



INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
MENCION INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL

Evaluación de la capacidad de un gen *SNARE-like* involucrado en tráfico vesicular, para modular la tolerancia a estrés salino en *Solanum lycopersicum*

Tesis para optar al grado de Doctor en
Ciencias mención Ingeniería Genética Vegetal

JOSELYN ANDREA SALINAS CORNEJO

Director de Tesis: Dr. Simón Ruiz Lara

Talca, enero 2022

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

Candidata a Doctor : Josselyn Andrea Salinas Cornejo
Fecha inicio de Tesis : marzo de 2017
Fecha término de Tesis : junio 2021
Fecha entrega de Tesis : agosto 2021
Fecha defensa de Tesis : enero 2022

Profesor Guía

Dr. Simón Aurelio Ruiz Lara
Instituto de Ciencias Biológicas
Universidad de Talca
2 norte 685, casilla 747, Talca.
sruiz@utalca.cl

Integrantes de la Comisión de Evaluación:

Dra. Lorena Norambuena
Departamento de Biología
Universidad de Chile, Chile

Dr. Cristian Ibáñez G.
Departamento de Biología
Universidad de La Serena, Chile

Dr. Erwan Michard
Instituto de Ciencias Biológicas
Universidad de Talca, Chile

AGRADECIMIENTOS

Agradecer al profesor Dr. Simón Ruiz por permitirme, una vez más, desarrollar mi trabajo de investigación y por confiar en mis capacidades.

A la Dra. Lorena Norambuena, Dr. Cristian Ibáñez y al Dr. Erwan Michard por ser parte de la comisión evaluadora y por sus enriquecedoras sugerencias.

A mis amigos Isabel Verdugo y José Madrid, por su constante apoyo y confianza.

A mi madre por su amor incondicional y por siempre creer que cumpliría con mis objetivos.

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

RESUMEN

El tráfico vesicular intracelular asegura el intercambio de lípidos y proteínas entre los compartimentos membranosos. Bajo estrés salino esto cobra gran importancia, ya que tanto la remoción de transportadores y canales iónicos de la membrana plasmática como la compartimentación de los iones tóxicos requiere de la formación de vesículas, que pueden ser mantenidos como cuerpos multivesiculares, o bien, ser fusionados a la vacuola central. Uno de los componentes participantes incluye a la familia de proteínas SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor), que actúan en el proceso de fusión de vesículas, otorgándole especificidad al destino final de éstas. Es por ello que las SNAREs son un blanco interesante de investigación que permitiría entender el rol que tienen éstas durante el estrés salino en plantas. Las evidencias descritas hasta la fecha en *Arabidopsis thaliana* muestran que la sobreexpresión de determinados *SNAREs* conducen a un aumento de la tolerancia al estrés salino. Este efecto podría ser consecuencia de un aumento en la acumulación de sodio en la vacuola o que ocurra una compartimentación de especies reactivas de oxígeno en cuerpos multivesiculares, evitando con ello la alcalinización y pérdida de viabilidad de la vacuola. Por otra parte, el análisis de los genomas de plantas ha revelado una superfamilia de genes que codifican para proteínas denominadas SNARE-like, que al igual que las anteriores parecen estar participando en el tráfico vesicular con funciones semejantes. La participación de estas proteínas durante el estrés abiótico es prácticamente desconocida, a excepción de los estudios recientemente descritos con la sobreexpresión en tabaco de un gen *SNARE-like* de la planta halófila *Salicornia brachiata*, que es capaz de otorgar tolerancia a múltiples tipos de estrés abiótico, incluyendo el estrés salino. Los estudios de la participación de SNARE-like en plantas de importancia económica, como tomate son desconocidos. Por lo anterior, en esta tesis se propuso estudiar los efectos de la sobreexpresión de un gen *SNARE-like*, denominado *SISLSP6*, en plantas de *Solanum lycopersicum* sometidas a condiciones de alta salinidad. Se realizó una búsqueda de putativos genes homólogos al *SNARE-like* de *S. brachiata* en el genoma de *S. lycopersicum*, identificándose aquellos que tienen expresión diferencial bajo estrés salino y se seleccionó aquel que mostró una mejor respuesta, tanto en hojas como en raíces. El análisis *in silico* de *SISLSP6* permitió la predicción de un dominio Longin-like, que la categorizó como una SNARE-like. Además, mediante análisis filogenético se determinó una relación de *SISLSP6*

con proteínas SNARE-like de *S. brachiata*, *Zostera marina* y *Solanum pennelli*, plantas tolerantes a la salinidad. Junto con esto, se predijo un putativo dominio de un complejo adaptador de clatrin y un sitio de palmitoilación. La localización subcelular indicó que SISLSP6 se ubica en la membrana plasmática, manifestando su posible participación en la endocitosis. Los efectos de la sobreexpresión de *SISLSP6* en plantas de tomate frente a estrés salino fueron evidentes al observarse una mejora de los parámetros fisiológicos y bioquímicos, tales como un mayor contenido de clorofila, índice de rendimiento, eficiencia del fotosistema II y contenido relativo de agua, y un menor contenido de MDA, mejorando la tolerancia de estas plantas bajo estrés salino. La sobreexpresión de *SISLSP6* también aumentó la tasa endocítica, aumentando el tráfico vesicular. Además, se observó una disminución en la acumulación de especies reactivas de oxígeno, lo que se correlacionaría con el aumento de la compartimentación del sodio en las vacuolas de células de raíces de tomate. Estos resultados contribuyen a comprender el rol de esta proteína SNARE-like durante el estrés salino. Se espera que esta investigación sirva de base para el uso de estos genes en programas de mejoramiento genético de la tolerancia a estrés salino en tomate.

SUMMARY

Intracellular vesicular traffic ensures the exchange of lipids and proteins between the membranous compartments. Under saline stress, this becomes very important, since both the removal of transporters and ion channels from the plasma membrane and the compartmentalization of toxic ions require the formation of vesicles, which can be maintained as multivesicular bodies, or be fused to the central vacuole. One of the participating components includes the family of genes encoding SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor) proteins, which act in the vesicle fusion process, giving specificity to their destination. For this reason, SNAREs are an interesting research target that would allow us to understand the role they have during saline stress in plants. The evidence described to date in *Arabidopsis thaliana* shows that the overexpression of certain *SNAREs* leads to an increase in tolerance to salt stress. This effect could be the consequence of an increase in the accumulation of sodium in the vacuole or that a compartmentalization of reactive oxygen species occurs in multivesicular bodies, thereby avoiding alkalization and loss of viability of the vacuole. On the other hand, the analysis of plant genomes has revealed a superfamily of proteins called SNARE-like, which, like SNAREs, seem to be participating in vesicular trafficking with similar functions. The participation of these proteins during abiotic stress is practically unknown, except for the recently described studies with the overexpression in tobacco of a *SNARE-like* gene from the halophytic plant *Salicornia brachiata*, which is capable of granting tolerance to multiple types of abiotic stress, including salt stress. Studies of the participation of SNARE-like in plants of economic importance, such as tomato are unknown. Therefore, in this work it was proposed to study the effects of the overexpression of a *SNARE-like* gene, called *SISLSP6*, in *Solanum lycopersicum* plants subjected to high salinity conditions. A search was carried out for putative genes homologous to the *SNARE-like* of *S. brachiata* in the genome of *S. lycopersicum*, identifying those that have differential expression under saline stress and the one that showed a better response, both in leaves and roots, was selected. The *in-silico* analysis of *SISLSP6* allowed the prediction of a Longin-like domain, which categorized it as a SNARE-like. In addition, by phylogenetic analysis, a relationship of *SISLSP6* with SNARE-like proteins from *S. brachiata*, *Zostera marina* and *Solanum pennelli*, salinity-

tolerant plants, was determined. Along with this, a putative domain of a clathrin adapter complex and a palmitoylation site were predicted. The subcellular location indicated that *SISLSP6* is in the plasma membrane, showing its possible participation in endocytosis. The effects of *SISLSP6* overexpression in tomato plants against saline stress were evident when an improvement in physiological and biochemical parameters was observed, such as a higher chlorophyll content and performance index, higher photosystem II efficiency and relative water content and a lower content of MDA, improving the tolerance of these plants under saline stress. *SISLSP6* overexpression also increased the endocytic rate, increasing vesicular traffic. In addition, a decrease in the accumulation of reactive oxygen species was observed, which would correlate with the increase in sodium compartmentation in the vacuoles of tomato roots cells. These results contribute to understanding the role of this SNARE-like protein during salt stress. It is expected that this research will serve as the basis for the use of these genes in programs for the genetic improvement of tolerance to salt stress in tomato.

I. INTRODUCCIÓN.

I.1 El estrés salino en plantas.

En las plantas expuestas a alta salinidad ocurre un desbalance osmótico e iónico al interior de sus células que comprometen las actividades fisiológicas, bioquímicas y moleculares y que conducen a una pérdida de la viabilidad de la planta (Macková et al., 2013). Como respuesta a esta condición de estrés, la planta activará una serie de mecanismos, tales como la síntesis y acumulación de osmolitos compatibles (Chen & Murata, 2011), reducir la pérdida de agua en la célula, reajustar la concentración de iones e inducir la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Munns & Tester, 2008; Pizarro & Norambuena, 2014). Una de las mayores respuestas frente al estrés abiótico es la generación de ROS (Leshem & Levine, 2007). De estas especies reactivas, el peróxido de hidrógeno es la especie más reactiva (Wu et al., 2020). Dentro de las proteínas reguladoras de los ROS se encuentran las denominadas Rboh. Estas proteínas transfieren electrones desde el NADPH citosólico hacia el oxígeno apoplástico, produciéndose superóxido en el apoplasto (Hao et al., 2014). Este superóxido es espontánea o enzimáticamente dismutado a peróxido de hidrógeno (Leshem et al., 2006). El H₂O₂ ingresa a la célula mediado por aquaporinas, regulando la señalización y diversos procesos celulares (Wu et al., 2020). Además, el exceso de sal también gatilla el aumento de la concentración de iones Ca⁺² en el citosol, lo que regula antiportadores Na⁺/H⁺ para remover el sodio (Jiang et al., 2019). Recientemente se identificó una proteína denominada MOCA1, una glucuronosil-transferasa de esfingolípidos del tipo glicosil inositol fosforilceramida (GIPC) en la membrana plasmática, el cual se une con los iones Na⁺ para gatillar un influjo de Ca⁺² (Jiang et al., 2019). Cuando el Na⁺ ingresa a la célula, produce un desequilibrio al interior de éstas, inhibiendo la absorción de nutrientes y procesos enzimáticos críticos (Baral et al., 2015b). Ahora bien, el restablecimiento de la homeostasis de iones durante y después del estrés salino requiere de la acumulación de ROS en pequeños compartimentos localizados en toda la célula (Leshem et al., 2006) debido a la internalización de proteínas como la NADPH oxidasa RbohD (Hao et al., 2014; Baral et al., 2015b), y de la relocalización de proteínas de membrana tales como aquaporinas (para disminuir la pérdida de agua), de los canales de iones y los transportadores (para evitar la entrada inespecífica de sodio a través de ellos) (Baral et al., 2015b). También se requiere la rápida movilización y acumulación de proteínas en la membrana de la vacuola, ya que los

iones serán acumulados en estos compartimentos mediados por transportadores de iones y bombas de protones como V-ATPasa y H⁺-ATPasa (Pizarro & Norambuena, 2014) (Figura 1). Debido a que el transporte de lípidos y proteínas entre los diferentes compartimentos celulares es realizado principalmente a través de vesículas membranosas, la regulación del tráfico vesicular intracelular cobra una alta importancia durante el estrés salino, ya que se debe mantener y cumplir con los requerimientos celulares del desafío impuesto por el estrés que amenaza la viabilidad de la planta (Pizarro & Norambuena, 2014).

I.2 El tráfico vesicular intracelular.

En eucariontes, el sistema de endomembranas está compuesto de una serie de compartimentos que están interconectados a través de diversas y específicas vías de tráfico de proteínas (Saito & Ueda, 2009). Estos compartimentos son la membrana plasmática, la red de trans Golgi (TGN)/endosoma temprano, retículo endoplasmático, complejo de Golgi, cuerpos multivesiculares/compartimentos prevacuolares (MVB/PVC) y vacuola (Pizarro & Norambuena, 2014). La dirección del cargo de proteínas transportadas y su localización dependen del balance de todas las rutas que afectan su movimiento. El equilibrio de las diferentes rutas determinará la cantidad de proteínas en cada uno de los compartimentos. La capacidad de cambiar este balance podría ser de utilidad cuando la presencia de ciertas proteínas cambia en un compartimento particular, en respuesta a un estímulo o una perturbación (Pizarro & Norambuena, 2014; Uemura & Ueda, 2014), como lo que se puede observar en plantas sometidas a condiciones de estrés salino (Baral et al., 2015a; Baral et al., 2015b) (Figura 1).

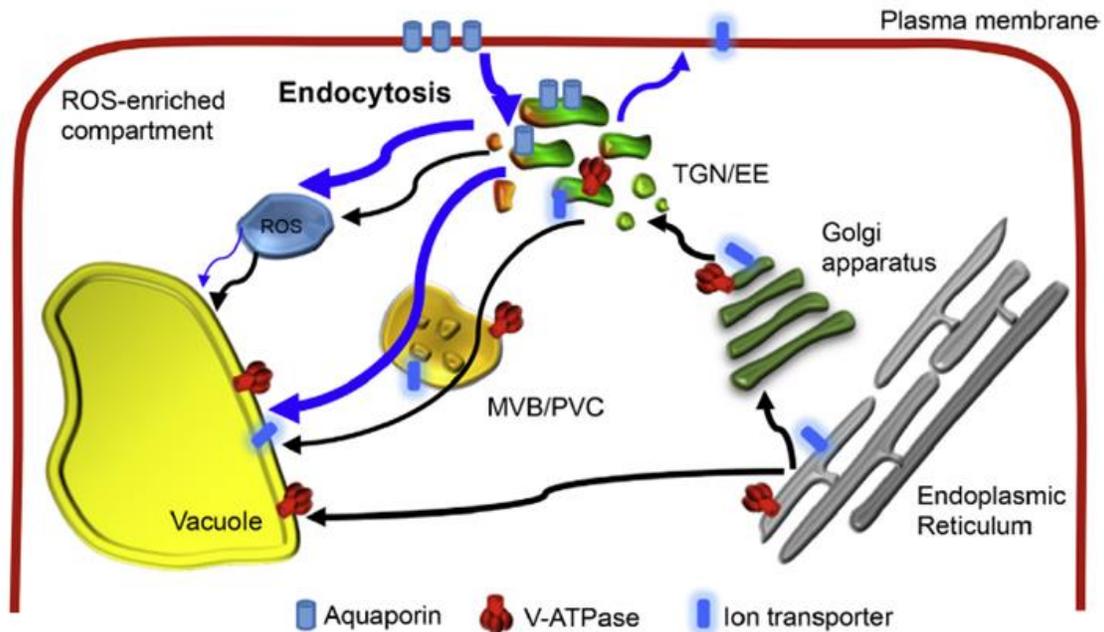


Figura 1: Modulación de las rutas del tráfico endomembranoso bajo condiciones de estrés abiótico. Bajo condiciones de estrés, como la salinidad, se produce un aumento de la endocitosis, lo que conlleva a que proteínas, como las aquaporinas, sean removidas y derivadas hacia el TGN/EE, y algunos transportadores de iones o V-ATPasas, sean relocalizadas y llevadas hacia la membrana plasmática o hacia la vacuola, para mantener la homeostasis celular. Además, la acumulación de ROS en vesículas y la inhibición del tráfico de éstas hacia la vacuola, ayudan a minimizar el estrés oxidativo y mantener la acidez vacuolar (adaptado desde Pizarro & Norambuena, 2014).

En el tráfico vesicular existen diversos componentes claves, entre los que se pueden mencionar fosfatidilinositol-quinasas, fosfatidilinositol-fosfatasas, pequeñas GTPasas, proteínas encargadas de recubrir vesículas (clatrin, COPI, COPII), proteínas SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor) y complejos como TPLATE, que dirigen y regulan procesos específicos en plantas (Paul et al., 2014; Gadeyne et al., 2014).

I.3 SNAREs en el transporte y fusión de vesículas.

Por lo general, el tráfico vesicular ocurre mediante tres pasos importantes: formación de las vesículas desde el organelo donador, movimiento hacia el organelo aceptor, y fusión de

vesículas con la membrana del compartimento aceptor. Una serie de proteínas están involucradas en el anclaje y fusión de las vesículas, para el reconocimiento y dirección de la fusión de membranas. Entre ellas, se ha descrito que las proteínas SNAREs cumplen un rol crítico en este proceso (Saito & Ueda, 2009).

Inicialmente, las proteínas SNARE fueron categorizadas en dos tipos: v-SNAREs (como SNAREs de vesículas) y t-SNAREs (como SNAREs de las membranas aceptoras). Cuando las vesículas se movilizan cerca de su objetivo, una v-SNARE de la vesícula interactúa con tres t-SNAREs situadas en la membrana aceptoras, formando un complejo heterotetramérico de SNAREs que guía la fusión de las membranas (Saito & Ueda, 2009; Pizarro & Norambuena, 2014; Karnik et al., 2015) (Figura 2). Alternativamente, una clasificación basada en la secuencia aminoacídica del dominio SNARE permite clasificarlas en dos grupos: Q-SNAREs (Qa-, Qb-, Qc- (o Qb + Qc)) y R-SNAREs. Esto, debido a que en el centro del dominio SNARE, estas proteínas presentan un residuo arginina (en el caso de las R-SNAREs) o una glutamina (en el caso de las Q-SNAREs) (Saito & Ueda, 2009; Kim & Brandizzi, 2012; Grefen et al., 2015). En concordancia con la primera clasificación, aquellas SNAREs que se encuentran en la vesícula se denominan R-SNAREs y aquellas que se ubican en las membranas de los compartimentos corresponden a Q-SNAREs.

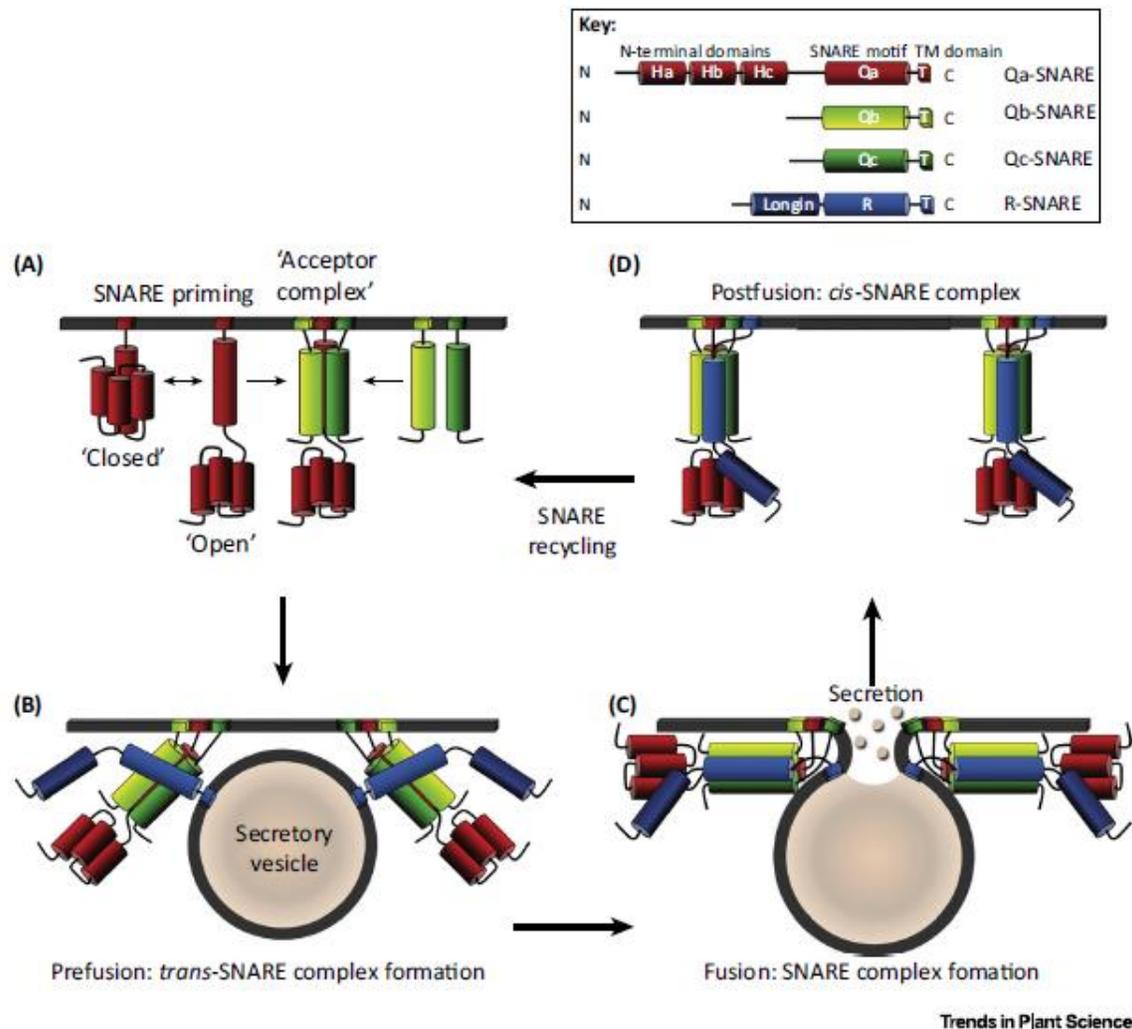


Figura 2: Funcionamiento del ciclo SNARE. (A) Las proteínas SNAREs se preparan para el ensamblaje en la membrana aceptora. (B) Se produce la interacción de las proteínas t-SNAREs con las v-SNAREs situadas en las vesículas. (C) Se produce la fusión de las vesículas con la membrana destino y la posterior liberación del cargo. (D) Luego de la fusión de las vesículas con la membrana destino se produce el desensamble del complejo SNARE y el reciclaje de los componentes participantes del tráfico de vesículas (Karnik et al., 2017).

Existen alrededor de 66 genes que codifican putativas SNAREs en *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative 2000), 57 en *Oryza sativa* (International Rice Genome Sequencing Project 2005), 69 en *Populus trichocarpa* (Sansebastiano & Piro, 2014) y aproximadamente 63 en *Solanum lycopersicum* (Figura 3) (Salinas-Cornejo et al., 2019). Se ha identificado que hay un mayor número de genes para SNAREs en plantas si se compara con otras especies, como hongos y animales. Esto se debe a la expansión del número de

miembros en subfamilias conservadas de estas proteínas y no a la evolución de nuevas isoformas (Sansebastiano & Piro, 2014), lo que podría facilitar el tráfico en un complejo sistema de endomembranas que incluye diferentes pasos de tráfico de la vía endocítica, secretora y vacuolar (Kim & Brandizzi, 2012; Pizarro & Norambuena, 2014).

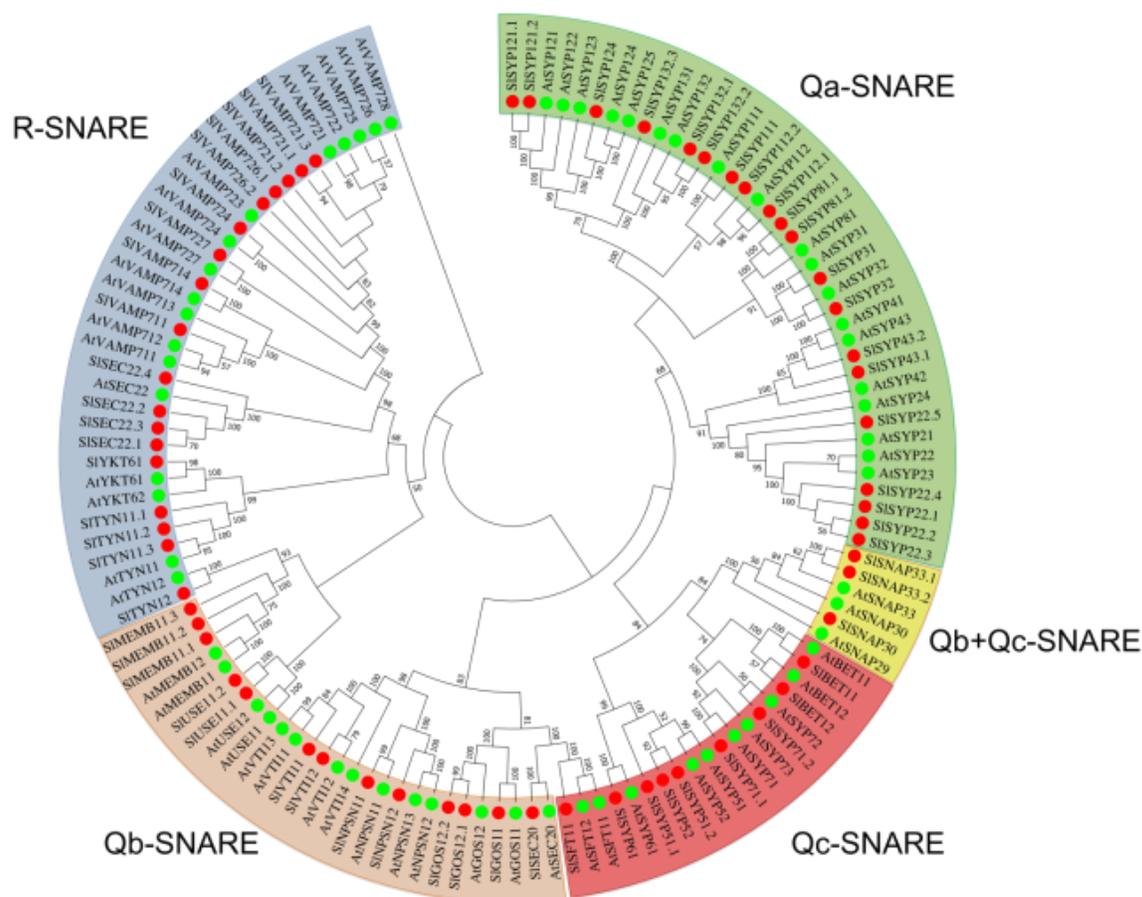


Figura 3: Árbol filogenético de las SNAREs identificadas en *Solanum lycopersicum*. Al igual que la clasificación descrita en *Arabidopsis thaliana*, las SNAREs de tomate se agrupan en Qa, Qb, Qc, Qb+Qc y R-SNAREs. Los círculos rojos indican las SNAREs de tomate y los círculos verdes los miembros de *Arabidopsis thaliana* (Salinas-Cornejo et al., 2019).

