relacionada con ácido abscísico (Geelen et al., 2002; Leyman et al., 1999), gravitropismo del ápice radical (Kato et al., 2002; Morita et al., 2002) y tolerancia frente al estrés salino y osmótico (Zhu et al., 2002; Leshem et al., 2006).

Como es posible observar el tráfico vesicular intracelular es un fenómeno altamente complejo y coordinado, que requiere de múltiples proteínas efectoras para desarrollar correctamente el movimiento de las distintas moléculas transportadas en las rutas endocíticas, retrogradadas, anterógradas o en la vía secretoria.

### **I.3 Relación de la respuesta endocítica y el estrés salino en plantas**

Durante el estrés salino la célula se ve expuesta a elevadas concentraciones de  $\text{Na}^+$ , esto genera un estrés de tipo osmótico en la membrana celular causando un desbalance iónico, tal incremento en el nivel de sodio intracelular, puede por ejemplo llevar a la inhibición de procesos enzimáticos críticos en la célula. Además, el incremento en los niveles del sodio extracelular genera una disminución en el potencial hídrico del suelo sometiendo a la planta a un estrés adicional por deshidratación (Maathuis, 2014). Diversos investigadores han reportado que el estrés salino induce una serie de cambios en la célula, uno de ellos sería un incremento de la endocitosis en masa observado en células radiculares de *Arabidopsis thaliana* (Leshem et al., 2007). Tal fenómeno es posible de registrar mediante el uso de sondas lipofílicas de membrana, como FM1-43 o FM4-64 cuya tasa de absorción se ve incrementada de manera importante en la zona de transición de las células de la raíz en plantas sometidas a estrés salino. Investigaciones adicionales han permitido confirmar que este incremento en la endocitosis, sería una respuesta de las células radiculares cuando las plantas se encuentran bajo condiciones de estrés salino (Li et al., 2011a; Baral et al., 2015a; Zwiewka et al., 2015). Además, el alza en la tasa endocítica estaría involucrada en el aumento en las especies reactivas de oxígeno (EROs), producto del metabolismo realizado por las NADPH oxidasas presentes en la membrana plasmática endocitadas al momento del estrés, actuando como moléculas señalizadoras críticas en el desarrollo de una respuesta de tolerancia al estrés salino (Hernandez et al., 2001).

Estudios enfocados en la caracterización funcional de la proteína de membrana PIN2, han propuesto que dicha estructura es internalizada de manera diferencial durante el estrés salino (aun cuando la tasa endocítica de otras proteínas transmembrana no se ven alteradas) (Galvan-Ampudia et al., 2013). Estudios recientes demuestran que el aumento de la endocitosis inducido por la sal es más bien un fenómeno general y no único para una proteína específica (Baral et al., 2015a; Zwiewka et al., 2015). No obstante, se ha documentado un incremento en la captación específica de algunas proteínas de membrana en respuesta al estrés salino, como acuaporinas y la oxidasa NADPH RbohD (Li et al., 2011a; Luu et al., 2012; Hao et al., 2014).

La contribución de la vía endocítica dependiente (EMC) e independiente (EIC) de clatrina en relación con el incremento de la endocitosis inducida por sal, es un área de investigación activa. Algunos de estos trabajos relacionan la EMC con incrementos en la tasa endocítica, ello debido a un incremento en el reclutamiento de clatrina en la membrana plasmática durante este estrés (Galvan-Ampudia et al., 2013; Zwiewka et al., 2015), mientras que otras investigaciones sugieren que la vía EIC también se verían potenciadas (Li et al., 2011a; Hao et al., 2014; Baral et al., 2015a). Es importante señalar que el aumento de la captación del trazador de membrana FM4-64 inducido por el estrés salino se puede observar incluso en presencia de perturbaciones genéticas y químicas de clatrina, aunque el grado de endocitosis se reduce sustancialmente. Sin embargo, la depleción de los esteroides de la membrana plasmática (MP) (conocidos por inhibir la vía independiente de la clatrina), en asociación con la inhibición de clatrina por el ácido naftilacético (NAA), elimina por completo el fenómeno de endocitosis aumentada. De esto es posible desprender que tanto la vía dependiente e independiente de clatrina parecen contribuir al incremento en la tasa endocítica (Baral et al., 2015a).

Se ha estudiado en detalle la contribución de la EMC y EIC en la captación de dos proteínas reguladas mediante endocitosis, la acuaporina PIP2.1 y la NADPH oxidasa RbohD. Mediante el uso de microscopía de fluorescencia de reflexión interna total de ángulo variable (VA-TIRF) se observó que bajo condiciones control, estas proteínas se asocian tanto a clatrina y flotilina (Flot-1) en la MP. Sin embargo, mediante alteraciones farmacológicas se logró determinar que la captación de estas proteínas depende principalmente de clatrina y no de componentes de la EIC tales como las flotilinas y los microdominios de membrana rica en esteroides. Por lo tanto, el estrés salino induce una rápida internación de ambas proteínas desde la MP, siendo principalmente este incremento en la captación independiente de la clatrina. La espectroscopía de fluorescencia de correlación cruzada reveló que, aunque el estrés salino aumentó la interacción de la proteína de membrana clatrina de cadena liviana (CLC) y RbohD significativamente, la interacción entre Flot-1 y RbohD aumentó aún más dramáticamente (Hao et al., 2014).

Basándonos en la información anterior podemos decir entonces que el estrés salino es censado por la célula, lo que provoca incrementos rápidos y evidentes en las dinámicas

endocíticas, sugiriendo que este proceso celular configura una parte importante de la respuesta al estrés por sal.

#### **I.4 Pequeñas GTPasas y su papel durante el tráfico vesicular**

Los mecanismos moleculares involucrados en el tráfico vesicular han sido estudiados con mayor detalle en algunos organismos modelo tales como, *Saccharomyces cerevisiae* y en células de mamíferos. Sin embargo, la caracterización en organismos vegetales aún debe ser estudiada en mayor profundidad. No obstante, existen algunas investigaciones en plantas que han permitido determinar que un importante número de familias proteicas pertenecientes a la superfamilia de las pequeñas GTPasas tienen una participación trascendental en los eventos de tráfico vesicular, puesto que actúan como “interruptores moleculares”, alternando entre estados activo (GTP) e inactivo (GDP) (Cherfils and Zeghouf, 2013).

La clasificación de los miembros de esta familia fue realizada de acuerdo con sus características estructurales y funcionales, lo que permitió dividirla en cinco sub-familias distintas: **Rab**, **Rho**, **Arf**, **Ran** y **Ras** (Kahn et al., 1992). Pese a ello, esta última no estaría en organismos vegetales (Ma, 2007). Entre las características de los miembros de esta superfamilia encontramos que la familia **RhoGTPasa** participaría del control en la reorganización de los filamentos de actina y las vías de transducción de señales asociadas con MAP quinasas. Las **RanGTPasas** regulan el transporte de proteínas y ARN a través de la envoltura nuclear. Finalmente, se ha descrito que las proteínas de las sub-familias **Rab** y **Arf** GTPasas actuarían en diversas etapas del tráfico vesicular, como interruptores moleculares que se desplazan entre los estados activo e inactivo, mediante la unión e hidrólisis de GTP (Vernoud et al., 2003; Ma, 2007).

Es necesario señalar que aunque las tasas normales de intercambio de nucleótidos y la hidrólisis de GTP en estas proteínas son muy bajas, la interconversión entre la forma unida a GTP o GDP depende de la interacción con otras proteínas denominadas “acesorias”. Por lo que el control fisiológico de estas GTPasas, requiere la participación de otros factores como el intercambiador de nucleótidos de guanina (**GEF**) que facilitan la disociación de GDP, junto con

la presencia de las proteínas activadoras de GTPasas (**GAP**) las cuales estimulan la hidrólisis de GTP (Bos et al., 2007; Cherfils and Zeghouf, 2013). En resumen, las principales proteínas involucradas en el correcto funcionamiento de este interruptor molecular serían una pequeña **GTPasa, GEF y GAP**. Además, en el caso de las pequeñas GTPasas que llevan un grupo farnesil o geranylgeranil en su C-terminal (Rho y Rab GTPasas), la alternancia entre el nucleótido de GDP o GTP tiene relación con su ubicación espacial en la célula (citosol o membrana). Por lo tanto, cada vez que se completa un ciclo de tráfico estas GTPasas presentes en las membranas blanco, son inactivadas mediante la hidrólisis de GTP a GDP. Dicha reacción se ve favorecida por la presencia de una proteína clave, denominada inhibidor de la disociación de GDP (**GDI**), cuyas funciones principales se relacionan con la extracción, solubilización, optimización y correcta destinación de las pequeñas GTPasas desde la membrana blanco hacia el orgánulo correcto (Pfeffer et al., 1995).

La vía endocítica ha sido una de las rutas del tráfico vesicular intracelular más estudiadas en mamíferos y levaduras, a diferencia de lo que sucede en plantas. Pese a esto, dado el elevado grado de conservación a nivel de secuencia aminoacídica y funcional entre las RabGTPasas, es posible establecer que en el tráfico de endosomas desde la membrana plasmática hacia la vacuola participan un conjunto de estas proteínas, que a su vez son reguladas por RabGDI. Entre ellas, podemos encontrar por ejemplo a la proteína RabF, cuya participación se encuentra vinculada a la vía endocítica, desde la formación de la vesícula en la membrana plasmática, hasta su destino final en el endosoma temprano. El paso siguiente es controlado por otra RabGTPasa (RabA) la que está relacionada con el movimiento de vesículas desde el endosoma temprano hasta el endosoma tardío y finalmente el direccionamiento de las vesículas desde el endosoma tardío hasta la vacuola es controlado por una RabGTPasa de la subfamilia G (Kilpinen et al., 2013; Vernoud et al., 2003).

Todo este proceso nos dice que el movimiento de vesículas desde la vía endocítica estaría dado gracias a la existencia de una cascada, donde participan cada una de las RabGTPasas, dependientes de la acción de RabGDI, permitiendo así el movimiento de las moléculas transportados con un alto grado de precisión.

## I.5 Participación de RabGDI durante el tráfico vesicular

En la numerosa familia de las pequeñas GTPasas, las proteínas RabGTPasas representan uno de los grupos más importantes y cuantiosos. Esta aseveración tiene su explicación en los diversos compartimentos celulares que precisan del tráfico vesicular intracelular (Ignatev et al., 2008). Como se mencionó anteriormente, para desempeñar correctamente sus funciones, las RabGTPasas son sujeto de modificaciones postraduccionales como la prenilación, esto consiste en la adición del grupo lipídico geranilgeranil en dos cisteínas presentes en el extremo C-terminal de la proteína (Pereira-Leal and Seabra, 2001; Khosravi-Far et al., 1991). Dicha modificación tiene como objetivo principal, la asociación con las membranas blanco y de manera circunstancial la interacción con otras proteínas. Para llevar a cabo esta adición, las proteínas Rab deben unirse con la proteína “Rab Escort Proteín” (**REP**) la que posteriormente transfiere la Rab a la sub-unidad  $\alpha$  de la “Geranil Geranil Transferasa (GGTasa) agregando dicho grupo funcional y dejándola en condiciones de participar en el movimiento de vesículas al interior de la célula (Andres et al., 1993; Cremers et al., 1994).

No obstante, aunque las RabGTPasas presenten todas sus modificaciones es necesaria la acción de otros reguladores moleculares al interior de la célula. De estos, el más importante es el inhibidor de la disociación de GDP (GDI). Una proteína que se une con gran especificidad al estado inactivo (post hidrólisis de GTP) de las RabGTPasas, manteniendo la solubilidad de las proteínas RabGTPasas en el citoplasma, en la forma del complejo RabGDP-GDI (inactivo) (Pfeffer et al., 1995). La importancia de *RabGDI* ha sido parcialmente demostrada mediante investigaciones previas, una de ellas tiene relación con la mutación del gen *GDI1* (*Gdi1p*) en levaduras, donde se pudo observar que en las membranas blanco existía una importante acumulación de proteínas en la forma RabGDP (inactiva), y que adicionalmente no se completaban las siguientes fases del tráfico vesicular (Garrett et al., 1994). Esta información permitió establecer la importancia de RabGDI, demostrando que su participación se encuentra fundamentalmente en la extracción de las proteínas RabGTPasas desde las membranas blanco, dejándolas por lo tanto disponibles para ser utilizadas en nuevos eventos de tráfico vesicular (Luan et al., 1999; Staehelin and Moore, 1995) (fig. 2).

Asimismo, mediante el empleo de células permeabilizadas (Soldati et al., 1994) y fracciones enriquecidas (Ullrich et al., 1994) se pudo demostrar que RabGDI es capaz de aumentar la precisión en la entrega de las RabGTPasas citosólicas en la membrana blanco. Otras investigaciones le conceden gran importancia a RabGDI, puesto que el complejo proteico formado por RabGTPasa y RabGDI (Rab-GDI) sería el grupo funcional de factores de transporte intracelular (Dirac-Svejstrup et al., 1994). Adicionalmente, a esta proteína, se le atribuye la capacidad de prevenir la unión inespecífica e indiscriminada de proteínas RabGTPasas en las membranas aportando selectividad al proceso de reclutamiento (Dettmer et al., 2006; Horiuchi et al., 1995). Con todos estos antecedentes es posible aseverar que las proteínas del tipo Rab-GDI aumentan la eficiencia del uso de las RabGTPasas (Wu et al., 1996b).

En lo que se refiere a las características estructurales de estas proteínas (RabGDI), se ha determinado que todos sus miembros presentan cinco regiones conservadas tanto a nivel funcional y estructural, denominadas **SCR** (Sequence Conserved Regions) compuestas por secuencias invariantes de tri o tetra péptidos (Luan et al., 2000). La información disponible actualmente en las bases de datos nos permite identificar otros genes homólogos a *RabGDI* en plantas, encontrando que en *A. thaliana* existen tres genes *AtRabGDI1*, *el AtRabGDI2* y *el AtRabGDI3*, de los cuales *AtRabGDI1* y *AtRabGDI2* fueron evaluados mediante ensayos de complementación en la levadura mutante *sec19-1 (gdi1p)*, que se caracteriza por su incapacidad para desarrollarse a la temperatura restrictiva de 37°C producto de una mutación en *ScGDI* (Žárský et al., 1997). Con ello se pudo comprobar que estos genes eran capaces de corregir el fenotipo mutante, mediante la conservación funcional del producto génico entre plantas y levaduras. Adicionalmente, existen otros ejemplos correspondientes a *RabGDI* aislados a partir de, arroz (Wu et al., 1996b) tabaco (Ezaki et al., 1997a), garbanzo (Muñoz et al., 2001) y medicago. (Yaneva and Niehaus, 2005).

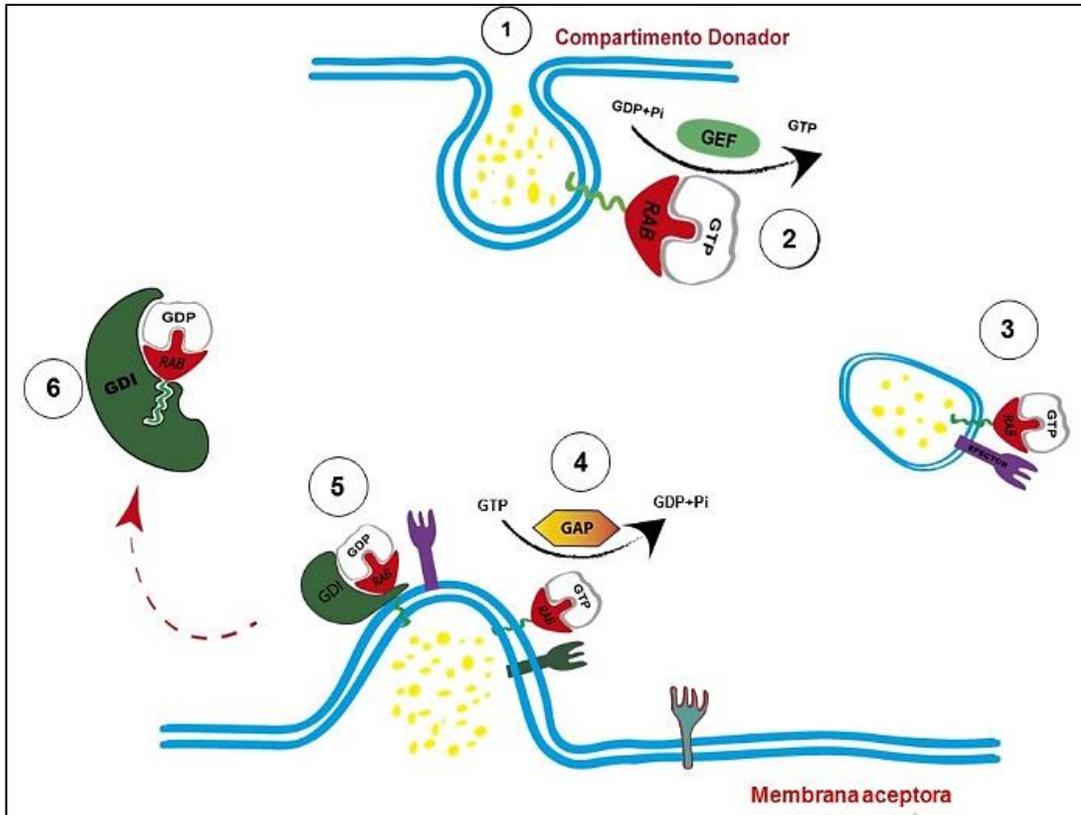


Figura 2: **Representación del ciclo de las RabGTPasas.** En la imagen se esquematiza el proceso de tráfico vesicular. En (1) formación de la pre-vesícula, (2) inicio del transporte mediante la activación de una RabGTPasa mediante la acción de GEF, (3) movimiento de la vesícula en dirección hacia la membrana blanco, (4) fusión de la vesícula en la membrana blanco e inactivación de la RabGTPasa mediante la proteína GAP, (5) extracción de la proteína Rab inactiva y su (6) solubilización por acción de RabGDI. (San Martin-Davison A.)

## I.6 Tráfico vesicular y estrés abiótico

El conocimiento que hoy se tiene respecto del tráfico vesicular y su relación con el estrés abiótico en plantas es escaso. Sin embargo, existen avances notables que darían cuenta de su relevancia, en la tolerancia al estrés ambiental (Leborgne-Castel and Luu, 2009). Entre los ejemplos más destacables se encuentra el de la proteína NtSyr1, perteneciente al grupo de las syntaxinas (un tipo de proteína SNARE), requerido para el tráfico de membranas (Leyman et al., 1999). Dicha proteína ha sido involucrada en la respuesta al estrés abiótico, puesto que presenta un incremento en el nivel de transcritos en respuesta a ABA (Leyman et al., 2000).

En los resultados obtenidos en la tesis doctoral de Gerardo Tapia (Tapia, 2005), se determinó que al someter plantas de *S. chilense* a estrés salino (400 mM, NaCl), estas responden modulando el nivel transcripcional de diversos genes. Entre ellos, llamo la atención el incremento en la acumulación de transcritos de una secuencia de 450 pb con un 83% de identidad al gen que codifica para una Sinaptobrevina, VAMP o R-SNARE de *A. thaliana* (tipo AtVAMP725), que según Uemura et al. (2004) se encuentra en forma ubicua en la membrana plasmática. Basados en los resultados obtenidos en el mismo trabajo, se determinó que AtVAMP725 está involucrada en el tráfico vesicular entre la membrana plasmática y el endosoma temprano.

Evaluaciones realizadas en la especie *Mesembryanthemum crystallinum*, tolerante a la salinidad, demostraron que la expresión relativa del gen que codifica para una Rab-GTPasa N-miristoilada (m-Rab<sub>mc</sub>), fue inducida por estrés salino (Bolte et al., 2000). Una investigación posterior mostró que esta proteína, tiene una participación en la regulación de la entrega de proteínas solubles a la vacuola lítica (Bolte et al., 2004). Trabajos adicionales en *A. thaliana* donde se expresó constitutivamente *AtRabG3e*, demostraron incrementar la tolerancia al estrés osmótico y salino como también una reducción en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Mazel et al., 2004). Análisis hechos mediante qPCR para evaluar la expresión relativa de las diversas sub-familias de RabGTPasas en *S. chilense* permitieron determinar que bajo la condición de estrés salino (300mM) existe un incremento en la abundancia relativa de transcritos de algunas GTPasas reportadas (Soto, 2014). Dicho hallazgo es concordante con la información presente en la literatura, en donde estas mismas RabGTPasas (RabA, F y G) se activan en respuesta al estrés salino, participando además en el incremento de la tolerancia a dicho estrés (Asaoka Rin et al., 2012; Mazel et al., 2004; Ebine et al., 2011).

Hasta ahora el estudio de la participación de *RabGDI* en el estrés abiótico, ha sido estudiado en algunos sistemas eucariontes tal como levaduras y plantas. El mutante de *S. cerevisiae* complementado con *NtGDII* fue sometido a estrés por aluminio (Al<sup>+</sup>), logrando aumentar la tolerancia a concentraciones letales de Al<sup>+</sup>. Esto, de acuerdo a los autores, se habría conseguido activando un sistema de eflujo hacia el extracelular (Ezaki et al., 1997b). Del mismo modo, la expresión heteróloga de *NtGDII* en *A. thaliana*, permitió la activación de un sistema de eflujo de iones Al<sup>+</sup>, aliviando los efectos negativos causados por este elemento cuando se

presenta en altas concentraciones (Ezaki et al., 2005, 2001). Los antecedentes expuestos sugieren que la maquinaria implicada en el tráfico vesicular, tal como las proteínas SNARE, RabGTPasas y sus principales proteínas reguladoras (RabGDI), estarían interactuando para que las células respondan y toleren al estrés ambiental.

