
**ESTUDIO DE LOS EFECTOS EJERCIDOS POR LA EXPRESIÓN Y
COEXPRESIÓN RADICULAR DE GENES MON1 Y CCZ1 DE SOLANUM
CHILENSE SOBRE LA RESPUESTA A ESTRÉS SALINO DE ARABIDOPSIS
THALIANA Y SU CAPACIDAD PARA COMPARTIMENTAR Na⁺ EN VACUOLAS**

**JOSÉ ANTONIO MADRID ESPINOZA
DOCTORADO EN CIENCIAS
(MENCIÓN EN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL)**

RESUMEN

Para evitar el efecto detrimental del estrés salino, las plantas son capaces de reducir las concentraciones citoplasmáticas de Na⁺ mediante el incremento de su compartimentación en la vacuola. Para lograrlo, un activo y eficiente mecanismo de transporte de vesículas, provenientes desde la Red Trans-Golgi o endosoma temprano, moviliza proteínas y membranas que se fusionarán con el tonoplasto y permitirán el secuestro de los iones. Recientemente, se estableció que este proceso requiere del intercambio entre miembros de la familia de RabGTPasas RabF y RabG, el cual es regulado por el complejo heterodimérico MON1/CCZ1. La proteína MON1 actúa como efector de RabF, dirigiendo la fusión de vesículas con el endosoma tardío, mientras que el complejo MON1/CCZ1 actúa como una proteína con actividad GEF (Intercambiadora del Nucleótido de Guanina) activando a RabG y permitiendo la fusión de vesículas provenientes desde el endosoma tardío con la vacuola. En *Arabidopsis thaliana*, la familia MON1 está compuesto de un solo miembro, mientras que la familia CCZ1 posee dos (CCZ1a y CCZ1b). La ausencia de cualquiera de ambas proteínas involucradas en el complejo causa enanismo y retardo en el desarrollo, evidenciando su importancia para el desarrollo vegetal. Por otra parte, las familias RabF y RabG están formadas por tres y ocho miembros, respectivamente, y todos son blancos de MON1/CCZ1. Entre ellas se destacan RabF1 y RabG3e, que ha sido involucradas en la tolerancia a estrés salino de *A. thaliana*, al incrementar la tasa endocítica, y la capacidad de compartimentar Na⁺ en la vacuola, sugiriendo fuertemente el potencial rol del complejo GEF en estos mecanismos. A partir de genes obtenidos de especies vegetales halófitas, diversas investigaciones señalan que los mecanismos de endocitosis y el tráfico vesicular pre-vacuolar tendría un rol

fundamental en la capacidad de tolerancia a estrés salino. De igual manera, mediante herramientas biotecnológicas, se ha demostrado que esta capacidad puede ser transferida a especies de interés comercial especialmente sensibles a estrés abiótico. En ese contexto, *Solanum chilense*, una especie de tomate silvestre tolerante a sequía y salinidad, evidenció poseer genes homólogos a los de MON1 y CCZ1 de *A. thaliana*, ambos denominados SchMON1 y SchCCZ1, y con capacidad para complementar funcionalmente las líneas mutantes de *A. thaliana* mon1-1 y ccz1a/b. Adicionalmente, la fuerte y coordinada expresión de ambos genes, en raíces y hojas de plantas de *S. chilense* sometidas a estrés salino, sugirió el involucramiento del complejo y la vía de tráfico pre-vacuolar en la capacidad de tolerancia de esta especie. Para confirmarlo, análisis experimentales de expresión y co-expresión heteróloga de SchMON1 y SchCCZ1, utilizando un promotor específico para raíces, evidenciaron incrementar la tolerancia a estrés salino de *A. thaliana* de forma diferencial. Entre los tres genotipos obtenidos, la expresión radicular de SchMON1 otorgó mayor tolerancia a estrés salino, debido a una mayor tasa endocítica en sus células radiculares, tanto en condiciones normales como en estrés. Adicionalmente, se reveló la presencia de grandes estructuras endosomales que podrían estar asociadas a esta mejorada capacidad para tolerar el estrés en este genotipo. El rol modulador que posee el tráfico pre-vacuolar durante estrés abiótico ha sido recientemente investigado en otros ámbitos, como el control hormonal, el movimiento vesicular de especies reactivas de oxígeno y la autofagia. En tal contexto, los tres genotipos transgénicos analizados evidenciaron reducir la expresión de genes involucrados en la vía de señalización por ABA cuando eran sometidos a estrés salino, sugiriendo la activación de la vía independiente a esta hormona. Esto fue confirmado con la reducción de la sensibilidad frente a la aplicación de ABA exógeno. Conjuntamente, se redujo del contenido de H₂O₂ en raíces, lo cual fue coherente con activación transcripcional de genes involucrados en mecanismos enzimáticos de detoxificación, como AtSOD1 y AtAPX, y además al verse contenido en endosomas. Adicionalmente, la reducción en la expresión de los genes de respuesta a estrés oxidativo en tejido aéreo sugirió un menor efecto del estrés