El amplio número de SNAREs que se conocen implican una diversidad de funciones de los complejos SNAREs en el tráfico vesicular durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como también durante los eventos que involucran respuestas frente a estrés biótico y

abiótico (Kim & Brandizzi, 2012; Takemoto et al., 2018). Es importante destacar que otras proteínas contribuyen en la función de las SNAREs, lo que aumenta el nivel de complejidad e incluso el nivel de fidelidad y regulación de los procesos biológicos que están mediados por estas proteínas. Es por esto, que se hace necesario conocer e indagar sobre los diferentes roles y procesos en los que están participando estas SNAREs y las respuestas generadas luego de realizada su función.

I.4 Rol de las SNAREs de retículo endoplasmático y Golgi.

En el retículo endoplasmático y el complejo de Golgi han sido localizadas aproximadamente 21 SNAREs (Kim & Brandizzi, 2012). Entre ellas, se ha descrito que la sobreexpresión de *SYP81* (Qa-SNARE) inhibe los tráficos anterógrado y retrógrado y que la sobreexpresión de *SYP31* (Qa-SNARE) inhibe sólo el tráfico anterógrado entre el retículo endoplasmático y el Golgi (Bubeck et al., 2008). También, se identificó otra SNARE que participa en la maquinaria involucrada en el transporte anterógrado y retrógrado entre el retículo y el complejo de Golgi, *SEC22* (R-SNARE), que junto con otros ortólogos presentes en plantas dicotiledóneas forman un grupo cercanamente relacionado (El-Kasmi et al., 2011). Se ha demostrado que en la mutante *atsec22* se ve afectada la morfología del complejo de Golgi, observándose la retención de *SYP124* en el retículo endoplasmático, una Qa-SNARE de membrana plasmática (El-Kasmi et al., 2011). En recientes investigaciones de genoma amplio en tomate se ha identificado que *SEC22* se induce bajo condiciones de estrés salino, lo que sugiere una posible participación en la respuesta frente a condiciones de estrés abiótico (Salinas-Cornejo et al., 2019).

Se ha reportado evidencia que algunas SNAREs tendrían una doble localización (Kim & Brandizzi, 2012). Un ejemplo de esto es *SYP71*, una proteína Qc-SNARE distribuida en el retículo endoplasmático y también en la membrana plasmática (Suwastika et al., 2008). Esto sugiere que *SYP71* podría formar al menos dos complejos SNARE diferentes en la membrana plasmática y en el retículo endoplasmático (Kim & Brandizzi, 2012). Cabe destacar que no se han identificado homólogos de *SYP71* en animales, lo que sugeriría que estaría involucrado en procesos específicos de tráfico vesicular en plantas (Kim & Brandizzi, 2012).

I.5 Rol de las SNAREs de TGN, endosoma y vacuola.

Existe amplia evidencia que indica que en el transporte de vesículas que ocurre entre el TGN, endosoma y vacuola participan alrededor de 21 proteínas SNAREs. La evidencia indica que el TGN representa un cruce de caminos para el tráfico de proteínas hacia la vacuola, ya que las vesículas que contienen cargo vacuolar o secretorio pueden brotar desde el TGN (Kim & Brandizzi, 2012). Entonces, SNAREs específicas deberían facilitar el tráfico anterógrado y retrógrado entre el TGN y endosomas, vacuola y membrana plasmática. Particularmente, dos Qa-SNAREs, SYP41 y SYP42 se ha demostrado que pueden formar complejos diferentes en la red de trans Golgi (Sanderfoot et al., 2001). Más aún, SYP61, una Qc-SNARE que pertenece a la familia de SNAREs SYP4, se ha identificado que participa en el tráfico relacionado con el TGN y se ha asociado con la tolerancia a estrés abiótico (Zhu et al., 2002). Se han localizado otras SNAREs en la ruta que involucra los compartimentos prevacuolares y vacuola. Ejemplo de ello es la familia de Qa-SNAREs SYP2 que posee tres miembros, SYP21, SYP22 y SYP23. Las mutantes de Arabidopsis para estas proteínas son viables, pero la doble mutante *atsyp21/atsyp22* presenta un fenotipo letal (Shirakawa et al., 2010). Al realizar ensayos de complementación de *atsyp22* con *AtSYP21* utilizando el promotor de *AtSYP22*, muestran que SYP21 y SYP22 podrían tener funciones redundantes (Uemura et al., 2010). También, se ha observado que al sobreexpresar *SYP21* existe acumulación de los compartimentos prevacuolares con cargos hacia la vacuola, lo que daría cuenta de una inhibición del tráfico anterógrado en la ruta que comprende los cuerpos multivesiculares y la vacuola (Foresti et al., 2006).

Se ha descrito que miembros de la familia de R-SNAREs VAMP71 están involucrados en la tolerancia a estrés por deshidratación regulando el cierre de estomas, y en la tolerancia a estrés salino inhibiendo la fusión de endosomas, que contienen especies reactivas de oxígeno (ROS) (Leshem et al., 2006; Leshem et al., 2010).

Análisis más profundos sobre los diversos complejos de SNAREs en las rutas que comprenden TGN, endosomas y vacuola podrían proveer información importante sobre la morfología del complejo de Golgi, la biogénesis de la vacuola y las vías de tráfico vesicular asociadas, relacionadas con la especificidad celular, crecimiento y desarrollo de las plantas. La evidencia podría indicar que, probablemente, las plantas hayan desarrollado un transporte

de vesículas específico para sobrellevar los diferentes tipos de estrés medioambientales a los que se ve sometida (Kim & Brandizzi, 2012).

I.6 Rol de las SNAREs en membrana plasmática.

La exocitosis denota la fusión de vesículas hacia la membrana plasmática y es el paso final de la ruta secretora, que comienza en el retículo endoplasmático, pasando a través del complejo de Golgi y terminando en el exterior de la célula (Battey et al., 1999; Kwon & Yun, 2014). La endocitosis, en cambio, involucra la internalización o retiro de proteínas desde la membrana plasmática o la incorporación de materiales extracelulares hacia el interior de la célula, a través de una serie de compartimentos vesiculares que juegan un rol fundamental en la intercomunicación entre células y la respuesta celular a diferentes estímulos (Chen et al., 2011; Fan et al., 2015; Zhang et al., 2019).

Se han identificado 23 SNAREs en membrana plasmática, que podrían permitir la entrega de diferentes tipos de vesículas en respuesta a señales específicas de desarrollo y estrés biótico/abiótico (Kim & Brandizzi, 2012). Por ejemplo, se ha demostrado que la familia de Qa-SNAREs, SYP121, está involucrada en la regulación de los canales de K⁺ dentro de la célula (Sutter et al., 2006; Grefen et al., 2015) y también se ha relacionado su participación bajo condiciones de estrés abiótico (Besserer et al., 2012). Diversos estudios indican que las familias de Qa-SNAREs AtSYP11, AtSYP12 y AtSYP13 en la membrana plasmática realizan una diversa pero redundante función en la membrana (Kim & Brandizzi, 2012). Se ha encontrado que AtSYP132 podría complementar una mutante para *atsyp111*, que presenta defectuoso el proceso de citocinesis, e incluso el reemplazo del dominio SNARE de AtSYP111 con el de AtSYP132 es capaz de rescatar el fenotipo mutante para *atsyp111* (Reichardt et al., 2011).

Un análisis sistemático de proteínas SNAREs en Arabidopsis reveló la existencia de R-SNAREs participando en el tráfico vesicular entre la membrana plasmática y el endosoma/TGN, entre las que se mencionan AtVAMP721 y AtVAMP722 (Uemura et al., 2004). Se ha descrito que AtVAMP721 y AtVAMP722 participan durante la formación de la placa celular en el proceso de citocinesis, donde estas R-SNAREs facilitarían el tráfico de proteínas y moléculas en el plano de división celular (Zhang et al., 2011). Además,

AtVAMP721 interactúa con los canales de potasio KAT1 y KC1, encargados de mantener la corriente de los canales de K^+ (Zhang et al., 2015). Junto con estas funciones, también se ha encontrado que algunos miembros de la familia de R-SNAREs VAMP72 estarían implicados en la tolerancia de plantas frente a condiciones de estrés salino (Sun et al., 2012).

I.7 Rol de las proteínas SNARE y SNARE-like frente a estrés salino.

La remoción de transportadores y canales iónicos desde la membrana plasmática a través del proceso de endocitosis, seguido por la degradación en las vacuolas, ha sido sugerido como un mecanismo común para prevenir la toxicidad en plantas bajo condiciones de estrés salino (Baral et al., 2015a). Gran parte del cargo endocitado termina en la vacuola y sujeto a degradación, o bien, otra parte es reciclado nuevamente hacia la membrana plasmática y otra menos común es reorientada y mantenida en estructuras prevacuolares. Debido a estas múltiples rutas de tráfico vesicular involucradas durante el estrés salino y la función indispensable de las SNAREs en este mecanismo, es que se han intensificado las investigaciones de su posible rol en la tolerancia a estrés salino (Saito & Ueda, 2009; Pizarro & Norambuena, 2014). Entre los estudios realizados destaca los efectuados con los genes que codifican para proteínas de la familia SYP4, asociadas a estrés abiótico, donde se ha observado que plantas doble mutantes para *SYP42* y *SYP43* (*syp42/syp43*) muestran efectos pleiotrópicos en su crecimiento y desarrollo. Además, estas plantas presentaron hipersensibilidad a estrés salino, planteando así que estas proteínas juegan un rol importante en la tolerancia bajo estas condiciones (Uemura et al., 2012).

Recientemente, se ha reportado que la sobreexpresión de GsSNAP33, un gen que codifica para una proteína de tipo Qb+Qc-SNARE de membrana plasmática, en *Arabidopsis thaliana* aumenta significativamente la tolerancia a estrés salino modificando el contenido de clorofila de las plantas y mostrando un mayor largo de raíces (Nisa et al., 2017). También, se ha identificado que la sobreexpresión del gen *AtSFT12*, que codifica para una Qc-SNARE localizada en el complejo de Golgi, confiere tolerancia a estrés salino en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Esto se explica debido a que las plantas que sobreexpresan *AtSFT12* estarían acumulando en mayor cantidad el exceso de sodio en la vacuola (Tarte et al., 2015). Aunque la sobreexpresión de los genes para estas SNAREs residentes de TGN/Golgi confiere

tolerancia a estrés salino, el silenciamiento de dos genes para SNAREs localizadas en vacuola, VAMP711 y SYP22, tienen el mismo efecto (Leshem et al., 2006; Hamaji et al., 2009), ya sea compartimentando especies reactivas de oxígeno en pequeñas vesículas o acumulando el Na⁺ en cuerpos multivesiculares. De hecho, en las mutantes de *vamp711* y *syp22* se bloquearía la fusión de vesículas con la vacuola, generando tolerancia a estrés salino. Esto se ha asociado con la endocitosis de NADPH oxidasas de membrana plasmática, resultando en la producción de peróxido de hidrógeno al interior de vesículas, evitando la movilización del ROS hacia la vacuola (Leshem et al., 2006). Bajo estrés salino, las especies reactivas de oxígeno cumplen un rol fundamental, pues activan las diferentes vías de regulación para promover la tolerancia. Sin embargo, la excesiva producción de éstas induce la muerte celular programada (Apel & Hirt, 2004). Así como se induce la remoción de RbohD desde la membrana plasmática, también se activa la compartimentación de ROS, regulándose la concentración de ROS citoplasmático (Martinière et al., 2019). De esta manera, se postula que la reducción de ROS disminuye el daño oxidativo de la vacuola y se previene su alcalinización, por consiguiente, se promueve el funcionamiento del gradiente de H⁺ que permitiría retirar el exceso de sodio citoplasmático (Leshem & Levine, 2007; Baral et al., 2015b).

Gran parte de los estudios mencionados hasta ahora han sido realizados en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, en especies de interés agronómico como *Solanum lycopersicum*, estos estudios eran desconocidos. Recientemente, se realizó la identificación y análisis transcripcional de las SNAREs en tomate en respuesta a estrés salino, donde el estudio de los perfiles de expresión en plantas de tomate bajo una condición de 300 mM de NaCl mostró que algunos genes SNARE, entre ellos *SIVAMP721.2*, *SISYP71.1* y *SISNAP33.2*, podrían estar cumpliendo un rol bajo condiciones de estrés salino y ser considerados candidatos en futuros estudios asociados con estrés abiótico (Salinas-Cornejo et al. 2019). Precisamente, se publicó que uno de estos genes, *SISNAP33.2*, aumentó la tolerancia a estrés salino modulando la endocitosis y mejorando los parámetros fisiológicos y bioquímicos en *Solanum lycopersicum* (Figura 4) (Salinas-Cornejo et al., 2021).

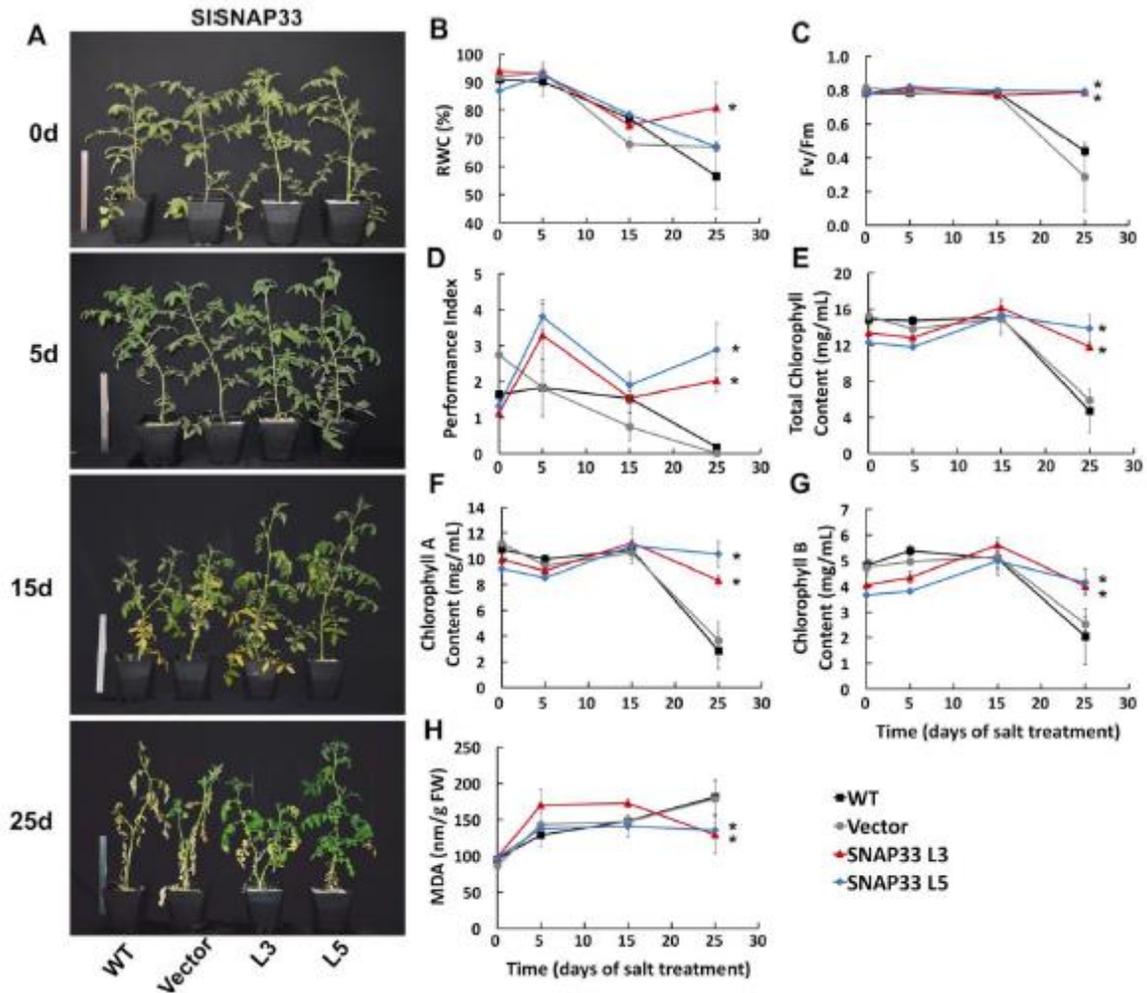


Figura 4: La sobreexpresión de *SISNAP33.2* de *S. lycopersicum* aumenta la tolerancia a estrés salino en plantas de tomate. Se observa una mejor respuesta fisiológica y bioquímica de las líneas sobreexpresoras a los 25 días de tratamiento salino. (A) Morfología de las plantas de tomate sometidas a estrés salino durante 25 días. (B - H) Parámetros fisiológicos medidos en plantas WT y Vector (líneas control) y L3 y L5 (líneas sobreexpresoras). (B) Contenido relativo de agua (RWC), (C) Eficiencia del fotosistema II (Fv/Fm), (D) Índice de rendimiento (PI), (E) Contenido de clorofila total, (F) Contenido de clorofila A, (G) Contenido de clorofila B, (H) Contenido de malondialdehído (MDA) (Salinas-Cornejo et al., 2021).

También se han realizado investigaciones que involucran especies tolerantes a la alta salinidad, como el caso de *Solanum chilense*, conocido comúnmente como tomate silvestre o tomatillo, que habita zonas desérticas extremas del norte de Chile (Tapia et al., 2016). Esta característica lo hace una especie modelo en lo que respecta a la tolerancia a estrés salino y es utilizada como fuente de recursos genéticos para usos biotecnológicos en el laboratorio de

Genómica Funcional de la Universidad de Talca. Interesantemente, en un estudio realizado por Zhou et al. (2011) utilizando el proteoma de plantas de *S. chilense* sometidas a estrés salino, se identificó que una SNARE denominada vesical transport v-SNARE 12 (VTI12) presentó una disminución en la tasa de cambio (de acuerdo con el criterio establecido en el experimento). Anteriormente, se identificó en *Arabidopsis thaliana* que el ortólogo de esta proteína participa en el transporte entre el complejo de Golgi y la vacuola (Sanmartín et al., 2007). Asimismo, el análisis de los patrones de expresión de algunas SNAREs, como *SchVAMP721.2* y *SchSNAP33.2*, mostraron una alta inducción a las 12 horas en plantas de *Solanum chilense* sometidas a estrés salino (Salinas-Cornejo et al., 2019).

Con el secuenciamiento masivo de los genomas de plantas, animales y microorganismos y su posterior análisis han revelado la existencia de una superfamilia de genes que codifican para unas proteínas que presentan una alta homología con las SNAREs (Wesolowski and Paumet, 2010; Ronzone & Paumet, 2013), por los que se les denomina *SNARE-like*. Funcionalmente, las proteínas SNARE-like imitan a las SNAREs presentes en eucariontes, ya que participan en el anclaje y posterior fusión de vesículas con sus membranas de destino (Weber et al., 2016). Se ha descrito que estas proteínas tienen secuencias repetidas que forman estructuras “coiled-coil” y en el centro del dominio SNARE poseen los residuos canónicos arginina o glutamina, características similares a las SNAREs. El uso de este criterio muchas veces dificulta la identificación de motivos SNARE-like desde datos genómicos, ya que, en algunos casos, estos motivos están constituidos por otros aminoácidos que se encuentran en el centro del dominio (Delevoye et al., 2008). A pesar de ello, se ha descrito la participación de este tipo de proteínas en diferentes procesos biológicos de plantas (Banfield et al., 1995; Mai et al, 2006). Tal es el caso de una SNARE-like de *Arabidopsis thaliana*, denominada LOLITA (Longin-like protein interact with TPLATE adaptor), que tiene una participación en la endocitosis mediada por clatrin (Gadeyne et al., 2014). Se ha descrito que esta proteína SNARE-like de *Arabidopsis* se encuentra localizada en la membrana plasmática, actuando como una proteína adaptadora en conjunto a otras 7 proteínas, formando lo denominado complejo TPLATE (Figura 5). Este complejo TPLATE dirige la endocitosis mediada por clatrin (Gadeyne et al., 2014; Yperman et al., 2021) y es específico de plantas y esencial para su sobrevivencia. Estudios más recientes muestran que la sobreexpresión de una *SNARE-like* que codifica para una proteína localizada en membrana

plasmática de la planta halófila *Salicornia brachiata*, denominada SbSLSP, en plantas de tabaco es capaz de conferir tolerancia bajo condiciones de estrés salino, manteniendo la homeostasis celular, aumentando la detoxificación de especies reactivas de oxígeno y mejorando los parámetros fisiológicos y bioquímicos (Singh et al., 2016). Esta SNARE-like se presenta como una potencial candidata para aumentar la tolerancia a la salinidad en plantas que son sensibles a este tipo de condiciones de estrés abiótico, y estimulan la investigación sobre el rol de este tipo de proteínas en estrés salino en otras especies de plantas.

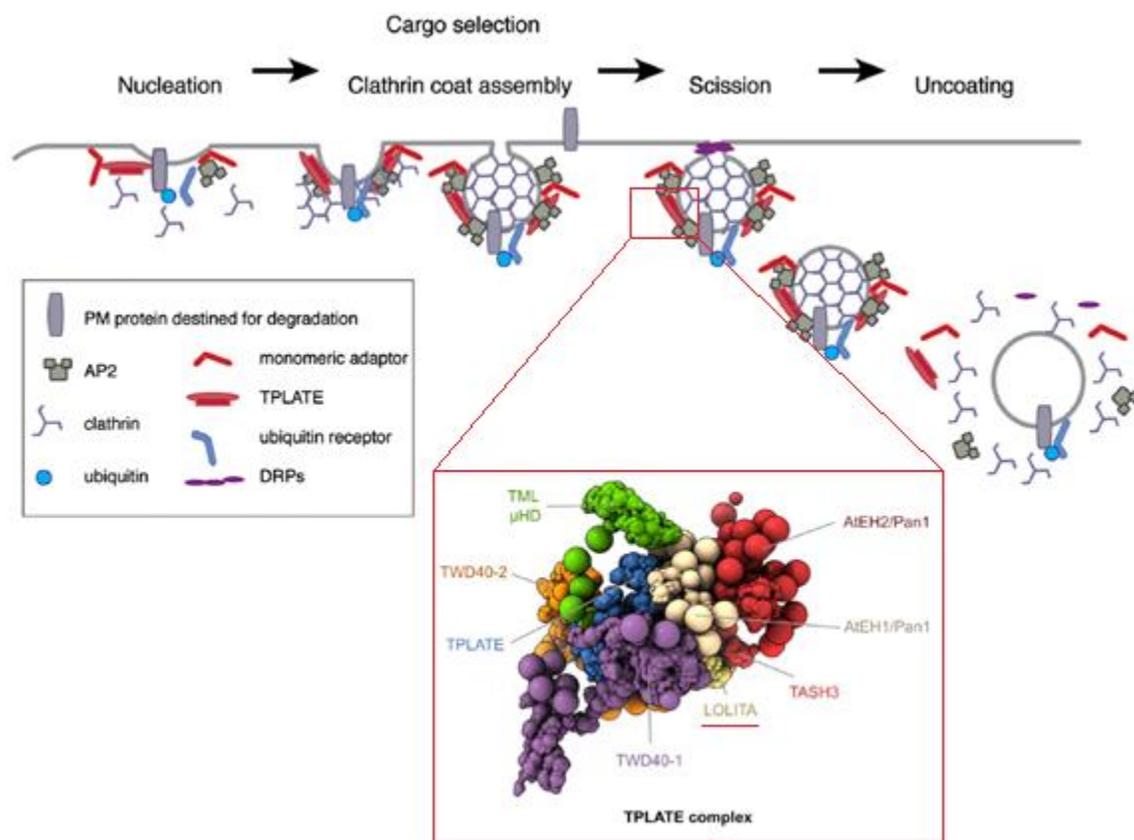


Figura 5: Secuencia de pasos que median la endocitosis mediada por clatrina. Entre los componentes que participan se encuentran las proteínas adaptadoras del complejo TPLATE, formado por 8 proteínas adaptadoras, entre ellas una SNARE-like (LOLITA). (Adaptado de Schwihla & Korbei, 2020; Yperman et al., 2021).

En base a los antecedentes planteados, se puede decir que bajo condiciones de estrés salino las proteínas SNARE cobran gran importancia, ya que las evidencias muestran que la

sobreexpresión de determinados genes *SNAREs* o *SNARE-like* conduce a un aumento en la tolerancia a estrés salino. Sin embargo, cuál de ellas y qué funciones estarían ejerciendo en plantas de importancia agronómica bajo condiciones de estrés salino, como es el caso de *Solanum lycopersicum*, aún no ha sido dilucidada. Por lo tanto, en esta tesis se planteó estudiar los efectos de la sobreexpresión de un gen *SNARE-like* en plantas de *Solanum lycopersicum* sometidas a condiciones de alta salinidad. Se propuso que, si la sobreexpresión de *SbSLSP* genera tolerancia a estrés abiótico en plantas de tabaco, entonces la sobreexpresión de un gen que codifica para una *SNARE-like* homóloga de tomate generará una mayor tolerancia a estrés salino, debido a un aumento en el tráfico vesicular en *S. lycopersicum*. Para ello, se identificaron los putativos genes que codifican para *SNARE-like* en el genoma de *S. lycopersicum* y se compararon sus niveles de expresión durante estrés salino, con el propósito de identificar cuál de estos genes presenta expresión diferencial, el cual fue seleccionado como candidato para las siguientes etapas de la investigación, que consistieron en la determinación de los efectos de su sobreexpresión en la tolerancia a estrés salino en plantas de *Solanum lycopersicum* mediante la medición de parámetros fisiológicos y bioquímicos. Posteriormente se determinó la localización subcelular de *SNARE-like*, para luego analizar la tasa endocítica, la acumulación de peróxido de hidrógeno y medir el contenido de sodio vacuolar bajo condiciones de estrés salino. De esta manera, los resultados obtenidos aquí servirán de base para realizar evaluaciones sobre el uso de este tipo de genes en programas asociados con mejoramiento genético y tolerancia a estrés salino en plantas de tomate.

HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Considerando que:

- Las SNAREs participan en el tráfico vesicular, específicamente en el anclaje y posterior fusión de las vesículas con la membrana del organelo o compartimento de destino, rol indispensable para asegurar la localización específica del cargo transportado.
- Se ha descrito que la sobreexpresión de genes para diferentes SNAREs genera tolerancia a estrés salino en plantas, mediante la internalización del exceso de sodio en la vacuola.
- Las proteínas SNARE-like imitan a las SNAREs presentes en eucariontes, ya que participan en el anclaje y posterior fusión de componentes vesiculares.
- Últimamente, se reportó que la sobreexpresión de *SbSLSP* de membrana plasmática de la planta halófila *Salicornia brachiata* en plantas de tabaco es capaz de conferir tolerancia bajo condiciones de alta salinidad, mejorando los parámetros fisiológicos y bioquímicos.
- El rol que estaría cumpliendo SNARE-like en *Solanum lycopersicum*, aún no ha sido dilucidado.