Jou y cols. (2006) propone que la relación entre el tráfico vesicular y la homeostasis iónica debería incluir los siguientes eventos: (1) liberación de los transportadores unidos al tonoplasto o a la membrana plasmática, como canales y bombas impulsadas por ATP (Zhu, 2001); (2) transporte de las proteínas de carga, a los orgánulos específicos (Lesak et al., 2002) o proteosomas que faciliten la adaptación a la alta salinidad; y (3) el reciclaje de los receptores de la señal de estrés (Ketelaar et al., 2003), o componentes de la membrana (Levine, 2002) que medien las respuestas de estrés osmótico.

La evidencia nos permite entonces pensar que si logramos incrementar la eficiencia de la maquinaria de tráfico vesicular, como el anclaje, fusión y reciclaje, debería ejercer efectos positivos en la adaptación de las plantas en un medio ambiente salino.

## **I.7 RabGDI de *Solanum chilense* y su participación en la tolerancia a estrés abiótico**

La tolerancia natural al estrés salino hoy es un fenómeno mejor comprendido debido a la existencia de plantas con tolerancia natural a este tipo de ambientes. Por esto, a partir de dichos organismos, se ha buscado profundizar en cuáles son los mecanismos moleculares implicados en la respuesta adaptativa a la salinidad. En Chile encontramos una especie de tomate silvestre, *Solanum chilense* (dunal) Reiche, altamente tolerante al estrés abiótico, distribuido geográficamente entre Arica y Antofagasta un área de baja precipitación, alta salinidad y altos niveles de radiación solar (Chetelat et al., 2009). Por esta razón y dado el elevado grado de parentesco con la especie comercial *Solanum lycopersicum*, nuestro grupo de investigación ha puesto un especial interés en la comprensión y el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la tolerancia al estrés abiótico de esta especie.

De las investigaciones iniciales en *S. chilense* se aisló un conjunto de genes que eran inducidos transcripcionalmente bajo condiciones ambientales desfavorables y que participarían

en la tolerancia al estrés. Entre estos genes se identificó una secuencia nucleotídica, cuya abundancia relativa de transcritos aumento notablemente cuando estas plantas son sometidas a estrés por NaCl (400mM) (Ahumada et al., 2004). Análisis posteriores, concluyeron que la secuencia aminoacídica deducida, tiene un alto grado de homología (>80%) con la proteína del inhibidor de la disociación de GDP (*GDI*) de *Arabidopsis*, razón por lo cual el gen se nombró *SchRabGDII*. Como ya se ha mencionado, se conoce que RabGDI es clave en el tráfico vesicular (fig. 2), puesto que actúa como un regulador de las RabGTPasas preniladas, en su estado inactivo (GDP-unido), permitiendo su extracción desde la membrana de destino y su posterior solubilización en el citoplasma, de modo tal que siempre exista una reserva para un próximo movimiento de vesículas (Müller and Goody, 2017). Adicionalmente, se ha descrito que la mutación de los genes que codifican para *RabGDI*, generan una acumulación de proteínas RabGTPasas inactivas (Rab-GDP) en las membranas blanco (Garrett et al., 1994), dando cuenta del importante papel que tiene esta proteína en el tráfico vesicular intracelular.

La evidencia experimental señala que en los casos estudiados, cuando las plantas fueron sometidas a estrés salino existe un incremento en la tasa endocítica (Leshem et al., 2007). Lo anterior podría indicar que, dicho tráfico sería un componente activo de la tolerancia al estrés, para lo cual se precisaría en forma directa de un mayor número de RabGTPasas con el objetivo de lograr el correcto movimiento y dirección de las moléculas cargo transportadas durante las situaciones estresantes. Siendo también necesaria, de manera conjunta un incremento en el número de proteínas del tipo RabGDI que permitan la optimización del recurso RabGTPasa (Pfeffer et al., 1995). Esta suposición concuerda con el incremento observado en la expresión relativa de *SchRabGDII* cuando plantas de *S. chilense* se encuentran bajo condiciones estrés salino (Ahumada et al., 2004). Por otra parte, bajo esta condición de estrés, existe una correlación espaciotemporal de la expresión relativa de *SchRabGDII* con un incremento en el número de transcritos del gen que codifica para una RabGTPasa (*SchRabG3e*) involucrada en el movimiento de vesículas entre el endosoma y la vacuola (Flavia Soto, unidad de investigación Doctorado en Ciencias mención Ingeniería Genética Vegetal de la Universidad de Talca)

El aumento de la endocitosis bajo condiciones de estrés salino puede tener dos propósitos, uno de ellos es el retiro de diversas proteínas desde la membrana celular tales como canales iónicos (transportadores), fosfolípidos y proteínas dañadas por el estrés. Pero adicionalmente, junto con el retiro de los transportadores o canales, la endocitosis puede incorporar de forma masiva agua y sales de sodio al interior de la célula. Razón por lo cual, los endosomas cargados tendrán como último destino la vacuola, para así compartimentar el sodio incorporado (Mimura et al., 2003; Hamaji et al., 2009), evitando los efectos tóxicos del  $\text{Na}^+$  citoplasmático y permitiendo además la entrada de agua pese a la disminución del potencial hídrico del suelo.

Por ello en esta tesis será interesante buscar respuesta algunos de los siguientes planteamientos: a) el conocer si el incremento en el número de moléculas de SchRabGDI1 en las plantas es por sí misma suficiente para aumentar la endocitosis, b) si esta SchRabRabGDI1 es capaz de regular alguna de las RabGTPasas involucradas en el tráfico de endosomas a vacuolas, c) verificar si estos endosomas poseen  $\text{Na}^+$  cuyo destino es la vacuola y d) determinar si este aumento en la endocitosis y la compartimentación inducido por la sobreexpresión de *SchRabGDII* es suficiente para conferir tolerancia a estrés salino en plantas sensibles a dicho estrés. Por lo tanto, y en función de los resultados que se obtengan podremos contribuir a elucidar el putativo papel que *RabGDII* de *Solanum chilense* cumple en los fenómenos de tráfico vesicular y en la adaptación de *Solanum chilense* cuando esta se encuentra bajo condiciones de estrés salino.

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## II.1 Hipótesis

Considerando que:

1. La vía endocítica se ve estimulada durante el estrés salino en plantas.
2. Las pequeñas GTPasas tienen una participación fundamental en los procesos de tráfico vesicular intracelular.
3. La expresión heteróloga de RabGTPasas ha mostrado incrementar la tolerancia a la salinidad.
4. RabGDI es un componente importante del tráfico vesicular, participando en la extracción y reciclaje de las proteínas RabGTPasas.
5. *RabGDII* de *Solanum chilense* incrementa la acumulación de transcritos durante el estrés salino.

La hipótesis de trabajo es:

Si *SchRabGDII* es un componente del tráfico vesicular intracelular, su expresión heteróloga en plantas de *Arabidopsis thaliana*, generará un aumento del tráfico vesicular desde la membrana plasmática hacia la vacuola, lo cual contribuye a un incremento de la tolerancia al estrés salino en estas plantas.

## II.2 Objetivos

### II.2.1 Objetivo general:

Evaluar la función celular y el efecto de la expresión heteróloga de *SchRabGDII* en el tráfico vesicular desde la membrana plasmática hacia la vacuola y su relación con la tolerancia al estrés salino en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

### II.2.2 Objetivos específicos:

1. Determinar el perfil transcripcional órgano-específico de *SchRabGDII* y bajo condiciones de estrés salino
2. Identificar las características estructurales y filogenéticas de la proteína codificada por *SchRabGDII*.
3. Determinar la identidad funcional de la proteína codificada por *SchRabGDII*, mediante la complementación de una mutante de levadura de *S. cerevisiae*, cuya única RabGDI (*sec19*) es inactivada a temperatura restrictiva de 37°C.
4. Determinar la capacidad de interacción de SchRabGDI1 con proteínas SchRABG3e que participan del tráfico de endosomas a vacuolas
5. Determinar el efecto de la expresión heteróloga de *SchRabGDII* sobre los parámetros fisiológicos en líneas transgénicas para *SchRabGDII* de *A. thaliana* sometidas a estrés salino.

6. Determinar el efecto de la expresión heteróloga de *SchRabGDII* sobre la endocitosis, en raíces de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones no estresantes.
  
7. Determinar la distribución intracelular del sodio ( $\text{Na}^+$ ) en raíces de plantas de *Arabidopsis thaliana* control y líneas transgénicas para *SchRabGDII*, cuando están sometidas estrés salino.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### III.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Semillas de la planta *Solanum chilense* (Dunal) Reiche, fueron obtenidas desde plantas colectadas en el norte de Chile a 2500 msnm en la ubicación 18° 26' lat. S 69° 45' long. Para la realización de los ensayos, se utilizaron plantas propagadas vegetativamente mediante esquejes enraizados en agua durante dos semanas, luego fueron transferidas a maceteros hasta alcanzar la edad aproximada de 8 semanas. Las plantas se mantuvieron en macetas de 2lt conteniendo una mezcla de sustrato perlita, vermiculita (1:1 v/v), crecidas en condiciones de invernadero entre 23-25 °C y con un fotoperiodo controlado de 16/8 h luz/oscuridad. El riego se realizó cada 2 días o según necesidad y la fertilización consistió en la utilización de una solución comercial de Hoagland (1/4 de fuerza) cada 10 días. Para la aplicación del tratamiento de estrés salino, en cada tiempo seleccionado se dispuso de 3 réplicas biológicas. Para la evaluación de los perfiles de expresión relativa en distintos órganos se realizaron en plantas no estresadas, las muestras fueron colectadas desde raíz (R), hoja joven (YL) y madura (YL), tallo (S), yema floral (FB) y Flor (F).

Plantas de tipo silvestre y transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia 0 (Col-0) fueron cultivadas en condiciones *in-vitro* en medio MS (Murashige and Skoog, basal salt mixture) a ½ de fuerza, en cámara de cultivo a 21°C y con fotoperiodo de 16h/8h luz/oscuridad. Para su validación estadística, todos los experimentos fueron realizados en triplicado.

### III.2 Ensayos de Salinidad

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

En el caso de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, para la realización de los distintos ensayos, fueron utilizadas en diversos estadios del desarrollo tales como; semilla y plántulas de 7 y 15 días de edad.

### **III.3 Tratamiento de salinidad en plantas de *Solanum chilense***

Un conjunto de 40 plantas fue regado con 200 ml de una solución salina (solución nutritiva comercial de Hoagland, *Phytotechnology Laboratories*) suplementada con 300 mM NaCl) 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. desde iniciado el tratamiento de estrés salino, considerando 3 réplicas biológicas (estrés) y 3 plantas control para cada tiempo (control). Las plantas control fueron regadas solo con solución nutritiva de Hoagland en las mismas condiciones.

### **III.4 Determinación de la variación de parámetros eco-fisiológicos**

Con el objetivo de determinar alteraciones en los parámetros fisiológicos producto de las condiciones de estrés impuestas, se procedió a la cuantificación de algunos parámetros eco-fisiológicos de las plantas estudiadas tales como; fotosíntesis neta ( $P_n$ ), transpiración ( $E$ ), conductancia estomática ( $G_s$ ), déficit de presión de vapor ( $VPD$ ) y concentración interna de  $CO_2$  que fueron medidos en hojas completamente expandidas de *S. chilense*, utilizando el sistema analizador portable CIRAS-2 (CIRAS-2 Portable Photosynthesis System; PP Systems, Amesbury, MS, USA).

### **III.5 Extracción de y purificación de ARN.**

El ARN total se extrajo de aproximadamente 100mg de tejido proveniente de los distintos órganos de *S. chilense* y en hojas de *A. thaliana* 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  $\mu$ l de volumen final de ARN el cual fue tratado con DNasa I libre de RNasas (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) según protocolo modificado de los fabricantes para eliminar contaminación de ADN genómico. Las modificaciones a la

metodología radican en el número variable de tratamientos con ADNasa que se realizó a cada muestra de ARN según la cantidad de ADN genómico presente. Para determinar la expresión relativa de los genes de interés en las condiciones y órganos seleccionados, las extracciones de ARN fueron realizadas en triplicado. La calidad de las muestras fue verificada en geles de agarosa al 1% p/v y la concentración de ARN 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 ARN fueron resuspendidas en agua estéril y almacenadas a -20°C.

### **III.6 Síntesis de ADNc.**

La reacción de transcripción reversa para síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó sobre 1-2 µg de ARN 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 µl, conteniendo: 10 µl de ARN (1-2 µg), 1 µl oligo (dT), 4 µl Buffer de Reacción (5X), 1 µl de Inhibidor de Ribonucleasa RiboLock, 2 µl de 10 mM dNTP's y 2 µl 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 ADNc se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### **III.7 Análisis de la expresión génica.**

El análisis de la expresión de los genes de interés fue determinado mediante PCR en tiempo real (qPCR) utilizando un termociclador Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies, Inc.). Las reacciones de amplificación de los ADNc se realizaron usando el método de SYBR green (Stratagene) en un volumen final de 20 µl y de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Cada reacción de 20 µl contenía: 2 µl of ADNc diluido (50

ng), 10 µl del reactivo 2X Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Máster 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<sub>m</sub>) 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 de los genes ubiquitina 3 (Ubi3, número de acceso X58253) y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH, número de acceso U97257) (Yáñez et al., 2009; Orellana et al., 2010). Para el análisis de expresión en *Arabidopsis* los transcritos fueron normalizados contra el partidor AtFbox (Fbox, número de acceso X58253) (Remans et al., 2008). Para los genes candidatos involucrados en la endocitosis de *S. chilense* y *Arabidopsis* se diseñaron partidores específicos a partir de las secuencias nucleotídicas descritas en (tabla 1) utilizando el software Beacon Designer 8 (Premier Biosoft). La secuencia nucleotídica de los partidores analizados por qPCR se describe en (tabla 1). Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados con la finalidad de corroborar la identidad del producto. Los datos obtenidos luego de la corrida 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 qPCR 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.

Tabla 1: Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados en esta tesis

A) Partidores para ensayos de qPCR			
Nombre del partidor	Secuencia del partidor 5'- 3'	Tamaño Amplicón (pb)	Temperatura Annealing (°C)
SchRabGDI1 (AY787206)	F-ACACTCATAATGTTGCTCCAAAGGG R-ATACCAGGCTTCAGTTCCTCTCC	136	58
SchAREB1 (AY530758)	F-CAGGTTTAATGGCTGGTAGTATCCC R-GCTGTGATTGTTGGTTCTGTTGC	142	58
SchTSW12 (X56040)	F-CTCCACGGTTCAGTAAAG R-CCATAAGCAGGATCACAC	128	58
SchGAPDH (U97257)	F-ACAACCTAACGGCAAATTGACTGG R-TTACCCTCTGATTCCTCCTTGATTG	130	58
SchUbiquitin3 (X58253)	F-GAAGAAGAAGACCTACACCAAGCC R-CACTCCTTACGAAGCCTCTGAAC	152	58
AtFbox (AT5G15710)	F-TTTCGGCTGAGAGGTTTCGAGT R-GATTCCAAGACGTAAAGCAGATCAA	63	60
B) Partidores utilizados en los ensayos de BIFC			
Nombre del partidor	Secuencia 5'- 3'	Tamaño Amplicón (pb)	Temperatura Annealing (°C)
B1-ScRabG3e	<u>F-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> cg ATGCCTTCTCGCCGGCGAACG	621	55
B2-ScRabG3e Stop	<u>R-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> cta ACACTCACATCCACCTGTCCTCTG		
B1-ScRabGDI1	<u>F-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> cg ATGGATGAAGAGTATGATGTGATTGTG	1332	54
B2-ScRabGDI1 stop	<u>R-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> c TTCTTCAGCGGCACTCGCAGCAC		
C) Partidores para amplificar genes de largo completo			
Nombre del partidor	Secuencia 5'- 3'	Tamaño Amplicón pb	Temperatura Annealing (°C)
SchRabGDI1_XbaI	F-GTCTAGAATGGATGAAGAGTATGATGTGATTG	1335	54
SchRabGDI1_SacI	R-TGAGCTCTCATTCTTCAGCGGCACTCGCA		
SchRabGDI1_pYF	F-CACCATGGATGAAGAGTATGATGTGATTGT	1323	54
SchRabGDI1_pYR	R-TTCTTCAGCGGCACTCGCAGCACTT		
GAL1_F	F-AAT ATA CCT CTA TAC TTT AAC GTC		

### **III.8 Reacción de polimerasas en cadena (PCR) y clonamiento de las secuencias amplificadas.**

Dado que la región codificante del gen *SchRabGDI1* no posee intrones, esta fue amplificada sin mayores complicaciones a partir de ADN genómico (ADNg) de raíces de *S. chilense*. La purificación del ADN genómico se realizó a partir de raíces usando el kit comercial Genomic ADN 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 la secuencia depositada en la base de datos NCBI GenBank: AY787206.1 (tabla 1) y la enzima ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen). En cada reacción de PCR se emplearon aproximadamente 25ng totales de ADNg aislado desde raíz de *S. chilense* como templado, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 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 en: 96°C por 10 min, 35 ciclos de 96°C por 45s, 58°C por 30s, 72°C por 45 seg, seguido de una extensión final de 72°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 DH5α* (Sambrook and Russell, 2001), y las colonias positivas fueron detectadas en medio de selección en base a su coloración (0,15 mM de IPTG, 30 µg/ml de X-Gal) y a la resistencia a ampicilina (100 µg/ml). Posteriormente, los ADN plasmidiales fueron purificados 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) y el software en línea ClustalO (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Posteriormente y con el objetivo de determinar la integridad del ORF, las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas y comparadas con la secuencia anotada en GenBank: AY787206.1 y con otras secuencias relativas a *RabGDI* de organismos vegetales preexistentes en las diversas bases de datos disponibles en línea.

### **III.9 Aislamiento y purificación de ADN 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 constante por 12-16 h. Posteriormente, las bacterias fueron procesadas para la obtención de su ADN 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).

### **III.10 Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.**

Utilizando la secuencia aminoacídica deducida de *SchRabGDII*, 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 múltiples de secuencias generados por el software BioEdit y utilizando el programa MEGA versión 6.0 (<http://www.megasoftware.net>; (Tamura et al., 2007)). Se empleó el método de neighborjoining (Saitou & Nei, 1987) con análisis bootstrap de 3000 réplicas.

### **III.11 Generación de construcciones genéticas para transformación estable de *Arabidopsis thaliana*.**

La región codificante del gen *SchRabGDII* fue amplificada desde ADNg utilizando partidores específicos (tabla 1) con los sitios de restricción necesarios para su posterior ligación 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 XbaI

(TCTAGA) SacI (GAGCTC) del vector binario pBI121; para reemplazar al gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), de esta forma el gen quedo bajo el control del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor *CaMV35S*. La construcción obtenida se denominó *35S::SchRabGDII*.

### **III.12 Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana***

El vector binario conteniendo la construcción *35S::SchRabGDII*, fue introducido en células químicamente competentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pmp 90 (Sambrook and 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 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2,2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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) 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 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 7) con los antibióticos de selección durante 24 h. a 28°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 600nm. 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::SchRabGDII*. 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 segundos 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, 5mg/L de anfotericina B y 500 mg/L de augmentina para seleccionar las plantas transgénicas 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 transgén, 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 resemebradas hasta la generación T3 y con ellas su evaluación molecular y fenotípica.

### III.13 Ensayos de complementación de levadura

Para los experimentos de complementación de levadura con *SchRabGDII*, se empleó la cepa mutante de levadura *sec19-1*. Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, RSY274 (MAT $\alpha$ , *ura3-52*, *his4-619*, *sec19-1*) y su cepa parental RSY249 (MAT $\alpha$ , *ura3-52*, *his4-619*) tipo silvestre fueron amablemente proporcionadas por R. Schekman (Universidad de California, Berkeley, CA). La secuencia de ADN correspondiente al marco abierto de lectura (ORF, del inglés open reading frame) de *SchRabGDII* se amplificó mediante PCR, utilizando las secuencias nucleotídicas dispuestas en la tabla 1, desde el vector de expresión *PBI121* que ya contenía el gen de interés y que fue previamente utilizado para transformación estable en organismos vegetales. Luego el ORF fue clonado mediante el uso del vector de entrada *pENTR*<sup>TM</sup>/*SD/D-TOPO*<sup>®</sup> de acuerdo con las instrucciones propuestas por el fabricante (sistema Gateway, ThermoFisher SCIENTIFIC, USA) permitiendo generar el constructo *pENTR-SchRabGDII*, la correcta inserción del fragmento amplificado fue verificado mediante la secuenciación del ADN plasmidial obtenido de 10 colonias distintas (Macrogen, Korea). Posteriormente el ADN de una colonia seleccionada, conteniendo el constructo *pENTR-SchRabGDII*, se recombinó mediante la reacción de LR Clonase<sup>®</sup> (Sistema Gateway, ThermoFisher SCIENTIFIC, USA) en el vector de expresión *pYES-dest52*, cuya expresión se encuentra regulada a través del control del promotor inducible *Gall*. La construcción resultante *pYES-dest52-Gall::SchRabGDII* y el vector vacío *pYES-dest52* se utilizaron para transformar

el mutante *sec19-1*, mientras que la cepa de tipo salvaje se transformó solo con el vector vacío. La transformación de levadura se realizó usando el kit de transformación *S. cerevisiae* EasyComp™ (Thermo Fisher Scientific) y la selección se realizó en medio sintético completo (SC) que carecía de uracilo y se complementó con glucosa para reprimir la inducción del promotor *Gall*, además las colonias obtenidas posterior a la transformación fueron confirmadas mediante PCR para verificar la presencia de *SchRabGDII* (tabla1, letra C). Para evaluar el fenotipo de la mutante *sec19-1* complementada con *SchRabGDII*, se cultivaron células de levadura transformadas en medio SC suplementado con uracilo y galactosa o glucosa a 28 °C o 37 °C durante 3 días, evaluándose su capacidad para crecer bajo dichas condiciones.