salino en los genotipos tolerantes. Por otra parte, resultó evidente el incremento en la actividad autofágica en los tres genotipos, lo cual es coherente con una mayor capacidad de la vacuola para compartimentar el Na⁺. Esto fue confirmado mediante el incremento en la intensidad de la fluorescencia del indicador de Na⁺, Sodium-Green, y la correlación positiva con la inducción transcripcional del gen AtNHX1. Todos estos resultados permiten concluir que SchMON1 y SchCCZ1 de *S. chilense* tienen la capacidad de participar del intercambio Rab5-Rab7 y del tráfico pre-vacuolar en *A. thaliana*; y que la expresión o co-expresión radicular de ambos genes incrementa diferencial y significativamente el grado de tolerancia a estrés salino de *A. thaliana*, de una manera independiente de ABA, vía la reducción del estrés oxidativo, el incremento de la actividad autofágica, y una capacidad superior para compartimentar Na⁺ de sus vacuolas, mecanismos potencialmente transferibles a especies agrícolas de interés económico.

ABSTRACT

To avoid the detrimental effect of salt stress, plants reduce cytoplasmic Na⁺ concentrations by increasing its compartmentalization in the vacuole. To achieve this, an active and efficient vesicle transport mechanism, coming from the Trans-Golgi Network or early endosome, mobilizes proteins and membranes that will fuse with the tonoplast and allow the sequestration of ions. Recently, it was established that this process requires the conversion between members of the RabGTPase family RabF and RabG, which is regulated by the MON1/CCZ1 heterodimeric complex. The MON1 protein acts as an effector of RabF, directing the fusion of vesicles with the late endosome, while the MON1/CCZ1 complex acts as a protein with GEF activity (Guanine Nucleotide Exchanger) activating RabG and allowing the fusion of vesicles from late endosome with the vacuole. In *Arabidopsis thaliana*, the MON1 family has only one member, while the CCZ1 family has two (CCZ1a and CCZ1b). The absence of either of the two proteins involved in the complex causes dwarfism and developmental delay, evidencing the importance of both in plant development. On the other hand, the RabF and RabG families have three and eight members, respectively, and all are MON1 / CCZ1 targets. Among them, RabF1 and RabG3e have been involved in the tolerance to saline stress of *A. thaliana*, by increasing the endocytic rate, and the capacity to compartmentalize Na⁺ in the vacuole, which strongly suggests a potential role of the GEF complex in these mechanisms. From genes obtained from halophytic plant species, various investigations indicate that endocytosis mechanisms and pre-vacuolar vesicular traffic would play a fundamental role in the capacity for tolerance to salt stress. Similarly, using biotechnological tools, it has been shown that this capacity can be transferred to species of commercial interest that are especially sensitive to abiotic stress. In this context, *Solanum chilense*, a species of wild tomato tolerant to drought and salinity, showed homologous genes to those of MON1 and CCZ1 of *A. thaliana*, both named SchMON1 and SchCCZ1, and with the capacity to functionally complement mutant lines of *A. thaliana* *mon1-1* and *ccz1a/b*. Additionally, the strong and coordinated expression of both genes, in roots and

leaves of *S. chilense* plants subjected to saline stress, suggested the involvement of the complex and the pre-vacuolar traffic pathway in the tolerance capacity of this species. To confirm this, experimental analysis of heterologous expression and co-expression of SchMON1 and SchCCZ1, using a specific promoter for roots, showed the differential increase of the tolerance to saline stress of *A. thaliana*. Among the three genotypes obtained, the radicular expression of SchMON1 granted greater tolerance to saline stress, due to a higher endocytic rate in its root cells, both under normal and stress conditions. Additionally, the presence of large endosomal structures that could be associated with this improved ability to tolerate stress in this genotype was revealed. The modulatory role of pre-vacuolar traffic during abiotic stress has recently been investigated in other areas, such as hormonal control, the vesicular movement of reactive oxygen species, and autophagy. In this context, the three transgenic genotypes showed a reduction in the expression of genes involved in the ABA signaling pathway when they were subjected to salt stress, suggesting the activation of the pathway independent of this hormone. This was confirmed with the enhance insensitivity to exogenous ABA. Together, the H₂O₂ content was reduced in roots, which was consistent with the transcriptional activation of genes involved in enzymatic detoxification mechanisms, such as AtSOD1 and AtAPX, and also with their compartmentalization in endosomes. Additionally, the reduction in gene expression related to oxidative stress response in air tissue suggested a lower effect of salt stress in tolerant genotypes. On the other hand, the increase in autophagic activity was evident in the three genotypes, which is consistent with a greater capacity of the vacuole to compartmentalize Na⁺. This was confirmed by the increase in the intensity of the fluorescence of the Na⁺ indicator, Sodium-Green, and the positive correlation with the transcriptional induction of the AtNHX1 gene. All these results allow us to conclude that SchMON1 and SchCCZ1 from *S. chilense* have the ability to participate in the conversion of Rab5-Rab7 and pre-vacuolar trafficking in *A. thaliana*; and that the radicular expression or co-expression of both genes increases the degree of tolerance to saline stress of *A. thaliana*, in an ABA-independent way, via the reduction of oxidative stress, the increase of autophagic

activity, and a superior capacity to compartmentalize Na^+ into its vacuoles, mechanisms potentially transferable to agricultural species of economic interest.