Dado los antecedentes previamente expuestos, se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

“Si la sobreexpresión de *SbSLSP* de *Salicornia brachiata* genera tolerancia a estrés abiótico en plantas de tabaco, entonces la sobreexpresión de un gen que codifica para una SNARE-like homóloga de tomate generará una mayor tolerancia a estrés salino, debido a un aumento en el tráfico vesicular en *Solanum lycopersicum*”.

OBJETIVOS.

Objetivo general:

Evaluar el rol de la proteína SNARE-like en la tolerancia de plantas de *Solanum lycopersicum* frente al estrés salino y su relación con las modificaciones generadas en el tráfico vesicular.

Objetivos específicos:

1. Identificar los genes que codifican para SNARE-like en plantas de *Solanum lycopersicum* y aquellos que presentan expresión diferencial frente a estrés salino.
2. Evaluar los efectos de la sobreexpresión de *SNARE-like* sobre los parámetros fisiológicos y bioquímicos en plantas de *Solanum lycopersicum* sometidas a estrés salino.
3. Determinar la localización subcelular de SNARE-like de *Solanum lycopersicum*.
4. Evaluar el efecto en la tasa endocítica, la acumulación de ROS y su correlación con el contenido de sodio vacuolar en plantas de *S. lycopersicum* que sobreexpresan el gen *SNARE-like*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

II.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.

El material biológico que se utilizó en este estudio corresponde a plantas de tomate *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker, cultivadas y masificadas en cámaras de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura de 25 °C, las cuales fueron utilizadas en ensayos de estrés salino y para estudios del efecto de la sobreexpresión de *SNARE-like*.

Se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) que se encuentran almacenadas en los repositorios del Laboratorio de Genómica Funcional del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Talca, las cuales fueron sembradas en un macetero plástico de 0,5 L con mezcla de perlita, vermiculita y turba (1:1:1) como sustrato. Luego de 15 días post germinación, las plántulas se traspasaron a maceteros plásticos de 2 L que contenían perlita, vermiculita y turba (1:1:1) y fueron regadas 1 vez por semana con una solución nutritiva de concentración 1,1 g/L de medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962), para continuar con su crecimiento, desarrollo y posterior propagación por esquejes. Además, se utilizaron plantas clónicas de tomate silvestre *Solanum chilense* (Dunal) Reiche, las cuales fueron propagadas a partir de esquejes enraizados en agua; una vez emergidas las raíces, las plántulas fueron tratadas bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Al cabo de 10 – 12 semanas, estas plantas fueron utilizadas en ensayos de estrés salino para realizar análisis de cuantificación de los niveles de expresión génica de *SNARE-like*, tanto en tejido foliar como en tejido radicular.

II.2 Análisis *in silico* de los genes que codifican para SNARE-like en plantas de tomate.

Utilizando la secuencia aminoacídica deducida de SbSLSP (SNARE-like Superfamily Protein) de *Salicornia brachiata* (Singh et al., 2016) se buscó en el genoma de *Solanum lycopersicum* aquellas secuencias de proteínas que presentaron alta identidad, para lo cual se usó la base de datos SolGenomics (<http://www.solgenomics.net>). De esta búsqueda se consideraron 3 secuencias para continuar con los siguientes análisis, denominadas *SISLSP3*, *SISLSP6* y *SISLSP11*. Se usó la herramienta disponible online TMHMM – 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) (Krogh et al., 2001) para la

predicción de dominios transmembrana y el software MUSCLE para alineamiento de secuencias. La determinación y análisis de los dominios conservados de SISLSP3, SISLSP6 y SISLSP11 se realizó con el programa BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) y Pfam, respectivamente. Para establecer la relación de estas SNARE-like con sus homólogos de otras especies de plantas se construyó un árbol filogenético usando el programa MEGA v. 6.1 (<http://www.megasoftware.net>) (Tamura et al., 2013) empleando el método neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) con análisis bootstrap de 1000 réplicas.

II.3 Tratamiento de estrés salino y mediciones de parámetros fisiológicos y bioquímicos en la determinación de los perfiles de expresión.

II.3.1 Tratamiento de estrés salino.

Para determinar el perfil de expresión de los genes SNARE-like de tomate, plantas wild-type de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Moneymaker y plantas de *S. chilense* de 10 – 12 semanas de edad aproximadamente y con características homogéneas fueron seleccionadas para el ensayo de estrés salino. Las plantas fueron regadas una sola vez con 400 mL de una solución salina (300 mM de NaCl) y mantenidas durante 72 horas; se tomaron muestras de hoja y raíz por cada individuo en los períodos 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas de tratamiento con estrés salino, considerando 3 individuos por cada tiempo. En el caso de las muestras que se recolectaron de tejido foliar, se consideró una mezcla de hojas nuevas (superiores), maduras (inferiores) y de la zona media; y se dispuso de un set de plantas control sin aplicación de tratamiento en cada uno de los tiempos considerados para el ensayo de estrés salino. Las muestras recolectadas fueron rápidamente congeladas con nitrógeno líquido, rotuladas y almacenadas a -80 °C, para posteriormente ser analizadas.

II.3.2 Medición de parámetros fisiológicos y bioquímicos.

Con el objetivo de determinar alteraciones en los parámetros fisiológicos producto del estrés al que se encuentran sometidas las plantas, se realizaron las siguientes mediciones:

- **Contenido relativo de agua (RWC):** Determinaciones del RWC fueron estimadas de acuerdo con el protocolo modificado de Maggio et al. (2007) y Vázquez – Robinet et al. (2008), donde $RWC = [(FW - DW) / (TW - DW)] \times 100$. Tres hojas del mismo tamaño y localización en la planta fueron pesadas (peso fresco, FW) y luego, incubadas en agua destilada por 24 horas a temperatura ambiente en absoluta oscuridad por toda la noche. Al cabo de este tiempo, el exceso de agua fue removido con un papel absorbente antes de pesar nuevamente (peso turgente, TW) y finalmente, las muestras fueron secadas a 60 °C por 48 horas, hasta alcanzar un peso constante para la determinación del peso seco (DW).
- **Fotosíntesis neta (Pn) y conductancia estomática (Gs):** Se utilizó el equipo CIRAS-2 (PP System, Amesbury, MS, USA) en un horario establecido entre las 9:00 y las 11:00 horas, realizando las mediciones en las hojas medias de cada planta. La primera medición se realizó al momento del inicio del ensayo de estrés (0 horas) y las mediciones posteriores se realizaron a las 24, 48 y 72 horas después de iniciado el tratamiento.
- **Niveles de expresión de los genes *SNARE-like* y marcadores de estrés (qRT-PCR) en hojas y raíces:** se analizaron los perfiles de expresión de los genes *SNARE-like* identificados en tomate *SISLSP3*, *SISLSP6* y *SISLSP11*, los genes *AREB1* (Orellana et al., 2010) y *TSW12* (Torres-Schumann et al., 1992; San Martín-Davison et al., 2017) como marcadores de estrés, en conjunto con los genes constitutivos *Ubiquitin3* y *GAPDH* (Yáñez et al., 2009; Orellana et al., 2010) en hojas y raíces de plantas de *S. lycopersicum* y *S. chilense*.

II.4 Aislamiento y purificación de RNA total y síntesis de cDNA.

El RNA total fue extraído de hojas y raíces (aproximadamente 100 mg por cada tejido vegetal) de plantas de *S. lycopersicum* y *S. chilense* a los diferentes tiempos del ensayo de estrés salino, usando el kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo el protocolo descrito por los proveedores. Con el fin de eliminar el DNA remanente luego de la extracción de RNA, cada muestra fue tratada con DNasa I (Ambion® TURBO DNA-free™). La concentración y pureza del RNA fue cuantificada y estimada a

260/280 nm, en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

La reacción de transcripción reversa para síntesis de la primera hebra de cDNA se realizó sobre 1 – 2 µg de RNA total tratado con DNAsa. Para estas reacciones se utilizó el sistema kit First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) en un volumen final de 20 µL, conteniendo: 10 µL de RNA (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 a 37 °C por 60 min y un periodo de incubación final a 70 °C por 5 min para detener la reacción. Las muestras de cDNA se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

II.5 Reacciones de PCR y PCR cuantitativa o en tiempo real (qRT - PCR).

Considerando que no se dispone de la secuenciación del genoma de *Solanum chilense* para el diseño de partidores, tanto para *S. lycopersicum* como para *S. chilense*, se utilizaron como referencias las secuencias de los genes homólogos de *S. lycopersicum*, información disponible en la base de datos de SolGenomics (Tabla 1).

Para las diferentes reacciones de PCR y qRT-PCR realizadas se utilizaron los siguientes primers u oligonucleótidos:

Tabla 1: Secuencias nucleotídicas de los partidores utilizados en esta investigación.

Gen	Partidor	T° de aneling (°C)
Partidores utilizados en qRT-PCR		
<i>SLSP3</i>	Fw: 5'-TCAACGCCTGAAAACGCGA-3'	58
	Rv: 5'-AGGATGTTGCCGTCAGAGTT-3'	
<i>SLSP6</i>	Fw: 5'-AAAAATGCTGCTAGCGGTGC-3'	58
	Rv: 5'-AAAAGACCGCCAATGCAGAC-3'	
<i>SLSP11</i>	Fw: 5'-ATGTTGCTTGCTGTGTTGATAGC-3'	58
	Rv: 5'-TACTCCTTTAAGATTTTCTGCCCC-3'	
<i>Ubiquitin3</i>	Fw: 5'-GAAGAAGAAGACCTACACCAAGCC-3'	58

	Rv: 5'-CACTCCTTACGAAGCCTCTGAAC-3'	
<i>GAPDH</i>	Fw: 5'- ACAACTTAACGGCAAATTGACTGG-3'	58
	Rv: 5'-TAACCCTCTGATTCCTCCTTGATTG-3'	
<i>AREB1</i>	Fw: 5'-CAGGTTTAATGGCTGGTAGTATCCC-3'	58
	Rv: 5'-GCTGTGATTGTTGGTTCTGTTGC-3'	
<i>TSW12</i>	Fw: 5'-CTCCACGGTTCAGTAAAG-3'	58
	Rv: 5'-CCATAAGCAGGATCACAC-3'	
<hr/>		
Partidores utilizados para amplificar el marco de lectura abierto		
<i>SISLSP6</i>	Fw: 5'-TTCTAGAATGCTGCTAGCGGTGCTATT-3'	58
	Rv: 5'-TGAGCTCTCAGAAATCGGTGGGTG-3'	
<hr/>		
Partidores utilizados para localización subcelular		
<i>GFP-SISLSP6</i>	Fw: 5'-TCTAGAAATGCTGCTAGCGGTGC-3'	58
	Rv: 5'-GGATCCTCAGAAATCGGTGGGT-3'	

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ L la cual contenía DNA plasmidial o genómico, tampón PCR 1X, MgCl₂, dNTPs, los oligonucleótidos correspondientes y la enzima Taq polimerasa. La reacción se realizó mediante el siguiente programa; 95 °C 5 min, (95 °C 1 min, 55 °C 1 min., 72 °C 2 min) por 35 ciclos y seguido por 5 min a 72 °C. El producto obtenido fue separado electroforéticamente y visualizado en gel de agarosa al 1% en tampón TAE.

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo utilizando el sistema Brilliant SYBR Green QPCR MasterMix (Stratagene, La Jolla, CA) en un termociclador DNA engine Opticon 2 Cycler System (MJ Research, Watertown, MA). Todas las reacciones se realizaron utilizando la mezcla SYBR Green Master Mix (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada muestra (tres réplicas biológicas), la qRT-PCR se llevó a cabo por triplicado (repeticiones técnicas) utilizando 10 μ L Master Mix, 0.5 μ L de partidores 250 nM, 1 μ L de cDNA diluido y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 μ L. Las condiciones de los ciclos de qRT-PCR fueron las siguientes: 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s, T_m °C según el partidor específico durante 20 s y 72 °C durante 20 s. El análisis de la curva de “melting” se realizó de manera rutinaria después de

40 ciclos para verificar la especificidad de los partidores (eficiencia calculada mínima del 95%). Se aplicó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para calcular el cambio en veces de los niveles de transcripción de genes (Livak & Schmittgen, 2001). Los transcritos de tomate se normalizaron utilizando los genes Ubiquitin3 (accesión X58253) y GAPDH (accesión U97257) (Yáñez et al., 2009; Orellana et al., 2010). Todos los productos qRT-PCR obtenidos de *S. chilense* y *S. lycopersicum* se secuenciaron previamente para corroborar la especificidad de los partidores y la identidad del gen.

II.6 Transformación de plantas de tomate.

Para la transformación de plantas de tomate *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker que sobreexpresan el gen *SISNARE-like*, el cDNA completo de *SISLSP6* fue insertado entre los sitios de restricción XbaI-BamHI, en reemplazo del gen removido *b-glucuronidasa* (gen *GUS*) del vector binario pBI121 (Clontech, Palo Alto, CA, USA), bajo el control del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor CaMV 35S. Por otro lado, plantas de tomate *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker fueron transformadas utilizando el vector binario pBI121 sin modificar, las cuales fueron utilizadas como un grupo de plantas control. Estas construcciones fueron introducidas en cepas quimiocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Luego, las bacterias fueron sembradas en medio sólido YM (0.04% p/v de extracto de levadura, 1% p/v de manitol, 1.7 mM NaCl, 0.8 mM MgSO₄·7H₂O y 1.5 p/v de agar) y crecidas a 28 °C con los antibióticos kanamicina (50 mg/mL), gentamicina (100 mg/mL) y rifampicina (100 mg/mL). Las colonias transformadas fueron analizadas por PCR. Las bacterias recombinantes fueron utilizadas para transformar explantes de cotiledones, lo cual se realizó de acuerdo con el método de Fillati *et al.* (1987). Las plantas fueron seleccionadas en antibiótico kanamicina (50 mg/mL) y micropropagadas continuamente para mantener un stock de biomasa vegetal. Estas plantas *in vitro* corresponden a las líneas transgénicas T₀, las cuales fueron analizadas por PCR para detectar la inserción del gen, así como los niveles de transcrito mediante qRT-PCR. Posteriormente, un grupo de plantas sin transformar (WT), plantas transformadas con el vector vacío (LC) y plantas transformadas con el gen de interés (líneas L9, L10 y L13) fueron utilizadas para los respectivos análisis.

II.7 Medición de parámetros de tolerancia frente condiciones de estrés salino.

Para analizar el comportamiento de las plantas frente a condiciones de estrés salino, plantas clones con tamaño y número de hojas homogéneo para cada uno de los grupos de plantas de esta investigación (WT, LC, L9, L10 y L13) fueron crecidas en macetas con sustrato perlita y vermiculita (1:1), las cuales fueron sometidas a riego con 200 mL de una solución salina 300 mM NaCl cada 72 horas. Para el ensayo de estrés salino se consideraron los tiempos 0, 5, 15 y 25 días de estrés. Cada tiempo del ensayo experimental contenía 3 individuos como réplicas biológicas y en cada tiempo se muestrearon los respectivos especímenes. El tiempo total del ensayo fue de 25 días y se midieron los siguientes parámetros fisiológicos y bioquímicos:

- **Clorosis y marchitez:** para detectar la clorosis y marchitez de las plántulas de tomate, se realizó una inspección visual de estos parámetros, considerando las plantas de tomate transgénicas sometidas a condiciones de estrés salino, las cuales fueron comparadas con las plantas control.
- **Contenido relativo de agua:** Determinaciones del RWC fueron estimadas utilizando la fórmula $RWC = [(FW - DW) / (TW - DW)] \times 100$, de acuerdo con el protocolo modificado de Maggio et al. (2007) y Vázquez – Robinet et al. (2008).
- **Eficiencia de PSII (Fv/Fm) e índice de rendimiento (PI):** Estas mediciones fueron obtenidas utilizando un fluorómetro de mano (Hansatech, King's Lynn, Norfolk, England) siguiendo el procedimiento descrito por Giorio (2011).
- **Contenido de clorofila:** Discos de hoja provenientes de tres plantas independientes fueron molidos e incubados con 80% acetona (v/v) y luego las muestras fueron centrifugadas. Se midió la absorbancia del sobrenadante utilizando el espectrofotómetro NanoQuant (UV-160A, Kyoto, Japan), utilizando el método descrito por Lichtenthaler & Wellburn (1983).
- **Peroxidación de lípidos:** el producto malondialdehído (MDA) generado por lipoperoxidación de ácidos grasos, indicador de oxidación de lípidos de membrana producto del estrés oxidativo, fue determinado de acuerdo con el protocolo modificado de Dionisio-Sese & Tobita (1998) y Ghanem (2008). La concentración

se obtuvo mediante la sustracción de la absorbancia entre 600 y 532 nm, luego el valor resultante fue multiplicado usando el coeficiente de extinción molar de $155 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

II.8 Localización subcelular

La determinación de la localización subcelular de SISLSP6 se realizó utilizando células de raíz de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 10 días de edad, las cuales se encontraban transformadas con diferentes marcadores de organelos (unidos al marcador mCherry), que se detallan a continuación: RabG3f-mCherry (Germplasm ID CS781670) que corresponde a endosoma tardío/vacuola, RabF2a-mCherry (Germplasm ID CS781672) que corresponde a endosoma tardío/compartimentos prevacuolares, VAMP711-mCherry (Germplasm ID CS781673) que corresponde a vacuola, VTI12-mCherry (Germplasm ID CS781675) que corresponde a endosoma temprano/TGN, SYP32-mCherry (Germplasm ID CS781677) que corresponde a complejo de Golgi y PIP1;4-mCherry (Germplasm ID CS781687) que corresponde a membrana plasmática (Geldner et al., 2009). Estas plántulas de *Arabidopsis* fueron transformadas de forma transitoria utilizando la construcción 35S::GFP-SISLSP6, que contiene el gen de interés fusionado a la proteína Green Fluorescent Protein (GFP). El gen de interés fue amplificado utilizando partidores forward y reverse que incluyeron los sitios de restricción XbaI y BamHI, respectivamente. El vector utilizado para la transformación transitoria fue el vector pAM1, el cual deriva de los vectores pGreen0029 y pA7-GFP (Katrin Czempinski, Universidad de Postdam, Alemania), conteniendo una versión mejorada del promotor CaMV 35S. El gen candidato fue insertado en los sitios XbaI-BamHI del vector pAM1 en orientación C-terminal del gen GFP. Para la transformación, se utilizó una adaptación de la técnica realizada por Wu et al., (2014), denominada AGROBEST. Se observó la localización de GFP fusionado a SISLSP6 y los marcadores de organelos ya mencionados, usando un microscopio confocal láser (Sistema Zeiss-LSM 700) usando objetivo de inmersión 40X y zoom digital 4X.

II.9 Análisis de la tasa de endocitosis

Para determinar el efecto de la sobreexpresión de *SISLSP6* en el tráfico vesicular se empleó el marcador de membrana FM4-64 (Dettmer et al., 2006). Se observó qué ocurre con la tasa de endocitosis utilizando la zona apical de la raíz (3 a 5 días luego de emergida ésta) tanto de plantas de tomate transgénicas (Líneas L9, L10 y L13) como plantas control (WT y LC). Las plantas fueron teñidas en frío y oscuridad, con el marcador FM4-64 5 μ M (Excitación 515 y rango de emisión de 640 – 734 nm, Molecular Probes, Eugene, OR) por un tiempo de 20 minutos. Luego, las muestras fueron lavadas e incubadas con una solución de medio Murashige y Skoog (MS) líquido a 25 °C y se analizó la tasa de endocitosis a los 5, 15 y 30 minutos, para observar la internalización de FM4-64. Luego, para determinar el efecto del estrés salino sobre la tasa endocítica, otro grupo de plántulas, crecidas en las mismas condiciones anteriormente descritas, fueron sometidas por 30 minutos a un medio MS líquido suplementado con 200 mM de NaCl y luego teñidas con FM4-64 5 μ M. Finalmente, fueron visualizadas utilizando el sistema de microscopía confocal Zeiss-LSM 700, usando el objetivo de inmersión 40X y zoom digital 4X. Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y se evaluaron imágenes de al menos 5 raíces de 5 plantas diferentes para el análisis estadístico (n = 25 células). La cuantificación de la internación de FM4-64 consideró la relación entre el promedio de la intensidad de los pixeles del lado intracelular de cada célula medida y el promedio de la intensidad de los pixeles de la membrana plasmática de la misma célula (Baral et al., 2015b).

II.10 Cuantificación de la fluorescencia de ROS

Se observó, midió y estimó en células de la zona apical de la raíz (3 a 5 días luego de emergida ésta) de plantas de tomate transgénicas (Líneas L9, L10 y L13) y plantas control (WT y LC) la acumulación de peróxido de hidrógeno, utilizando para ello plántulas de tomate expuestas por 40 minutos a un medio MS líquido suplementado con 200 mM de NaCl, luego teñidas por 20 minutos con el trazador fluorescente H₂DCFDA 10 μ M (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Thermo Fisher Scientifics, Massachusetts, USA) (excitación 492 nm y emisión 517 nm). Finalmente, las raíces fueron teñidas por 20 minutos

con el marcador de membranas FM4-64 5 μM , metodología adaptada de acuerdo con lo descrito por Leshem et al. (2006) y Zhao et al. (2009). Las raíces de estas plántulas fueron visualizadas utilizando el sistema de microscopía confocal Zeiss-LSM 700, usando el objetivo 10X y zoom digital 0.8X para una panorámica de la producción de ROS. Para la cuantificación, se analizaron las imágenes obtenidas con el software ImageJ, considerando, al menos, 5 raíces de 5 plantas diferentes.

II.11 Estudio de la acumulación de sodio en la vacuola

El contenido de sodio vacuolar se determinó utilizando el marcador específico de Na^+ Sodium Green (Thermo Fisher Scientific). Plántulas de tomate con raíces emergidas luego de 3 o 5 días fueron incubadas en medio MS suplementado con 200 mM de NaCl por un período de 16 horas. Luego del tratamiento, las plántulas fueron incubadas con 5 μM de Sodium Green por 2 horas (Thermo Fisher Scientifics, Massachusetts, USA) y Pluronic F-127 20% p/v (Thermo Fisher Scientifics, Massachusetts, USA) (adaptado de Tarte et al., 2015; San Martín-Davison et al., 2017; Salinas-Cornejo et al., 2021). Finalmente, las raíces fueron teñidas por 20 minutos con el marcador de membranas FM4-64 5 μM . Las muestras fueron visualizadas utilizando microscopía confocal (Sistema Zeiss-LSM 700, excitación 507 nm y emisión 532 nm) con el objetivo de inmersión 40X y zoom digital 0,8X. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software ImageJ, cuantificándose la intensidad de píxeles de los compartimentos teñidos, considerando, al menos, 5 raíces de 5 plantas diferentes.

II.12 Análisis estadístico.

Para la interpretación de los resultados de los diferentes experimentos realizados en esta tesis, los análisis estadísticos fueron ejecutados mediante el programa R (versión 1.7). Se determinó la significancia estadística mediante análisis de ANOVA de una vía, seguido por comparaciones múltiples con la prueba de *Tukey's honestly significant difference (HSD)*, considerando un nivel de significancia $p < 0,05$.

III. RESULTADOS.

III.1 Identificación de genes que codifican para SNARE-like en plantas de *Solanum lycopersicum*.

Realizando una búsqueda en la base de datos Solgenomics, fue posible la identificación de tres secuencias que codifican para putativas SNARE-like en *Solanum lycopersicum*. Estas tres secuencias son homólogas a SbSLSP de *Salicornia brachiata* (Singh et al., 2016). Estos genes se nombraron de acuerdo con la siguiente nomenclatura: SISLSPX, donde SISLSP proviene de *Solanum lycopersicum* SNARE-like Superfamily Protein, y X indica el cromosoma donde se ubican cada uno de los genes identificados. De acuerdo con esto, los genes se denominaron *SISLSP3* (Solyc03g116600.2), *SISLSP6* (Solyc06g068080.2) y *SISLSP11* (Solyc11g008330.1), los cuales no han sido previamente caracterizados.

A continuación, se realizó un análisis para identificar si los genes que codifican para las proteínas SISLSP3, SISLSP6 y SISLSP11, que poseen 147 aminoácidos cada una, poseían dominios transmembranas, debido a su homología estructural con las proteínas SNARE, que poseen dominios transmembrana. En base a los resultados entregados por la herramienta TMHMM – 2.0, se observó que las putativas SNARE-like no presentan dominios transmembranas en sus secuencias, tal y como se muestra en la zona marcada en rojo de la Figura 6, que no mostró variaciones en la gráfica. Ahora, para ahondar un poco más en ello, se realizó un análisis que consideró la búsqueda de modificaciones post-traduccionales o lipídicas para inserción en membranas o para interacciones con otras proteínas. En el análisis se predijo que las secuencias presentan sitios para modificaciones post-traduccionales, específicamente el motivo LDKYGKICLCLDEIV que genera una putativa palmitoilación en el residuo cisteína situado en la posición 115 (Cys115) de las putativas SNARE-like identificadas (Figura 7).

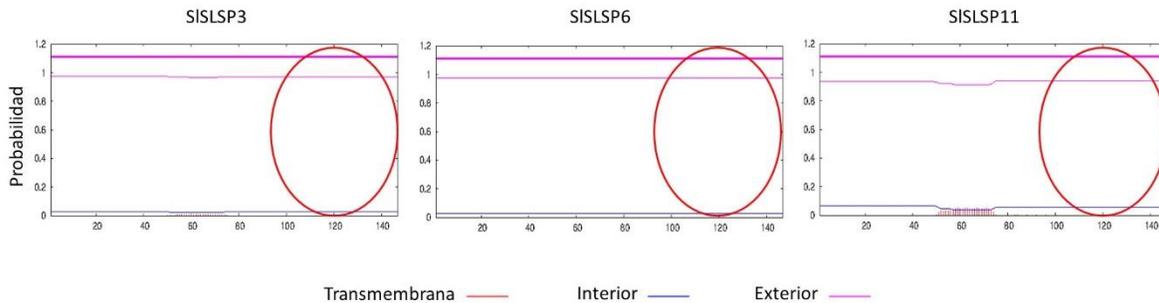


Figura 6: Análisis de dominios transmembrana de las secuencias *Solyc03g116600.2* (SISLSP3), *Solyc06g068080.2* (SISLSP6) y *Solyc11g008330.1* (SISLSP11). Utilizando la herramienta TMHMM – 2.0, disponible en la web <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>, se observa que no existe presencia de dominios transmembrana. En círculo rojo: posición esperada del dominio transmembrana.