### **III.14 Análisis de la tolerancia al estrés salino en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana***

Para el ensayo de estrés por salinidad se sembraron semillas previamente estratificadas (4°C) en oscuridad durante 3 días y luego desinfectadas. El ensayo se realizó con los genotipos control (*Col-0*) y las líneas transgénicas sobreexpresoras para *SchRabGDI1* (*L15*, *L32*). Estas fueron sembradas en placas que contenían medio de cultivo MS (1/2 fuerza), sacarosa 1% p/v, MES 0,02% p/v y Fito-agar 0,7% p/v por un espacio de 5 días y luego fueron mantenidas o traspasadas a un nuevo medio que contenía el agente inductor de estrés (NaCl). Para la realización del ensayo se contempló el análisis de las líneas heterólogas para *SchRabGDI1*, bajo condiciones no estresantes (Sin NaCl) y debido a que *Arabidopsis* es una planta sensible a la salinidad se utiliza una concentración estresante de 75mM NaCl. Esta concentración es suficiente para generar estrés pero también es la óptima para ensayos de larga data en condiciones *in vitro* permitiendo el desarrollo del fenotipo silvestre (Prerostova et al., 2017). El período del ensayo fue de 15 días de cultivo. Este ensayo fue realizado en triplicado y considero el análisis y evaluación de 15 plántulas por cada uno de los genotipos comparados.

### **III.15 Predicción de estructura mediante modelamiento por homología**

Los modelos estructurales de las proteínas SchRabGDI1 y SchRabG3e fueron construidos mediante modelamiento por homología basados en las estructuras cristalinas de proteínas homólogas. El programa SWISS-MODEL fue utilizado para la selección de los modelos cristalizados que tuvieran el mayor grado de homología de secuencia (Biasini et al., 2014), pero además el mismo software fue utilizado para la construcción de estructuras de modelos comparativos. La estructura cristalina de RabGDI y Rab7 (Ypt7) se obtuvo desde *Saccharomyces cerevisiae*, PDB código 1UKV; (Rak et al., 2003) y PDB código 4PHH respectivamente (Wiegandt et al., 2015).

La estructura cristalina proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* de RabGDI (PDB código 1UKV; (Rak et al., 2003)) e Ypt7, una clase de Rab7, (PDB código 4PHH; (Wiegandt

et al., 2015)) fueron seleccionadas basados en su alto grado de homología con SchRabGDI1 y SchRabG3e respectivamente. Los mejores modelos para ambas proteínas fueron obtenidos mediante el uso de la plataforma SWISS-MODEL, y luego fueron mejorados mediante la simulación de dinámicas moleculares y mediante métodos de equilibrado usando los programas Nano Molecular Dynamics (NAMDv 2.10; (Phillips et al., 2005), el campo de fuerza CHARMM27 (Schlenkrich and Brickmann, 1996) y el modelo de agua TIP3P (Jorgensen et al., 1983). Se utilizó una minimización inicial corta de 15000 pasos con el fin de remover algunos puntos de contacto incorrectos y además para la optimización de la energía. Las dinámicas moleculares fueron realizadas de acuerdo con las siguientes condiciones: 12 ns de dinámica molecular, una caja con condiciones periódicas de borde 80 Å, 100 Å y 80 Å, 150 mM NaCl y 300°K (Phillips et al., 2005). El modelo tridimensional final de cada estructura fue comprobado en su calidad estereoquímica y coordenadas atómicas con un gráfico de Ramachandran usando PROCHECK (Laskowski et al., 1993).

### **III.16 Simulación de acoplamiento molecular Proteína-proteína**

La simulación del acoplamiento molecular proteína-proteína entre SchRabGDI1 y SchRabG3e se realizó mediante el uso del software CLUSPRO (Comeau et al., 2004), y para determinar la plataforma de interacción se realizó un alineamiento estructural con el modelo tridimensional de *Saccharomyces cerevisiae* 1UKV RabGDI. Luego se realizó una dinámica molecular de 12ns mediante NAMD con la finalidad de evaluar la interacción entre los aminoácidos presentes en la plataforma de unión y además determinar el extremo libre de ambas proteínas. Esta información fue utilizada para predecir y seleccionar el mejor sitio de ligación de las proteínas fluorescentes SCYCE y VYNE. Para realizar las visualizaciones definitivas se utilizaron los programas Python Molecular Viewer 1.4.5 (Sanner, 1999) y Visual Molecular Dynamics (VMD; (Humphrey et al., 1996)).

### III.17 Interacción in vivo entre SchRabGDI1 y SchRabG3e mediante complementación bimolecular de la fluorescencia BiFC

El marco de lectura abierto de *SchRabGDI* sin el codón de stop y *SchRabG3e* fueron amplificados (tabla 1) y clonados en el vector pDONR207 (Invitrogen, USA), con el fin de generar las construcciones *pENTR-RabGDI1* y *pENTR-RabG3* respectivamente. Posteriormente el vector *pENTR-RabGDI1*, fue recombinado con el vector Gateway *pDEST-GWVYNE*, generando de esta manera la construcción *RabGDI-VYNE*. Juntamente, el vector *pENTR-RabG3e* fue recombinado con el vector Gateway *pDEST-SCYCE(R)GW* (Gehl et al., 2009), generando la construcción *SCYCE-SchRabG3e*. En esta forma se obtuvieron las construcciones donde VYNE estaba fusionada al extremo carboxilo de SchRabGDI1 y SCYCE se encontraba fusionada al extremo amino de la proteína SchRabG3e. Con el fin de validar los experimentos de interacción específica entre RabGTPasa y RabGDI1, se usó el constructo que contenía el gen codificante para la proteína NHX5 con el mismo vector de entrada utilizado por Bassil et al., (2011). Las construcciones resultantes se utilizaron para transformar la cepa quimiocompetente de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. La transformación fue corroborada mediante PCR de colonias, con el fin de comprobar la presencia de los vectores mencionados conteniendo los genes de interés. Cada una de las construcciones fue crecida por separado y luego se utilizaron para infiltrar plantas de tabaco de aproximadamente 4 semanas de edad (*Nicotiana benthamiana*) de acuerdo a la metodología descrita por Shamloul et al., (2014). Las plantas infiltradas se mantuvieron en cámara de cultivo bajo condiciones controladas de fotoperíodo (16h/8h-Luz/oscuridad) y temperatura de 23°C. Para la observación de la fluorescencia se utilizó la cara abaxial de las hojas, las imágenes fueron capturadas a partir de discos de hojas y mediante el empleo del microscopio confocal Zeiss LSM 710. La señal fluorescente verde (500-550 nm) y roja mRFP (585-620) se colectó mediante la excitación con los láseres a 488 y 561nm como fue descrito previamente (Reguera et al., 2014).

### III.18 Determinación de la internalización de FM4-64

Para evaluar el incremento en la endocitosis neta, producto de la sobreexpresión de *SchRabGDI1*, se utilizó el marcador lipofílico de membrana FM4-64 (Thermo Fisher Scientific #T-13320). Este es internalizado a través de un proceso dependiente de clatrina (Dhonukshe et al., 2007) y que al ingresar es capaz de marcar otros compartimentos celulares, tales como: endosomas, compartimentos pre-vacuolares y la vacuola (Dettmer et al., 2006; Ueda et al., 2001). Esta técnica que a medida que el compuesto es incorporado va marcando la ruta endocítica.

La incorporación de la sonda FM4-64 fue evaluada sobre células de la raíz de plantas tipo silvestre y transgénicas de *A. thaliana* (Col-0) de 7 días de edad cultivadas en medio MS sólido (1/2 fuerza) bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad relativa (16 h luz:  $120 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ , 25°C y 60% humedad relativa). Para cada uno de los genotipos utilizados el lugar de observación fue la zona de transición de la raíz (segmento apical) debido a la arquitectura celular de esta zona y su capacidad para internalizar el trazador de membrana Fm4-64 (Lichtscheidl-schultz and Baluska, 2014). 4 plántulas, fueron incubadas con la sonda FM4-64 (4 $\mu\text{M}$ ) durante 10 minutos a temperatura de 4°C. Luego del tiempo de incubación las plantas fueron lavadas para retirar el exceso de tinción y enseguida fueron mantenidas en una solución de MS (1/2 fuerza) a 25°C por un período de 5 y 30 minutos para permitir la internalización de la sonda FM4-64. Las imágenes de la zona de transición fueron capturadas mediante el uso del microscopio confocal Zeiss LSM 710. La longitud de onda del láser utilizado para excitar el FM4-64 fue de 543 nm y la fluorescencia fue capturada en el rango de 560-650 nm. La tasa de internalización de la sonda FM4-64 se calculó a partir de 4 experimentos independientes, donde se cuantificó la relación entre la media de la fluorescencia intracelular y la media de la fluorescencia de la célula completa (incluyendo la membrana plasmática). En cada experimento y en cada uno de los genotipos se examinó un número aproximado de entre 20 a 50 células por réplica biológica. El análisis de las imágenes se realizó mediante el uso del software FIJI-Image J (Schindelin et al., 2015) y el análisis estadístico y los gráficos se realizaron mediante el uso del software GraphPad Prism 6. ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

### **III.19 Análisis de la distribución intracelular del sodio (Na<sup>+</sup>) en plantas transgénicas de *A. thaliana* sometidas a estrés salino.**

Puesto que uno de los principales sitios de acumulación del exceso de iones (ej. Na<sup>+</sup>) en la célula, es la vacuola, se decidió monitorear la localización intracelular del Na<sup>+</sup> presente en las células de la región de transición de la raíz de plantas de *A. thaliana* tipo silvestre y de líneas transgénicas sobreexpresoras de *SchRabGDII*. Para ello, se utilizó la sonda específica Sodium Green<sup>TM</sup> tetraacetate (ThermoFisher Scientific #S-6901), debido a que este compuesto permite la detección espacial y temporal del Na<sup>+</sup> endocitado, basado en su capacidad para difundir de manera libre a través de la membrana plasmática. Una vez que el compuesto se encuentra al interior de la célula, los residuos acetato son escindidos por esterasas intracelulares, permitiéndole formar un complejo con el sodio libre y emitiendo fluorescencia al ser excitado a una longitud de onda específica (Park et al., 2009).

Semillas de *Arabidopsis thaliana*, silvestres y sobreexpresoras para *SchRabGDII*, fueron esterilizadas mediante la técnica en fase gaseosa por clorina, y luego crecidas *in-vitro* en agar (MS), bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad relativa (16 h luz:120  $\mu$  mol\*m<sup>-2</sup> x s<sup>-1</sup>, 25°C y 60% humedad relativa) por un período de 7 días. Luego, las plántulas se mantuvieron en MS líquido (1/2 fuerza) por un período de 12 h, suplementado con 0 o 100 mM de NaCl y 4  $\mu$ M FM4-64 (Hamaji et al., 2009), manteniendo las condiciones de crecimiento antes descritas. Posteriormente el tejido radicular de estas plántulas fue tratado con la sonda Sodium Green<sup>TM</sup> (5 $\mu$ M) durante 30 minutos (Bassil et al., 2011; Oh et al., 2010). Finalmente, las muestras fueron lavadas con una solución tampón (10mM KCl, 5mM Ca<sup>2+</sup>-MES, pH 6.1) por 1 minuto. La fluorescencia dependiente de Sodium Green y FM4-64, proveniente de la zona de transición de la raíz primaria, fue capturada mediante el sistema confocal ZEISS-LSM 710 utilizando los ajustes predeterminados del software “ZEN 2012 edition” para ambas sondas. El análisis de la distribución intracelular del sodio se realizó a partir de las imágenes obtenidas de 4 experimentos independientes. Para cada línea se examinó un promedio de 20-50 células por réplica biológica (4 réplicas por línea). La cuantificación de la fluorescencia de Sodium Green<sup>TM</sup> tetraacetato, se hizo con el software de código libre FIJI-ImageJ (Schindelin et al., 2015). El análisis estadístico y las gráficas mediante el uso del software GraphPad Prism 6 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

### **III.20 Detección de especies reactivas de oxígeno (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)**

Para la detección histoquímica del radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), se utilizaron plantas de *A. thaliana* sometidas a estrés salino durante un período de 15 días. La detección del anión superóxido se llevó a cabo mediante el método de Nitroblue tetrazolium (NBT) (Grellet Bournonville and Díaz-Ricci, 2011). Posterior a los 15 días de tratamiento con NaCl 75mM, las plantas fueron tratadas mediante inmersión completa en una solución que contenía NBT (0,5 mg/ml disuelto en tampón fosfato de sodio a pH 8.0) y luego incubado en oscuridad durante 12 horas con agitación suave a temperatura ambiente. La clorofila se eliminó mediante la utilización de una solución de decoloración que estaba compuesta por Etanol:Acido acético:Glicerol (3:1:1). Cada una de las plántulas se acomodó en un tubo de centrifuga de 2 ml (perforado en la tapa con aguja quirúrgica para liberar la presión) y se le agregó aproximadamente 1,5 ml de solución de desteñido, los tubos fueron sometidos a 90°C en baño termostático seco durante 15 minutos con el fin de eliminar por completo la clorofila. Cada tubo fue rotulado con lápiz grafito a fin de evitar que el rótulo se borre producto del escurrimiento de la solución de desteñido. Al finalizar el material se traspasó a un nuevo tubo de 2 ml con agua destilada, para evitar la decoloración acelerada producto de los solventes presentes en la mezcla de desteñido. Dicho material se utilizó en un tiempo no superior a 72 horas para evitar la degradación del producto coloreado azul (formazan).

### **III.21 Análisis químicos**

#### **III.21.1 cuantificación del contenido total de Na<sup>+</sup>**

Plántulas de tipo silvestre de *A. thaliana* Col-0 y 35S::*SchRabGDII* fueron cultivadas en condiciones in-vitro (orientación vertical) en medio MS (1/2 fuerza) suplementado con 75mM de NaCl durante 15 días. Para la cuantificación del contenido total de Na<sup>+</sup> se utilizó por separado el tejido radicular y foliar de las plántulas. Hojas y raíces fueron colectadas y lavadas con agua bidestilada para eliminar exceso de iones provenientes del medio de cultivo, posteriormente

ambos órganos fueron secados en estufa a temperatura de 70°C. Para la digestión se utilizó 0,5 gramos de cada muestra y 5 ml de ácido nítrico Suprapur®. Las muestras fueron secadas por completo en campana de extracción, agitación constante y mediante el uso de una placa calefactora mantenida a temperatura de 90°C. Finalmente, las soluciones fueron filtradas usando membranas de 0,45 µm. El filtrado final se llevó hasta un volumen de 50 ml, completado con agua bidestilada. Las mediciones de sodio fueron realizadas mediante espectrofotometría de absorción atómica de llama (aire/acetileno), Unicam modelo 969. La metodología analítica fue validada a través del uso de material de referencia (Bimep-432), provisto a través del “Programa Wageningen para Laboratorios Analíticos” (WEPAL). Los reactivos utilizados fueron de un alto grado de pureza (Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany) y las soluciones estándar para los diversos metales evaluados se prepararon a partir de soluciones concentradas (Fisher Scientific International Company).

### III.22 Análisis Estadísticos

Todos datos obtenidos a partir de los ensayos fueron sometidos a diversos análisis estadísticos realizados en el software R y Rcmdr ([http://knuth.uca.es/R/doku.php?id=instalacion\\_de\\_r\\_y\\_rcmdr:r-uca](http://knuth.uca.es/R/doku.php?id=instalacion_de_r_y_rcmdr:r-uca)), así como también mediante el uso del software Graphpad Prism 6 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Para todos los análisis de expresión génica, el nivel de significancia fue determinado por análisis de ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ), seguido por una comparación múltiple con la prueba “*Tukey’s honestly significant difference (HSD) mean-separation*”. En el caso de la determinación de la tasa de endocitosis neta, desarrollo de biomasa total y cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS, superóxido) el análisis estadístico utilizado fue *t-student* con un nivel de significancia ( $p \leq 0.05$ ). Para la determinación del contenido de sodio en raíces y tejido foliar, así como para la cuantificación de la fluorescencia en raíces producto del tratamiento con la sonda *Sodium Green tetraacetato* se utilizó la prueba de ANOVA de una vía. Los valores obtenidos se consideraron con un nivel de significancia cuando  $P \leq 0,05$ .

#### **IV. RESULTADOS**

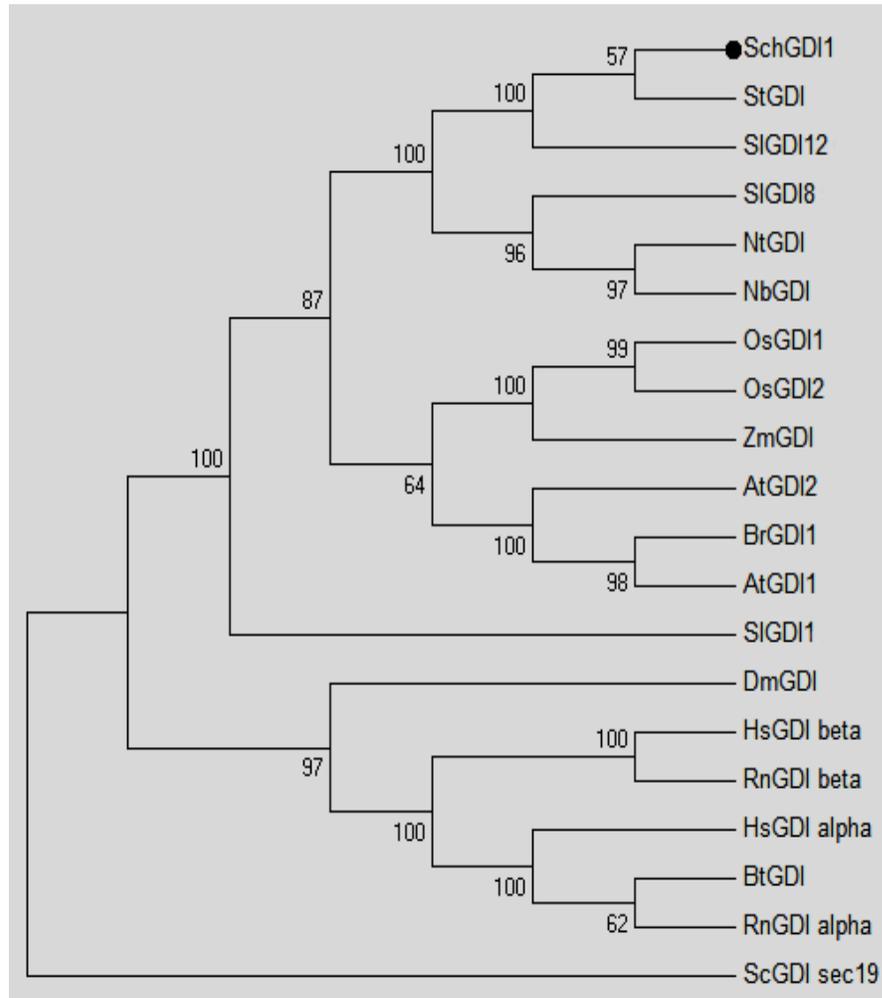
#### **IV.1 Identificación del gen codificante para el inhibidor de la disociación de GDP *SchRabGDII* de *Solanum chilense***

En trabajos previos realizados en el laboratorio de Genómica Funcional del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Taca, se asilaron un conjunto de genes de expresión diferencial bajo condiciones de estrés abiótico en la especie *Solanum chilense*. Entre estos genes se obtuvo la secuencia de un gen con un alto grado de homología con el inhibidor de la disociación de GDP (GDI) de *Arabidopsis thaliana* (*AtGDII*) (Ueda et al., 1996), cuya función ha sido relacionada con la extracción y mantención de un reservorio citosólico de las proteínas RabGTPasas, por lo cual fue anotado como *SchRabGDII* (Accesión N.º AY787206) y no existe una caracterización previa. A partir de los datos anotados en GenBank AY787206.1, se diseñaron partidores (tabla 1) para para obtener la secuencia de *SchRabGDII*. La región codificante del gen *SchRabGDII* fue amplificada y luego clonada a partir de ADN genómico (DNAg) aislado desde tejido radicular; y, al igual que *AtGDII*, *SchRabGDII* no presenta intrones en su región codificante. La secuencia de longitud completa, obtenida para *SchRabGDII*, fue de 1335 pares de bases, codificando para una proteína predicha de 444 aminoácidos.

Mediante una búsqueda por homología de secuencias realizada en la base de datos del genoma del tomate (<https://solgenomics.net/>) se identificó que en la especie *S. lycopersicum* existirían tres genes del tipo *RabGDI*, los que se denominaron *SIRabGDII*, *SIRabGDI8* y *SIRabGDI12* según su ubicación cromosómica. El análisis bioinformático nos permitió determinar que la secuencia proteica deducida de *SchRabGDII* comparte un 99% de identidad con *SIRabGDI12* (Accesión Solyc12g017570.1) de *S. lycopersicum* y con *StRabGDI* (NP\_001274860.1) de *S. tuberosum*. El grado de homología a nivel de secuencia aminoacídica con otras *RabGDI* fue: 93.5% con *SIRabGDI8* (Solyc08g015860.2), 84.41% con *AtRabGDII*, 84.23% *AtRabGDI2* y 82.21% con *SIGDI1* (Solyc01g105810.2).

Para establecer su relación evolutiva con otras proteínas del tipo GDI se realizó un árbol filogenético utilizando las secuencias de las proteínas predichas. El análisis de las relaciones evolutivas reveló que *SchRabGDII* se encuentra estrechamente relacionado con otras proteínas del tipo *RabGDI* de la familia de las solanáceas tales como *RabGDI* de *S. tuberosum*, *RabGDI12* y *RabGDI8* de *S. lycopersicum* y también *RabGDI* de *Nicotiana Tabacum* (Ezaki et

al., 2000). Sin embargo, RabGDI1 de *S. lycopersicum* se agrupa de manera separada del resto de otras proteínas del tipo GDI en plantas. Esta información nos plantea que *SchRabGDI1* del tomate silvestre *S. chilense* codificaría para una proteína del tipo RabGDI (fig. 3) participando en los fenómenos de tráfico vesicular.



