

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE TABLA Y FIGURAS	6
RESUMEN	8
SUMMARY	10
I. INTRODUCCIÓN	12
I.1 El estrés salino en plantas	13
I.2 El tráfico vesicular intracelular	14
I.3 SNAREs en el transporte y fusión de vesículas	15
I.4 Rol de las SNAREs de retículo endoplasmático y Golgi	19
I.5 Rol de las SNAREs de TGN, endosoma y vacuola	20
I.6 Rol de las SNAREs en membrana plasmática	21
I.7 Rol de las proteínas SNARE y SNARE-like frente a estrés salino	22
HIPÓTESIS DE TRABAJO	28
OBJETIVOS	29
II. MATERIALES Y MÉTODOS	30
II.1 Material vegetal y condiciones de cultivo	31
II.2 Análisis <i>in silico</i> de los genes que codifican para SNARE-like en plantas de tomate	31
II.3 Tratamiento de estrés salino y mediciones de parámetros fisiológicos y bioquímicos en la determinación de los perfiles de expresión	32
II.3.1 Tratamiento de estrés salino	32
II.3.2 Medición de parámetros fisiológicos y bioquímicos	32
II.4 Aislamiento y purificación de RNA total y síntesis de cDNA	33
II.5 Reacciones de PCR y PCR cuantitativa o en tiempo real (qRT-PCR)	34
II.6 Transformación de plantas de tomate	36
II.7 Medición de parámetros de tolerancia frente condiciones de estrés salino	37
II.8 Localización subcelular	38
II.9 Análisis de la tasa de endocitosis	39

II.10	Cuantificación de la fluorescencia de ROS	39
II.11	Estudio de la acumulación de sodio e la vacuola	40
II.12	Análisis estadístico	40
III.	RESULTADOS	41
III.1	Identificación de genes que codifican para SNARE-like en plantas de <i>Solanum lycopersicum</i>	42
III.2	Determinación del perfil de expresión de los genes que codifican para SISLSP en plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> sometidas a estrés salino	46
III.3	La evaluación a nivel fisiológico y bioquímico de plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan <i>SISLSP6</i> indica que son capaces de tolerar las condiciones de alta salinidad	49
III.4	SISLSP6 está localizada en la membrana plasmática	54
III.5	La sobreexpresión de <i>SISLSP6</i> en plantas de tomate modula la tasa endocítica en condiciones normales y aumenta significativamente la endocitosis bajo estrés salino	56
III.6	La expresión constitutiva de <i>SISLSP6</i> modifica la acumulación de ROS en células radiculares de tomate bajo condiciones de estrés salino	58
III.7	La sobreexpresión de <i>SISLSP6</i> aumenta la capacidad de compartimentar sodio en las vacuolas durante condiciones de alta salinidad	60
IV.	DISCUSIÓN	62
IV.1	SISLSP6 codifica para una proteína SNARE-like y participa en el tráfico vesicular a nivel de la membrana plasmática	63
IV.2	La proteína SISLSP6 aumenta el tráfico vesicular, implicando una mayor tolerancia frente al estrés salino en tomate	66
V.	CONCLUSIONES	71
VI.	PROYECCIONES	73
VII.	BIBLIOGRAFÍA	75
	FIGURAS SUPLEMENTARIAS	90

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados en esta investigación.	34
Figura 1. Modulación de las rutas del tráfico endomembranoso bajo condiciones de estrés abiótico.	15
Figura 2. Funcionamiento del ciclo SNARE.	17
Figura 3. Árbol filogenético de las SNAREs identificadas en <i>Solanum lycopersicum</i> .	18
Figura 4. La sobreexpresión de SISNAP33.2 de <i>S. lycopersicum</i> aumenta la tolerancia a estrés salino en plantas de tomate.	24
Figura 5. Secuencia de pasos que median la endocitosis mediada por clatrin.	26
Figura 6. Análisis de dominios transmembrana de las secuencias Solyc03g116600.2 (SISLSP3), Solyc06g068080.2 (SISLSP6) y Solyc11g008330.1 (SISLSP11).	43
Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de SISLSP con sus homólogos para identificación de motivos conservados.	44
Figura 8. Árbol filogenético que establece la relación de putativas proteínas SNARE-like de tomate con sus homólogos con otras especies de plantas.	45
Figura 9. Perfil de expresión de los genes <i>SLSP3</i> , <i>SLSP6</i> y <i>SLSP11</i> en hojas y raíces de plantas de <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. chilense</i> expuestas a estrés salino.	47
Figura 10. Análisis de expresión del gen <i>SISLSP11</i> de <i>S. lycopersicum</i> cv. Heinz en diferentes tejidos de la planta bajo condiciones normales.	48
Figura 11. Patrones de expresión de <i>SISLSP6</i> en diferentes líneas de plantas transgénicas de tomate <i>S. lycopersicum</i> (log10).	50
Figura 12. Respuesta de las plantas WT y plantas sobreexpresoras de <i>SISLSP6</i> bajo condiciones de estrés salino.	51
Figura 13. La respuesta a nivel fisiológico y bioquímico de las plantas transformadas con <i>SISLSP6</i> evidencia una mayor tolerancia frente a condiciones de alta salinidad.	52
Figura 14. <i>SISLSP6</i> reside en membrana plasmática.	55
Figura 15. Dinámica de la tasa de endocitosis de FM4-64 en <i>Solanum lycopersicum</i> .	57
Figura 16. Contenido de H ₂ O ₂ en raíces de <i>Solanum lycopersicum</i> bajo condiciones de estrés salino.	59

Figura 17. Compartimentación de sodio en las vacuolas de células de las raíces de <i>Solanum lycopersicum</i> bajo condiciones de estrés salino.	61
Figura S1. Parámetros fisiológicos de las plantas <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. chilense</i> sometidas a condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) medidas a las 0, 24, 48 y 72 horas.	90
Figura S2. Perfiles de expresión de genes marcadores de estrés <i>AREB1</i> y <i>TSW12</i> en hojas y raíces de plantas de <i>S. lycopersicum</i> y <i>S. chilense</i> sometidas a condiciones de estrés salino.	91
Figura S3. Análisis de expresión del gen <i>SISLSP3</i> de <i>S. lycopersicum</i> cv. Heinz en diferentes tejidos de la planta bajo condiciones normales.	92
Figura S4. Análisis de expresión del gen <i>SISLSP6</i> de <i>S. lycopersicum</i> cv. Heinz en diferentes tejidos de la planta bajo condiciones normales.	93
Figura S5. Localización subcelular del gen que codifica para Green Fluorescent Protein (GFP) dirigido por el promotor constitutivo 35S.	94
Figura S6. Contenido de H ₂ O ₂ en raíces de <i>Solanum lycopersicum</i> bajo condiciones normales.	95
Figura S7. Acumulación de sodio en raíces de <i>Solanum lycopersicum</i> bajo condiciones normales.	96