Utilizando el programa BLASTp, se encontró que la secuencia aminoacídica SbSLSP de *Salicornia brachiata* (Accession AGV05388) presentó un 84,35% de identidad con la secuencia SISLSP6 de *Solanum lycopersicum* (Accession XP_010322672), seguida de SISLSP3 de *Solanum lycopersicum* (Accession XP_004236027) con 83,67%, SNARE-like Superfamily Protein de *Arabidopsis thaliana* (denominada en esta tesis como AtSLSP) (Accession NP_172989) con 78,08% de identidad y SISLSP11 de *Solanum lycopersicum* (Accession XP_004250051) con 76,19% de identidad de secuencia. El alineamiento múltiple y comparación de las secuencias aminoacídicas de SNARE-like de *Arabidopsis thaliana* (AtSLSP), *Salicornia brachiata* (SbSLSP) y *Solanum lycopersicum* (SISLSP3, SISLSP6 y SISLSP11) reveló la presencia conservada de dominios que permiten la clasificación de estas secuencias dentro de la superfamilia de SNARE-like (Figura 7). Se analizaron estos posibles dominios conservados y se identificó que estas putativas proteínas tienen dos dominios que se superponen, descritos como “Clat_adaptor_s” y el dominio “Longin-like”. El dominio “Clat_adaptor_s” corresponde a un complejo que interactúa con las proteínas de cubierta de las vesículas, denominadas clatras, que son importantes para la selección de la carga y dirección de transporte de las vesículas; el dominio “Longin-like” se asemeja estructuralmente al dominio Longin presente en las proteínas R-SNAREs. El detalle de las características descritas se visualiza en la Figura 7.

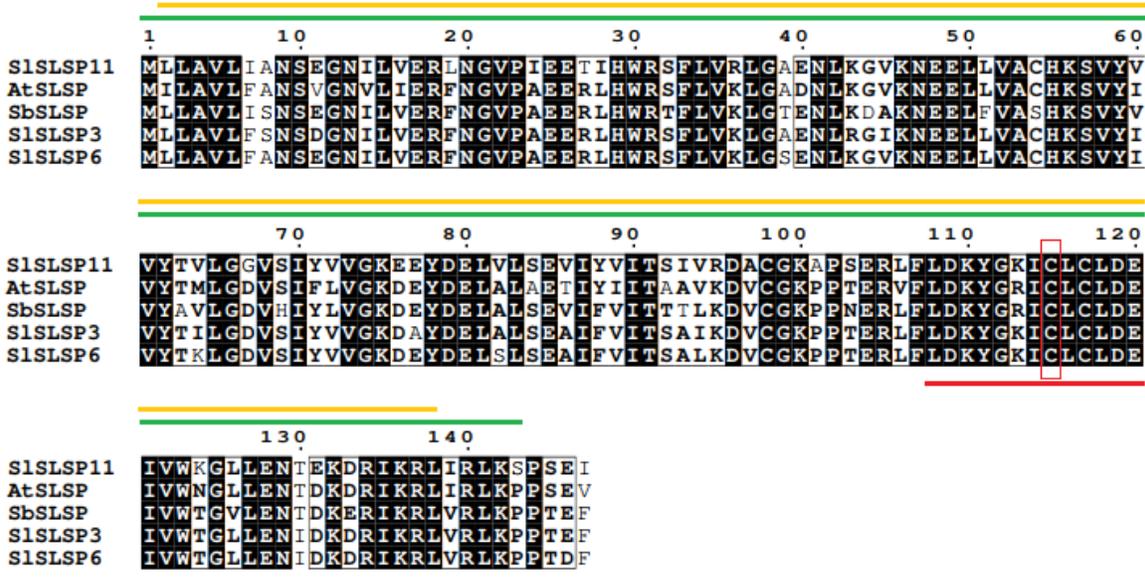


Figura 7: Alineamiento múltiple de secuencias de SISLSP con sus homólogos para identificación de motivos conservados. En anaranjado: dominio “Clat_adaptor_s” en la posición 2 – 138; en verde: dominio “Longin-like” (superfamilia SNARE-like) en la posición 1 – 143; en rectángulo rojo: sitio de predicción de palmitoilación en Cys115; en rojo: motivo correspondiente a la palmitoilación predicha, que podría corresponder a un putativo dominio transmembrana o sitio de interacción con otras proteínas.

Para establecer la relación entre las proteínas de tomate identificadas previamente (S1S1SP3, S1S1SP6 y S1S1SP11) con proteínas homólogas pertenecientes a la familia de SNARE-like, se realizó un árbol filogenético (Figura 8). El análisis mostró que las proteínas SNARE-like de *Solanum lycopersicum* S1S1SP3 y S1S1SP6 se agrupan con aquellas secuencias de las plantas *Salicornia brachiata* y *Zostera marina*, plantas consideradas halófitas (Singh et al., 2016). También se agrupan con las proteínas de las plantas *Nicotiana tomentosiformis* y *Solanum pennelli*, que también son consideradas dentro del grupo de plantas tolerantes a la salinidad. En el caso de S1S1SP11, esta proteína se encuentra agrupada en un clado alejado con respecto a las anteriormente mencionadas (Figura 8).

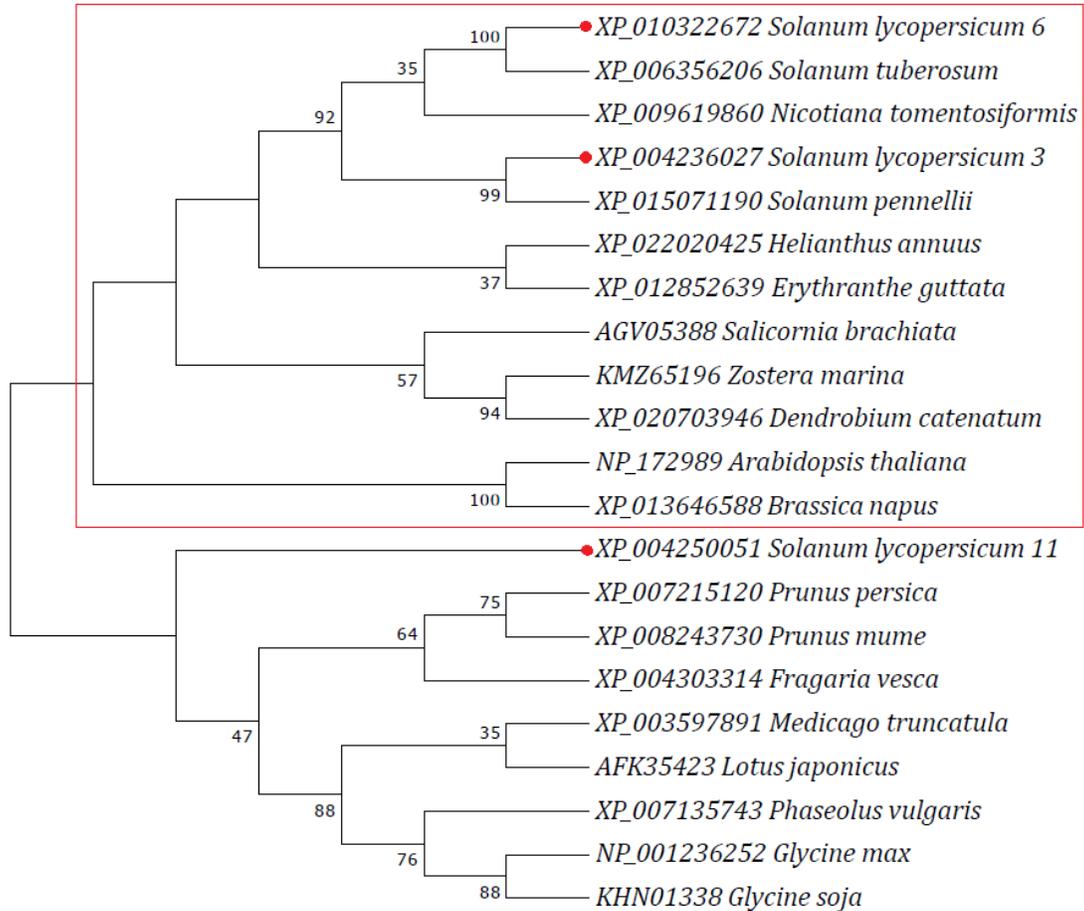


Figura 8: Árbol filogenético que establece la relación de putativas proteínas SNARE-like de tomate con sus homólogos con otras especies de plantas. En círculo rojo: proteínas de *S. lycopersicum*, SISLSP3, SISLSP6 y SISLSP11; en rectángulo rojo: agrupación de proteínas SNARE-like de tomate y de proteínas homólogas más cercanas. La descripción de cada una de las proteínas incluidas en el árbol filogenético corresponde al número de accesoión de las secuencias en NCBI, seguido de la especie a la que pertenece cada secuencia.

En consecuencia, en base a las características y similitudes de secuencia, los dominios estructurales presentes en las proteínas de tomate identificadas y compartidos con otros miembros de la superfamilia de SNARE-like, es que se sugiere que estas proteínas SISLSP3, SISLSP6 y SISLSP11 corresponden a unas SNARE-like de *S. lycopersicum*, de las cuales aún no ha sido dilucidada su función.

III.2 Determinación del perfil de expresión de los genes que codifican para SISLSP en plantas de *Solanum lycopersicum* sometidas a estrés salino.

Plantas de *S. lycopersicum* (plantas sensibles a salinidad) y *S. chilense* (plantas tolerantes a salinidad) fueron sometidas a condiciones de estrés salino durante 72 horas, para evaluar si los genes que codifican para SISLSP3, SISLSP6 y SISLSP11 de tomate responden a estrés por salinidad. En el transcurso del ensayo de estrés salino, fueron medidos los parámetros fisiológicos de Fotosíntesis neta (Pn) y Conductancia estomática (Gs), en conjunto con mediciones de los perfiles de expresión de genes marcadores de estrés, *AREB1* y *TSW12*, para determinar si las plantas se encontraban bajo las condiciones impuestas de estrés. De acuerdo con lo observado, la Fotosíntesis neta (Figura S1, panel superior) y la Conductancia estomática (Figura S1, panel inferior) se vieron disminuidas, tanto en las plantas *S. lycopersicum* como *S. chilense*, sometidas a estrés salino de 300 mM de NaCl. A las 24 horas de estrés ya se observa una marcada disminución en las mediciones de ambos parámetros fisiológicos en las plantas estresadas (Figura S1, líneas rojas) en comparación a lo observado en las plantas no estresadas (Figura S1, líneas azules), situación que continúa disminuyendo a medida que transcurre el ensayo. Los análisis transcripcionales de los genes marcadores de estrés (Figura S2) mostraron que las plantas se encontraban bajo condiciones de estrés salino, ya que se evidencian patrones diferenciales en la expresión relativa de estos genes entre las plantas sometidas a la condición sin estrés (tiempo 0 horas) y aquellas sometidas a la condición bajo estrés por salinidad (tiempos entre 3 y 72 horas).

A continuación, para investigar si los genes que codifican para SNARE-like de tomate responden diferencialmente a estrés salino a distintos tiempos, se evaluaron los niveles de expresión de los genes *SLSP3*, *SLSP6* y *SLSP11*, tanto en tejido de hojas como de raíces de las plantas *S. lycopersicum* y *S. chilense*, en función del tiempo (Figura 9). Se observó que los niveles de expresión de *SISLSP3* de *S. lycopersicum* mostraron una mayor inducción en hojas a las 24 horas y en raíces a las 72 horas, y en el caso de *SchSLSP3* de *S. chilense* se observó una mayor inducción a las 12 horas en raíces y una inducción temprana a las 3 horas de iniciado el estrés en hojas, la cual se mantuvo durante las 72 horas que duró el ensayo (Figura 9, panel izquierdo). Por otro lado, los niveles de expresión relativa de *SISLSP6* de *S. lycopersicum* indicaron una mayor inducción a las 12 horas, tanto en hojas como en raíces, y

el gen *SchSLSP6* de *S. chilense* mostró mayor inducción a las 6 horas en raíces y a las 12 horas en hojas (Figura 9, panel central). En el caso del gen *SISLSP11* de *S. lycopersicum* y *SchSLSP11* de *S. chilense*, los resultados mostraron que no existió presencia de transcritos en los tejidos de hojas y raíces (Figura 9, panel derecho), por lo cual, utilizando la información disponible en la base de datos BAR para tomate de la Universidad de Toronto (http://bar.utoronto.ca/eplant_tomato/) para visualizar datos de genómica funcional de forma interactiva, se verificó dónde se estaría expresando este gen, dando como resultado que se encuentra presente solamente en los botones florales sin abrir (Figura 10). Además, la información referencial disponible en la base de datos BAR de la Universidad de Toronto, respecto de la inducción de los genes *SISLSP3* (Figura S3) y *SISLSP6* (Figura S4) indicó que hay mayor presencia del gen *SISLSP6*, tanto en hojas como en raíces, que en *SISLSP3*. Estos resultados sugieren que *SISLSP6* y *SchSLSP6* se estarían induciendo a tiempos más tempranos en hojas y raíces, si se compara con lo que ocurre con la expresión de *SISLSP3* y que *SchSLSP3* tendría una mayor participación en hojas que en raíces bajo estrés salino.

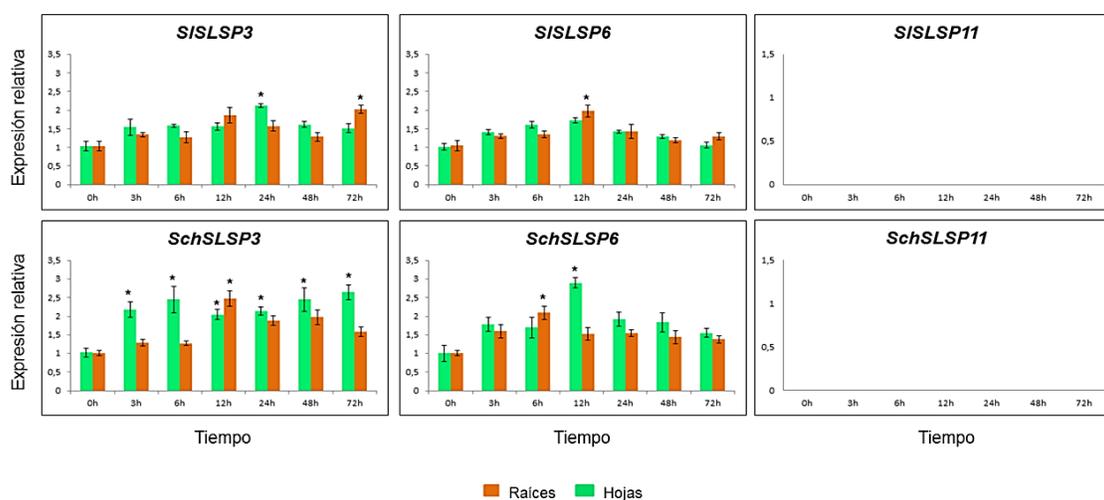


Figura 9: Perfil de expresión de los genes *SLSP3*, *SLSP6* y *SLSP11* en hojas y raíces de plantas de *S. lycopersicum* y *S. chilense* expuestas a estrés salino. Los niveles relativos de los transcritos de los genes *SNARE-like* en raíces (barras en naranja) y hojas (barras en verde) de plantas de tomate de 10-12 semanas de edad fueron determinados a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas de iniciado el estrés con 300 mM NaCl. Las columnas y las barras de error representan la media y la desviación estándar de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Gen normalizador: Ubiquitin3 (accesión X58253). Los asteriscos sobre las barras indican las diferencias estadísticamente significativas, determinadas mediante ANOVA de una vía (p -value < 0.05).

Plant eFP: Solyc11g008330

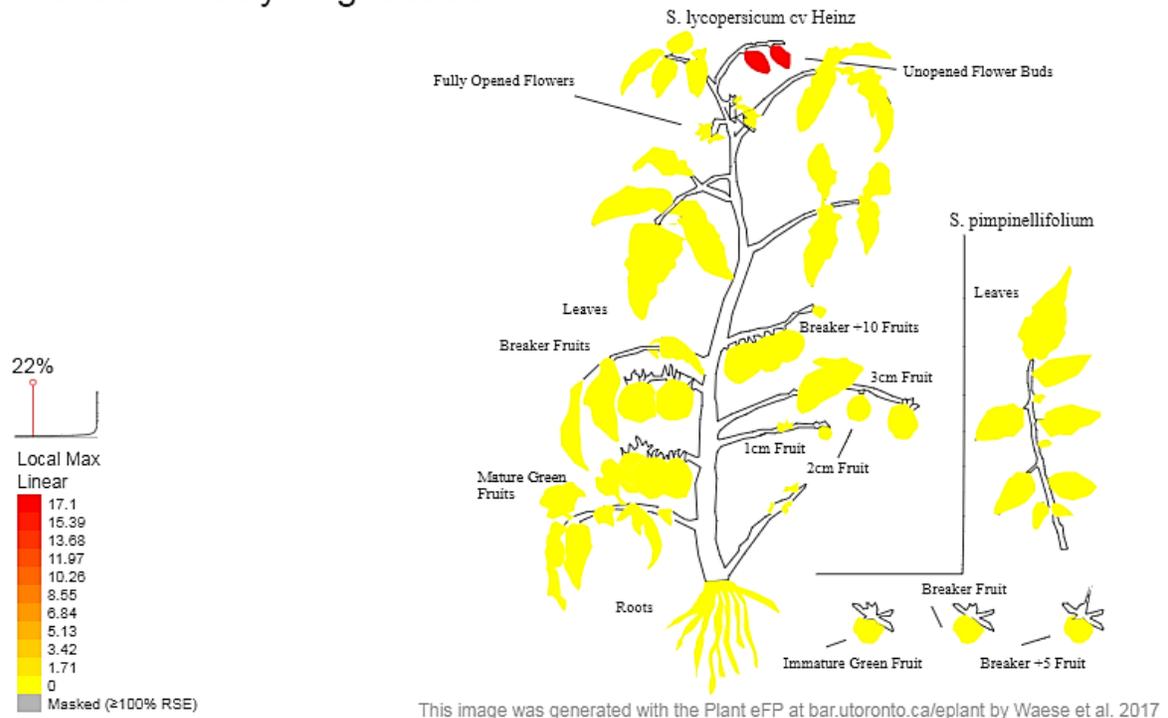


Figura 10: Análisis de expresión del gen *SISLSP11* de *S. lycopersicum* cv. Heinz en diferentes tejidos de la planta bajo condiciones normales. Resultado basado en la información obtenida desde la base de datos BAR de la Universidad de Toronto (http://bar.utoronto.ca/eplant_tomato/). La presencia de transcritos se observa solamente en los botones florales sin abrir (tejido marcado de color rojo en la figura) y no en el resto de los tejidos y órganos de la planta (tejidos marcados en color amarillo, que indica nula expresión de genes).

Tomando en consideración toda esta información, se procedió a seleccionar uno solo de estos genes para continuar con el resto de los análisis de esta investigación. Por lo tanto, se seleccionó el gen *SISLSP6* para continuar con el siguiente paso, se realizaron partidores específicos para aislar el gen desde *Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker; la región codificante fue amplificada y luego clonada a partir de cDNA y el producto fue enviado a secuenciación. El tamaño de la secuencia fue de 444 pb, tamaño esperado para el gen *SISLSP6*.

III.3 La evaluación a nivel fisiológico y bioquímico de plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan *SISLSP6* indica que son capaces de tolerar las condiciones de alta salinidad.

Debido a que *SISLSP6* mostró una mayor inducción bajo estrés salino, se decidió estudiar los efectos provocados por la sobreexpresión de este gen *SNARE-like* en plantas de tomates. Para ello, un grupo de plantas de *S. lycopersicum* cv. Moneymaker fue transformado con el gen de interés inserto en el vector pBI121 y comandado por el promotor 35S, y otro grupo de plantas fue transformado utilizando sólo el vector, siendo seleccionadas todas ellas en medios suplementados con el antibiótico de selección kanamicina. De esto, se obtuvo un total de 32 líneas transgénicas, de las cuales 16 líneas corresponden a aquellas transformadas con el transgén y 16 transformadas con el vector sin modificar, para ser usadas como grupo control (LC), en conjunto con plantas WT. La presencia del gen de interés en estas plantas y la transformación con el vector pBI121 fueron evaluadas mediante PCR. Una vez confirmada la transformación, las plantas fueron propagadas para mantener un stock de las líneas transgénicas. A continuación, mediante qRT-PCR se evaluaron los niveles de expresión de 5 líneas transformadas con *SISLSP6*, escogidas al azar ya que no presentaron diferencias morfológicas importantes al compararlas con las plantas WT. De este grupo de plantas, se escogieron aquellas que presentaron patrones de expresión contrastantes, contemplando éstos un nivel alto, nivel medio y nivel bajo (Figura 11) con el fin de utilizarlas en ensayos de tolerancia a alta salinidad. Como se evidencia en la Figura 11, los niveles de expresión relativa de *SISLSP6* fueron normalizados con respecto a la planta WT. En la línea L8 fueron menores a los patrones de expresión de la planta WT, la línea L16 aumentó 1,1 veces, tomando como referencia el perfil de la planta WT, la línea L10 aumentó 2 veces en comparación a la WT, la línea L9 mostró un patrón de expresión aumentado en 23 veces y la línea L13 aumentó 369 veces respecto de la planta WT. En base a estos resultados, se tomaron las líneas L9, L10 y L13 para proceder a evaluar su respuesta frente a condiciones de estrés salino.

SISLSP6

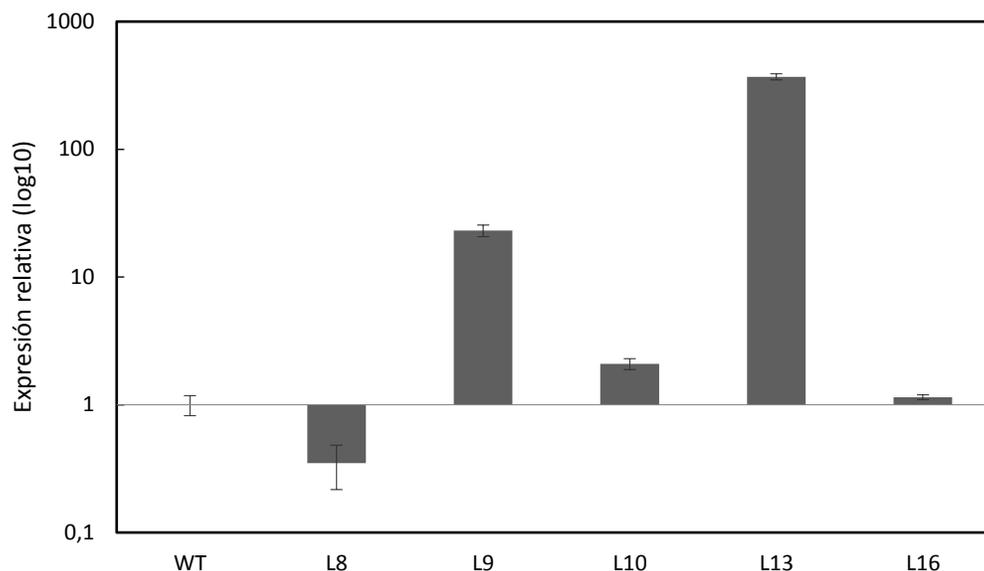


Figura 11: Patrones de expresión de *SISLSP6* en diferentes líneas de plantas transgénicas de tomate *S. lycopersicum* (log₁₀). Los niveles de transcritos de las plantas transformadas fueron obtenidos mediante análisis de qRT-PCR. Las columnas y las barras de error representan la media y la desviación estándar de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

Para estudiar qué efectos produce la sobreexpresión de *SISLSP6* en tomate, las plantas fueron sometidas a condiciones de estrés salino. En este ensayo, plantas WT y plantas transgénicas de tomate fueron regadas cada 72 horas con una solución de 300 mM NaCl por un período de 25 días. A los 5 días de tratamiento, tanto las plantas control como las líneas transgénicas no presentaron diferencias a nivel fenotípico. Los síntomas inducidos por estrés salino comenzaron a ser visibles a los 15 días de transcurrido el tratamiento con sal, donde las plantas mostraron clorosis en algunas de sus hojas y signos de marchitez en las hojas inferiores. A los 25 días se evidenciaron notorias diferencias entre las plantas control y las plantas sobreexpresoras. Se incrementaron los síntomas de clorosis y marchitez en los individuos utilizados como control, mostrando una pérdida importante de tejido foliar. Sin embargo, las líneas sobreexpresoras (L9, L10 y L13) exhibieron menores daños a nivel foliar y menor clorosis y marchitez durante el ensayo de estrés salino (Figura 12).