**Figura 3 Relaciones filogenéticas entre RabGDI1 de *Solanum chilense* y otras proteínas del tipo RabGDI** El árbol filogenético fue construido usando el método de neighbor-joining con el programa MEGA versión 6 (Tamura et al., 2007) con 3000 réplicas para los valores de bootstrap. Los números de accesiones de las secuencias en GenBank y Solgenomics son los siguientes: *Solanum chilense* SchRabGDI1 (AAW78520.1), *Solanum lycopersicum* (SlRabGDI8, Solyc08g015860.2), (SlRabGDI1, Solyc01g105810.2), (SlRabGDI12, Solyc12g017570.1), *Solanum tuberosum* (StRabGDI, NP\_001274860.1), *Nicotiana tabacum* (NtRabGDI, AAB80717.1), *Nicotiana bentamiana* (NbRabGDI, ACN65853.1), *Oryza sativa* (OsRabGDI1, AAB69870.1) y (OsGDI2, AAB69871.1), *Zea mays* (ZmRabGDI, NP\_001183437.1). *Arabidopsis thaliana* (AtRabGDI2, XP\_002876528.1) y (AtGDI2, XP\_002880083.1), *Brassica rapa* BrRabGDI (NP\_001288917.1), *Drosophila melanogaster* (DmRabGDI, L03209), *Homo sapiens* (HsRabGDIalfa, D45021), *Homo sapiens* (HsRabGDIbeta, D13988), *Rattus norvegicus* (RnRabGDIalfa, NP\_058784.2), *Rattus norvegicus* (RnRabGDIbeta, X7440), *Bos tauri* (BtRabGDI, D90103), *Saccharomyces cerevisiae* (ScRabGDI, S69371).

El alineamiento múltiple de SchRabGDI1 con otras proteínas del tipo RabGDI , muestra que posee los dominios característicos de las proteínas del tipo GDI, esto es la presencia de los dominios SCR (sequence conserved regions ) (Wu et al., 1996a). La ubicación de estos dominios para RabGDI1 de *S. chilense* se encuentran, en el caso de SCR1A en la posición de los aminoácidos 11-24, SCR1B en la posición 33-47, SCR2 en la posición 77-156, SCR3A en la posición 211-242 y el SCR3B en la posición 243-262 (fig. 4). Tal como se puede observar en la figura 4, aquellos residuos que son idénticos entre las secuencias comparadas se presentan de color negro y representan un 80%, en el caso de los aminoácidos similares se distinguen de color gris. Esta observación nos indica que existe una alta conservación entre las secuencias aminoacídicas de todas las proteínas analizadas así como de esta putativa ScRabGDI1. Siguiendo esta lógica, se observa que los residuos aminoacídicos que conforman los motivos SCR de las RabGDI alineadas con SchRabGDI1, también se encuentran altamente conservados. Esto nos permite suponer que dada la elevada homología a nivel de la secuencia primaria y en los motivos SCR, la conformación estructural que la proteína adopte al interior de la célula debiese permitir su participación en los fenómenos de tráfico vesicular de la misma forma que alguna de las secuencias utilizados para realizar este análisis comparativo.



Figura 4 Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida de *SchRabGDI* aislada desde *S. chilense* y de otras RabGDI homólogas en plantas. Los residuos idénticos en más de 80% son marcados en negro, mientras que aminoácidos similares son marcados en gris. La ubicación de los sitios SCR (Sequence conserved residues) y los residuos de aminoácidos pertenecientes a la plataforma de interacción RabGTPasa-SchRabGDI (asteriscos rojos) se indican sobre el alineamiento. Las secuencias alineadas fueron obtenidas desde GenBank y Solgenomics y su número de acceso corresponde a: *SchRabGDI1* (AAW78520.1), *SlRabGDI12* (Solyc12g017570.1), *NtRabGDI* (AAB80717), *AtRabGDI2* (XP\_002876528.1), *BtRabGDI* (D90103) y *ScRabGDI* (S69371)

## **IV.2 *RabGDII* de *Solanum chilense* incrementa su perfil de expresión relativa durante el estrés salino.**

El estrés salino en plantas es un factor abiótico que puede actuar regulando la expresión génica, mediante mecanismos de inducción o represión de genes, lo cual puede afectar directamente diferentes procesos celulares, fisiológicos y moleculares. Sin embargo, para certificar que dichos genes efectivamente cambian su nivel de expresión bajo las condiciones estresantes, primero hay que conocer su nivel de expresión bajo condiciones no estresantes. Al mismo tiempo, en el caso de plantas silvestres cuyo hábitat es bajo condiciones extremas, la validación de la condición de estrés impuesta debe ser corroborada con cambios a nivel fisiológico y además sustentadas con marcadores moleculares.

Por lo anterior y con el propósito de evaluar la abundancia relativa de los transcritos correspondientes a *RabGDII* en plantas de *Solanum chilense*, se determinó su perfil transcripcional órgano-específico. Para ello se colectaron muestras de tejido de raíz (**R**), tallo (**S**), hoja joven (**YL**), hoja madura (**ML**), botón floral (**FB**) y flores (**F**) y a partir de este material se realizaron extracciones de ARN total, el cual fue utilizado en reacciones qPCR. El análisis de los resultados sugiere que cuando las plantas se encuentran bajo condiciones no estresantes la expresión relativa de *SchRabGDII* se encuentra presente en todos los órganos analizados, siendo el nivel de acumulación de transcritos 2 veces mayor en raíces cuando se compara, por ejemplo, con el nivel de acumulación de transcritos presente en flores u otros tejidos vegetativos estudiados (fig. 5). El tejido que evidencia la menor acumulación de transcritos es la hoja joven (**YL**) por lo tanto esta fue utilizada como el tejido normalizador. Le sigue en la cantidad de transcritos acumulados el botón floral (**BF**), aquí se observa una tendencia al incremento de transcritos, sin embargo el análisis estadístico arroja que comparativamente es igual a la hoja joven. En el caso de los tejidos hoja madura (**ML**), tallo (**S**) y flores (**F**) se observa que no existe diferencias estadísticamente significativas en el nivel de acumulación de transcritos, sin embargo su nivel de acumulación es mayor que en el botón floral o en hoja joven. (fig. 5)

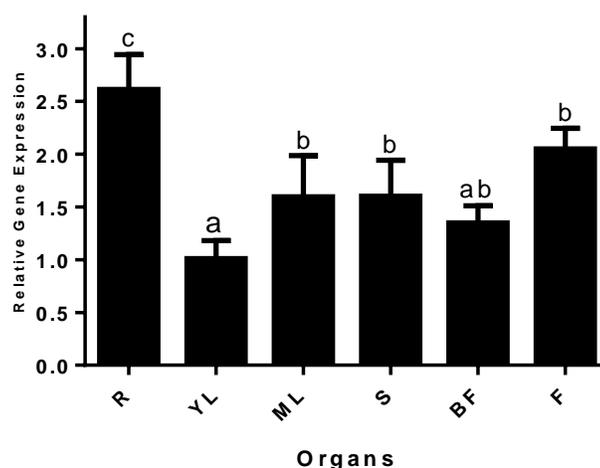


Figura 5. Perfil de expresión génica de *SchRabGDII* en tejido vegetativo y reproductivo de *Solanum chilense*. Se determinó la abundancia relativa de los transcritos mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) a partir de ARN total de los siguientes órganos: raíz (**R**), tallo (**S**), hoja joven (**YL**), hoja madura (**ML**), botón floral (**BF**) y Flores (**F**). Los valores de las barras representan el promedio de la expresión relativa de cada gen  $\pm$  el error estándar de 3 réplicas biológicas. La normalización de los valores de expresión relativa se hizo en función de los valores obtenidos para SchUBI3 y del método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito en (Livak and Schmittgen, 2001). El nivel de transcritos obtenido para hoja joven (**YL**) fue asignado como el valor uno para la normalización de los demás tejidos.

Para evidenciar que el estrés salino estaba siendo censado por las plantas de *S. chilense*, se estableció un tratamiento de estrés salino que consistió en someter a plantas de aproximadamente 8 semanas de edad, crecidas en sustrato inerte perlita:vermiculita (1:1) y regadas con solución nutritiva de Hoagland suplementada con 300 mM de NaCl (estrés salino severo) por un periodo de tres días. Durante todo el transcurso del ensayo se evaluó un conjunto de parámetros fisiológicos que suelen modificarse cuando las plantas se encuentran sometidas bajo condiciones de estrés abiótico. Estos parámetros fueron la fotosíntesis neta (Pn), el déficit en la presión de vapor foliar (VPD), la conductancia estomática (Gs) y transpiración (E). El análisis de la figura 6, muestra que el comportamiento de las plantas control (regadas con medio nutritivo sin sal). En el caso de las plantas tratadas con NaCl, como era de esperar, se produce una marcada reducción en cuanto a la tasa fotosintética, conductancia estomática y la transpiración la cual iniciaba a las 24h del inicio del tratamiento, los que fueron disminuyendo a medida que transcurría el tiempo del ensayo.

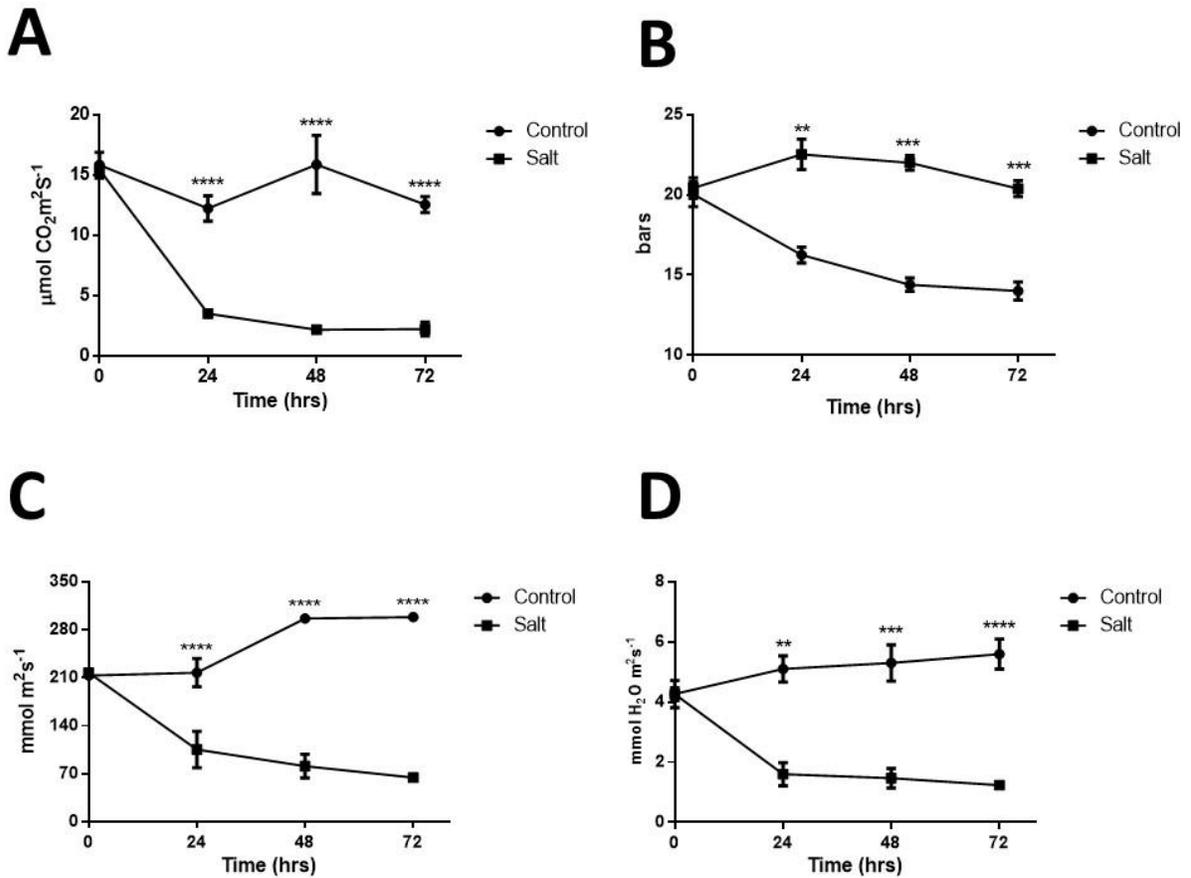


Figura 6. Evaluación de parámetros fisiológicos bajo condiciones de estrés salino en plantas de *S. chilense*. Plantas de 8 semanas de edad fueron tratadas con 200 ml de una solución 300 mM NaCl. (A) Fotosíntesis neta, (B) déficit en la presión de vapor, (C) conductancia estomática y (D) transpiración de plantas cada 24h post-riego con la solución salina. Cada punto indica el valor promedio  $\pm$  E.S. Los asteriscos sobre la línea indican diferencias significativas entre ambos tratamientos (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  y \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

A partir del análisis de los resultados de qPCR, fue posible establecer el patrón de expresión relativa de *SchRabGDII*. Para corroborar que *RabGDII* de *Solanum chilense* presenta un patrón de inducción bajo la condición de estrés salino, se utilizaron dos genes caracterizados previamente porque su nivel de acumulación de transcritos incrementa fuertemente bajo una condición de estrés salino en plantas. Los genes utilizados como control de inducción génica son *TSW12* (Orellana et al., 2010; Torres-Schumann et al., 1992) y *AREB1* (Orellana et al., 2010; Hsieh et al., 2010). Para la evaluación se obtuvo ARN total de hojas y raíces a diferentes

tiempos de los tratamientos de las plantas con y sin NaCl. Estos ARN fueron utilizados en reacciones de qPCR y en la determinación de la abundancia relativa de los transcritos pertenecientes a los genes antes mencionados. En la figura 7A se puede observar que desde las 3 horas de iniciado el tratamiento salino, existe un incremento en la acumulación de los transcritos relativos a *SchRabGDII* en las raíces, alcanzando un incremento máximo (4 veces) a las 6 h, para luego disminuir gradualmente hasta alcanzar los niveles de acumulación de la planta control (no mostrado) pasado 72 h del inicio del estrés. Una situación similar se observa con el nivel de expresión de *SchRabGDII* en el tejido foliar, donde la diferencia se observa en que la máxima abundancia relativa de los transcritos (4 veces) se observa a las 12 h desde el inicio del tratamiento salino, disminuyendo hasta niveles basales después de las 24 h tratamiento y permaneciendo constantes hasta las 72 h (fig. 7B). El patrón de expresión de *SchRabGDII* bajo estrés salino fue similar al perfil exhibido por los genes *AREB1* (fig. 7C y D) y *TSW12* (fig. 7E y F) durante el estrés salino, sugiriendo que estos podrían responder a una ruta de señalización similar y que por lo tanto *SchRabGDII* tendría una posible participación en mecanismos asociados con la respuesta al estrés salino.

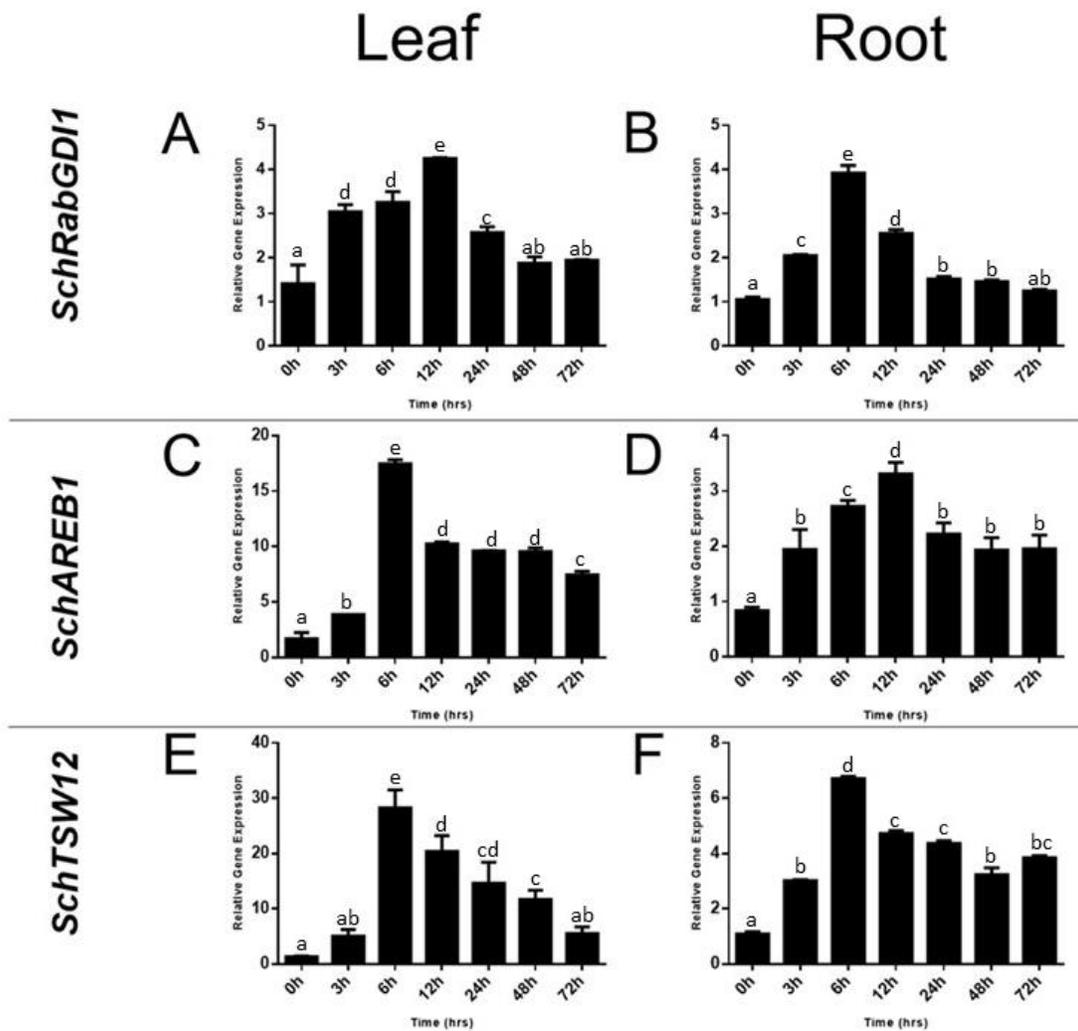


Figura 7. Análisis de la abundancia relativa de transcritos de *SchRabGDI1* en plantas de *Solanum chilense* sometidas a estrés salino. *SchRabGDI1* (A, B), *SchAREB1* (C, D), *SchTSW12* (E, F). Fueron evaluadas mediante PCR cuantitativa en tiempo Real (qPCR) a partir de ARN total extraído desde hojas y raíces de plantas de 12 semanas de edad sometidas a estrés salino (300mM NaCl) durante los siguientes intervalos de tiempo de 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h. Los valores de las barras representan el promedio de la expresión relativa de cada gen  $\pm$  SE de 3 réplicas biológicas. La normalización de los valores de expresión relativa se hizo en función de los valores obtenidos para SchUBI3 y del método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito en (Livak and Schmittgen, 2001). El nivel de acumulación transcritos obtenido para el tiempo 0 fue asignado como el valor uno para la normalización de cada gen.

### IV.3 *SchRabGDII* codifica una proteína del tipo RabGDI

La determinación de la identidad funcional de *SchRabGDII* se realizó mediante la complementación de una cepa de levadura mutante cuya principal característica es poseer un defecto a nivel del tráfico de membranas. La levadura *S. cerevisiae* contiene en su genoma una única copia del gen que codifica para el inhibidor de la disociación de GDP (GDI) cuya denominación alélica es *SEC19* (Garrett et al., 1994; Novick et al., 1980). Las mutaciones en *SEC19* (ej. el mutante *sec19-1*) causan un defecto de crecimiento termosensible, permitiendo el crecimiento de la levadura a temperatura permisiva (28°C), pero no se desarrolla normalmente cuando esta es sometida a la temperatura restrictiva de 37°C. Por ello el mutante *sec19-1* fue transformado con el constructo *Gall::SchRabGDII* cuya característica es la incorporación del promotor *Gall* quien confiere la capacidad de activar la transcripción del gen *SchRabGDII* cuando este se encuentra en un medio de crecimiento que contenga galactosa entre sus constituyentes y que por el contrario permanece inactivado en un medio que carezca de este monosacárido o que posea otro tipo de azúcar.

Los resultados de la transformación con este constructo demostraron que la expresión de *SchRabGDII* tiene la capacidad de corregir el fenotipo defectuoso del mutante cuando este crece en un medio de cultivo que contiene galactosa, aun cuando la levadura se desarrolla a temperatura restrictiva de 37°C (fig. 8). Sin embargo, es posible observar que al evaluar al mutante complementado con *Gall::SchRabGDII* en un medio que contiene glucosa y a la temperatura restrictiva (37°C), este presenta una capacidad mínima o basal para desarrollarse debido a la inactivación del gen sujeto de estudio en esta investigación, por parte del promotor inducible *Gall*. Por lo tanto, a partir de estos resultados, es posible señalar que la complementación de la mutante *sec19-1* con *SchRabGDII*, es capaz de restaurar el fenotipo normal observado en la cepa control de levadura *SEC19* de *S. cerevisiae*, en consecuencia es posible concluir que *SchRabGDII* codifica para una proteína tipo RabGDI.