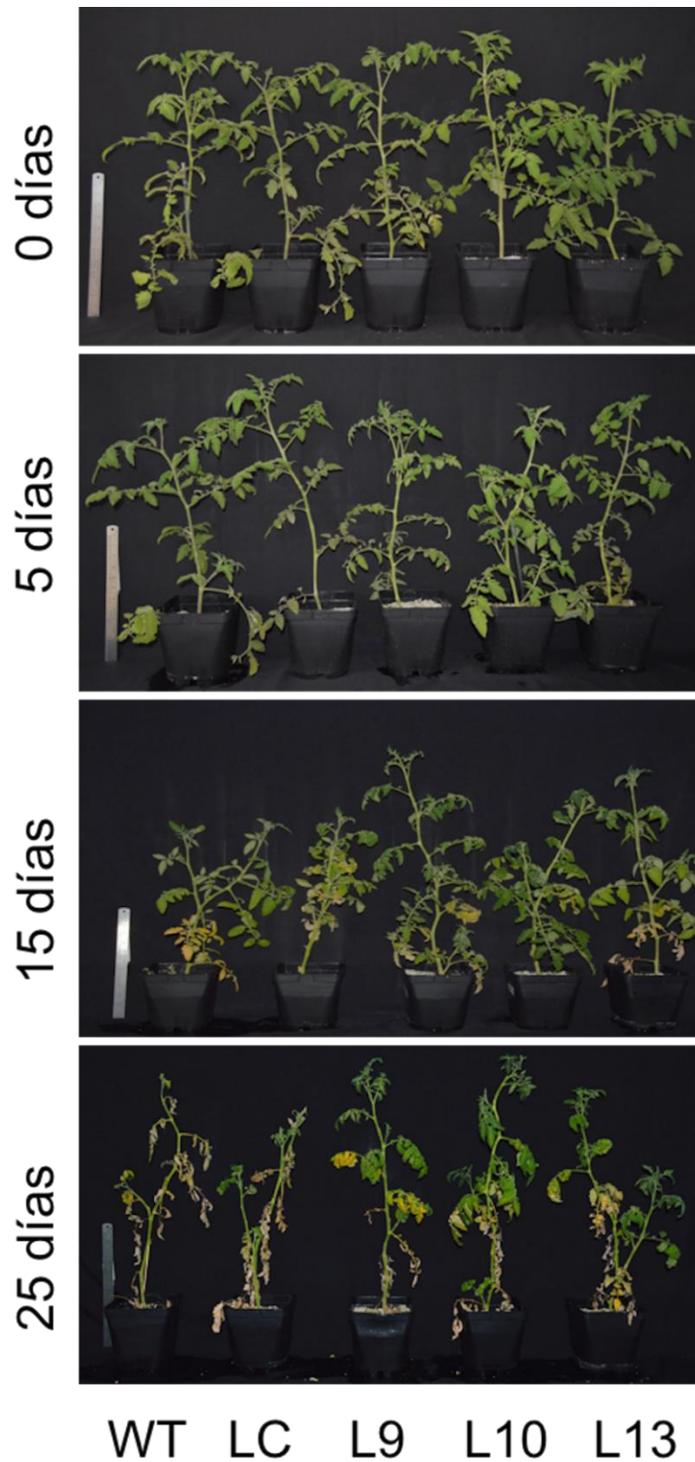


Figura 12: Respuesta de las plantas WT y plantas sobreexpresoras de *SISLSP6* bajo condiciones de estrés salino. Plantas de tomate que sobreexpresan *SISLSP6* de similares características en tamaño y número de hojas fueron tratadas con 300 mM de NaCl cada 72 horas y por un período de 25 días. Se exhiben plantas representativas de cada línea a los 0, 5, 15 y 25 días post- tratamiento.

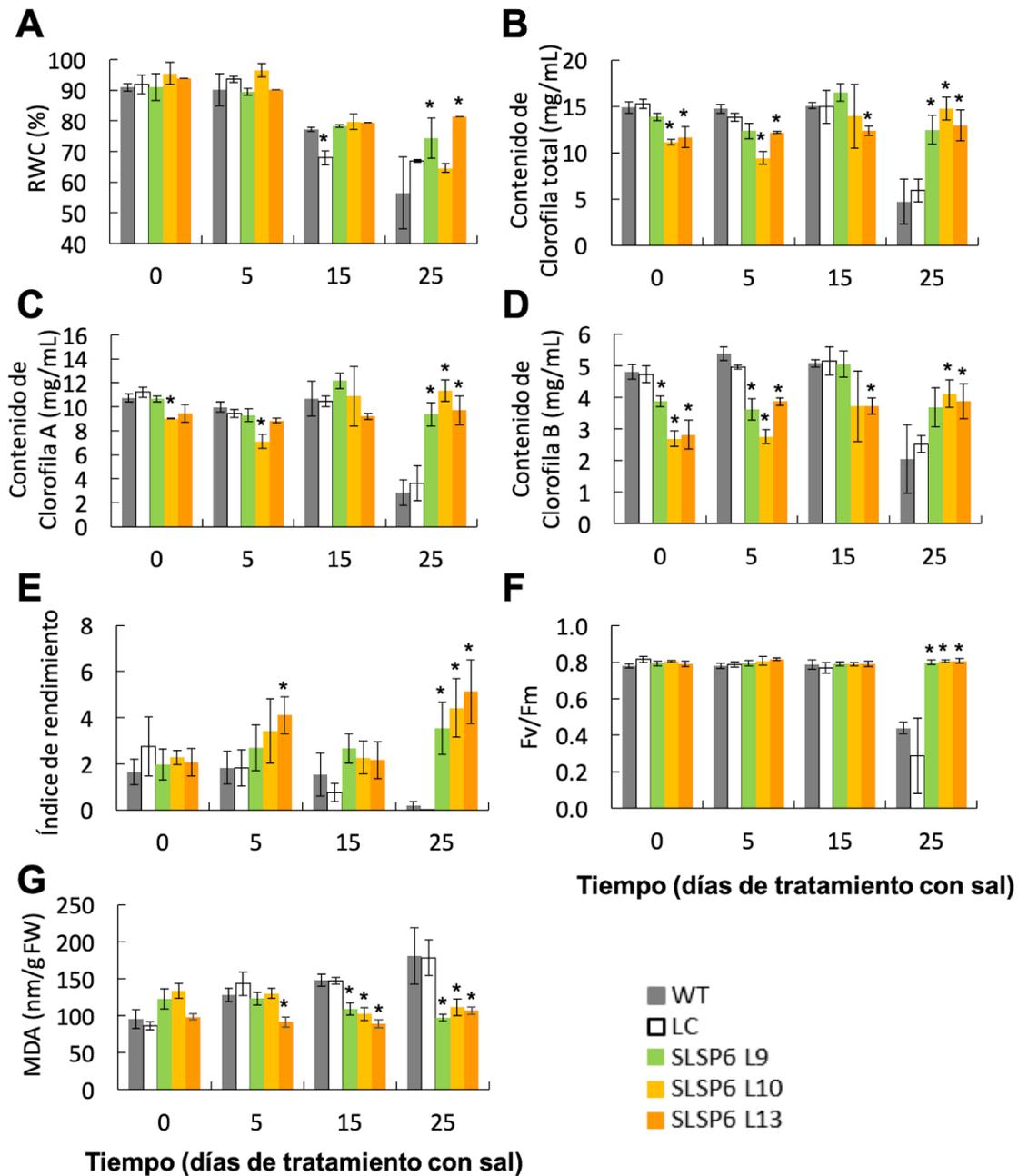


Figura 13: La respuesta a nivel fisiológico y bioquímico de las plantas transformadas con *SISLSP6* evidencia una mayor tolerancia frente a condiciones de alta salinidad. Plantas de tomate que sobreexpresan *SISLSP6* de similares características en tamaño y número de hojas fueron tratadas con 300 mM de NaCl cada 72 horas y por un período de 25 días. Se exhiben los resultados de cada línea a los 0, 5, 15 y 25 días post-tratamiento. (A) Contenido relativo de agua (RWC), (B) Contenido de clorofila total, (C) Contenido de Clorofila A, (D) Contenido de Clorofila B, (E) Análisis del índice de rendimiento (PI), (F) Análisis de eficiencia cuántica máxima del PSII (Fv/Fm), (G) Contenido de MDA. Cada barra indica el valor promedio y las barras de error representan la desviación estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre las líneas control (WT y LC) y las plantas transgénicas (p -value < 0.05), utilizando ANOVA de una vía.

Además de los daños visibles a nivel fenotípico, otro parámetro fisiológico considerado en este ensayo fue el contenido relativo de agua (RWC), ya que esta medida muestra el estado hídrico de la planta en términos de la consecuencia fisiológica del déficit de agua a nivel celular. En las plantas WT, el RWC disminuyó a un 77% pasados 15 días luego de iniciado el tratamiento y a un 56% a los 25 días (Figura 13A). Sin embargo, a los 25 días post-tratamiento, el RWC en la línea transgénica L9 alcanzó un promedio de 74%, en la línea L10 un 64% y en la línea L13 fue de 81%, demostrando que todas las plantas sobreexpresoras presentaron un contenido relativo de agua superior en comparación con las plantas WT (Figura 13A). Esto sugiere que existe una mayor turgencia en las hojas de las líneas sobreexpresoras y que se correlaciona con los daños observados fenotípicamente.

Junto con estos parámetros, se midió el contenido de clorofila. Los niveles de clorofila total mostraron que las plantas no transformadas presentaron alrededor de 70% menos de clorofila a los 25 días de iniciado el estrés salino, a diferencia de las plantas sobreexpresoras, en las que se mantuvieron los niveles de clorofila total durante todo el ensayo (Figura 13B). Situación similar se observó con el contenido de clorofila A y clorofila B, donde las plantas sobreexpresoras de *SISLSP6* mantuvieron estables estos niveles (Figura 13C, D) Estos resultados se correlacionan con la aparición de clorosis en las plantas bajo condiciones de estrés salino y podría ser un indicador que las plantas sobreexpresoras mantienen el funcionamiento de la maquinaria fotosintética.

Para evaluar el nivel de daño a nivel químico y celular experimentado por las plantas sometidas a las condiciones de alta salinidad, tanto en plantas transformadas como en las no transformadas, se midió el índice de rendimiento (PI) como un indicador del estado fisiológico de las plantas y se midió la eficiencia del fotosistema II (PSII), representado por la eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m). Los valores de PI en las tres líneas transgénicas L9, L10 y L13 fueron significativamente mayores en comparación a lo observado en las plantas controles (WT), que exhibieron una disminución de los valores de PI (Figura 13E) a lo largo del ensayo de estrés. Durante los primeros días del ensayo y hasta el día 15, las plantas transformadas y no transformadas exhibieron valores normales de F_v/F_m (alrededor de 0,8). Sin embargo, posterior al día 15, las plantas transformadas mantuvieron altos los niveles de F_v/F_m (alrededor de 0,8), mientras que las plantas no transformadas disminuyeron drásticamente los valores hasta aproximadamente 0,4 (Figura

13F). Estos resultados sugieren que las líneas sobreexpresoras bajo condiciones de estrés salino tienen un mejor funcionamiento del fotosistema II y presentan un mejor rendimiento fisiológico, confirmando la correlación entre la sobreexpresión de *SISLSP6* y la tolerancia observada en las plantas frente las condiciones de alta salinidad.

Finalmente, el último parámetro considerado para analizar los efectos de la sobreexpresión de esta *SNARE-like* fue medir la producción de malondialdehído (MDA), producto final en la lipoperoxidación de membranas, debido a que el estrés salino aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan un daño oxidativo en las membranas celulares. Los niveles de MDA fueron 1,8 veces mayores en las plantas controles en comparación con las líneas sobreexpresoras (Figura 13G) a los 25 días de tratamiento, indicando un daño importante a nivel celular en las plantas WT. Esto sugiere que las plantas transgénicas podrían inducir procesos de detoxificación de especies reactivas de oxígeno para disminuir el daño celular, mejorando la tolerancia a estrés salino.

III.4 SISLSP6 está localizada en la membrana plasmática.

Para comprender de mejor manera el posible mecanismo de acción de *SISLSP6*, y de esa forma establecer una posible conexión con su función, es que se indagó su localización subcelular. Para ello, se utilizaron plantas transgénicas de *A. thaliana* transformadas con diferentes marcadores de organelos, entre los que se mencionan membrana plasmática (AtPIP1;4), endosoma temprano/TGN (AtVTI12), Golgi (AtSYP32), endosoma tardío/compartimentos prevacuolares (AtRabF2a) y vacuola (AtVAMP711). Estas plantas fueron co-transformadas, de forma transitoria, utilizando un protocolo adaptado de la técnica AGROBEST (Wu et al., 2014), con dos construcciones diferentes: con el gen *SISLSP6* fusionado a GFP por su extremo carboxilo (*35S::GFP-SISLSP6*) y con el vector pAM1 conteniendo solamente la construcción *35S::GFP*, como control negativo. Los resultados indicaron que la señal de GFP proveniente de la construcción *35S::GFP* mostró una localización poco clara y no específica, situándose mayoritariamente en citoplasma, abarcando también estructuras endosomales, vacuola y membrana plasmática (Figura S5).

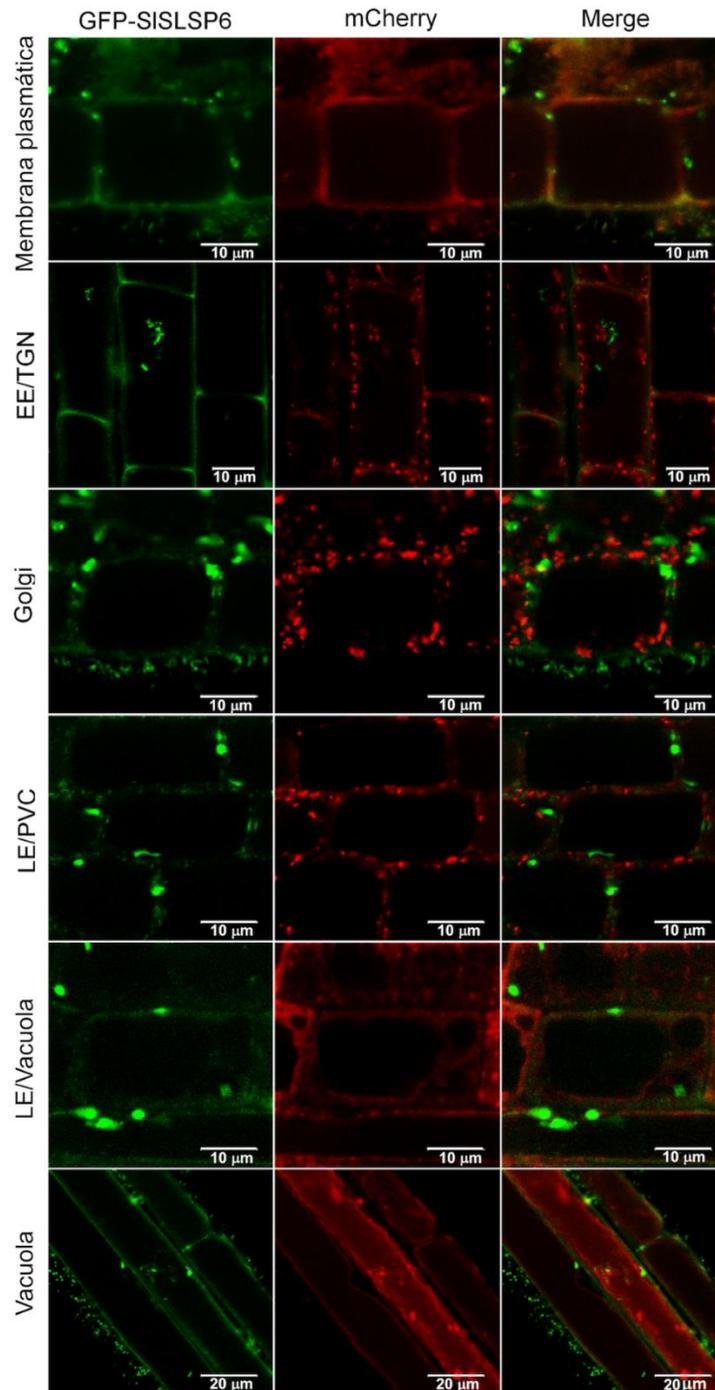


Figura 14: SISLSP6 reside en membrana plasmática. Plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de 10 días de edad, transformadas con diferentes marcadores de organelos fusionados a mCherry, fueron transformadas transitoriamente usando un protocolo adaptado de la técnica AGROBEST (Wu et al., 2014), con el constructo que expresaba la proteína GFP fusionada a SISLSP6. Las plantas fueron analizadas utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 700. Membrana plasmática, PIP1;4-mCherry; EE/TGN, VTI12-mCherry; Golgi, SYP32-mCherry; LE/PVC, RabF2a-mCherry; LE/Vacuola, RabG3f-mCherry; Vacuola, VAMP711-mCherry.

En el caso de los ensayos de colocalización de GFP-SISLSP6 con las proteínas AtVAMP711 y AtSYP32 (Figura 14) indicaron que no existió una superposición de las señales de GFP y mCherry, lo que sugiere que esta proteína no estaría localizada ni en vacuola y tampoco en Golgi, respectivamente. Por otro lado, GFP-SISLSP6 mostró una superposición con la señal de mCherry que está fusionada a la proteína AtPIP1;4, localizada en la membrana plasmática (Figura 14), lo que sugiere fuertemente que SISLSP6 está localizada en la membrana plasmática. Además, GFP-SISLSP6 mostró situarse en compartimentos de características similares a endosomas o PVCs. El análisis con la proteína AtVTI12, que indica a una de las poblaciones de endosomas que residen en el endosoma temprano/TGN, no mostró colocalización con la señal de GFP-SISLSP6. Misma situación ocurrió con la proteína utilizada como marcador de LE/PVC, AtRabF2a. Esto no descarta la posibilidad de la presencia de SISLSP6 en algún pool de endosomas residentes en el TGN o en los compartimentos prevacuolares. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la proteína SISLSP6 estaría participando en procesos ligados a la membrana plasmática, entre ellos la endocitosis, no descartando su participación en las rutas hacia el endosoma temprano o tardío.

III.5 La sobreexpresión de *SISLSP6* en plantas de tomate modula la tasa endocítica en condiciones normales y aumenta significativamente la endocitosis bajo estrés salino.

Considerando el hecho que SISLSP6 se localiza en la membrana plasmática, se plantea la hipótesis que esta SNARE-like tendría un rol en la endocitosis. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la internalización del trazador FM4-64, bajo condiciones normales, en raíces de plántulas de tomate a los 5, 15 y 30 minutos. Además, se analizó la internalización de FM4-64 en raíces de plántulas de tomate sometidas a 200 mM de NaCl por 30 minutos. Los resultados indicaron que hubo un aumento de 1,6 veces aproximadamente, en la internación de FM4-64 a los 15 minutos en las plantas transgénicas sobreexpresoras de SISLSP6 (líneas L10 y L13) en comparación con lo observado en las raíces de las plantas control (WT y LC) (Figura 15A, B). A los 30 minutos, la línea L10 mostró una tasa de endocitosis significativamente mayor en comparación con los otros genotipos (Figura 15A, B). Ahora, al someter las plántulas de tomate (WT y LC) a 30 minutos de estrés salino se observó un aumento en la tasa de endocitosis (Figura 15A, C). En el caso de las líneas

sobreexpresoras L9 y L10 mostraron una tasa de internación de FM4-64 de 1,2 y 1,4 respectivamente, siendo un aumento significativamente mayor en la tasa endocítica a los 30 minutos de estrés salino (Figura 15A, C). En el caso de la línea L13 también se observó un aumento en la tasa de endocitosis en comparación con las plántulas control (Figura 15A, C). Estos resultados sugieren una modulación del tráfico vesicular en las plantas transgénicas que sobreexpresan *SISLSP6*, aumentando la tasa de endocitosis en estas plantas, tanto en condiciones normales como bajo condiciones de estrés salino.

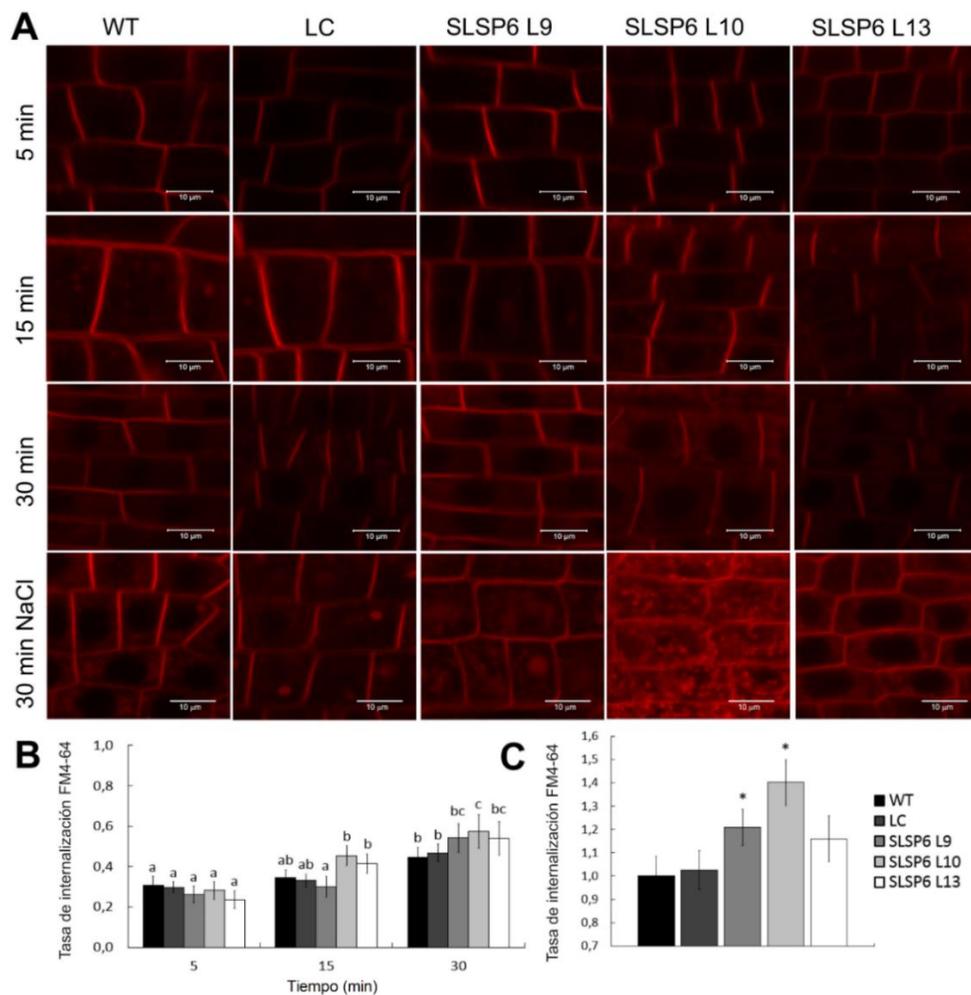


Figura 15: Dinámica de la tasa de endocitosis de FM4-64 en *Solanum lycopersicum*. A, Imágenes representativas de la internación del trazador FM4-64, transcurridos 5, 15 y 30 minutos en raíces de plántulas de tomate control (WT y LC) y líneas sobreexpresoras de *SISLSP6* (L9, L10 y L13) bajo condiciones normales y frente a 200 mM de NaCl. La barra indica una escala de 10 μ m. B, Cuantificación de la tasa de internación de FM4-64 bajo condiciones normales. Las barras indican el valor promedio y las barras de error representan

error estándar; n=25 células. Las letras indican diferencias significativas de acuerdo con ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples HSD de Tukey (p-value < 0,05). C, Cuantificación de la tasa de internación de FM4-64 bajo condiciones de estrés salino 200 mM NaCl (30 min). Los valores son relativos a la tasa de endocitosis de las raíces de las plántulas WT sometidas a estrés salino. Los datos representan promedios y error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre las líneas control (WT y LC) y las plantas transgénicas (p-value < 0.05), utilizando ANOVA de una vía.

III.6 La expresión constitutiva de *SISLSP6* modifica la acumulación de ROS en células radiculares de tomate bajo condiciones de estrés salino.

Previamente, se ha descrito que bajo condiciones de estrés salino se induce la remoción de proteínas desde la membrana plasmática, entre ellas algunas NADPH oxidasas, que, al ser internalizadas, son mantenidas en estructuras endosomales, generando ROS al interior de estas (Leshem et al., 2007). En concordancia con estos antecedentes, y considerando el aumento de la tasa endocítica de las plantas que sobreexpresan *SISLSP6*, se hace evidente determinar si este incremento en la endocitosis en las células radiculares de las líneas transgénicas generará cambios en el contenido de especies reactivas de oxígeno. Para evaluar los efectos en la acumulación de especies reactivas de oxígeno en las plantas sobreexpresoras de *SISLSP6* bajo condiciones de estrés salino, se determinó la concentración de H₂O₂ en células radiculares de tomate sometidas a 200 mM de NaCl, usando para ello el marcador fluorescente H₂DCFDA como indicador del contenido de H₂O₂ en las células, que fue analizado mediante microscopía confocal. Los resultados indicaron que bajo condiciones normales no se observaron diferencias en la acumulación de H₂O₂ entre los diferentes genotipos (Figura S6). Ahora bien, luego de sometidas a estrés salino, la línea sobreexpresora L10 mostró una disminución significativa en la acumulación de H₂O₂, siendo aproximadamente un 30% menos; la línea L9 también presentó una menor acumulación de H₂O₂, acumulando un 15% menos aproximadamente y la línea L13 no mostró diferencias, si se comparan con los resultados observados para las plantas control (WT y LC) (Figura 16A, B). Estos resultados sugieren que ocurre una modificación del contenido de ROS en las plantas que sobreexpresan *SISLSP6*, que podría estar relacionado con la modulación de la dinámica de endocitosis observada en la Figura 15.

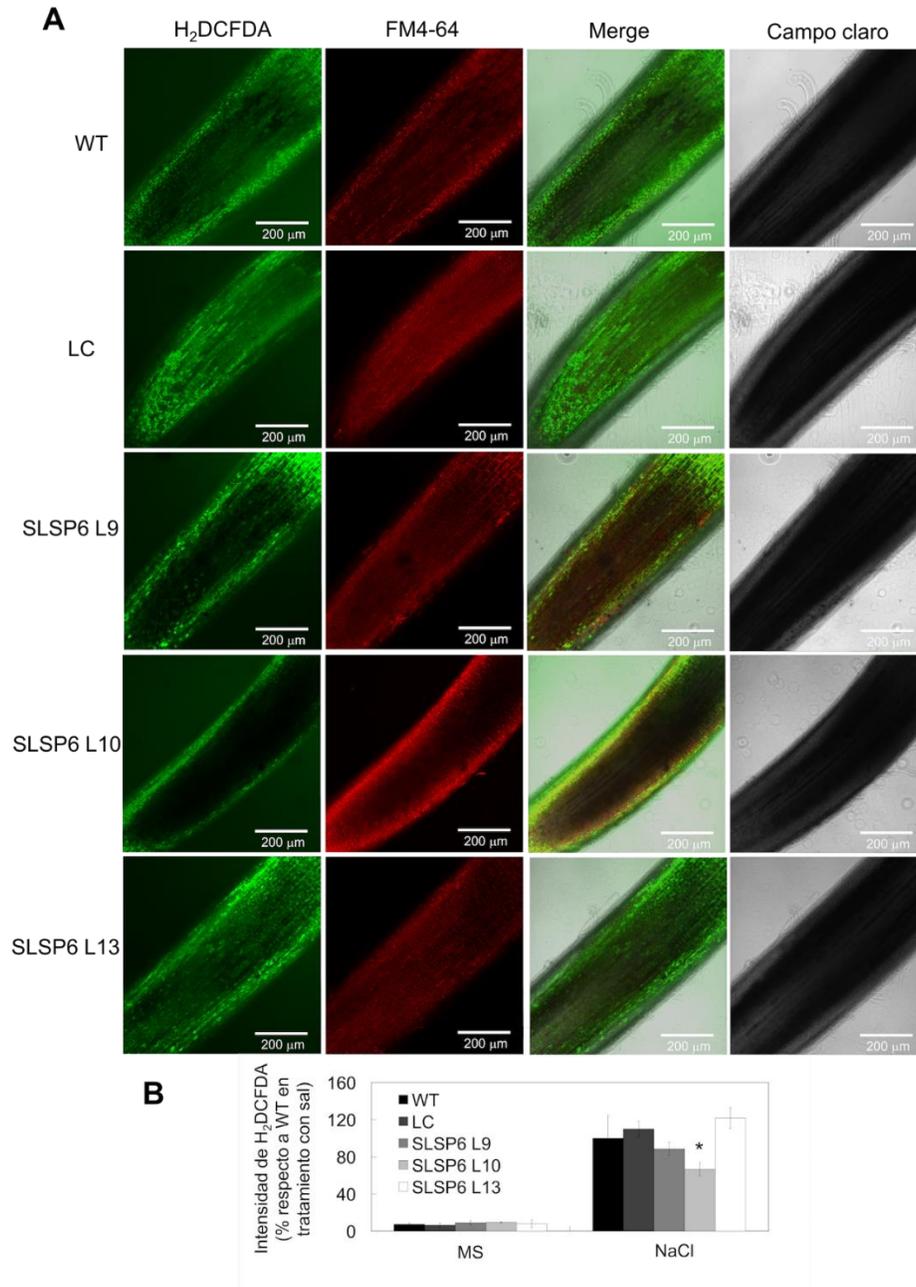


Figura 16: Contenido de H₂O₂ en raíces de *Solanum lycopersicum* bajo condiciones de estrés salino. A, Imágenes representativas de la producción de H₂O₂ en plántulas de tomate control (WT y LC) y líneas sobreexpresoras de *SISLSP6* (L9, L10 y L13) frente a 200 mM NaCl y observadas mediante microscopía confocal. Las raíces de tomate fueron tratadas con H₂DCFDA (señal en verde) y el trazador FM4-64 (señal en rojo). La barra indica una escala de 200 μm. **B,** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de H₂DCFDA. Los valores indican el porcentaje relativo al 100% de intensidad de fluorescencia evaluada en las plantas WT bajo estrés salino. Los datos indican valores promedio y errores estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre las líneas control (WT y LC) y las plantas transgénicas (p-value < 0.05), utilizando ANOVA de una vía.

III.7 La sobreexpresión de *SISLSP6* aumenta la capacidad de compartimentar sodio en las vacuolas durante condiciones de alta salinidad.

Investigaciones previas han evidenciado que un aumento en la tasa de endocitosis y una menor producción de ROS promoverían una mayor compartimentación de sodio en las vacuolas, generando tolerancia de las plantas frente a condiciones de estrés salino (Salinas-Cornejo et al., 2021). De acuerdo con lo evidenciado anteriormente en este trabajo, las líneas transgénicas mostraron una modificación en la dinámica de endocitosis y en la acumulación de ROS en las células, lo que sugiere que se podría generar una mayor acumulación de sodio en las vacuolas de células radiculares de tomate. Para verificar esta relación, se monitoreó la acumulación de sodio en células radiculares de tomate de las líneas transgénicas L9, L10 y L13 para compararlas con las plantas controles, utilizadas como controles y sometidas a 200 mM de NaCl durante 16 horas. Esta acumulación se monitoreó utilizando el indicador fluorescente Sodium Green. Los resultados de este tratamiento mostraron un aumento de la intensidad de la fluorescencia del Sodium Green en las células radiculares de las líneas sobreexpresoras de *SISLSP6* por sobre lo evidenciado en las células de las líneas control (WT y LC) (Figura 17A, B). En el caso de la línea L9, este aumento fue de un 60% aproximadamente y en la línea L13 fue de un 50%, mientras que en la línea L10 el aumento de la intensidad de Sodium Green fue más del doble en comparación con las plantas control. Se observó, además, que la acumulación de sodio ocurre al interior de las vacuolas, tanto de la zona de la epidermis como de la zona cortical de las raíces de tomate, a diferencia de lo que se identifica en las plantas WT y LC, donde la mayor acumulación se observó en las células de la epidermis. Junto con esto, se observó que hubo acumulación del marcador de sodio en unas estructuras con un patrón diferente al que presentan las vacuolas, de las cuales se desconoce su composición y naturaleza. Estas estructuras también fueron marcadas con FM4-64. Se podría especular que corresponden a grandes endosomas o compartimentos prevacuolares, pero requiere de mayor investigación. Estos resultados sugieren que la mayor compartimentación de sodio en las vacuolas estaría relacionada con una mayor dinámica endocítica de las plantas transgénicas que sobreexpresan *SISLSP6* y se podría correlacionar con un menor contenido de ROS, observado principalmente en la línea sobreexpresora L10, permitiendo explicar la tolerancia de las plantas frente a condiciones de alta salinidad.

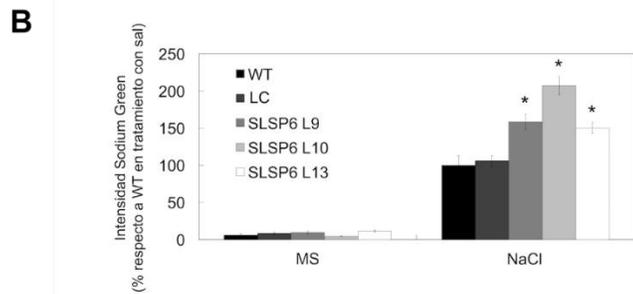
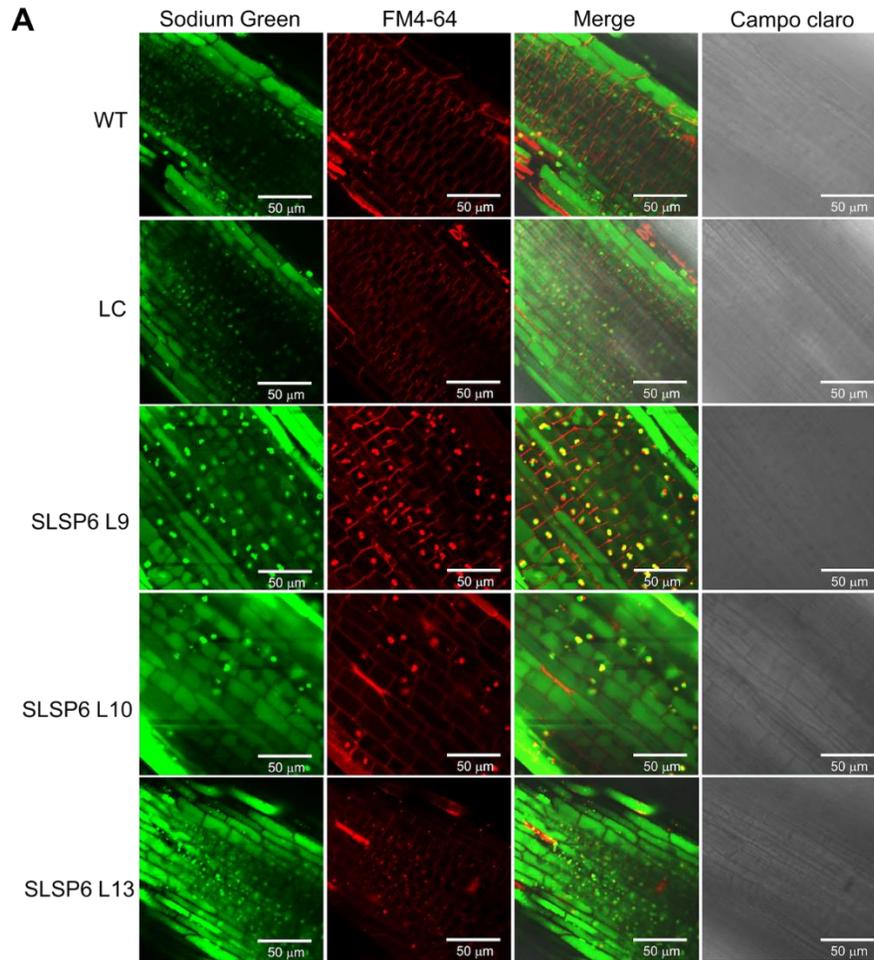


Figura 17: Compartimentación de sodio en las vacuolas de células de las raíces de *Solanum lycopersicum* bajo condiciones de estrés salino. **A**, Imágenes representativas de la acumulación de sodio en plántulas de tomate control (WT y LC) y líneas sobreexpresoras de *SISLSP6* (L9, L10 y L13) frente a 200 mM de NaCl y observadas mediante microscopía confocal. Las raíces de tomate fueron tratadas con Sodium Green (señal en verde) y el trazador FM4-64 (señal en rojo). La barra indica una escala de 50 μ m. **B**, Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Sodium Green. Los valores indican el porcentaje relativo al 100% de intensidad de fluorescencia evaluada en las plantas WT bajo estrés salino. Los datos indican valores promedio y errores estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre las líneas control (WT y LC) y las plantas transgénicas (p-value < 0.05), utilizando ANOVA de una vía.

IV. DISCUSIÓN.

IV.1 SISLSP6 codifica para una proteína SNARE-like y participa en el tráfico vesicular a nivel de la membrana plasmática.

La especie de tomate *Solanum lycopersicum* es una de las especies más cultivadas en el mundo. Sin embargo, su susceptibilidad frente a las condiciones de estrés por salinidad afecta negativamente su productividad. En contraste, especies de tomate como *Solanum chilense* y *Solanum pimpinellifolium*, presentan una mayor tolerancia frente a las condiciones adversas de salinidad (Salinas-Cornejo et al., 2019). Los conocimientos e información existente en bases de datos y la secuenciación de genomas permiten el estudio y la identificación de genes asociados a estrés abiótico, lo cual provee una excelente oportunidad para anotar nuevos genes y otorgar nueva información sobre genes identificados en especies de interés agronómico. En este sentido, se ha identificado y caracterizado un gen SNARE-like, denominado *SISLSP6* en tomate, determinando su posible relación con la tolerancia a estrés salino. A través del análisis filogenético, se observó la relación que existe entre diferentes proteínas homólogas que pertenecen a la familia SNARE-like. Se estimó que la proteína *SISLSP6* de *Solanum lycopersicum* se agrupa con aquellas proteínas pertenecientes a plantas consideradas halófitas, como *Salicornia brachiata*, *Zostera marina* y *Solanum pennellii* (Singh et al., 2016; Salinas-Cornejo et al., 2019), lo que sugiere un mecanismo de adaptación común de estas plantas frente al estrés salino (Singh et al., 2016).

Las proteínas SNARE son componentes fundamentales en la maquinaria de tráfico vesicular, cumpliendo un papel central en el anclaje y fusión de vesículas con sus membranas aceptoras y en muchos procesos biológicos, como la señalización en respuesta a condiciones de estrés abiótico (Salinas-Cornejo et al., 2019). Son proteínas relativamente pequeñas, en un rango de 200 – 400 aminoácidos, donde el dominio SNARE es propenso a formar estructuras “coiled-coil” (Lipka et al., 2007). Gran parte de las proteínas SNARE descritas poseen dominios transmembrana; sin embargo, algunas proteínas SNARE se anclan a las membranas mediante modificaciones lipídicas (Saito & Ueda, 2009). Junto con esto, se ha postulado que las proteínas homólogas de SNAP-25, una proteína del tipo Qb+Qc-SNARE, poseen un sitio donde ocurre una modificación postraducciona conocida como palmitoilación, que contribuiría en la estabilidad de su asociación con la membrana plasmática (Gonzalo &

Linder, 1998; Greaves & Chamberlain, 2011; Won & Kim, 2020). Los resultados mostraron que la proteína SISLSP6 posee un putativo dominio transmembrana, predicho como un sitio de señalización de una palmitoilación. Este tipo de modificaciones postraduccionales reversibles permitiría un rol pivote en las asociaciones con membranas o interacciones con otras proteínas, regulando su tráfico o modulando su estabilidad; y en la señalización de estrés abiótico, anclando proteínas en la membrana en respuesta de las plantas frente condiciones de estrés ambiental, como estrés salino y osmótico (Singh et al., 2016; Won & Kim, 2020). De la misma forma, en otras SNARE-like descritas se ha identificado la presencia de secuencias señales donde ocurren modificaciones lipídicas, aumentando la afinidad de las proteínas solubles por las membranas permitiendo su inserción. Tal es el caso de SbSLSP de la planta halófito *Salicornia brachiata*, en la que se ha predicho un sitio de miristilación en la posición aminoacídica 125 – 130 (GVLENT) (Singh et al., 2016). De modo complementario, se realizó el análisis predictivo de sitios de putativas modificaciones de tipo lipídica sobre la secuencia SNARE-like de *Arabidopsis thaliana*, mostrando sitios de posibles palmitoilaciones o miristilaciones (Figura 7); lo cual sugiere que modificaciones postraduccionales aumentan la afinidad de las SNARE-like a la membrana o a ciertas proteínas, siendo una característica general que requiere mayor investigación.

Además, la proteína SISLSP6 también presentó un dominio conservado asociado con las clatrininas, un complejo de proteínas que está involucrado en el ensamblaje de las capas que recubren las vesículas (CCVs) que brotan desde la membrana plasmática, importantes en la selección de la carga que será transportada y de la dirección del transporte. Se ha descrito que estas CCVs forman parte del transporte de proteínas de membrana mediante la ruta de endocitosis (Reynolds et al., 2018). En este contexto, algunas proteínas de la superfamilia de SNARE-like han sido descritas en plantas, entre ellas LOLITA de *Arabidopsis thaliana* (Gadeyne et al., 2014) y SbSLSP de *S. brachiata* (Singh et al., 2016). Estas proteínas se han asociado con mecanismos de regulación de la endocitosis mediada por clatrininas y en respuesta a estrés salino y osmótico, según lo observado en plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresaban *SbSLSP* de la planta halófito *Salicornia brachiata*, mejorando su tolerancia en comparación con las plantas sin transformar (Singh et al., 2016).

La membrana plasmática es la barrera esencial de la célula, que permite la intercomunicación entre las diferentes células y en la cual se lleva a cabo la adición y remoción de canales iónicos, transportadores, receptores, entre otras proteínas de membrana, frente a diferentes estímulos (Fan et al., 2015). Entre los procesos de endocitosis, la CME o endocitosis mediada por clatrina es la ruta endocítica determinada por la participación de proteínas que recubren las vesículas, denominadas clatrina (Wang et al., 2020). Los resultados obtenidos en el análisis *in silico* de SISLSP6 mostrados anteriormente, indicaron que esta proteína poseía el dominio “Clat_adaptor_s”, que permite la interacción con las proteínas de cubierta de vesículas, clatrina, en conjunto con el dominio “Longin-like”, que permitió su clasificación como una proteína SNARE-like y predecir que tiene un comportamiento similar funcional y estructuralmente a las proteínas R-SNARE (Hong & Lev, 2014). El análisis realizado mediante la técnica de AGROBEST permitió, de forma transitoria, observar la colocalización subcelular de la proteína SISLSP6 con diferentes marcadores de organelos. Este análisis mostró que esta SNARE-like se localizó predominantemente en membrana plasmática, dando soporte al análisis *in silico* desarrollado. También, se identificó la presencia de pequeñas estructuras en la vecindad de la membrana plasmática, de naturaleza desconocida. Se ha descrito que la red de trans-Golgi es un eje esencial del cual se bifurcan múltiples rutas de tráfico de vesículas, incluyendo la vía secretora y vacuolar (Uemura et al., 2019). Si bien, no se observó una colocalización con VTI12, marcador de EE/TGNE, no se puede descartar que estas estructuras de carácter desconocido pudiesen corresponder a endosomas que participan en una ruta diferente a la relacionada con el marcador utilizado. Junto con esto, las proteínas SbSLSP de *S. brachiata* y LOLITA de *Arabidopsis* también se localizan en membrana plasmática, por lo que su localización en tomate podría indicar la mantención del mecanismo de acción de esta SNARE-like. Singh et al., (2016) propusieron un modelo hipotético donde SbSLSP cumpliría un rol bajo estrés abiótico, mediando el aumento de la internación de vesículas recubiertas con clatrina y provenientes de la membrana plasmática. Esto permitiría mejorar la integridad y estabilidad de las membranas celulares, aumentando el recambio de lípidos de membrana y la eficiencia de diferentes transportadores. Gadeyne et al., (2014) establecieron que LOLITA forma parte de un complejo denominado TPLATE, conformado por 8 proteínas adaptadoras, que, en conjunto, dirigen la endocitosis mediada por clatrina en plantas. La CME ha sido bien caracterizada en eucariontes, sin embargo, no

ha sido bien dilucidado el mecanismo de acción en plantas, por lo que las investigaciones en especies vegetales se han intensificado recientemente (Narasimhan et al., 2020; Wang et al., 2020). Además, el análisis de expresión relativa realizado para la identificación de las proteínas SNARE-like en tomate (Figura 9) sugiere que *SISLSP6* podría estar cumpliendo un rol importante bajo condiciones de estrés salino. De la misma forma, genes como *GsSNAP33* de *Glycine soja* (Nisa et al., 2017), *SISNAP33* de *Solanum lycopersicum* (Salinas-Cornejo et al., 2021), *AtSFT12* de *Arabidopsis thaliana* (Tarte et al., 2012), *SbSLSP* de *Salicornia brachiata* (Singh et al., 2016), e incluso genes que son utilizados como marcadores de estrés salino, como *SlAREB1* de *S. lycopersicum* (Orellana et al., 2010), se inducen por sobre los niveles basales de expresión génica cuando las plantas son sometidas a diferentes concentraciones salinas y participan en la activación de mecanismos de tolerancia. Por lo tanto, todos estos antecedentes permiten especular que la función de esta SNARE-like de tomate, asociada en abundancia a la membrana plasmática, podría estar generando un aumento en el tráfico vesicular y modulando la endocitosis mediada por clatrin, siendo un candidato capaz de contribuir en la respuesta de las plantas frente a condiciones adversas, como el estrés por salinidad analizado en esta tesis.

IV.2 La proteína SISLSP6 aumenta el tráfico vesicular, implicando una mayor tolerancia frente al estrés salino en tomate.

Las condiciones adversas, como el estrés por salinidad, pueden inhibir el normal crecimiento de las plantas y afectar su desarrollo, ya sea en etapas como la germinación o en tiempos tempranos de crecimiento, incluso en el rendimiento de los cultivos, lo que se verá reflejado en el tamaño de las plantas, la alteración en la diferenciación de tejidos y órganos y una reducción del peso fresco (Nisa et al., 2017). Sin embargo, estudios previos han evidenciado que la sobreexpresión de genes permite mejorar algunos parámetros fisiológicos y bioquímicos de las plantas cuando éstas se encuentran sometidas a estrés abiótico. Por ello, una estrategia que permita indagar sobre los efectos que podría provocar la sobreexpresión de un gen SNARE-like y analizar los mecanismos que generan esta tolerancia al estrés salino, representa una alternativa de estudio del funcionamiento de *SISLSP6* en tomate. Además, estudios que involucren la sobreexpresión de este tipo de genes en tomate aún no han sido

descritos. En concordancia, esta investigación reveló que la sobreexpresión de *SISLSP6* mejoró los parámetros fisiológicos y bioquímicos de las plantas de tomate sometidas a estrés salino en comparación a lo observado en las plantas control (WT y LC). Las diferencias fueron evidentes desde los 15 días de tratamiento salino y fueron en aumento hasta finalizar el tratamiento de estrés (Figura 13). En estudios previos, se observó que plantas de tomate silvestre sometidas a 300 mM de NaCl presentaron síntomas evidentes de estrés alrededor de los 15 días, disminuyendo el contenido relativo de agua y la fotosíntesis, síntomas atribuibles a una interrupción del normal funcionamiento y mantención de la estructura celular (Orellana et al., 2010). El tratamiento salino causó una constante y marcada inhibición de la maquinaria fotosintética en las plantas controles, a diferencia de lo observado en las líneas sobreexpresoras de *SISLSP6*, que mantuvieron un funcionamiento adecuado, demostrando una mejor tasa fotosintética. La sobreexpresión de *GsSNAP33* de *Glycine soja* en plantas de *Arabidopsis* también generó tolerancia bajo condiciones de estrés abiótico, donde los genotipos transgénicos presentaron una mayor tasa de sobrevivencia, mayor producción de biomasa y una mayor tasa fotosintética (Nisa et al., 2017). Bajo estrés salino o por déficit de agua, ocurre un cierre de los estomas que limita la concentración de CO₂ y daña la maquinaria fotoquímica de las hojas, deprimiendo fuertemente la fotosíntesis (Chaves et al., 2009). En las plantas de tomate WT y LC fueron evidentes los efectos adversos a nivel fisiológico y morfológico (Figura 12, Figura 13). En contraste, las plantas sobreexpresoras se mostraron más tolerantes a las condiciones de estrés salino, manteniendo la turgencia de sus hojas, lo que indicaría que estas plantas tienen una menor pérdida de agua. Similar a lo determinado para *SISLSP6*, se observó que plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresaban el gen *AtSFT12* y que fueron sometidas a condiciones de estrés salino, presentaron un mayor peso fresco y hojas más verdes en comparación a las plantas control (Tarte et al., 2015). Esto sugiere un cambio en la distribución de algunas proteínas que residen en la membrana plasmática, como las aquaporinas, que podrían estar involucradas en la disminución de la pérdida de agua intracelular (Baral et al., 2015b). Asimismo, una condición hiperosmótica desorganiza el equilibrio de las membranas celulares; disminuye el volumen celular, lo que conlleva un exceso de membrana plasmática que debe ser endocitado para reestablecer el turgor de la célula (Zhang et al., 2019; Zwiewka et al., 2015). El tráfico vesicular es el proceso indispensable en la vida de las plantas, que permite el movimiento de materiales celulares al

interior de pequeñas vesículas. Específicamente, la endocitosis juega un rol fundamental en la remoción y/o relocalización de proteínas, lípidos y otros materiales de la membrana plasmática (Baral et al., 2015b). Se ha reportado que durante el estrés salino ocurre un aumento de la endocitosis, analizado mediante la internalización del marcador FM4-64 en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Baral et al., 2015a). Del mismo modo, en esta investigación se evidenció un aumento de la endocitosis en las líneas sobreexpresoras de tomate, respecto de las plantas control, considerando tanto condiciones normales como condiciones de estrés salino, que fue cuantificado mediante la internalización del indicador FM4-64 (Figura 15). Otras evidencias indican la consistencia de estos resultados, como es el caso de las plantas tolerantes a estrés salino que sobreexpresan *AtRabGDII* (San Martín-Davison et al., 2017) o *SISNAP33* (Salinas-Cornejo et al., 2021), sugiriendo que ocurre una aceleración de la endocitosis en las raíces de plantas de tomate sobreexpresoras de *SISLSP6*. Del mismo modo, se hipotetiza que la sobreexpresión de *SbSLSP* de *S. brachiata* aumentaría la endocitosis mediada por clatrin, mejorando la estabilidad e integridad de las membranas y modificando la distribución de los transportadores en la membrana plasmática (Singh et al., 2016). El aumento de la endocitosis observado en las líneas transgénicas podría estar contribuyendo a la internalización de membrana plasmática, para restablecer la turgencia de las células (Zwiewka et al., 2015), y a la remoción de proteínas desde la membrana plasmática, como aquaporinas, para permitir el ajuste osmótico al interior de las células. Este mecanismo se activaría tanto frente a las condiciones de estrés salino aplicadas en esta investigación como a otros tipos de estrés abiótico, otorgando mayor tolerancia en las plantas de tomate.

Para mitigar las consecuencias que produce el estrés salino, tanto a nivel fisiológico, celular y molecular, las plantas responden activando diferentes mecanismos. Una alta concentración de iones Na^+ causará un desequilibrio iónico, que repercutirá no sólo provocando un ingreso masivo de iones tóxicos al interior de las células, sino que también producirá cambios a nivel lipídico (Baral et al., 2015b). Además, como el estrés salino genera especies reactivas de oxígeno que inducen un daño oxidativo en macromoléculas, como los lípidos de membranas celulares, es que se procedió a cuantificar los niveles de MDA, un producto final en la lipoperoxidación de membranas que es considerado un marcador real de daño de membranas bajo condiciones de estrés (Jouve et al., 1993; Zhang & Kirkham, 1994). La evidencia

obtenida en esta investigación indicó que las líneas sobreexpresoras mostraron un menor daño a nivel de membranas celulares (Figura 13). Estudios previos han reportado que plantas de tabaco que sobreexpresan el gen *SNARE-like*, *SbSLSP*, de *Salicornia brachiata* presentan menores niveles de MDA en respuesta a estrés, en comparación con las plantas controles (Singh et al., 2016). De la misma forma, una SNARE descrita en tomate, *SISNAP33*, también ha mostrado otorgar tolerancia a plantas de tomate cuando es sobreexpresada, mejorando la tolerancia de las plantas sometidas a condiciones de estrés salino, indicando que éstas presentan un menor daño en las membranas celulares (Salinas-Cornejo et al., 2021). Cuando las plantas están sometidas a condiciones hiperosmóticas, provocadas por estrés salino, por ejemplo, la respuesta de las células está asociada con la producción de especies reactivas de oxígeno y la compartimentación de iones tóxicos en las vacuolas, por mencionar algunos mecanismos (Zwiewka et al., 2015). Aquí, se ha evidenciado mediante el uso del trazador fluorescente H_2DCFDA , que la sobreexpresión de *SISLSP6* en plantas de tomate causa una reducción significativa de peróxido de hidrógeno, observado principalmente en la línea transgénica L10 (Figura 16). Esta respuesta también ha sido reportada en plantas de tomate que sobreexpresan *SISNAP33*, lo que se ha asociado con la endocitosis de NADPH oxidasas de membrana plasmática (Salinas-Cornejo et al., 2021), generando una menor producción de ROS en células radiculares. Además, en plantas de *Arabidopsis thaliana* también ha sido reportado que la internalización de NADPH oxidasas, como RbohD, genera que la producción de ROS se produzca al interior de vesículas, disminuyendo sus niveles en las células (Leshem et al., 2006). Esto es interesante, ya que esta disminución de la acumulación de ROS en las vacuolas generaría una mayor compartimentación de sodio vacuolar cuando las plantas son sometidas a estrés salino. Se sugiere que ocurriría una disminución del daño oxidativo en el tonoplasto y de las v-ATPasas, ayudando a mantener el gradiente de protones y promover el secuestro del sodio citoplasmático en el interior de la vacuola (Leshem & Levine, 2007). En este contexto, los resultados obtenidos mostraron que las plantas transgénicas poseían mayor acumulación de sodio en las vacuolas en comparación con las plantas control (Figura 17). Similares resultados fueron expuestos por Tarte et al., 2015 y Salinas-Cornejo et al., 2021, donde se mostró que, tanto las plantas sobreexpresoras de *AtSFT12* de *Arabidopsis thaliana* sometidas a 100 mM de NaCl como las plantas sobreexpresoras de *SISNAP33* de *Solanum lycopersicum* sometidas a 200 mM de NaCl

compartimentaron más sodio en las vacuolas, que fue monitoreado con el trazador fluorescente Sodium Green, siendo un efecto decisivo en la tolerancia a estrés salino. Interesantemente, junto con la acumulación de sodio en las vacuolas, se observó tinción con Sodium Green en unos compartimentos redondeados al interior de las células (Figura 17), de los cuales se desconoce su naturaleza. Dado que estas estructuras presentaron tinción con el marcador de membranas FM4-64, se podría suponer que están delimitados por una membrana lipídica, ya que este marcador fluorescente es ampliamente utilizado en estudios de tráfico de vesículas (Jelínková et al., 2010). Estos compartimentos se observaron mayoritariamente en las plantas sometidas a estrés salino, teñidos tanto con FM4-64 como con Sodium Green (Figura 17). En las plantas bajo condiciones normales, estos putativos endosomas fueron teñidos sólo con el marcador de membranas (Figura S7). Sin embargo, en las plantas sobreexpresoras, pareciera ser que estas estructuras están acumulando mayor cantidad de sodio que en las plantas WT. Se podría especular que estos compartimentos poseen características similares a cuerpos endosomales o prevacuolares, que estarían secuestrando los iones de sodio provenientes del citosol, mediado por los antiportadores de Na^+/H^+ NHX5 y NHX6, que residen en estructuras endosomales móviles (Bassil et al., 2011). De similares características fue lo descrito por Hamaji et al., 2009, quienes, en estudios sobre la dinámica de acumulación de iones, observaron la formación de vesículas que rodeaban a las vacuolas en células de raíces de *A. thaliana*. Estas vesículas fueron marcadas con el trazador fluorescente Sodium Green, lo que permite asumir que se trata de acumulación de sodio al interior de estos compartimentos. De todas formas, para dar certezas de estas especulaciones se requiere de mayor investigación. Por lo tanto, de esta tesis surgen los planteamientos que implican que: ocurriría una aceleración de la endocitosis, activando la remoción de transportadores desde la membrana plasmática; en consecuencia de lo anterior, se generaría un aumento de la exocitosis, permitiendo el recambio de lípidos dañados desde la membrana; aumentaría el tráfico hacia la vacuola, retirándose en mayor proporción el exceso de sodio desde el citosol para evitar sus efectos tóxicos intracelulares, para finalmente obtener una mejorada tolerancia de las plantas de tomate sobreexpresoras de *SISLSP6* al estrés salino.