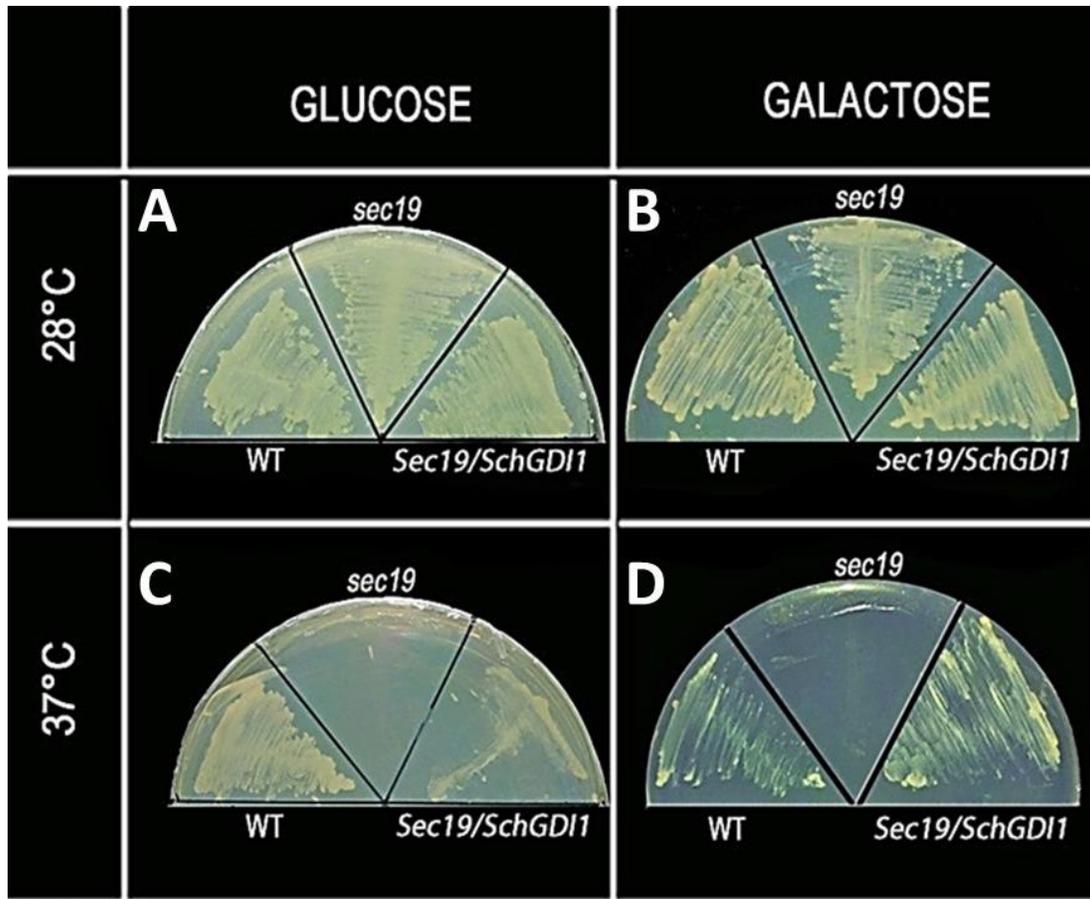


Figura 8. **Ensayo de complementación de la cepa mutante de levadura *sec19-1* con *SchRabGDI1*.** Se transformaron las cepas de levadura RSY249 (WT) y RSY274 (mutante, *sec19-1*) perteneciente a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. En el caso del WT, se transformó con el constructo génico *pYES-DEST52* (vector vacío) y para la transformación de RSY274, *sec19-1* (mutante) se utilizó el constructo que portaba *GALI::SchRabGDI1*. En A y B se observa desarrollo normal de la cepa silvestre (WT), la cepa mutante y mutante complementada, desarrollándose normalmente a 28°C en un medio con glucosa y galactosa (inductor) respectivamente. En C y D se observa el crecimiento normal de la cepa WT y sin desarrollo de la cepa mutante. En C, hay escaso desarrollo de la cepa mutante complementada en medio con glucosa y en D crecimiento normal de la cepa mutante complementada en medio con galactosa. C y D están bajo la condición de temperatura restrictiva de 37°C. Ambas cepas transformadas, fueron sembradas sobre medio Synthetic Complete, Glucosa+Uracilo (Gluc; SC-URA) o Galactosa+Uracilo (Gal; SC-URA) y se incubaron a temperatura de 28°C (permisivo) o 37°C (restrictivo) durante 3 días.

#### IV.4 RabGDI1 de *Solanum chilense* interactúa in vivo con la proteína SchRabG3e

Las proteínas RabGDI son efectivos reguladores que tienen la capacidad de interactuar en el interior de la célula con diversas proteínas del tipo RabGTPasas permitiéndoles ejercer una correcta función (fig. 1). Adicionalmente al gen *SchRabGDI1*, en nuestro grupo de investigación ha identificado otro gen llamado *SchRabG3e* cuya secuencia aminoacídica presenta un alto grado de homología con la proteína codificada por *AtRabG3e* de *Arabidopsis thaliana*.

Mediante predicciones realizadas *in-silico* se pudo establecer la interacción entre *SchRabGDI1* y *SchRabG3e* (fig. 9). El acoplamiento proteína-proteína entre las estructuras tridimensionales de *SchRabGDI1* y *SchRabG3e*, junto con el alineamiento estructural de la estructura cristalizada del complejo RabGTPasa-RabGDI (PDB código 1UKV), permitió evidenciar la región de interacción entre ambas proteínas (fig. 9). De hecho, los análisis de las dinámicas moleculares mostraron los residuos de aminoácidos esenciales que participan en la superficie de interacción. A continuación se detallan los aminoácidos que participan en las 5 superficies encontrados. En A se presenta un primera superficie donde SchRabG3e expone los aminoácidos valina (75), serina 72 y glutamina. Estos interactuarían con **tirosina (38)** leucina (251) y asparagina (252) de SchRabGDI1. En B se predice una segunda superficie de interacción donde participan los residuos alanina (65), treonina (64) y alanina (76) de SchRabG3e con los residuos de SchRabGDI1 valina (244), arginina (240) y arginina (236). En C se observa una tercera superficie de interacción entre los residuos glutamina (67), alanina (43) y glicina (42) de SchRabG3e con los aminoácidos **arginina (240)** y valina (244) de SchRabGDI1. En D se observa una cuarta superficie que muestra la interacción de la cadena lateral de arginina (79) de SchRabG3e con **tirosina (229)** y **Ac. Glutámico (233)** de SchRabGDI1. La quinta superficie está conformada por las cadenas laterales de los aminoácidos Ac. Aspártico (44) y fenilalanina (45) de SchRabG3e con **tirosina (98)** y **lisina (97)** de SchRabGDI1 (fig. 9, (A-D)). De las superficies de interacción antes descritas, SchRabGDI1 presenta los aminoácidos **tirosina 38** (cuadro A), **arginina 240** (cuadro C) y el aminoácido **glutamina 233** (cuadro D), los cuales han sido identificados como claves en la

interacción con las diversas RabGTPasas que se encuentran en el intracelular (Wu et al., 1996a; Yaneva and Niehaus, 2005)

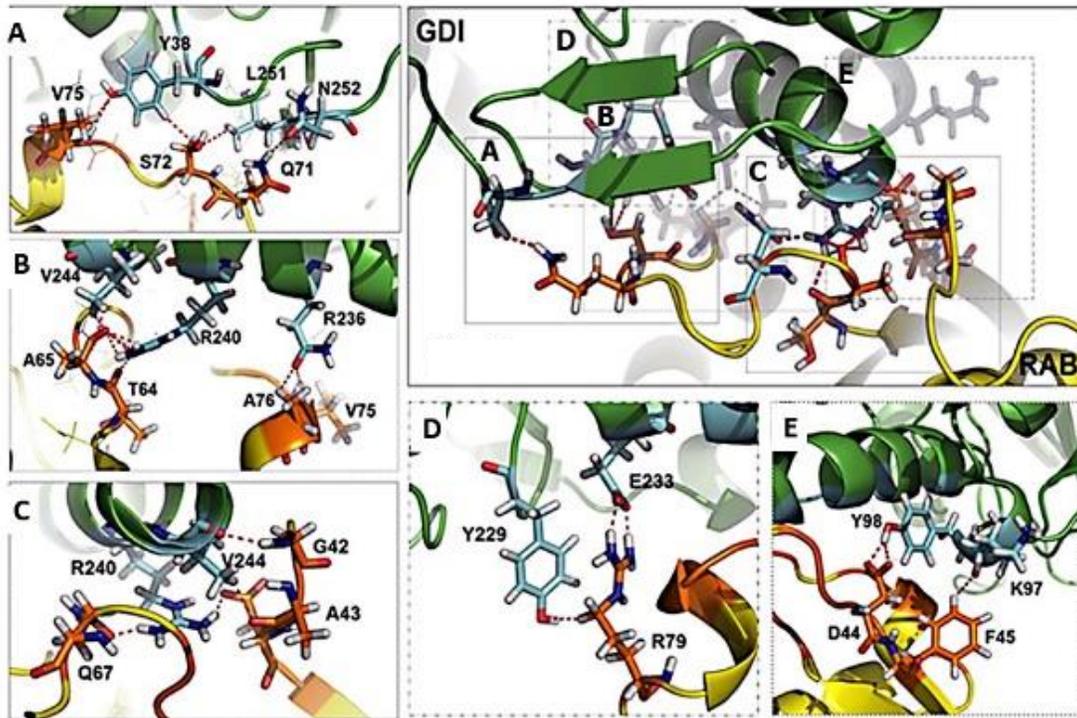


Figura 9. **Representación *in silico* de la superficie de interacción entre SchRabGDI1 y SchRabG3e.** Esquematización de los aminoácidos y enlaces implicados en la plataforma de unión entre SchRabG3e y SchRabGDI1 obtenidos a través de una simulación mediante dinámica molecular. A la derecha, una vista general de la superficie de interacción. Esta figura se encuentra separada en 5 planos para la identificación detallada de la interacción entre los aminoácidos involucrados (planos desde A - D). En verde, la proteína SchRabGDI1 y en amarillo la proteína SchRabG3e. En azul claro, los aminoácidos de SchRabGDI1 y en naranja los que pertenecen a SchRabG3e. En azul: nitrógeno; Blanco: hidrógeno; y rojo: oxígeno. Se muestran con líneas punteadas rojas, los enlaces fuertes menores a 2.8 Å.

Para confirmar que estas dos proteínas pueden interactuar *in-vivo*, se llevó a cabo la técnica de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) que se basa en la capacidad de la restauración de la fluorescencia. El desarrollo de esta metodología implica la utilización de una proteína fluorescente fraccionada en dos hemipéptidos, los cuales son fusionadas a un extremo de cada una de las proteínas que participaron en el complejo estudiado. Posteriormente la interacción estable de este complejo de proteínas, permite la restauración de la estructura de

la proteína fluorescente y con ello la visualización del complejo proteico y su ubicación subcelular aproximada (Hu et al., 2002). Para desarrollar el ensayo, fue necesaria la realización de una evaluación (*in silico*) del efecto que podría tener la adición de la proteína de fusión en la unión del complejo RabGTPasa-RabGDI. Por lo tanto, además se realizó una evaluación visual de las estructuras formadas por la mitad de la proteína fluorescente venus fusionada al extremo C-terminal de SchRabGDI1 y la mitad de la proteína fluorescente super Cyan (SCFP) unida al extremo N-terminal de SchRabG3e, junto con un análisis de dinámica molecular de cada sistema, mostrando virtualmente que no existe obstrucción de la región de interacción entre RabGTPasa-RabGDI (fig. 9).

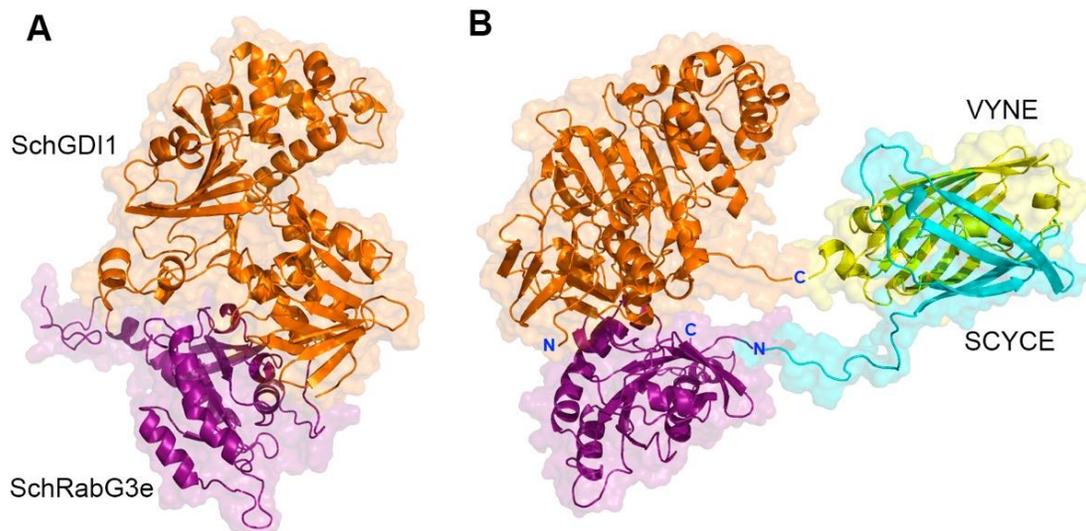


Figura 10. **Simulación del acoplamiento molecular dado entre SchRabGDI1, SchRabG3e y proteínas de fusión para la complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC).** (A) Se muestra el acoplamiento proteína-proteína entre SchRabGDI1-SchRabG3e. Mediante CLUSPRO se calculó la energía para este acoplamiento el cual fue de -693 Kcal/mol. (B) Se observa un esquema del complejo formado por las proteínas RabGTPasa-RabGDI-YC155-YN155. Además, se ve que la proteína VYNE (amarillo) se encuentra fusionada al extremo C-terminal de SchRabGDI1 (naranja) y SCYCE (cian) está fusionado al extremo N-terminal de SchRabG3e (púrpura).

De manera subsecuente los constructos SchRabGDI1-VYNE (C-terminal de SchRabGDI1 fusionado la mitad N-terminal de Venus) y SCYCE-SchRabG3e (la mitad C-terminal de SCFP fusionada a N-terminal de SchRabG3e) fueron expresados transitoriamente en células epidermales de hojas de *N. bentamiana* de 6 semanas de edad mediante la técnica de agroinfiltración. Como control positivo de la transformación se utilizó un constructo que permitía la acumulación de la proteína intrínseca de membrana PIP1;4 fusionada a la proteína roja fluorescente (PIP1:4-RFP). La señal verde fluorescente muestra la interacción de las proteínas de fusión SchRabGDI1-VYNE y SCYCE-SchRabG3e confirmando la interacción *in-vivo* de ambas proteínas (fig. 11), esto es ratificado en las imágenes utilizadas como control de la técnica donde las flechas blancas (fig. 12 A y D) señalan las células correctamente transformadas y en donde se obtiene la señal BiFC. En ambas construcciones se pudo observar que tanto SchRabGDI1 y SchRabG3e mantuvieron su normal direccionamiento hacia sus sitios blanco. De hecho el patrón de localización subcelular observado para el complejo SchRabGDI1-SchRabG3e coincide con la localización reportada, entre el endosoma y la vacuola, lo cual es consistente con la función de SchRabGDI1 en el reclutamiento de RabGTPasas y el tráfico de membranas, apoyando la funcionalidad de esta proteína en el tráfico vesicular intracelular (fig. 11C).

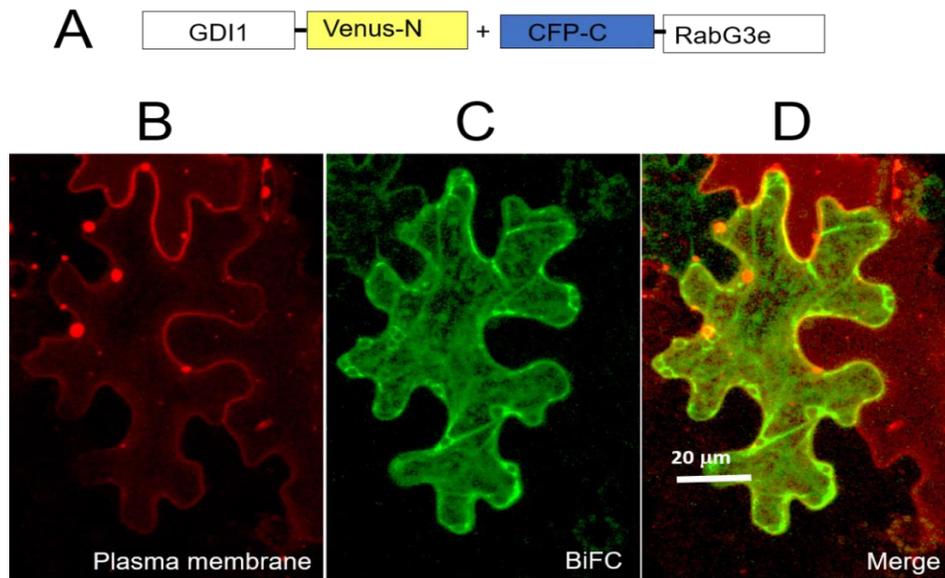


Figura 11. **Determinación de la Complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) entre SchRabGDI1 y SchRabG3e, en células epidérmicas de hojas de tabaco.** (A) representación esquemática de los constructos de fusión utilizados en la realización del BiFC. (B) Se capturaron imágenes representativas que muestran la señal fluorescente generada por la proteína de fusión entre RFP y la proteína intrínseca de membrana plasmática 1-4 (PIP1; 4), (C) señal de la interacción BiFC generada por SchRabGDI1 y SchRabG3e e imágenes fusionadas (D). La interacción proteína-proteína observada en C se logró utilizando las construcciones pDEST-SchRabGDI1:VYNE y pDEST-SCYCE:SchRabG3e.

Con el fin de verificar la que la interacción entre SchRabGDI1 y SchRabG3e fue específica, se utilizó como control negativo de interacción con SchRabG3e una construcción que portaba el gen que codifica para la proteína AtNXH5 cuyo destino celular ha sido reportado en los compartimentos endosomales (Bassil et al., 2011). Tal como se muestra en la figura 12B no se pudo observar la señal de BiFC entre AtNXH5 y SchRabG3e, mientras que en el control de expresión de membrana RFP si existe señal fluorescente. De manera similar la figura 12C evidencia que no existe señal de interacción BiFC entre SchRabGDI1 y AtRem1.2 (codifica una remorina, asociada a microdominios de MP y vacuola). La señal de interacción BiFC presente en la figura 12D mostró que NXH5-VYNE y SCYCE-Rem1.2 se expresan y son traducidos correctamente por la maquinaria celular, pero además mostró, que este complejo proteico es capaz de interactuar en condiciones *in-vivo*. Por lo tanto, estos resultados indican que la interacción BiFC entre las proteínas SchRabGDI1 y SchRabG3e fue específica.

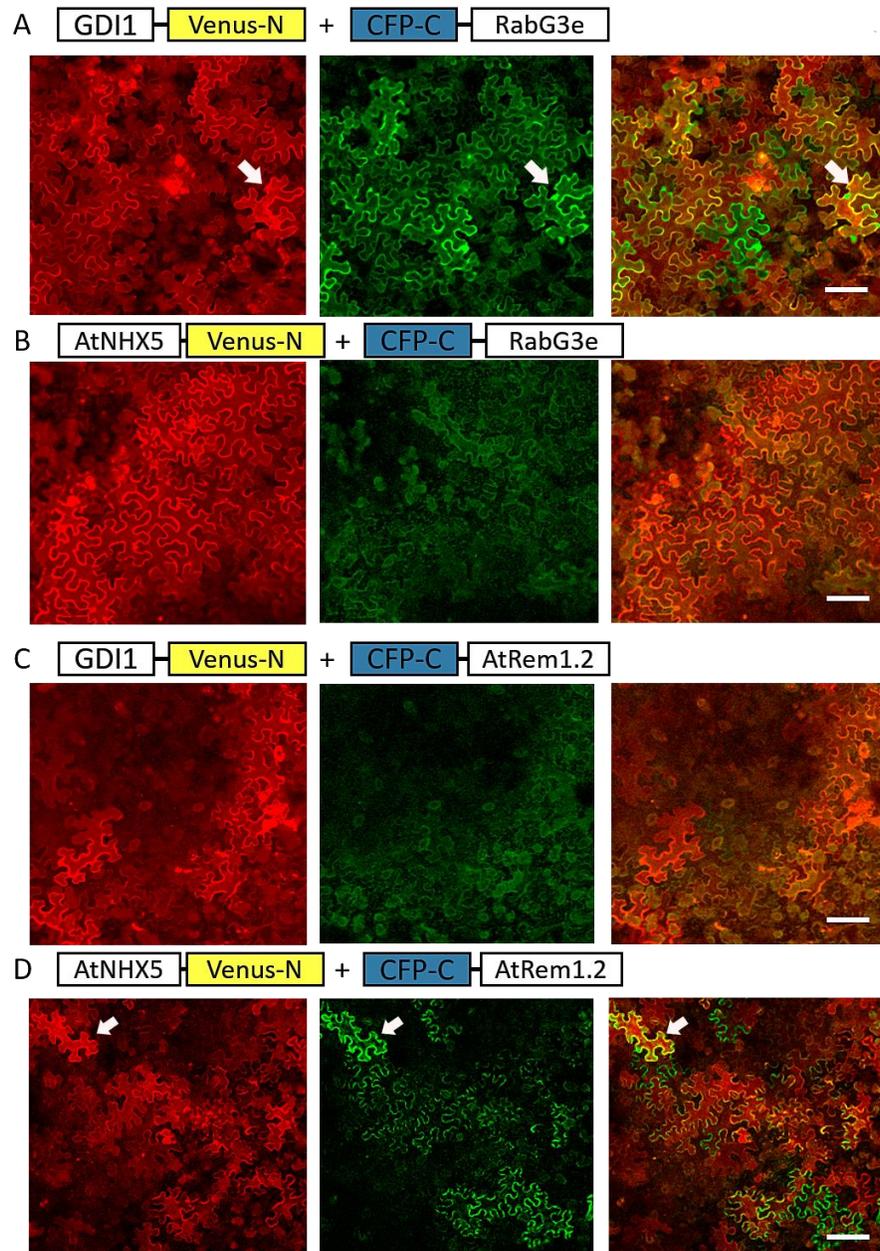


Figura 12: **Controles para la determinación de la Complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) entre SchRabGDI1 y SchRabG3e en células epidérmicas de hojas de tabaco.** En A se observa la señal de la interacción BiFC generada entre SchRabGDI1 y SchRabG3e. En B y C se muestran las combinaciones de constructos que se consideran como controles de interacción negativo y en D se muestran los constructos utilizados como controles positivos de interacción bimolecular.

#### IV.5 La expresión heteróloga de *RabGDII* de *Solanum chilense* incrementa la tolerancia al estrés salino en *Arabidopsis*.

Dado que la expresión de *SchRabGDII* es inducida por el estrés salino en plantas de *S. chilense* (fig. 7 A-B), evaluamos si la expresión heteróloga de *SchRabGDII* podría contribuir a mejorar la tolerancia a la sal en plantas de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Para ello, el gen *SchRabGDII* fue clonado en el vector binario *PBI121* y dirigido por el promotor de expresión constitutiva *CaMV35S* (*35S::SchRabGDII*). Esta construcción se utilizó para transformar plantas de *A. thaliana* ecotipo *Col-0* generándose diversas líneas transgénicas, para finalmente proceder a la selección de 2 de ellas. Estas fueron utilizadas para todos los análisis posteriormente realizados. Es importante señalar que estas plantas fueron cultivadas y cosechadas hasta obtener la generación homocigótica T3 (fig. 13) y con ellas se evaluó su capacidad de crecimiento bajo una concentración salina de 75 mM de NaCl (fig. 14).

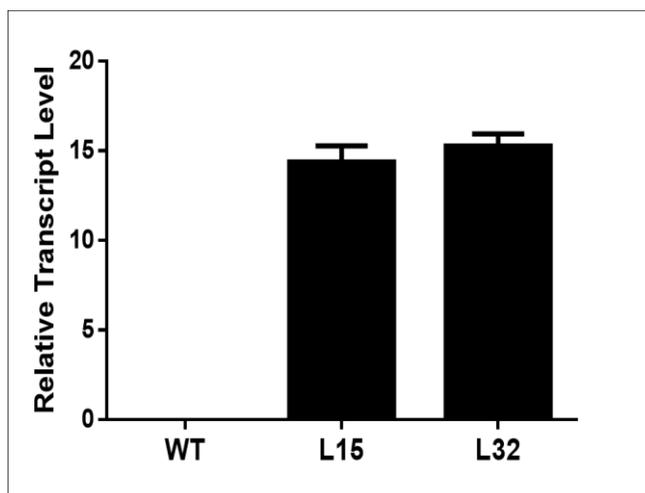


Figura 13. Evaluación de la presencia y la abundancia relativa de los transcritos de *SchRabGDII* en el genotipo control (WT), así como en dos líneas transgénicas independientes de *Arabidopsis thaliana*. Los niveles de transcritos se evaluaron mediante qPCR sobre ADNc obtenido desde tejido foliar en plantas de 4 semanas de edad y se normalizaron respecto del nivel de expresión relativa para el gen normalizador *AtFbox*. Los valores corresponden a la media  $\pm$  E.S. calculado a partir del análisis de tres réplicas biológicas por cada genotipo.

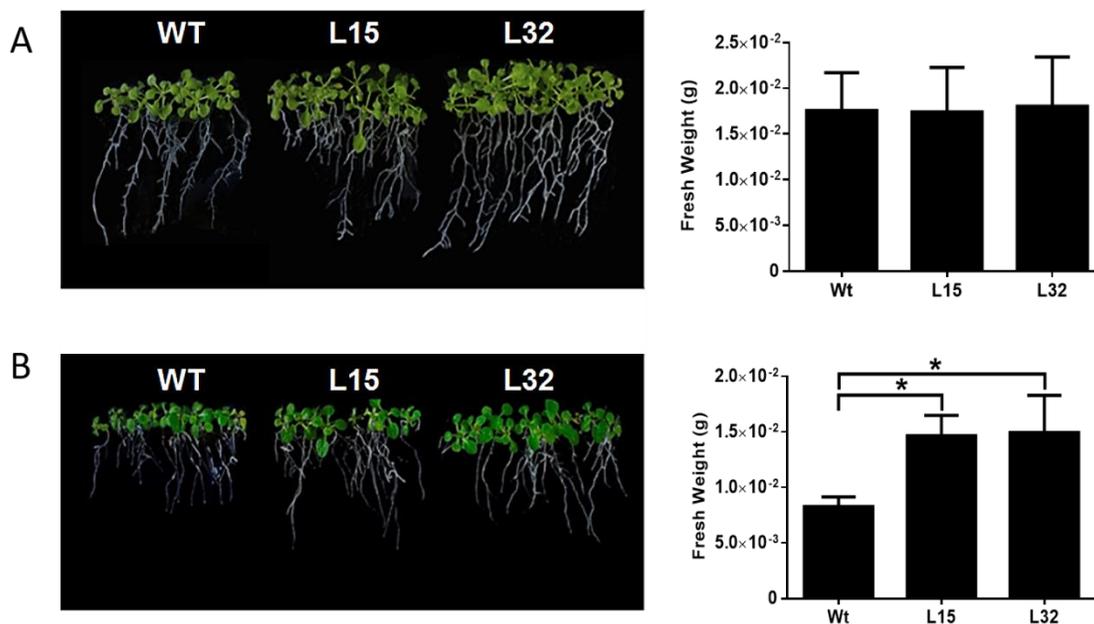


Figura 14. **Análisis de plantas heterólogas de *Arabidopsis* que expresan *SchRabGDI1* sometidas a estrés salino.** Fenotipos y determinación de peso fresco (PF) de líneas transgénicas que expresan *SchRabGDI1* en condiciones normales (medio MS) de crecimiento in-vitro (A) y bajo estrés salino (Ms+NaCl 75 mM) (B). Se realizaron tres experimentos independientes y para el análisis posterior se utilizaron quince plantas de cada genotipo. Los datos corresponden a los valores del promedio  $\pm$  E.S. (n=15) Los asteriscos sobre cada barra representan una diferencia significativa con respecto al genotipo control (P < 0.05).

En condiciones normales de crecimiento no se pudieron observar diferencias fenotípicas entre las plantas no transformadas y las transformadas, así como tampoco se observaron diferencias cuando se evaluó su producción de biomasa (fig. 14A). Sin embargo, cuando las plantas fueron sometidas a un estrés de 75 mM NaCl, el desarrollo de biomasa de las plantas transgénicas (L15 y L32), fue significativamente mayor (60-80%) en comparación con las plantas control durante el estrés (fig. 14B).

Actualmente sabemos que bajo diversas situaciones estresantes las plantas incrementan la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En el caso del estrés salino, las especies de ROS que mayormente se acumulan son O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En la vía de síntesis de ROS, se conoce que el O<sub>2</sub><sup>-</sup> corresponde a la primera especie generada y que actúa oxidando a nivel de las diversas estructuras intracelulares, pero principalmente oxidación de aminoácidos y peroxidación lipídica, induciendo fragilidad de las membranas celulares. Incluso es conocido

que la acumulación intracelular de  $O_2^-$ , a través de la reacción de Mehler, conlleva a la generación de una de las especies reactivas más peligrosas el  $OH^\cdot$  (Miller et al., 2010; Pang and Wang, 2008). Además, se encuentra documentado que bajo situaciones de estrés salino existe una importante síntesis de  $O_2^-$  por acción de la NADPH oxidasa de la membrana plasmática lo cual contribuye activamente en la acumulación de esta molécula (Hernandez et al., 2001). Por ello se realizó una determinación histoquímica con el compuesto Nitroblue tetrazolium (NBT), lo cual permitió observar, de forma semicuantitativa, que las líneas transgénicas L15 y L32 acumulaban menores niveles del radical superóxido ( $O_2^-$ ) en comparación con las plantas no transformadas (Wt) luego del período en que fueron sometidas al estrés salino (fig.14).

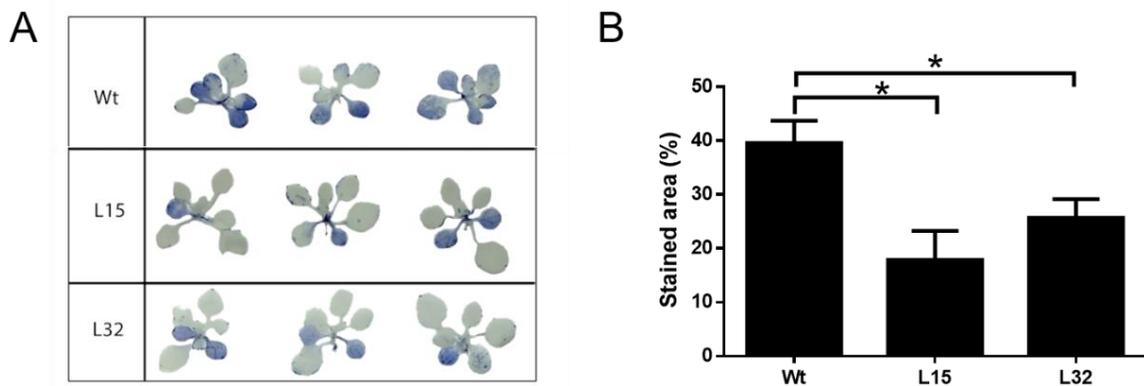


Figura 15 **Detecciones del anión superóxido ( $O_2^-$ ) en plantas control y transgénicas que expresan constitutivamente *SchRabGDI1* en condiciones de estrés salino.** (A) Se evaluó la acumulación de ROS en plántulas de tipo silvestre y dos líneas heterólogas (4 semanas de edad) expuestas a condiciones de crecimiento normal (MS) y un tratamiento con solución salina (MS + NaCl 75 mM), durante 15 días. Se muestran tres imágenes representativas de cada línea. (B) Se evaluaron 15 plántulas para cada línea. Los experimentos se realizaron en triplicado y de forma independiente. Los valores de las barras representan el promedio del área teñida por el compuesto azulado (formazán) en cada línea (n=15)  $\pm$  D.E. El asterisco sobre las barras indica diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05).

El análisis de estos resultados permite inferir que el incremento en la tolerancia a la salinidad exhibida por las plantas transgénicas se correlaciona con el incremento en la abundancia relativa de transcritos de *SchRabGDI1* (figs. 12 y 14), sugiriendo que una mayor acumulación de SchRabGDI1 tendría un papel activo en la tolerancia al estrés salino en *Arabidopsis*.

Paralelamente, el contenido total de  $\text{Na}^+$  fue determinado a nivel de tejido foliar y radicular en plántulas transgénicas, así como en plantas control cultivadas en condiciones *in-vitro*, cuando estas se encuentran con o sin el estrés por NaCl. Observándose de manera interesante que el contenido de  $\text{Na}^+$  en hojas y raíces de plantas transgénicas y control (Wt) fue similar cuando estas se desarrollaron en condiciones no estresantes, sin verse afectados los niveles basales de este ion producto de la sobreexpresión del gen estudiado en esta investigación. De manera contrastante, al revisar los resultados obtenidos después del tratamiento con estrés, se observa que el contenido total de  $\text{Na}^+$  presente en el tejido foliar de las plántulas transgénicas fue significativamente menor en comparación a lo observado en los individuos control. Un fenómeno inverso fue posible verificar al determinar el contenido de  $\text{Na}^+$  en la raíz de las plántulas transgénicas donde la cantidad medida de este ion es significativamente mayor en comparación con la planta control (fig. 16A y B). Por lo tanto, este resultado sugiere que el  $\text{Na}^+$  es retenido en las raíces de las plantas transgénicas impidiendo su traslocación los órganos aéreos de las plantas.

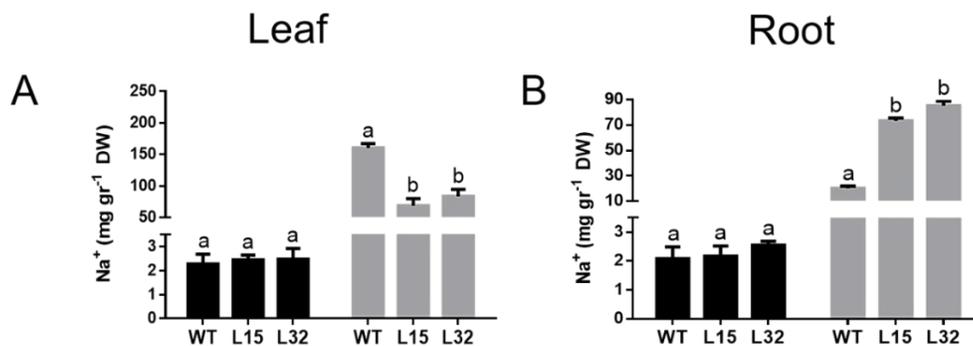


Figura 16. **Contenido total de sodio (Na<sup>+</sup>) en hojas y raíces de *A. thaliana*.** Plántulas control (Col-0) y transgénicas para *SchRabGDII* de 15 días de edad, fueron sometidas a una condición que implicaba ausencia o presencia de NaCl (75 mM NaCl). El contenido total de sodio en hoja y raíz se muestra en A y B respectivamente. El color de las barras negro y gris representa el contenido de sodio en condiciones control y estrés respectivamente. Los valores representan la media  $\pm$  E.S. Los análisis estadísticos de raíz y hoja se hicieron mediante comparaciones de los distintos genotipos en cada condición estudiada. Las letras sobre las barras indican si existen diferencias estadísticamente significativas en cada tratamiento ( $P < 0.05$ ).

#### IV.6 La expresión heteróloga de *SchRabGDII* induce un incremento en la internalización de FM4-64 en plantas transgénicas de *Arabidopsis*.

Para analizar la participación de SchRabGDI1 en la vía endocítica, se utilizaron plantas transgénicas de *Arabidopsis*, cuya característica es la expresión constitutiva de *SchRabGDII* en asociación con el trazador lipofílico de membrana FM4-64 (Bolte et al., 2000) que tiene la capacidad unirse a la membrana plasmática y luego ser internalizado exclusivamente a través de la vía endocítica. Esto es posible de observar en la figura 17 donde se muestra la internalización de FM4-64 a 5 y 30 minutos en las células de la raíz de las plantas control y las líneas transgénicas para *SchRabGDII*. Los resultados obtenidos muestran una endocitosis acelerada en las líneas transgénicas para *SchRabGDII* desde los 5 minutos posteriores del tratamiento con FM4-64, en comparación con las plantas control (fig. 17A), este resultado se mantiene al evaluar tiempos más tardíos (30 minutos) (fig. 17B).

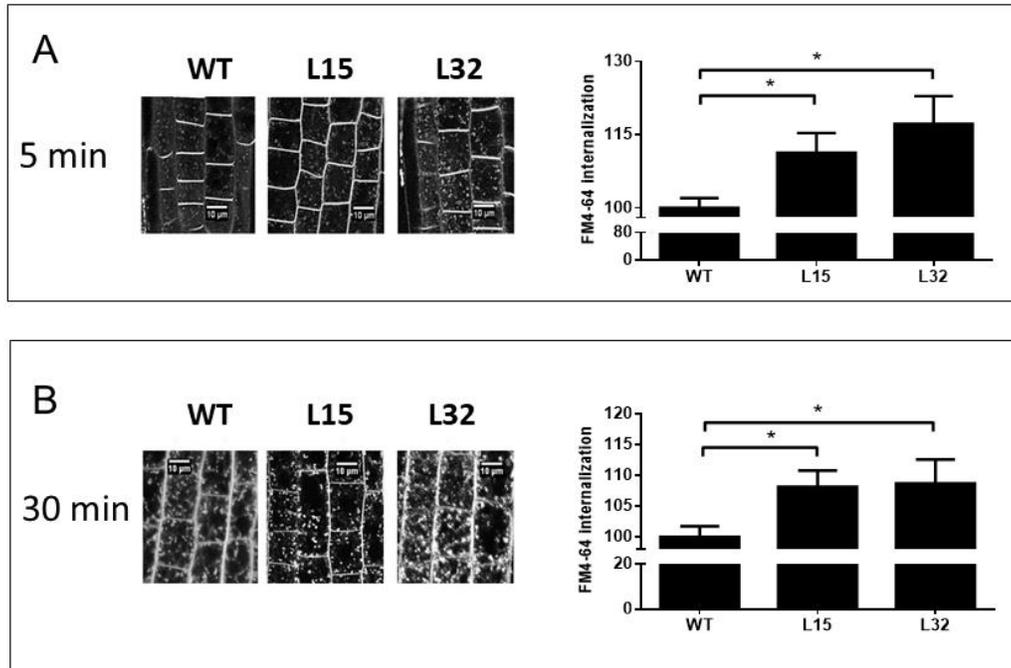


Figura 17. **Internalización de FM4-64 en células de la raíz de plantas control y transgénicas que expresan constitutivamente *SchRabGDI1*.** La internalización de la membrana se visualizó utilizando el trazador lipofílico FM4-64 en células de raíz de plántulas de 7 días de edad. Las imágenes se capturaron a los 5 min (A) y 30 min (B) después de la tinción. Barra de escala = 10  $\mu$ m. La cuantificación de fluorescencia se realizó utilizando el software FIJI-Image J (Schindelin et al., 2015). La tasa de internalización de FM4-64 se calculó a partir de la relación entre la media de la fluorescencia intracelular y la media de la fluorescencia de células completas (incluida la membrana plasmática) de 20-50 células por planta. Los experimentos se realizaron en triplicado y de forma independiente. Los valores de las barras representan el promedio de la internalización de FM4-64 de cada línea  $\pm$  la desviación estándar de 4 réplicas biológicas.

Mediante la cuantificación de la fluorescencia se pudo comprobar que existen diferencias significativas en la tasa de endocitosis que exhiben las líneas transgénicas en comparación a las plantas control (fig. 17). Es posible comprobar este incremento en las dinámicas de endocitosis a través de la internalización del trazador de membrana, lo que se traduce como una gran acumulación de pequeños puntos de color blanco (Endosomas de FM4-64) tanto a los 5 y 30 minutos posterior a la aplicación de la tinción. La cuantificación de la señal fluorescente de FM4-64 mostró diferencias significativas entre las líneas sobreexpresoras de *SchRabGDI1* y las plantas control de hasta un 15% (fig16B), sugiriendo que un incremento en la acumulación citosólica de *SchRabGDI1* tendría un efecto positivo sobre el uso del pool de RabGTPasas

circulantes, evidenciando un incremento la tasa de internalización de la membrana plasmática. Esto indicaría una conservación de la funcionalidad de *SchRabGDII* en la planta modelo *A. thaliana* en relación con el papel descrito de las proteínas del tipo RabGDI en el tráfico vesicular intracelular, bajo condiciones no estresantes.

#### **IV.7 La expresión heteróloga de *SchRabGDII* induce un incremento en la compartimentación de sodio en raíces de plantas transgénicas de *Arabidopsis***

En relación con el análisis de la localización intracelular del Na<sup>+</sup> en células de la raíz de las plantas control y líneas transgénicas para *SchRabGDII*, se logró realizar mediante una estrategia que utiliza en forma combinada las sondas fluorescentes Sodium Green y del marcador de endocitosis FM4-64. Debido a que en este tipo de experimentos de microscopia confocal la extensión de los tratamientos es más breve (12 h) la concentración de NaCl de 75mM no es suficiente para observar la acumulación de Na<sup>+</sup> en los compartimentos celulares, por ello las plantas fueron sometidas a una concentración levemente superior de 100mM de NaCl durante un periodo de tiempo de 12 horas. A partir de los resultados obtenidos en este ensayo se pudo observar que, en las células de la zona de transición de la raíz, la distribución de los iones de Na<sup>+</sup> se encuentra principalmente en el lumen de la vacuola principal, pero además se advierte la presencia de una gran cantidad de pequeñas estructuras vesiculares, algunas de las cuales se pueden observar altamente cargadas de sodio (fig. 18A). La cuantificación de la intensidad de la fluorescencia para Sodium Green demostró una mayor capacidad en la acumulación de Na<sup>+</sup> en las líneas transgénicas en comparación a las plantas control (fig. 18B). Por lo tanto, estos resultados apuntarían a que un incremento en la tolerancia al estrés salino de estas plantas se encuentra altamente correlacionado con la expresión heteróloga de *SchRabGDII*. Lo que puede ser explicado como una consecuencia del incremento en la tasa endocítica, permitiendo una mayor compartimentación y acumulación del sodio en estructuras endosomales o en la vacuola de las células de la raíz en las plantas transgénicas disminuyendo los efectos adversos cuando existe un exceso de este ion.

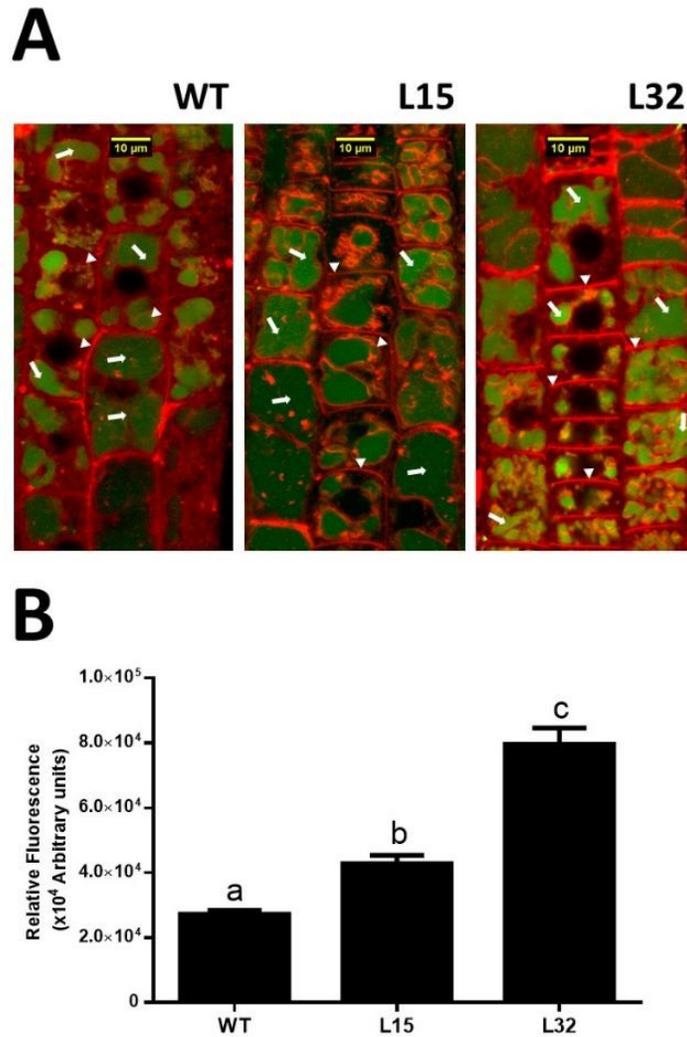


Figura 18. **Localización subcelular y comparación de los contenidos de sodio entre líneas transgénicas (*SchRabGDI1*) y plantas control (WT) en raíces de *Arabidopsis* mediante la sonda fluorescente Sodium Green.** (A) Los planos confocales muestran células de la zona de transición de la raíz después de un tratamiento de 12 horas con NaCl 100 mM, tratadas con el trazador de membrana FM4-64 (4μM), y luego teñidas con colorante Sodium Green (5 μM) durante 30 min. Las flechas blancas señalan las vacuolas y la coloración verde en su interior representa el sodio marcado por la sonda Sodium Green. Las cabezas de flecha muestran la membrana plasmática teñida con FM4-64. (B) El gráfico señala la cuantificación de la fluorescencia relativa a partir de las líneas transgénicas y las plantas control. La fluorescencia intracelular para la determinación de sodio se realizó a partir de 20-50 células por planta (sin incluir la membrana plasmática). Los experimentos se realizaron en triplicado y de forma independiente. Las letras sobre las barras indican si existen diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos estudiados ( $P < 0.05$ ).