V. CONCLUSIONES.

- Las proteínas deducidas de los genes *SISLSP3*, *SISLSP6* y *SISLSP11* identificados en *S. lycopersicum* se clasifican dentro de la superfamilia SNARE-like.
- Las proteínas SISLSP3 y SISLSP6 presentan alta homología con proteínas de las plantas *S. brachiata*, *Z. marina* y *S. pennelli*, todas plantas más tolerantes a la salinidad.
- *SISLSP6* aumenta su expresión relativa en plantas bajo condiciones de salinidad.
- La proteína SISLSP6 se localiza principalmente en la membrana plasmática. La presencia del dominio denominado “Clat_adaptor_s” sugiere su involucramiento en los mecanismos mediados por las clatrin.
- SISLSP6 es una proteína que participa del tráfico vesicular, estimulando la endocitosis y generando aumento del tráfico vesicular hacia la vacuola.
- Se genera un menor daño en las plantas de tomate sobreexpresoras de *SISLSP6* en comparación con lo observado en los genotipos controles, resultando en la obtención de plantas más tolerantes al estrés salino.

VI. PROYECCIONES.

Del desarrollo de esta tesis se desprenden proyecciones de ciencia básica y biotecnológicas.

Entre las de carácter de ciencia básica hay dos proyecciones:

- La primera se deriva de la evidencia que las SNARE-like identificadas en tomate no poseen dominio transmembrana. Sin embargo, se identificó en sus secuencias aminoacídicas un motivo donde ocurre una putativa palmitoilación (en Cys115), que correspondería a su dominio de anclaje. Este resultado requiere de mayores evidencias para verificar esta putativa palmitoilación, lo que podría ser abordado realizando, por ejemplo, una mutación sitio dirigida en Cys115 y analizar sus efectos.
- La segunda surge de la identificación del dominio de interacción con las proteínas clatras “Clat_adaptor_s” sobre la proteína *SISLSP6* y su localización subcelular predominante en la membrana plasmática, lo que sugiere que participaría en la endocitosis mediada por clatras. Una propuesta para dilucidar si efectivamente esta SNARE-like participa de la endocitosis mediada por clatras podría ser utilizar reactivos que reduzcan o inhiban específicamente la endocitosis mediada por clatras y cuantificar los efectos en la endocitosis en plantas controles y sobreexpresoras de *SISLSP6* bajo condiciones de estrés salino. Otra alternativa es analizar el efecto en la endocitosis dependiente de clatrina en plantas que tengan silenciado el gen *SISLSP6*.

Desde una perspectiva biotecnológica, esta tesis abre la posibilidad:

- Primero, de utilizar el gen como marcador para buscar genotipos de plantas de interés agronómico que expresen con mayor eficiencia dicho gen bajo condiciones de estrés salino y así obtener plantas con mayor tolerancia a este estrés abiótico.
- Como segunda opción y dado que una inducción, de al menos, dos veces en la expresión de *SISLSP6* permitió modular la tolerancia a estrés salino en las plantas de tomate, permite plantear la posibilidad de generar una sobreexpresión controlada de este gen en otras especies dicotiledóneas de interés agronómico y así ofrecer una alternativa de cultivo en lugares que presentan problemas de salinidad de los suelos agrícolas.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology*, 55, 373–399.

Banfield, D. K., Lewis, M. J., & Pelham, H. R. (1995). A SNARE-like protein required for traffic through the Golgi complex. *Nature*, 375(6534), 806–809.

Batley, N. H., James, N. C., Greenland, A. J., & Brownlee, C. (1999). Exocytosis and endocytosis. *The Plant cell*, 11(4), 643–660.

Baral, A., Irani, N. G., Fujimoto, M., Nakano, A., Mayor, S., & Mathew, M. K. (2015a). Salt-induced remodeling of spatially restricted clathrin-independent endocytic pathways in *Arabidopsis* root. *The Plant cell*, 27(4), 1297–1315.

Baral, A., Shruthi, K. S., & Mathew, M. K. (2015b). Vesicular trafficking and salinity responses in plants. *IUBMB life*, 67(9), 677–686.

Bassil, E., Ohto, M. A., Esumi, T., Tajima, H., Zhu, Z., Cagnac, O., Belmonte, M., Peleg, Z., Yamaguchi, T., & Blumwald, E. (2011). The *Arabidopsis* intracellular Na⁺/H⁺ antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. *The Plant cell*, 23(1), 224–239.

Besserer, A., Burnotte, E., Bienert, G. P., Chevalier, A. S., Errachid, A., Grefen, C., Blatt, M. R., & Chaumont, F. (2012). Selective regulation of maize plasma membrane aquaporin trafficking and activity by the SNARE SYP121. *The Plant cell*, 24(8), 3463–3481.

Bubeck, J., Scheuring, D., Hummel, E., Langhans, M., Viotti, C., Foresti, O., Denecke, J., Banfield, D. K., & Robinson, D. G. (2008). The syntaxins SYP31 and SYP81 control ER-Golgi trafficking in the plant secretory pathway. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(10), 1629–1652.

Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 103, 551–560.

Chen, X., Irani, N. G., & Friml, J. (2011). Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. *Current opinion in plant biology*, 14(6), 674–682.

Chen, T. H., & Murata, N. (2011). Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, cell & environment*, 34(1), 1–20.

Delevoeye, C., Nilges, M., Dehoux, P., Paumet, F., Perrinet, S., Dautry-Varsat, A., & Subtil, A. (2008). SNARE protein mimicry by an intracellular bacterium. *PLoS pathogens*, 4(3), e1000022.

Dettmer, J., Hong-Hermesdorf, A., Stierhof, Y. D., & Schumacher, K. (2006). Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *The Plant cell*, 18(3), 715–730.

Dionisio-Sese, M., & Tobita, S. (1998). Antioxidant response of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science* 135(1), 1–9.

El-Kasmi, F., Pacher, T., Strompen, G., Stierhof, Y. D., Müller, L. M., Koncz, C., Mayer, U., & Jürgens, G. (2011). Arabidopsis SNARE protein SEC22 is essential for gametophyte development and maintenance of Golgi-stack integrity. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 66(2), 268–279.

Fan, L., Li, R., Pan, J., Ding, Z., & Lin, J. (2015). Endocytosis and its regulation in plants. *Trends in plant science*, 20(6), 388–397.

Fillati, J., Kiser, J., & Rose, R. (1987). Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary tumefaciens vector. *Biotechnology* 5, 726–730.

Foresti, O., daSilva, L. L., & Denecke, J. (2006). Overexpression of the Arabidopsis syntaxin PEP12/SYP21 inhibits transport from the prevacuolar compartment to the lytic vacuole in vivo. *The Plant cell*, 18(9), 2275–2293.

Gadeyne, A., Sánchez-Rodríguez, C., Vanneste, S., Di Rubbo, S., Zauber, H., Vanneste, K., Van Leene, J., De Winne, N., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Cannoot, B., Vercruyse, L., Mayers, J. R., Adamowski, M., Kania, U., Ehrlich, M., Schweighofer, A., Ketelaar, T., Maere, S., ... Van Damme, D. (2014). The TPLATE adaptor complex drives clathrin-mediated endocytosis in plants. *Cell*, 156(4), 691–704.

Geldner, N., Déneraud-Tendon, V., Hyman, D. L., Mayer, U., Stierhof, Y. D., & Chory, J. (2009). Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 59(1), 169–178.

Ghanem, M. E., Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Romero-Aranda, R., Dodd, I. C., Lutts, S., & Pérez-Alfocea, F. (2008). Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of experimental botany*, 59(11), 3039–3050.

Giorio, P. (2011). Black leaf-clips increased minimum fluorescence emission in clipped leaves exposed to high solar radiation during dark adaptation. *Photosynthetica*, 49(371).

Gonzalo, S., & Linder, M. E. (1998). SNAP-25 palmitoylation and plasma membrane targeting require a functional secretory pathway. *Molecular biology of the cell*, 9(3), 585–597.

Greaves, J., & Chamberlain, L. H. (2011). DHHC palmitoyl transferases: substrate interactions and (patho)physiology. *Trends in biochemical sciences*, 36(5), 245–253.

Grefen, C., Karnik, R., Larson, E., Lefoulon, C., Wang, Y., Waghmare, S., Zhang, B., Hills, A., & Blatt, M. R. (2015). A vesicle-trafficking protein commandeers Kv channel voltage sensors for voltage-dependent secretion. *Nature plants*, 1, 15108.

Hamaji, K., Nagira, M., Yoshida, K., Ohnishi, M., Oda, Y., Uemura, T., Goh, T., Sato, M. H., Morita, M. T., Tasaka, M., Hasezawa, S., Nakano, A., Hara-Nishimura, I., Maeshima, M., Fukaki, H., & Mimura, T. (2009). Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis*. *Plant & cell physiology*, 50(12), 2023–2033.

Hao, H., Fan, L., Chen, T., Li, R., Li, X., He, Q., Botella, M. A., & Lin, J. (2014). Clathrin and Membrane Microdomains Cooperatively Regulate RbohD Dynamics and Activity in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 26(4), 1729–1745.

Hong, W., & Lev, S. (2014). Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends in cell biology*, 24(1), 35–43.

Jelínková, A., Malínská, K., Simon, S., Kleine-Vehn, J., Parezová, M., Pejchar, P., Kubes, M., Martinec, J., Friml, J., Zazimalová, E., & Petrásek, J. (2010). Probing plant membranes with FM dyes: tracking, dragging or blocking?. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 61(5), 883–892.

Jiang, Z., Zhou, X., Tao, M., Yuan, F., Liu, L., Wu, F., Wu, X., Xiang, Y., Niu, Y., Liu, F., Li, C., Ye, R., Byeon, B., Xue, Y., Zhao, H., Wang, H. N., Crawford, B. M., Johnson, D. M., Hu, C., Pei, C., ... Pei, Z. M. (2019). Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca²⁺ influx. *Nature*, 572(7769), 341–346.

Jouve, L., Engelmann, F., Noirot, M., & Charrier, A. (1993). Evaluation of biochemical markers (sugar, proline, malondialdehyde and ethylene) for cold sensitivity in microcuttings of two coffee species. *Plant Science*, 91(1), 109-116.

Karnik R., Zhang B., Waghmare S., Aderhold C., Grefen C., Blatt M. Binding of SEC11 Indicates its Role in SNARE Recycling After Vesicle Fusion and Identifies Two Pathways for Vesicular Traffic to the Plasma Membrane. 2015. *The Plant Cell* 27: 675 – 694.

Karnik, R., Waghmare, S., Zhang, B., Larson, E., Lefoulon, C., Gonzalez, W., & Blatt, M. R. (2017). Commandeering Channel Voltage Sensors for Secretion, Cell Turgor, and Volume Control. *Trends in plant science*, 22(1), 81–95.

Kim, S. J., & Brandizzi, F. (2012). News and Views into the SNARE Complexity in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 3, 28.

Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, 305(3), 567–580.

Kwon, C., & Yun, H. S. (2014). Plant exocytic secretion of toxic compounds for defense. *Toxicological research*, 30(2), 77–81.

Leshem, Y., Golani, Y., Kaye, Y., & Levine, A. (2010). Reduced expression of the v-SNAREs AtVAMP71/AtVAMP7C gene family in Arabidopsis reduces drought tolerance by suppression of abscisic acid-dependent stomatal closure. *Journal of experimental botany*, 61(10), 2615–2622.

Leshem, Y., Melamed-Book, N., Cagnac, O., Ronen, G., Nishri, Y., Solomon, M., Cohen, G., & Levine, A. (2006). Suppression of Arabidopsis vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), 18008–18013.

Leshem, Y., & Levine, A. (2007). Intracellular ROS: What Does it Do There?. *Plant signaling & behavior*, 2(3), 155–156.

Leshem, Y., Seri, L., & Levine, A. (2007). Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 51(2), 185–197.

Lichtenthaler, H., & Wellburn, A. (1983). Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extract in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11(5), 591–592.

Lipka, V., Kwon, C., & Panstruga, R. (2007). SNARE-ware: the role of SNARE-domain proteins in plant biology. *Annual review of cell and developmental biology*, 23, 147–174.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408.

Macková, H., Hronková, M., Dobrá, J., Turečková, V., Novák, O., Lubovská, Z., Motyka, V., Haisel, D., Hájek, T., Prášil, I. T., Gaudinová, A., Štorchová, H., Ge, E., Werner, T., Schmölling, T., & Vanková, R. (2013). Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. *Journal of experimental botany*, 64(10), 2805–2815.

Mai, H. T., Nomura, M., Takegawa, K., Asamizu, E., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., & Tajima, S. (2006). Identification of a Sed5-like SNARE gene LjSYP32-1 that contributes to nodule tissue formation of *Lotus japonicus*. *Plant & cell physiology*, 47(7), 829–838.

Maggio, A., Raimondi, G., Martino, A., & De Pascale, S. (2007). Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environmental and Experimental Botany*, 59(3), 276–282.

Martinière, A., Fiche, J. B., Smokvarska, M., Mari, S., Alcon, C., Dumont, X., Hematy, K., Jaillais, Y., Nollmann, M., & Maurel, C. (2019). Osmotic Stress Activates Two Reactive Oxygen Species Pathways with Distinct Effects on Protein Nanodomains and Diffusion. *Plant physiology*, 179(4), 1581–1593.

Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology*, 59, 651–681.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.

Narasimhan, M., Johnson, A., Prizak, R., Kaufmann, W. A., Tan, S., Casillas-Pérez, B., & Friml, J. (2020). Evolutionarily unique mechanistic framework of clathrin-mediated endocytosis in plants. *eLife*, 9, e52067.

Nisa, Z. U., Mallano, A. I., Yu, Y., Chen, C., Duan, X., Amanullah, S., Kousar, A., Baloch, A. W., Sun, X., Tabys, D., & Zhu, Y. (2017). GsSNAP33, a novel Glycine soja SNAP25-type protein gene: Improvement of plant salt and drought tolerances in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology and biochemistry: PPB*, 119, 9–20.

Orellana, S., Yañez, M., Espinoza, A., Verdugo, I., González, E., Ruiz-Lara, S., & 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 & environment*, 33(12), 2191–2208.

Paul, P., Simm, S., Mirus, O., Scharf, K. D., Fragkostefanakis, S., & Schleiff, E. (2014). The complexity of vesicle transport factors in plants examined by orthology search. *PloS one*, 9(5), e97745.

Paumet, F., Wesolowski, J., Garcia-Diaz, A., Delevoye, C., Aulner, N., Shuman, H. A., Subtil, A., & Rothman, J. E. (2009). Intracellular bacteria encode inhibitory SNARE-like proteins. *PloS one*, 4(10), e7375.

Pizarro, L., & Norambuena, L. (2014). Regulation of protein trafficking: posttranslational mechanisms and the unexplored transcriptional control. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 225, 24–33.

Reichardt, I., Slane, D., El Kasmi, F., Knöll, C., Fuchs, R., Mayer, U., Lipka, V., & Jürgens, G. (2011). Mechanisms of functional specificity among plasma-membrane syntaxins in *Arabidopsis*. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 12(9), 1269–1280.

Reynolds, G. D., Wang, C., Pan, J., & Bednarek, S. Y. (2018). Inroads into Internalization: Five Years of Endocytic Exploration. *Plant physiology*, 176(1), 208–218.

Ronzone, E., & Paumet, F. (2013). Two coiled-coil domains of *Chlamydia trachomatis* IncA affect membrane fusion events during infection. *PloS one*, 8(7), e69769.

Saito, C., & Ueda, T. (2009). Chapter 4: functions of RAB and SNARE proteins in plant life. *International review of cell and molecular biology*, 274, 183–233.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406–425.

Salinas-Cornejo, J., Madrid-Espinoza, J., & Ruiz-Lara, S. (2019). Identification and transcriptional analysis of SNARE vesicle fusion regulators in tomato (*Solanum lycopersicum*) during plant development and a comparative analysis of the response to salt stress with wild relatives. *Journal of plant physiology*, 242, 153018.

Salinas-Cornejo, J., Madrid-Espinoza, J., Verdugo, I., Pérez-Díaz, J., Martín-Davison, A. S., Norambuena, L., & Ruiz-Lara, S. (2021). The Exocytosis Associated SNAP25-Type Protein, SISNAP33, Increases Salt Stress Tolerance by Modulating Endocytosis in Tomato. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(7), 1322.

Sanderfoot, A. A., Kovaleva, V., Bassham, D. C., & Raikhel, N. V. (2001). Interactions between syntaxins identify at least five SNARE complexes within the Golgi/prevacuolar system of the *Arabidopsis* cell. *Molecular biology of the cell*, 12(12), 3733–3743.

Sanmartín, M., Ordóñez, A., Sohn, E. J., Robert, S., Sánchez-Serrano, J. J., Surpin, M. A., Raikhel, N. V., & Rojo, E. (2007). Divergent functions of VTI12 and VTI11 in trafficking to storage and lytic vacuoles in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(9), 3645–3650.

San Martín-Davison, A., Pérez-Díaz, R., Soto, F., Madrid-Espinoza, J., González-Villanueva, E., Pizarro, L., Norambuena, L., Tapia, J., Tajima, H., Blumwald, E., & Ruiz-Lara, S. (2017). Involvement of SchRabGDI1 from *Solanum chilense* in endocytic trafficking and tolerance to salt stress. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 263, 1–11.

Sansebastiano, G., & Piro, G. (2014). The SNARE Proteins (in Plants) Beyond the Nobel Prize. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology*, 2(2), e122.

Schwihla, M., & Korbei, B. (2020). The Beginning of the End: Initial Steps in the Degradation of Plasma Membrane Proteins. *Frontiers in plant science*, 11, 680.

Shirakawa, M., Ueda, H., Shimada, T., Koumoto, Y., Shimada, T. L., Kondo, M., Takahashi, T., Okuyama, Y., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2010). *Arabidopsis* Qa-SNARE SYP2 proteins localized to different subcellular regions function redundantly in vacuolar protein sorting and plant development. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 64(6), 924–935.

Singh, D., Yadav, N. S., Tiwari, V., Agarwal, P. K., & Jha, B. (2016). A SNARE-Like Superfamily Protein SbSLSP from the Halophyte *Salicornia brachiata* Confers Salt and Drought Tolerance by Maintaining Membrane Stability, K(+)/Na(+) Ratio, and Antioxidant Machinery. *Frontiers in plant science*, 7, 737.

Sun, X., Ji, W., Ding, X., Bai, X., Cai, H., Yang, S., Qian, X., Sun, M., Zhu, Y. (2012). GsVAMP72, a novel *Glycine soja* R-SNARE protein, is involved in regulating plant salt tolerance and ABA sensitivity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 113(2), 199–215.

Sutter, J. U., Campanoni, P., Tyrrell, M., & Blatt, M. R. (2006). Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the Arabidopsis KAT1 K⁺ channel at the plasma membrane. *The Plant cell*, 18(4), 935–954.

Suwastika, I. N., Uemura, T., Shiina, T., Sato, M. H., & Takeyasu, K. (2008). SYP71, a plant-specific Qc-SNARE protein, reveals dual localization to the plasma membrane and the endoplasmic reticulum in Arabidopsis. *Cell structure and function*, 33(2), 185–192.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725–2729.

Tapia, G., Méndez, J., & Inostroza, L. (2016). Different combinations of morpho-physiological traits are responsible for tolerance to drought in wild tomatoes *Solanum chilense* and *Solanum peruvianum*. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 18(3), 406–416.

Takemoto, K., Ebine, K., Askani, J. C., Krüger, F., Gonzalez, Z. A., Ito, E., Goh, T., Schumacher, K., Nakano, A., & Ueda, T. (2018). Distinct sets of tethering complexes, SNARE complexes, and Rab GTPases mediate membrane fusion at the vacuole in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(10), E2457–E2466.

Tarte, V. N., Seok, H. Y., Woo, D. H., Le, D. H., Tran, H. T., Baik, J. W., Kang, I. S., Lee, S. Y., Chung, T., & Moon, Y. H. (2015). Arabidopsis Qc-SNARE gene AtSFT12 is involved in salt and osmotic stress responses and Na⁽⁺⁾ accumulation in vacuoles. *Plant cell reports*, 34(7), 1127–1138.

Torres-Schumann, S., Godoy, J. A., & Pintor-Toro, J. A. (1992). A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant molecular biology*, 18(4), 749–757.

Uemura, T., Morita, M. T., Ebine, K., Okatani, Y., Yano, D., Saito, C., Ueda, T., & Nakano, A. (2010). Vacuolar/pre-vacuolar compartment Qa-SNAREs VAM3/SYP22 and PEP12/SYP21 have interchangeable functions in Arabidopsis. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 64(5), 864–873.

Uemura, T., Nakano, R., Takagi, J., Wang, Y., Kramer, K., Finkemeier, I., Nakagami, H., Tsuda, K., Ueda, T., Schulze-Lefert, P., & Nakano, A. (2019). A golgi-released subpopulation of the trans-golgi network mediates protein secretion in Arabidopsis. *Plant physiology*, 179(2), 519–532.

Uemura, T., & Ueda, T. (2014). Plant vacuolar trafficking driven by RAB and SNARE proteins. *Current opinion in plant biology*, 22, 116–121.

Uemura, T., Ueda, T., & Nakano, A. (2012). The physiological role of SYP4 in the salinity and osmotic stress tolerances. *Plant signaling & behavior*, 7(9), 1118–1120.

Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R. L., Nakano, A., Takeyasu, K., & Sato, M. H. (2004). Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell structure and function*, 29(2), 49–65.

Vasquez-Robinet, C., Mane, S. P., Ulanov, A. V., Watkinson, J. I., Stromberg, V. K., De Koeber, D., Schafleitner, R., Willmot, D. B., Bonierbale, M., Bohnert, H. J., & Grene, R. (2008). Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *Journal of experimental botany*, 59(8), 2109–2123.

Wang, J., Mylle, E., Johnson, A., Besbrugge, N., De Jaeger, G., Friml, J., Pleskot, R., & Van Damme, D. (2020). High Temporal Resolution Reveals Simultaneous Plasma Membrane Recruitment of TPLATE Complex Subunits. *Plant physiology*, 183(3), 986–997.

Weber, M. M., Noriega, N. F., Bauler, L. D., Lam, J. L., Sager, J., Wesolowski, J., Paumet, F., & Hackstadt, T. (2016). A Functional Core of IncA Is Required for *Chlamydia trachomatis* Inclusion Fusion. *Journal of bacteriology*, 198(8), 1347–1355.

Wesolowski, J., & Paumet, F. (2010). SNARE motif: a common motif used by pathogens to manipulate membrane fusion. *Virulence*, 1(4), 319–324.

Won, K. H., & Kim, H. (2020). Functions of the Plant Qbc SNARE SNAP25 in Cytokinesis and Biotic and Abiotic Stress Responses. *Molecules and cells*, 43(4), 313–322.

Wu, F., Chi, Y., Jiang, Z., Xu, Y., Xie, L., Huang, F., Wan, D., Ni, J., Yuan, F., Wu, X., Zhang, Y., Wang, L., Ye, R., Byeon, B., Wang, W., Zhang, S., Sima, M., Chen, S., Zhu, M., Pei, J., ... Pei, Z. M. (2020). Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in Arabidopsis. *Nature*, 578(7796), 577–581.

Wu, H. Y., Liu, K. H., Wang, Y. C., Wu, J. F., Chiu, W. L., Chen, C. Y., Wu, S. H., Sheen, J., & Lai, E. M. (2014). AGROBEST: an efficient Agrobacterium-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in Arabidopsis seedlings. *Plant methods*, 10, 19.

Yáñez, M., Cáceres, S., Orellana, S., Bastías, A., Verdugo, I., Ruiz-Lara, S., & Casaretto, J. A. (2009). An abiotic stress-responsive bZIP transcription factor from wild and cultivated tomatoes regulates stress-related genes. *Plant cell reports*, 28(10), 1497–1507.