## **V. DISCUSSION**

## V.I *RabGDI* de *Solanum chilense* codifica para una proteína funcional del tipo inhibidor de la disociación de GDP y es inducida por el estrés salino

*SchRabGDI* fue identificado, a partir de raíces de *Solanum chilense*, entre diversos transcritos inducibles por estrés salino. A partir del trabajo realizado en esta investigación fue posible evidenciar que la expresión de *SchRabGDI* en hojas y raíces es inducida tempranamente por la salinidad (6h post tratamiento), de manera similar a dos genes ya reportados que incrementan su acumulación de transcritos durante situaciones de estrés salino, como lo son *TSW12* (Orellana et al., 2010; Torres-Schumann et al., 1992) y *AREB1* (Orellana et al., 2010; Hsieh et al., 2010) (fig. 5). Los patrones de expresión órgano-específico de *SchRabGDI* fueron similares a los observados en *SlRabGDI2* (Solyc12g017570.1) de tomate ([http://bar.utoronto.ca/efp\\_tomato/cgi-bin/efpWeb.cgi](http://bar.utoronto.ca/efp_tomato/cgi-bin/efpWeb.cgi)) y *AtRabGDI* (AT2G44100) en *Arabidopsis* (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). No obstante, difieren del perfil de expresión de *RabGDI* de *Mangifera indica* L, el cual es reprimido en hojas cuando la planta se encuentra bajo el estrés salino (Liu et al., 2015). Sin embargo, los tiempos de inducción de *SchRabGDI* en respuesta a dicho estímulo es coincidente con los ya descritos para algunos de los genes pertenecientes a la familia de las RabGTPasas tales como *McRab5-b* de *Mesembryanthemum crystallinum* (Bolte et al., 2000), *AtRabG3e* (AT1G49300.1) y *AtRabA1* (At1g06400) de *Arabidopsis thaliana* (Mazel et al., 2004; Asaoka et al., 2012), y *SchRabG3e* de *S. chilense* (datos no publicados). Estos resultados sugieren que cuando la planta se encuentra bajo condiciones de estrés salino, es requerida una mayor acumulación de *SchRabGDI* durante los eventos del tráfico vesicular.

El análisis de la secuencia aminoacídica deducida, realizado mediante comparaciones de secuencias, reveló que *SchRabGDI* posee un alto grado de homología con otras proteínas del tipo RabGDI presentes en plantas (80-99%) y una alta proximidad evolutiva con RabGDI de otras solanáceas tales como *S. tuberosum*, *S. lycopersicum* o *Nicotiana bentamiana* (fig. 3). Mediante el alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida de *SchRabGDI* con otras proteínas del tipo RabGDI, se pudo constatar que esta proteína presenta los cinco dominios estructurales y funcionales conocidos como “sequence conserved regions” (SCR) que se encuentran presentes en todas las proteínas del tipo RabGDI (fig. 4), cuya función descrita es la correcta interacción con las proteínas RabGTPasas, así como con efectores de membrana.

Permitiendo la extracción y solubilización de estas proteínas en el citosol de la célula. Adicionalmente fue posible comprobar (en relación a la función celular) que *SchRabGDI1* tiene la capacidad de recuperar la sobrevivencia la mutante de levadura *sec19-1 RSY273*, corrigiendo por completo el fenotipo letal (sensible a temperatura) que presenta esta cepa cuando es cultivada a 37°C (fig. 8D) (Garrett et al., 1994). Esto demuestra que RabGDI1 de *Solanum chilense* expresada en forma heteróloga en el sistema de levadura puede actuar como un sustituto del único gen mutado (*Gdi1p*) que se encuentra presente en estas células, permitiendo que se desarrollen las fases del tráfico vesicular al interior de la levadura.

Durante cualquier evento de tráfico vesicular intracelular, la interacción de los complejos proteicos que permiten la formación, destinación y el posterior anclaje de la vesícula son factores determinantes. En este sentido la interacción proteína-proteína formada entre RabGTPasa y RabGDI es también un evento crítico para la correcta mantención del movimiento vesicular intracelular, puesto que RabGDI actúa extrayendo desde la membrana blanco la forma inactiva de la RabGTPasa (Rab-GDP) formando un complejo heterodimérico cuya función principal es mantener un reservorio citosólico de las proteínas RabGTPasas, permitiéndole ser reutilizadas en una serie de nuevos eventos de formación y fusión de vesículas de transporte (Pfeffer, 2017; Saito and Ueda, 2009).

A través del uso de herramientas bioinformáticas se logró determinar *in silico* que SchRabGDI1 contiene los residuos de aminoácidos esenciales que participarían en la superficie de interacción entre SchRabGDI1 y SchRabG3e. Nuestros resultados son consistentes con la evidencia bibliográfica reportada, que señala a los dominios SCR1A, SCR1B y SCR3B (fig. 3) como claves en la interacción con las RabGTPasas (Wu et al., 1996a; Rak et al., 2003). Además la simulación del acoplamiento molecular muestra que las cadenas laterales de los aminoácidos implicados en la formación del complejo RAB-GDI tienen una alta afinidad de interacción lo cual se ve reflejado en la variación de energía libre calculada  $\Delta G = -693 \text{Kcal/mol}$  (fig. 9A), indicando que desde el punto de vista termodinámico la interacción de ambas proteínas tiende a la espontaneidad. De las superficies de interacción descritas (fig. 9 A,C;D), se puede observar claramente que SchRabGDI1 presenta la triada de aminoácidos característicos, **tirosina 38** (cuadro A), **arginina 240** (cuadro C) y el aminoácido **glutamina**

**233** (cuadro D), los cuales han sido identificados como claves en la interacción con las diversas RabGTPasas que se encuentran en el intracelular (Wu et al., 1996a; Yaneva and Niehaus, 2005)

Es muy importante señalar que aun cuando las predicciones hechas *in silico* son altamente favorables, lo que determina la veracidad de estos estudios son los ensayos posteriores realizados en un sistema *in vivo*. En esa línea los resultados obtenidos mediante ensayos de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) ratifican las predicciones hechas *in silico*, logrando documentar en forma experimental la interacción *in vivo* que se da entre SchRabGDI1 y SchRabG3e cuando ambas proteínas fueron transcritas en forma transitoria en células epidermales de hojas de tabaco (fig. 11). Este resultado, en conjunto con el estudio de complementación en levadura (fig. 8), demuestran que SchRabGDI1 fue capaz de formar un heterodímero con SchRabG3e, sugiriendo un modelo de su participación funcional en el ciclo de las RabGTPasas y de manera concomitante en el tráfico vesicular intracelular.

## **V.2 La expresión ectópica *SchRabGDI1* confiere tolerancia al estrés salino en *Arabidopsis*.**

En años recientes las evidencias indican que el tráfico vesicular intracelular juega un papel importante en los mecanismos adaptativos de los organismos vegetales frente al estrés salino (Hamaji et al., 2009; Baral et al., 2015b). La expresión ectópica y el silenciamiento ha sido utilizado para algunos de los miembros de las familias de las RabGTPasas y SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor), dos de los principales reguladores del tráfico vesicular, cuya función ha sido demostrada en la tolerancia de las plantas frente al estrés salino (Mazel et al., 2004; Asaoka et al., 2012; Son et al., 2013; Singh et al., 2016).

Bajo condiciones normales de crecimiento fue posible determinar que tanto las plantas transgénicas como las plantas de tipo silvestre no exhibieron diferencias a nivel fenotípico (fig. 14A), probablemente debido a que la proteína codificada por el transgén requiere de la expresión y participación de otros genes que en su conjunto conforman el interruptor molecular de las RabGTPasas, las cuales no modifican su perfil de expresión bajo estas condiciones. Para

demostrar su participación en la respuesta al estrés salino, se analizó el efecto de la expresión ectópica de *SchRabGDII* en plantas de *Arabidopsis*. A partir de estos experimentos fue posible comprobar que las líneas transgénicas evidencian una tolerancia aumentada al estrés salino (75mM NaCl), lo cual se ve reflejado en una mayor producción de biomasa y una reducida acumulación de especies reactivas de oxígeno (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), cuando se realiza una comparación con las plantas control (figs. 14 y 15). El incremento en la tolerancia a la salinidad de las plantas de *Arabidopsis* que portaban *SchRabGDII* es comparable con otros resultados descritos en *Arabidopsis*, tabaco y arroz cuando estas sobreexpresaban *Rab7* (*RabG3e*) bajo condiciones de estrés salino (Mazel et al., 2004; Agarwal et al., 2008; Peng et al., 2014). Además de acumular Na<sup>+</sup> en sus vacuolas y de expulsar el Na<sup>+</sup> al apoplasto, las plantas también restringen el movimiento de este ion desde las raíces hasta las hojas (Blumwald, 2000). Este incremento en la tolerancia a la salinidad mostrada por las plantas transgénicas que sobreexpresan *SchRabGDII* se correlaciona con un aumento de la acumulación de Na<sup>+</sup> en las vacuolas de la raíz y el contenido diferencial de Na<sup>+</sup> entre las raíces y las hojas (figs. 16A y B).

### **V.3 SchRabGDI1 participa en la regulación la vía endocítica y la distribución del sodio intracelular**

Las investigaciones realizadas por Leshem y colaboradores (2006), han reportado que el estrés salino induce una endocitosis masiva en raíces de plantas de *Arabidopsis*. Este incremento en la endocitosis, asociado al estrés salino ha sido ratificado en otros estudios posteriores (Baral et al., 2015b; Li et al., 2011b; Luu et al., 2012). Además, se ha documentado que la endocitosis masiva, producto del estrés salino, induce rápidos cambios a nivel de la morfología vacuolar de las células de la raíz y junto a ello una mayor acumulación de sodio en las vacuolas presentes en las células de la raíz (Mimura et al., 2003).

En este sentido, uno de los principales logros obtenidos en la investigación planteada en esta tesis fue el incremento significativo en la endocitosis, mediante la expresión heteróloga de *SchRabGDII* en la raíz de *Arabidopsis*, lo cual fue determinado a través de la tasa de internalización del marcador FM4-64 (fig. 17). Más aún, cuando se expusieron las plantas transgénicas a una concentración 75mM (fig. 16) y 100mM (fig.18) de NaCl, estas lograron

acumular concentraciones de sodio significativamente mayores que las plantas silvestres. Por ello, estos resultados sugieren la participación de *SchRabGDI1* en la regulación de la endocitosis y además postulan su contribución en la compartimentación del sodio en estructuras endosomales y vacuolares durante el estrés salino. Sin duda este mecanismo puede actuar complementando otros sistemas presentes en la célula, tales como, la acción de las bombas antiportadoras  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Blumwald, 2000; Reguera et al., 2014) o la excreción de iones de  $\text{Na}^+$  a través de la vía SOS (Shi et al., 2000; Qiu et al., 2002). Lo que en su conjunto conllevaría a un incremento en la tolerancia al estrés salino.

#### **V.4 La acumulación de transcritos de *SchRabGDI1* durante el estrés salino se correlaciona con la endocitosis masiva y una mayor tolerancia al estrés salino en *Solanum chilense*.**

La respuesta fisiológica de las plantas al estrés salino es un proceso altamente complejo que requiere la acción coordinada de una gran cantidad de genes. En este sentido, existe evidencia que algunos genes implicados en las vías de tráfico vesicular son pieza clave durante eventos estresantes, como el estrés salino (Wang et al., 2020). Entre los ejemplos más relevantes están los integrantes de la familia de las pequeñas GTPasas y específicamente de la subfamilia de las RabGTPasas (Yao and Xue, 2011; Wang et al., 2020). Sin embargo, la información existente respecto de la participación de aquellos genes implicados en el control molecular de las RabGTPasas y más aún en relación con su participación en la respuesta al estrés salino no es del todo claro. Por ello esta tesis presenta la caracterización de un nuevo candidato (*SchRabGDI1*), además de los genes ya identificados por su activa participación en el tráfico de vesículas.

La evidencia aquí reunida muestra que la expresión heteróloga de un gen del tipo *RabGDI*, aislado de la especie de tomate silvestre *Solanum Chilense* cuya característica molecular es responder aumentando la abundancia relativa de sus transcritos durante el estrés salino (fig. 7), incrementó la tolerancia a este estrés en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Esta tesis presenta antecedentes que confirman estudios previos, donde se ha observado que los

organismos vegetales responderían incremento de las dinámicas de tráfico vesicular entre la membrana plasmática y la vacuola durante situaciones de estrés salino (Mazel et al., 2004; Asaoka Rin et al., 2012; Hamaji et al., 2009).

Como ha sido descrito previamente, el tráfico vesicular puede tener diversos objetivos tales como: (1) internalización de proteínas de membrana, que actuarían incrementando la presencia de especies reactivas de oxígeno en el citosol (Hernandez et al., 2001). (2) recambio de estructuras celulares que se ven ampliamente afectadas durante el estrés salino (Mazel et al., 2004) y (3) la acumulación de sodio en estructuras endosomales o vacuolares limitando la acción citotóxica este ion en el intracelular (Hamaji et al., 2009). Es posible notar que estas tres estrategias precisarían de la participación de todos los integrantes moleculares implicados en la formación, el movimiento y la correcta destinación celular de las vesículas formadas. La evidencia aportada por esta investigación tendría relación principalmente con la tercera estrategia mencionada, dado que la expresión heteróloga de *SchRabGDII* en la especie *Arabidopsis thaliana* (sensible a la salinidad), permitió incrementar la tolerancia natural de estas plantas frente al estrés salino (fig. 14). Es importante destacar que esta tolerancia aumentada se correlaciona con el aumento observado en la endocitosis (fig. 17), la gran cantidad de estructuras vesiculares (endosomas) y vacuolares (fig. 18A), así como una mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  al interior de estos compartimentos en las células radiculares de estas plantas (fig 18B).

El análisis de los datos entregados previamente en conjunto con la inducción temprana de *SchRabGDII* (desde 3h) en tejido radicular cuando las plantas están bajo la condición de salinidad (fig. 7B) nos lleva a pensar que posiblemente en la especie *Solanum chilense*, la endocitosis masiva podría ser un mecanismo de tolerancia que permita aliviar los efectos del estrés salino durante en las etapas iniciales del estrés. La modulación transcripcional de *RabGDII* de *S. chilense* estaría implicada en la respuesta al estrés, a través de un control más activo y eficiente del reclutamiento y de la transición entre el ciclo activo e inactivo de las proteínas RabGTPasas con las que *SchRabGDII* interactúa en la vía endocítica. Es interesante pensar que el incremento en las dinámicas vesiculares durante el estrés salino podría tener alcances más allá de la compartimentación de grandes cantidades de  $\text{Na}^+$  en vacuolas o

endosomas. Sin embargo estos planteamientos solo se pueden presentar como un modelo, dado que aún es necesario profundizar con nuevas investigaciones que permitan validar esta explicación.

Como conclusión, podríamos sugerir que a partir de las observaciones realizadas en levadura, en tabaco y en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* se propone el uso de *RabGDII* de *Solanum chilense* como una herramienta biotecnológica para el mejoramiento vegetal de algunas especies de importancia agrícola como el tomate o la papa entre otros cultivos que se ven afectados en forma importante por esta creciente condición de los suelos.

## **VI. CONCLUSIONES**

**Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral permiten concluir:**

- I. SchRabGDI1 se relaciona evolutivamente con otras RabGDI de organismos vegetales y presenta los dominios clásicos de este grupo de proteínas. Muestra un nivel de acumulación de transcritos mayor en raíz y es inducido a tiempos tempranos durante el estrés salino en *Solanum chilense*.
- II. La complementación con el gen que codifica para SchRabGDI1 tiene el potencial para recuperar la sobrevivencia de la mutante de levadura *sec19-1* de *S. cerevisiae*, demostrando su identidad funcional.
- III. Mediante complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) es posible demostrar que SchRabGDI1 interactúa *in-vivo* con SchRabG3e en células de *Nicotiana benthamiana*.
- IV. La expresión heteróloga de *SchRabGDII* permite incrementar la tasa endocítica en raíces de plantas de *A. thaliana* bajo condiciones no estresantes.
- V. La expresión heteróloga de *SchRabGDII* en plantas de *A. thaliana* permite acumular en su raíz un gran número de pequeñas estructuras vesiculares, así como un mayor contenido de sodio en las vacuolas en comparación a las plantas de tipo silvestre bajo condiciones de estrés salino.
- VI. La expresión heteróloga de *SchRabGDII* en plantas de *Arabidopsis thaliana* incrementa la tolerancia al estrés salino en comparación a las plantas silvestres.

## **VII. LITERATURA CITADA**

## BIBLIOGRAFÍA.

- Agarwal P.K., Agarwal P., Jain P., Jha B., Reddy M.K., and Sopory S.K.** (2008). Constitutive overexpression of a stress-inducible small GTP-binding protein PgRab7 from *Pennisetum glaucum* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep.* **27**: 105–115.
- Ahumada I., Meza L., and Ruiz-lara S.** (2004). Identificación y análisis de la expresión del gen SchRabGDI1 en la planta nativa de tomate *Solanum chilense*. *Reun. Anu. la Soc. Biol. Chile* **37**.
- Andres D. a, Seabra M.C., Brown M.S., Armstrong S. a, Smeland T.E., Cremers F.P., and Goldstein J.L.** (1993). cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell* **73**: 1091–1099.
- Asaoka R., Uemura T., Ito J., Fujimoto M., Ito E., Ueda T., and Nakano A.** (2012). Arabidopsis RABA1 GTPases are involved in transport between the trans-Golgi network and the plasma membrane, and are required for salinity stress tolerance. *Plant J.*: 240–249.
- Asaoka Rin, Tomohiro U., Jun I., Fujimoto M., Ito E., Ueda T., and Nakano A.** (2012). Arabidopsis RABA1 GTPases are involved in transport between the trans-Golgi network and the plasma membrane, and are required for salinity stress tolerance. *Plant J.* **73**: 240–249.
- Assaad F.F.** (2001). Plant cytokinesis. Exploring the links. *Plant Physiol.* **126**: 509–516.
- Baral A., Irani N.G., Fujimoto M., Nakano A., Mayor S., and Mathew M.K.** (2015a). Salt-Induced Remodeling of Spatially Restricted Clathrin-Independent Endocytic Pathways in Arabidopsis Root. *Plant Cell* **27**: tpc.15.00154.
- Baral A., Shruthi K.S., and Mathew M.K.** (2015b). Vesicular trafficking and salinity responses in plants. *IUBMB Life* **67**: 677–686.
- Bassil E., Tajima H., Liang Y.-C., Ohto M.-A., Ushijima K., Nakano R., Esumi T., Coku A., Belmonte M., and Blumwald E.** (2011). The Arabidopsis Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K<sup>+</sup> homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction. *Plant Cell* **23**: 3482–97.
- Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G., Schmidt T., Kiefer F., Cassarino T.G., Bertoni M., Bordoli L., and Schwede T.** (2014). SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* **42**: 252–258.
- Blumwald E.** (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 431–434.
- Bolte S., Brown S., and Satiat-Jeunemaitre B.** (2004). The N-myristoylated Rab-GTPase m-Rabmc is involved in post-Golgi trafficking events to the lytic vacuole in plant cells. *J. Cell Sci.* **117**: 943–54.

- Bolte S., Schiene K., and Dietz K.** (2000). Characterization of a small GTP-binding protein of the rab 5 family in *Mesembryanthemum crystallinum* with increased level of expression during early salt stress. *Plant Mol. Biol.* **42**: 923–936.
- Bos J., Rehmann H., and Wittinghofer A.** (2007). GEFs and GAPs : Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell*: 865–877.
- Chen Z., Pottosin I.I., Cuin T. a, Fuglsang A.T., Tester M., Jha D., Zepeda-Jazo I., Zhou M., Palmgren M.G., Newman I. a, and Shabala S.** (2007). Root plasma membrane transporters controlling K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiol.* **145**: 1714–1725.
- Cherfils J. and Zeghouf M.** (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* **93**: 269–309.
- Chetelat R.T., Pertuzue R., Faundez L., Graham E., and Jones C.M.** (2009). Distribution, ecology and reproductive biology of wild tomatoes and related nightshades from the Atacama Desert region of northern Chile. *Euphytica* **167**: 77–93.
- Clough S.J. and Bent A.F.** (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743.
- Comeau P.G., Filipescu C.N., Kabzems R., and DeLong C.** (2004). Corrigendum to: Growth of white spruce underplanted beneath spaced and unspaced aspen stands in northeastern B.C.-10 year results (DOI:10.1016/j.foreco.2008.11.023). *For. Ecol. Manage.* **34**: 2277–2283.
- Cremers F.P., Armstrong S. a, Seabra M.C., Brown M.S., and Goldstein J.L.** (1994). REP-2, a Rab escort protein encoded by the choroideremia-like gene. *J. Biol. Chem.* **269**: 2111–7.
- Demidchik V. and Tester M.** (2002). Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* **128**: 379–387.
- Dettmer J., Hong-Hermesdorf A., Stierhof Y.-D., and Schumacher K.** (2006). Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase Activity Is Required for Endocytic and Secretory Trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 715–730.
- Dewald D.B., Torabinejad J., Jones C.A., Shope J.C., Cangelosi A.R., Thompson J.E., Prestwich G.D., and Hama H.** (2001). Rapid Accumulation of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate and Inositol 1,4,5-Trisphosphate Correlates with Calcium Mobilization in Salt-Stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**: 759–769.
- Dhonukshe P., Aniento F., Hwang I., Robinson D.G., Mravec J., Stierhof Y.D., and Friml J.** (2007). Clathrin-Mediated Constitutive Endocytosis of PIN Auxin Efflux Carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **17**: 520–527.
- Dirac-Svejstrup a B., Soldati T., Shapiro a D., and Pfeffer S.R.** (1994). Rab-GDI presents functional Rab9 to the intracellular transport machinery and contributes selectivity to Rab9 membrane recruitment. *J. Biol. Chem.* **269**: 15427–30.
- Drobak B.K. and Watkins P. a. C.** (2000). Inositol (1, 4, 5) trisphosphate production in plant cells: an early response to salinity and hyperosmotic stress. *FEBS Lett.* **481**: 240–244.

- Ebine K. et al.** (2011). A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat. Cell Biol.* **13**: 853–859.
- Ezaki B., Gardner R.C., Ezaki Y., and Matsumoto H.** (2000). Expression of aluminum-induced genes in transgenic arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol.* **122**: 657–665.
- Ezaki B., Katsuhara M., Kawamura M., and Matsumoto H.** (2001). Different mechanisms of four aluminum (Al)-resistant transgenes for Al toxicity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **127**: 918–27.
- Ezaki B., Koyanagi M., Gardner R.C., and Matsumoto H.** (1997a). Nucleotide Sequence of a cDNA for GDP Dissociation Inhibitor (GDI) Which Is Induced by Aluminum (Al) Ion Stress in Tobacco Cell Culture. *Plant Physiol.* **115**: 313–315.
- Ezaki B., Koyanagi M., Gardner R.C., and Matsumoto H.** (1997b). Nucleotide sequence of a cDNA for GDP dissociation inhibitor (GDI) which is induced by aluminum (Al) ion stress in tobacco cell culture (accession no. AF012823). *Plant Physiol.* **118**: 1533–1536.
- Ezaki B., Sasaki K., Matsumoto H., and Nakashima S.** (2005). Functions of two genes in aluminium (Al) stress resistance: repression of oxidative damage by the AtBCB gene and promotion of efflux of Al ions by the NtGDI1 gene. *J. Exp. Bot.* **56**: 2661–71.
- Fasshauer D., Sutton R.B., Brunger a T., and Jahn R.** (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 15781–15786.
- Galvan-Ampudia C.S., Julkowska M.M., Darwish E., Gandullo J., Korver R.A., Brunoud G., Haring M.A., Munnik T., Vernoux T., and Testerink C.** (2013). Halotropism is a response of plant roots to avoid a saline environment. *Curr. Biol.* **23**: 2044–2050.
- Garrett M.D., Zahner J.E., Cheney C.M., and Novick P.J.** (1994). GDI1 encodes a GDP dissociation inhibitor that plays an essential role in the yeast secretory pathway. *EMBO J.* **1**: 1718–1728.
- Geelen D., Leyman B., Batoko H., Di Sansebastiano G.-P., Moore I., and Blatt M.R.** (2002). The abscisic acid-related SNARE homolog NtSyr1 contributes to secretion and growth: evidence from competition with its cytosolic domain. *Plant Cell* **14**: 387–406.
- Gehl C., Waadt R., Kudla J., Mendel R.-R., and Hänsch R.** (2009). New GATEWAY vectors for High Throughput Analyses of Protein–Protein Interactions by Bimolecular Fluorescence Complementation. *Mol. Plant* **2**: 1051–1058.
- Grellet Bournonville C.F. and Díaz-Ricci J.C.** (2011). Quantitative determination of superoxide in plant leaves using a modified NBT staining method. *Phytochem. Anal.* **22**: 268–271.
- Hall T.A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**: 95–98.
- Hamaji K. et al.** (2009). Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **50**: 2023–33.

- Hao H., Fan L., Chen T., Li R., Li X., He Q., Botella M.A., and Lin J.** (2014). Clathrin and Membrane Microdomains Cooperatively Regulate RbohD Dynamics and Activity in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 1729–1745.
- Hernandez J.A., Ferrer M.A., Jimenez A., Ros-Barcelo A., and Sevilla F.** (2001). Antioxidant Systems and O<sub>2</sub>- / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production in the Apoplast of Pea Leaves . Its Relation with Salt-Induced Necrotic Lesions in Minor Veins. *Plant Physiol.* **127**: 817–831.
- Horie T., Hauser F., and Schroeder J.I.** (2009). HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in Arabidopsis and monocot crop plants. *Trends Plant Sci.* **14**: 660–668.
- Horiuchi H., Giner A., Hoflack B., and Zerial M.** (1995). A GDP/GTP exchange stimulatory activity for the RabS-RabGDI complex on clathrin-coated vesicles from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **270**: 11257–11262.
- Hossain S.M.** (2019). Present Scenario of Global Salt Affected Soils , its Management and Importance of Salinity Research Present Scenario of Global Salt Affected Soils , its Management and Importance of Salinity Research. *J. Biol. Sci.* **1**: 1–3.
- Hsieh T.H., Li C.W., Su R.C., Cheng C.P., Sanjaya, Tsai Y.C., and Chan M.T.** (2010). A tomato bZIP transcription factor, SIAREB, is involved in water deficit and salt stress response. *Planta* **231**: 1459–1473.
- Hu C.D., Chinenov Y., and Kerppola T.K.** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* **9**: 789–798.
- Humphrey W., Dalke A., and Schulten K.** (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**: 33–38.
- Ignatev A., Kravchenko S., Rak A., Goody R.S., and Pylypenko O.** (2008). A structural model of the GDP dissociation inhibitor rab membrane extraction mechanism. *J. Biol. Chem.* **283**: 18377–84.
- Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., and Klein M.L.** (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**: 926.
- Jou Y., Chiang C.-P., Jauh G.-Y., and Yen H.E.** (2006). Functional characterization of ice plant SKD1, an AAA-type ATPase associated with the endoplasmic reticulum-Golgi network, and its role in adaptation to salt stress. *Plant Physiol.* **141**: 135–146.
- Jurgens G.** (2004). Membrane trafficking in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**: 481–504.
- Kahn R. a, Der C.J., and Bokoch G.M.** (1992). The ras superfamily of GTP-binding proteins: guidelines on nomenclature. *FASEB J.* **6**: 2512–2513.
- Kato T., Morita M.T., Fukaki H., Yamauchi Y., Uehara M., Niihama M., and Tasaka M.** (2002). SGR2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are involved in the shoot gravitropism of Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 33–46.
- Ketelaar T., de Ruijter N.C. a, and Emons A.M.C.** (2003). Unstable F-actin specifies the area and microtubule direction of cell expansion in Arabidopsis root hairs. *Plant Cell* **15**: 285–292.

- Khosravi-Far R., Lutz R.J., Cox a D., Conroy L., Bourne J.R., Sinensky M., Balch W.E., Buss J.E., and Der C.J.** (1991). Isoprenoid modification of rab proteins terminating in CC or CXC motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 6264–6268.
- Kilpinen L. et al.** (2013). Extracellular membrane vesicles from umbilical cord blood-derived MSC protect against ischemic acute kidney injury, a feature that is lost after inflammatory conditioning. *J. Extracell. vesicles* **2**: 1–15.
- Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., and Thornton J.M.** (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**: 283–291.
- Lauber M.H., Waizenegger I., Steinmann T., Schwarz H., Mayer U., Hwang I., Lukowitz W., and Jürgens G.** (1997). The Arabidopsis KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J. Cell Biol.* **139**: 1485–1493.
- Leborgne-Castel N. and Luu D. -T.** (2009). Regulation of endocytosis by external stimuli in plant cells. *Plant Biosyst. - An Int. J. Deal. with all Asp. Plant Biol.* **143**: 630–635.
- Lesak I., Miszalski Z., Karpinska B., Niewiadomska E., Ratajczak R., and Karpinski S.** (2002). Redox control of oxidative stress responses in the C3-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 669–677.
- Leshem Y., Melamed-Book N., Cagnac O., Ronen G., Nishri Y., Solomon M., Cohen G., and Levine A.** (2006). Suppression of Arabidopsis vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 18008–13.
- Leshem Y., Seri L., and Levine A.** (2007). Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant J.* **51**: 185–97.
- Levine A.** (2002). Regulation of stress responses by intracellular vesicle trafficking? *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 531–535.
- Leyman B., Geelen D., and Blatt M.R.** (2000). Localization and control of expression of Nt-Syr1, a tobacco snare protein. *PLANT J.* **24**: 369–381.
- Leyman B., Geelen D., Quintero F.J., and Blatt M.R.** (1999). A tobacco syntaxin with a role in hormonal control of guard cell ion channels. *Science* **283**: 537–540.
- Li X., Wang X., Yang Y., Li R., He Q., Fang X., Luu D.-T., Maurel C., and Lin J.** (2011a). Single-molecule analysis of PIP<sub>2</sub>;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of Arabidopsis plasma membrane aquaporin regulation. *Plant Cell* **23**: 3780–97.
- Li X., Wang X., Yang Y., Li R., He Q., Fang X., Luu D.-T., Maurel C., and Lin J.** (2011b). Single-Molecule Analysis of PIP<sub>2</sub>;1 Dynamics and Partitioning Reveals Multiple Modes of Arabidopsis Plasma Membrane Aquaporin Regulation. *Plant Cell* **23**: 3780–3797.
- Lichtscheidl-schultz I. and Baluska F.** (2014). Aluminium toxicity in plants : internalization of aluminium into cells of the transition zone in Arabidopsis root apices related to changes in plasma membrane potential , endosomal behaviour , and nitric oxide production. *J. Exp. Bot.*: 1–13.

- Liu Z., Luo C., Li L., Dong L., Can V., Wei P., and He X.** (2015). Isolation, characterization and expression analysis of the GDP dissociation inhibitor protein gene MiRab-GDI from *Mangifera indica* L. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **185**: 14–21.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Logemann E., Birkenbihl R.P., Ulker B., and Somssich I.E.** (2006). An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol. *Plant Methods* **2**: 16.
- Los D. a. and Murata N.** (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1666**: 142–157.
- Luan P., Balch W.E., Emr S.D., and Burd C.G.** (1999). Molecular Dissection of Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor Function in Vivo: Rab-INDEPENDENT BINDING TO MEMBRANES AND ROLE OF RAB RECYCLING FACTORS. *J. Biol. Chem.* **274**: 14806–14817.
- Luan P., Heine a, Zeng K., Moyer B., Greasely S.E., Kuhn P., Balch W.E., and Wilson I. a** (2000). A new functional domain of guanine nucleotide dissociation inhibitor ( $\alpha$ -GDI) involved in Rab recycling. *Traffic* **1**: 270–281.
- Lukowitz W., Mayer U., and Jürgens G.** (1996). Cytokinesis in the *Arabidopsis* embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell* **84**: 61–71.
- Luu D.-T., Martinière A., Sorieul M., Runions J., and Maurel C.** (2012). Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in *Arabidopsis* roots under salt stress. *Plant J.* **69**: 894–905.
- Ma Q.-H.** (2007). Small GTP-binding Proteins and their Functions in Plants. *J. Plant Growth Regul.* **26**: 369–388.
- Maathuis F.J.M.** (2014). Sodium in plants: Perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *J. Exp. Bot.* **65**: 849–858.
- Mahajan S., Sopory S., and Tuteja N.** (2006). CBL-CIPK Paradigm: Role in Calcium and Stress Signaling in Plants. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* **78**: 63–78.
- Mazel A., Leshem Y., Tiwari B.S., and Levine A.** (2004). Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 ( AtRabG3e ). *Plant Physiol.* **134**: 118–128.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., and Mittler R.** (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell Environ.* **33**: 453–467.
- Mimura T., Kura-Hotta M., Tsujimura T., Ohnishi M., Miura M., Okazaki Y., Mimura M., Maeshima M., and Washitani-Nemoto S.** (2003). Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress. *Planta* **216**: 397–402.
- Morita M.T., Kato T., Nagafusa K., Saito C., Ueda T., Nakano A., and Tasaka M.** (2002). Involvement of the vacuoles of the endodermis in the early process of shoot gravitropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 47–56.

- Muchate N.S. and Nikalje G.C.** (2016). Plant Salt Stress : Adaptive Responses , Tolerance Mechanism and Bioengineering for Salt Tolerance. *Bot. Rev.* **82**: 371–406.
- Müller M.P. and Goody R.S.** (2017). Molecular control of Rab activity by GEFs, GAPs and GDI. *Small GTPases* **0**: 1–17.
- Muñoz F.J., Esteban R., Labrador E., and Dopico B.** (2001). Expression of a novel chickpea Rab-GDI cDNA mainly in seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 363–366.
- Novick P., Field C., and Schekman R.** (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**: 205–15.
- Oh D., Lee S.Y., Bressan R.A., Yun D., and Bohnert H.J.** (2010). Intracellular consequences of SOS1 deficiency during salt stress. **61**: 1205–1213.
- Orellana S., Yañez M., Espinoza A., Verdugo I., González E., Ruiz-Lara S., and 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 Environ.* **33**: 2191–2208.
- Pang C. and Wang B.** (2008). Oxidative Stress and Salt Tolerance in Plants. In, pp. 231–245.
- Park M., Lee H., Lee J.-S., Byun M.-O., and Kim B.-G.** (2009). In Planta Measurements of Na<sup>+</sup> Using Fluorescent Dye CoroNa Green. *J. Plant Biol.* **52**: 298–302.
- Peng X., Ding X., Chang T., Wang Z., Liu R., Zeng X., Cai Y., and Zhu Y.** (2014). Overexpression of a vesicle trafficking gene, OsRab7, enhances salt tolerance in rice. *Sci. World J.* **2014**: 1–7.
- Pereira-Leal J.B. and Seabra M.C.** (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* **313**: 889–901.
- Pfeffer S.R.** (2017). Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Mol. Biol. Cell* **28**: 712–715.
- Pfeffer S.R., Dirac-Svejstrup a B., and Soldati T.** (1995). Rab GDP dissociation inhibitor: putting rab GTPases in the right place. *J. Biol. Chem.* **270**: 17057–9.
- Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kal?? L., and Schulten K.** (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**: 1781–1802.
- Prerostova S., Dobrev P.I., Gaudinova A., Hosek P., Soudek P., Knirsch V., and Vankova R.** (2017). Hormonal dynamics during salt stress responses of salt-sensitive *Arabidopsis thaliana* and salt-tolerant *Thellungiella salsuginea*. *Plant Sci.* **264**: 188–198.
- Qiu Q.-S., Guo Y., Dietrich M. a, Schumaker K.S., and Zhu J.-K.** (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 8436–8441.
- Rak A., Pylypenko O., Durek T., Watzke A., Kushnir S., Brunsveld L., Waldmann H., Goody R.S., and Alexandrov K.** (2003). Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. *Science* **302**: 646–50.

- Reguera M., Bassil E., and Blumwald E.** (2014). Intracellular NHX-Type cation/H<sup>+</sup> antiporters in plants. *Mol. Plant* **7**: 261–263.
- Remans T., Smeets K., Opdenakker K., Mathijsen D., Vangronsveld J., and Cuypers A.** (2008). Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta* **227**: 1343–1349.
- Rengasamy P.** (2006). World salinization with emphasis on Australia. *J. Exp. Bot.* **57**: 1017–1023.
- Saito C. and Ueda T.** (2009). Chapter 4 Functions of RAB and SNARE Proteins in Plant Life 1st ed. (Elsevier Inc.).
- Sambrook J. and Russell D.** (2001). *Molecular Cloning: a laboratory Manual*.
- Sanderfoot a a and Raikhel N. V** (1999). The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs. *Plant Cell* **11**: 629–642.
- Sanner M.F.** (1999). Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* **17**: 57–61.
- Schindelin J., Rueden C.T., Hiner M.C., and Eliceiri K.W.** (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol. Reprod. Dev.* **82**: 518–529.
- Schlenkrich M. and Brickmann J.** (1996). An Empirical Potential Energy Function for Phospholipids: Criteria for Parameter Optimization and Applications.
- Shamloul M., Trusa J., Mett V., and Yusibov V.** (2014). Optimization and Utilization of Agrobacterium mediated Transient Protein Production in *Nicotiana*. *J. Vis. Exp.*: 1–13.
- Shi H., Ishitani M., Kim C., and Zhu J.K.** (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 6896–901.
- Shi H., Lee B., Wu S.-J., and Zhu J.-K.** (2003). Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* **21**: 81–85.
- Singh D., Yadav N.S., Tiwari V., Agarwal P.K., and Jha B.** (2016). A SNARE-Like Superfamily Protein SbSLSP from the Halophyte *Salicornia brachiata* Confers Salt and Drought Tolerance by Maintaining Membrane Stability, K<sup>(+)</sup>/Na<sup>(+)</sup> Ratio, and Antioxidant Machinery. *Front. Plant Sci.* **7**: 737.
- Soldati T., Shapiro a D., Svejstrup a B., and Pfeffer S.R.** (1994). Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* **369**: 76–78.
- Son Y.S., Im C.H., Kim D.W., and Bahk J.D.** (2013). OsRab11 and OsGAP1 are essential for the vesicle trafficking of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase OsVHA-a1 under high salinity conditions. *Plant Sci.* **198**: 58–71.
- Soto F.** (2014). Analisis transcripcional de RabGTPasas en la especie tolerante *Solanum chilense*, durante el estres salino.

- Staelin L. a and Moore I.** (1995). The Plant Golgi Apparatus: Structure, Functional Organization and Trafficking Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 261–288.
- Takai Y., Sasaki T., and Matozaki T.** (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* **81**: 153–208.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., and Kumar S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596–1599.
- Tapia G.** (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.
- Tester M. and Davenport R.** (2003). Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher Plants. *Ann. Bot.* **91**: 503–527.
- Torres-Schumann S., Godoy J.A., and Pintor-Toro J.A.** (1992). A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol. Biol.* **18**: 749–57.
- Ueda T., Matsuda N., Anai T., Tsukaya H., Uchimiya H., and Nakano A.** (1996). An Arabidopsis gene isolated by a novel method for detecting genetic interaction in yeast encodes the GDP dissociation inhibitor of Ara4 GTPase. *Plant Cell* **8**: 2079–91.
- Ueda T., Yamaguchi M., Uchimiya H., and Nakano A.** (2001). Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of Arabidopsis thaliana. *EMBO J.* **20**: 4730–4741.
- Uemura T., Ueda T., Ohniwa R.L., Nakano A., Takeyasu K., and Sato M.H.** (2004). Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct. Funct.* **29**: 49–65.
- Ullrich O., Horiuchi H., Bucci C., and Zerial M.** (1994). Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* **368**: 157–160.
- Vernoud V., Horton A.C., Yang Z., and Nielsen E.** (2003). Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of Arabidopsis 1. **131**: 1191–1208.
- Wang X., Xu M., Gao C., Zeng Y., Cui Y., Shen W., and Jiang L.** (2020). The roles of endomembrane trafficking in plant abiotic stress responses. *J. Integr. Plant Biol.* **62**: 55–69.
- Wiegandt D., Vieweg S., Hofmann F., Koch D., Li F., Wu Y.-W., Itzen A., Müller M.P., and Goody R.S.** (2015). Locking GTPases covalently in their functional states. *Nat. Commun.* **6**: 7773.
- Wu S., Zeng K., Wilson A., and Balch W.E.** (1996a). Structural insights into the function of the Rab GDI superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 472–476.
- Wu S., Zeng K., Wilson I., and Balch W.** (1996b). Structural insights into the function of the Rab GDI superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 472–476.
- Yaneva I.A. and Niehaus K.** (2005). Molecular cloning and characterisation of a Rab-binding GDP-dissociation inhibitor from *Medicago truncatula*. *Plant Physiol. Biochem.* **43**: 203–12.

- Yáñez M., Cáceres S., Orellana S., Bastías A., Verdugo I., Ruiz-Lara S., and Casaretto J.A.** (2009). An abiotic stress-responsive bZIP transcription factor from wild and cultivated tomatoes regulates stress-related genes. *Plant Cell Rep.* **28**: 1497–1507.
- Yao H.Y. and Xue H.W.** (2011). Signals and mechanisms affecting vesicular trafficking during root growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 571–579.
- Žárský V., Cvrčková F., Bischoff F., and Palme K.** (1997). At-GDI1 from *Arabidopsis thaliana* encodes a rab-specific GDP dissociation inhibitor that complements the sec19 mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **403**: 303–308.
- Zhang J., Jia W., Yang J., and Ismail A.M.** (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *F. Crop. Res.* **97**: 111–119.
- Zhu J.-K.** (2001). Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**: 66–71.
- Zhu J.-K.** (2012). Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 247–273.
- Zhu J., Gong Z., Zhang C., Song C., Damsz B., Inan G., Koiwa H., Zhu J., Hasegawa P.M., and Bressan R. a** (2002). OSM1 / SYP61 : A Syntaxin Protein in *Arabidopsis* Controls Abscisic Acid – Mediated and Non-Abscisic Acid – Mediated Responses to Abiotic Stress. *Society* **14**: 1–20.
- Zwiewka M., Nodzyński T., Robert S., Vanneste S., and Friml J.** (2015). Osmotic Stress Modulates the Balance between Exocytosis and Clathrin-Mediated Endocytosis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* **8**: 1175–1187.