Yperman, K., Wang, J., Eeckhout, D., Winkler, J., Vu, L. D., Vandorpe, M., Grones, P., Mylle, E., Kraus, M., Merceron, R., Nolf, J., Mor, E., De Bruyn, P., Loris, R., Potocký, M., Savvides, S. N., De Rybel, B., De Jaeger, G., Van Damme, D., & Pleskot, R. (2021). Molecular architecture of the endocytic TPLATE complex. *Science advances*, 7(9), eabe7999.

Zhang, B., Karnik, R., Wang, Y., Wallmeroth, N., Blatt, M. R., & Grefen, C. (2015). The Arabidopsis R-SNARE VAMP721 Interacts with KAT1 and KC1 K⁺ Channels to Moderate K⁺ Current at the Plasma Membrane. *The Plant cell*, 27(6), 1697–1717.

Zhang, J., & Kirkham, M.B. (1994). Drought stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. *Plant and cell physiology*, 35(5), 785–791.

Zhang, L., Xing, J., & Lin, J. (2019). At the intersection of exocytosis and endocytosis in plants. *The New phytologist*, 224(4), 1479–1489.

Zhang, L., Zhang, H., Liu, P., Hao, H., Jin, J. B., & Lin, J. (2011). Arabidopsis R-SNARE proteins VAMP721 and VAMP722 are required for cell plate formation. *PloS one*, 6(10), e26129.

Zhao, C. R., Ikka, T., Sawaki, Y., Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Hibino, T., Sato, S., Sakurai, N., Shibata, D., & Koyama, H. (2009). Comparative transcriptomic characterization of aluminum, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology*, 9, 32.

Zhou, S., Sauv e, R., Liu, Z., Reddy, S., Bhatti, S., Hucko, S., Fish, T., & Thannhauser, T. (2011). Identification of Salt-induced Changes in Leaf and Root Proteomes of the Wild Tomato, *Solanum chilense*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136(4), 288–302.

Zhu, J., Gong, Z., Zhang, C., Song, C. P., Damsz, B., Inan, G., Koiwa, H., Zhu, J. K., Hasegawa, P. M., & Bressan, R. A. (2002). OSM1/SYP61: a syntaxin protein in Arabidopsis controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *The Plant cell*, 14(12), 3009–3028.

Zwiewka, M., Nodzyński, T., Robert, S., Vanneste, S., & Friml, J. (2015). Osmotic Stress Modulates the Balance between Exocytosis and Clathrin-Mediated Endocytosis in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant*, 8(8), 1175–1187.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS.

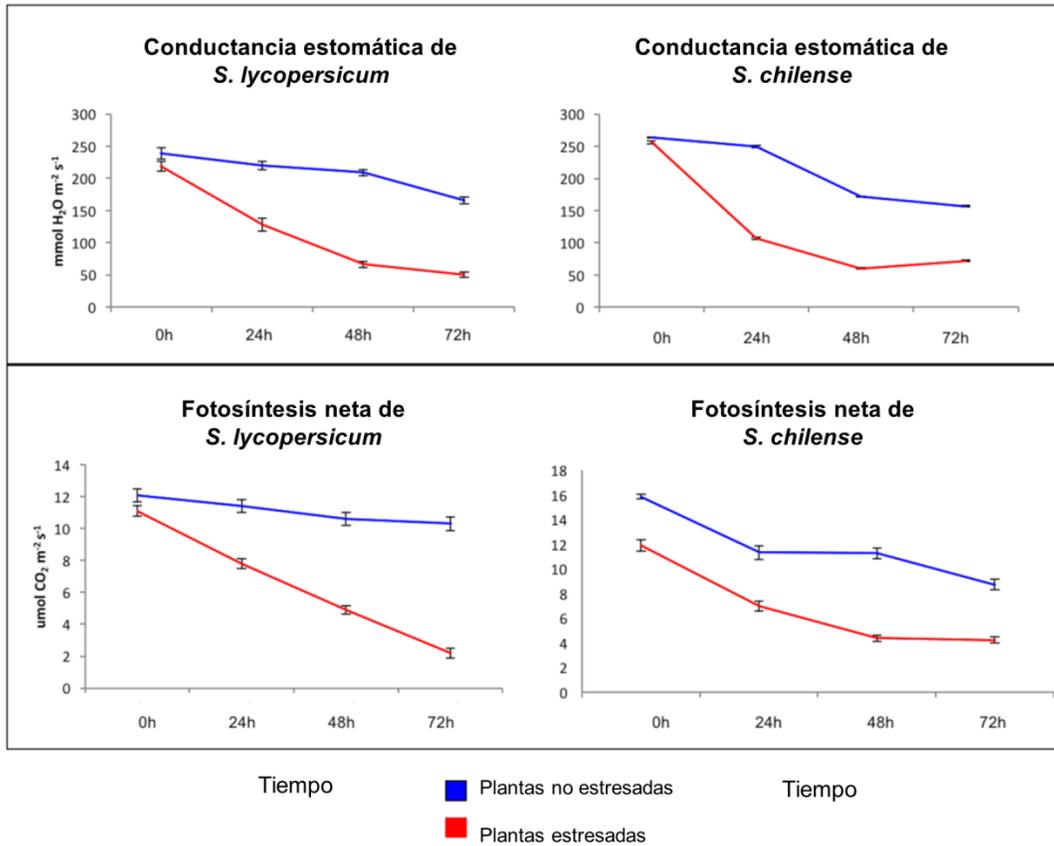


Figura S1: Parámetros fisiológicos de las plantas *S. lycopersicum* y *S. chilense* sometidas a condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) medidas a las 0, 24, 48 y 72 horas. Las mediciones se realizaron en las hojas medias de plantas de tomate de 10-12 semanas de edad. Las líneas y las barras de error representan la media y la desviación estándar de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Panel superior: Conductancia estomática; Panel inferior: Fotosíntesis neta.

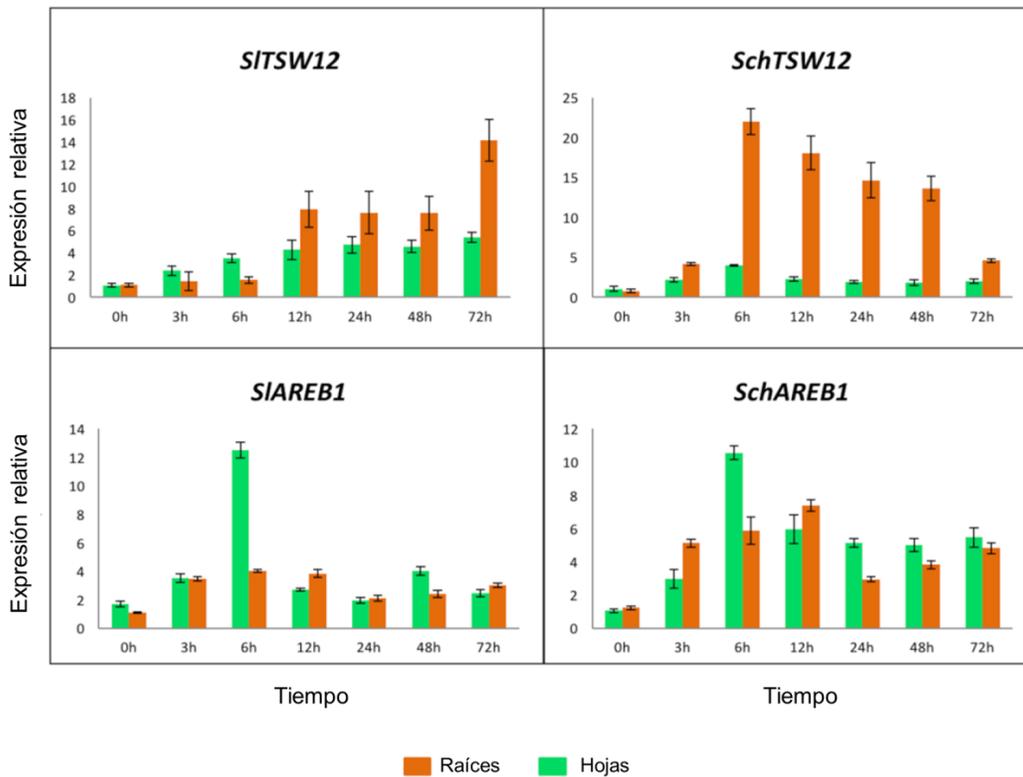


Figura S2: Perfiles de expresión de genes marcadores de estrés *AREB1* y *TSW12* en hojas y raíces de plantas de *S. lycopersicum* y *S. chilense* sometidas a condiciones de estrés salino. Los transcritos de los genes marcadores de estrés en raíces (barras en naranja) y hojas (barras en verde) de plantas de tomate de 10-12 semanas de edad fueron determinados a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas de iniciado el estrés con 300 mM de NaCl. Las columnas y las barras de error representan la media y la desviación estándar de tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

Plant eFP: Solyc03g116600

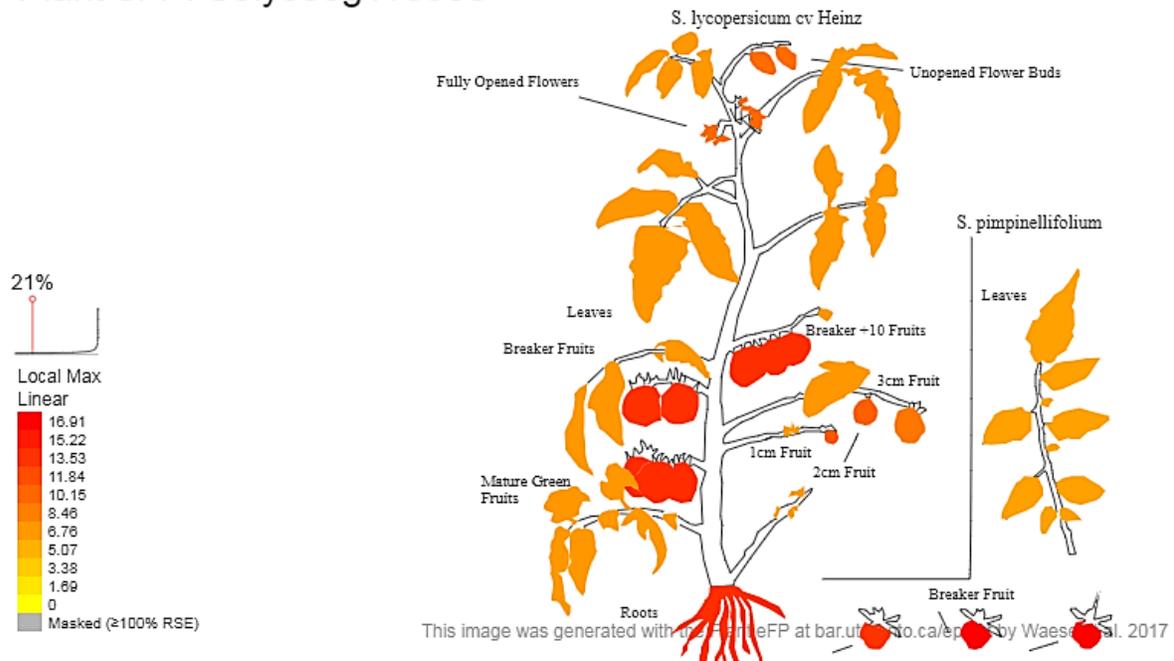


Figura S3: Análisis de expresión del gen *SISLSP3* de *S. lycopersicum* cv. Heinz en diferentes tejidos de la planta bajo condiciones normales. Basado en la información obtenida desde la base de datos BAR de la Universidad de Toronto (http://bar.utoronto.ca/eplant_tomato/). La presencia de transcritos se observa en todos los tejidos y órganos de la planta (tejido marcado en tonalidades naranja-rojo) en la figura.

Plant eFP: Solyc06g068080

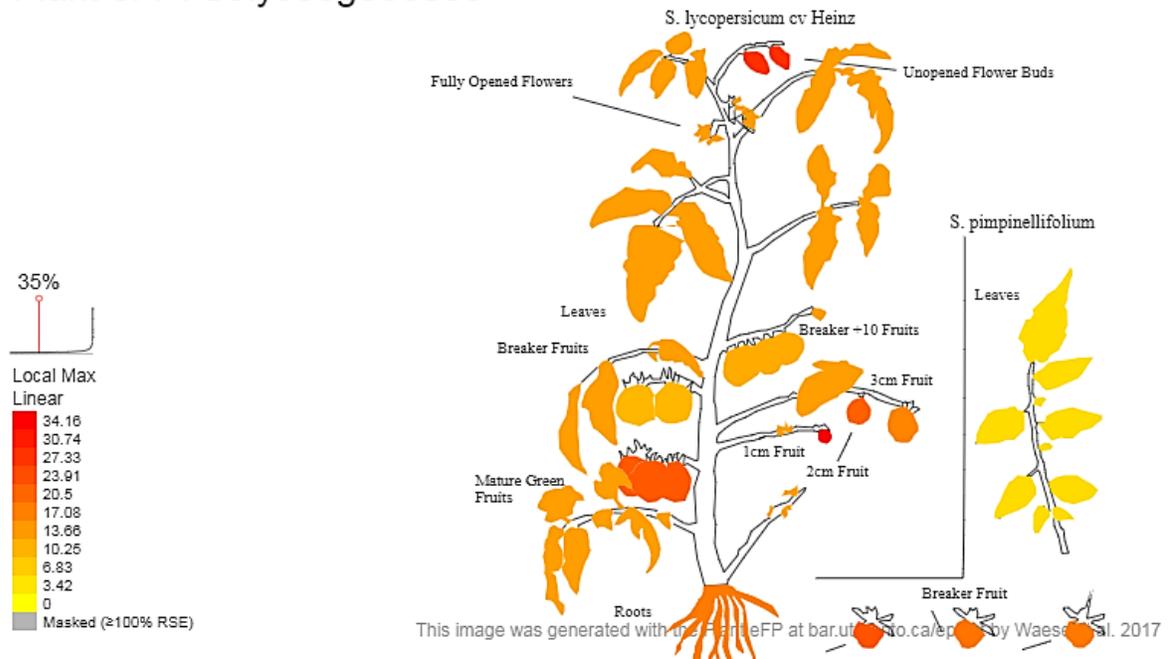


Figura S4: Análisis de expresión del gen *SISLSP6* de *S. lycopersicum* cv. Heinz en diferentes tejidos de la planta bajo condiciones normales. Basado en la información obtenida desde la base de datos BAR de la Universidad de Toronto (http://bar.utoronto.ca/eplant_tomato/). La presencia de transcritos se observa en todos los tejidos y órganos de la planta (tejido marcado en tonalidades naranjo-rojo) en la figura.

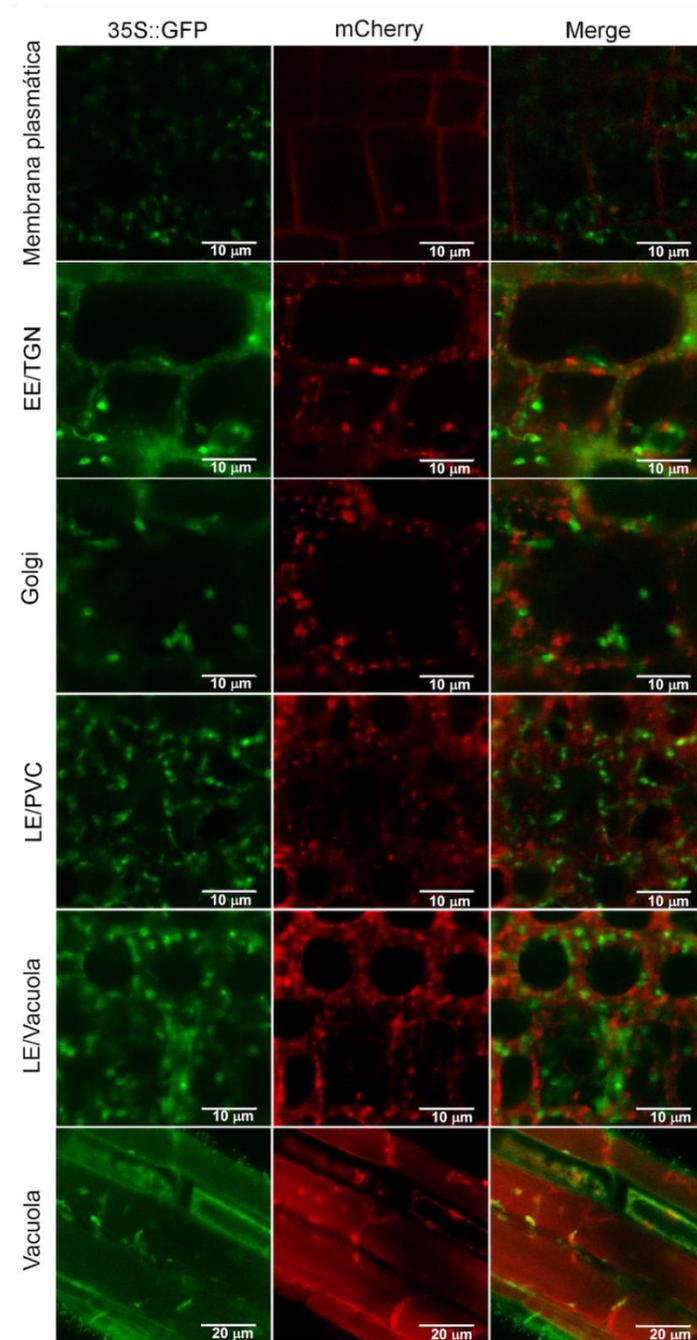


Figura S5: Localización subcelular del gen que codifica para Green Fluorescent Protein (GFP) dirigido por el promotor constitutivo 35S. La señal de GFP se observa en citoplasma y diversos organelos. Plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de 10 días de edad, transformadas con diferentes marcadores de organelos fusionados a mCherry, fueron transformadas transitoriamente usando un protocolo adaptado de la técnica AGROBEST (Wu et al., 2014), con el constructo que expresaba la proteína GFP bajo el promotor 35S. Las plantas fueron analizadas utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 700. Membrana plasmática, PIP1;4-mCherry; EE/TGN, VTI12-mCherry; Golgi, SYP32-mCherry; LE/PVC, RabF2a-mCherry; LE/Vacuola, RabG3f-mCherry; Vacuola, VAMP711-mCherry.

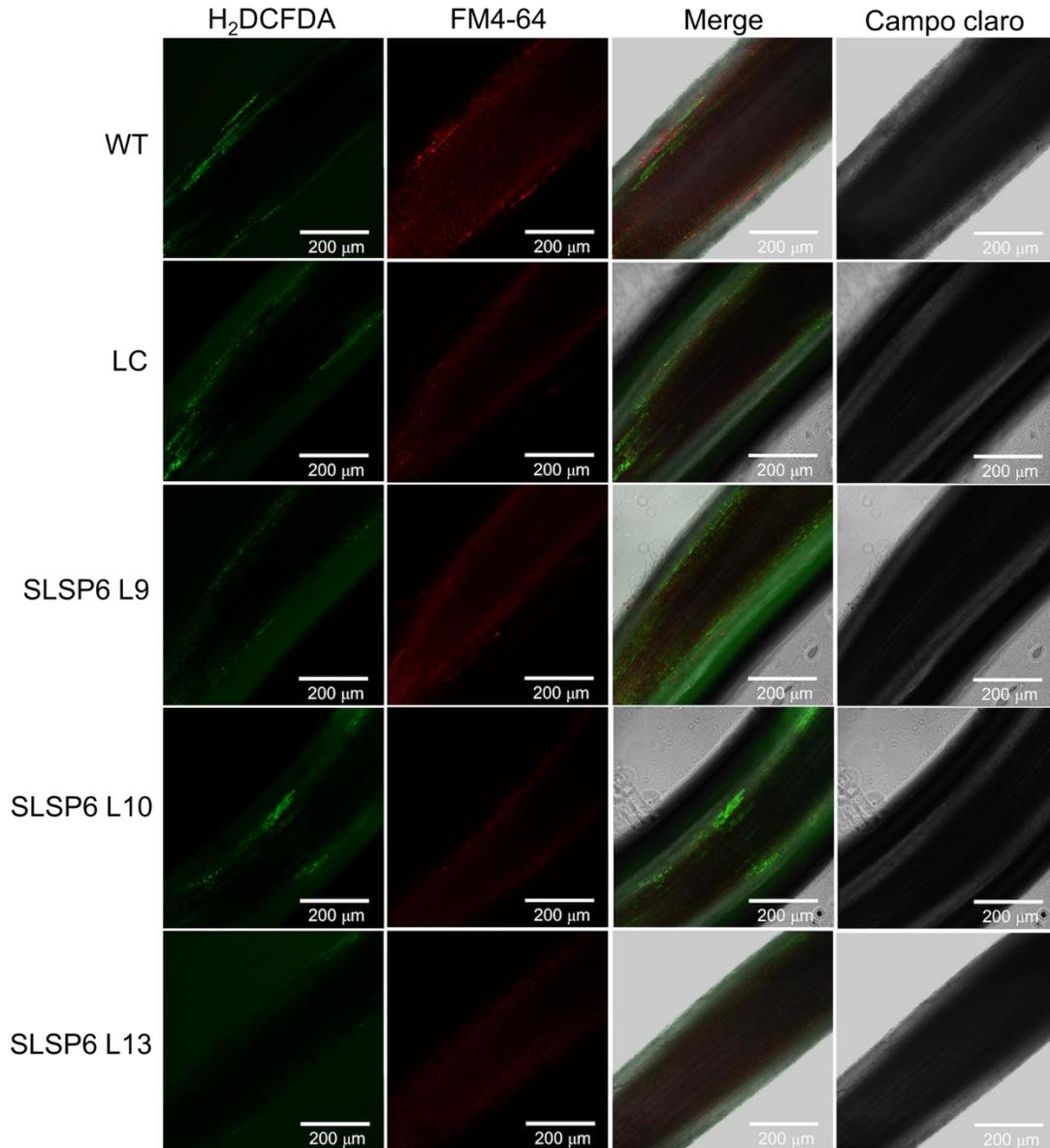


Figura S6: Contenido de H₂O₂ en raíces de *Solanum lycopersicum* bajo condiciones normales. Imágenes representativas de la producción de H₂O₂ en plántulas de tomate control (WT y LC) y líneas sobreexpresoras de *SISLSP6* (L9, L10 y L13), observadas mediante microscopía confocal. Las raíces de tomate fueron tratadas con H₂DCFDA (señal en verde) y el trazador FM4-64 (señal en rojo). La barra indica una escala de 200 μm.

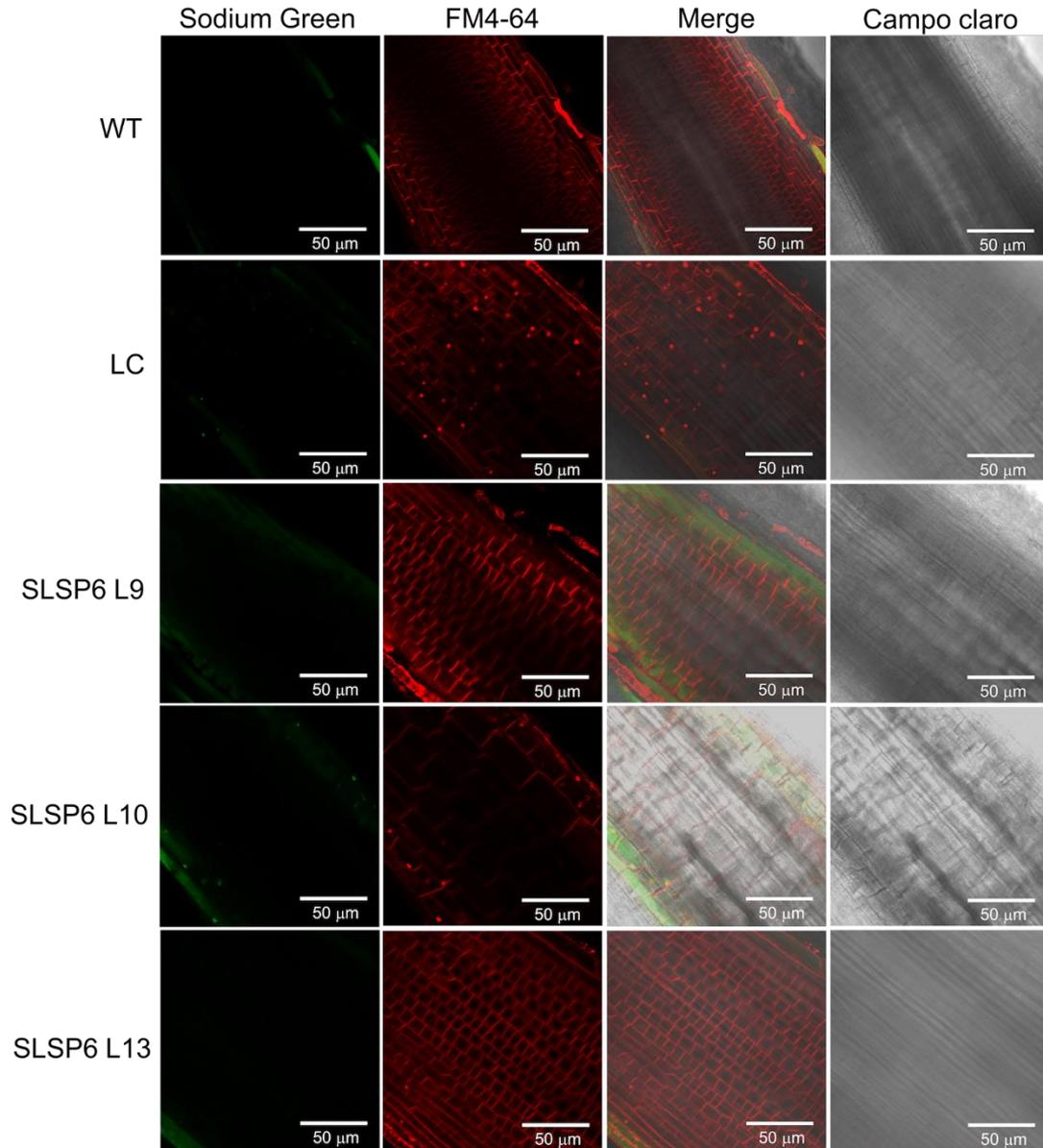


Figura S7: Acumulación de sodio en raíces de *Solanum lycopersicum* bajo condiciones normales. Imágenes representativas de la detección de sodio en plántulas de tomate control (WT y LC) y líneas sobreexpresoras de *SISLSP6* (L9, L10 y L13), observadas mediante microscopía confocal. Las raíces de tomate fueron tratadas con Sodium Green (señal en verde) y el trazador FM4-64 (señal en rojo). La barra indica una escala de 50 μm .