



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

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

JOSÉ ANTONIO MADRID ESPINOZA

Doctor en Ciencias

Mención Ingeniería Genética Vegetal

Talca, noviembre 2021

CONSTANCIA

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



Talca, 2022

Candidato a Doctor : José Antonio Madrid Espinoza
Fecha inicio de Tesis : marzo de 2017
Fecha término de Tesis : junio 2020
Fecha entrega de Tesis : junio 2021
Fecha defensa de Tesis : noviembre de 2021

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:

Dr. Hannetz Roschztardt
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.

Dr. Andrés Zurita
Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)
Centro Regional de Investigación Intihuasi, La Serena, Chile.

Dr. Carlos Figueroa
Instituto de Ciencias Biológicas
Universidad de Talca, Chile.

AGRADECIMIENTOS

Aquí finaliza y queda plasmada una etapa importante de mi vida, no tan sólo académica, sino también personal. Bajo ningún contexto imaginé escribir esta página cuando di mis primeros pasos en ciencias, ni menos cuando me aventuré en este motivante y desafiante programa de doctorado. Para comenzar, quisiera agradecer el haber tenido la oportunidad de compartir y recibir la formación de mis mentores tempranamente como estudiante de pregrado en la carrera de Ingeniería en Bioinformática. Al profesor Dr. Simón Ruiz Lara, la confianza depositada durante cada etapa de mi formación académica y científica, al Dr. Enrique González Villanueva (Q.E.P.D.), por compartir su particular visión del mundo y por último al Dr. Alejandro Vega Santander, por sus acertivos consejos. Cada uno de ustedes fue, de manera desinteresada, el motor para la culminación exitosa de esta etapa.

Agradezco la fortuna que tuve al compartir y hacer amigos en el Laboratorio de Genómica Funcional del Instituto de Ciencias Biológicas. A Isabel Verdugo por enseñarme a tener la actitud de trabajo científico. A la Dra. Josselyn Salinas por ser mi amiga, mi compañera de Doctorado, por su constante apoyo, y por todos los viajes científicos que realizamos. A Mónica Yañez, a la Dra. Carola Campos, y a Sabina Rojas, por mostrarme sus habilidades como científicas. Y en general, a todos los que son parte del gran equipo de este laboratorio: Oscar Arrey, Ana Carolina Puentes, Jorge y Ricardo Pérez, Flavia Soto, y Freddy Asencio.

Estaré eternamente agradecido por la familia que elegí, y me ha elegido. A Braulio Urzua por ser, ante todo, mi amigo, compañero y confidente. Por sus consejos y apoyo sin horarios, ni condiciones, de lo cual sé que seguirá siendo así. A Andrea Araya, por su contagiosa jovialidad. A Oriana Castillo, por ser auténtica y siempre considerarme. A Daniela Fierro, por su misticidad y precisas palabras. A María José Jara por sus risas y alegría. A Enzo Urrutia por su simplicidad. A Alejandro Vega por sus conversaciones. Y a todos y todas quienes de una u otra forma han vivido conmigo este importante proceso.

Finalmente, agradezco de forma infinita a mi familia. A mi mamá, Bernardita Espinoza, a mi papá, José Antonio Madrid, y a mi hermano, Emmanuel Patricio, por el apoyo recibido en todas las decisiones que he tomado y seguiré tomando.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	7
RESUMEN	9
SUMMARY	11
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Estrés salino y su efecto molecular en plantas	14
I.2 Endocitosis y tráfico vesicular pre-vacuolar	18
I.3 Rol de la endocitosis y el tráfico vesicular en la modulación de la percepción hormonal.	22
I.4 Regulación de la endocitosis y del tráfico vesicular pre-vacuolar	23
I.5 Respuesta de la endocitosis y del tráfico vesicular pre-vacuolar al estrés salino.	27
Hipótesis de Trabajo	32
Objetivos	33
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
II.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.	35
II.2 Ensayos de estrés salino y ABA.	35
II.3 Aislamiento de ARN y síntesis de cADN.	36
II.4 Búsqueda y análisis de secuencias.	37
II.5 Análisis de la expresión génica.	40
II.6 Reacciones de la Polimerasa en Cadena (PCR).	41
II.7 Generación de construcciones genéticas.	42
II.8 Obtención de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	43
II.9 Localización subcelular de SchMON1 y SchCCZ1.	45
II.10 Tinción GUS de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	46
II.11 Estimación de parámetros morfométricos.	47
II.12 Estimación de la internación de FM4-64.	47
II.13 Tratamiento de Brefeldin-A en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> SchMON1.	47
II.14 Cuantificación y localización del H ₂ O ₂ y autofagosomas.	48

II.15 Detección del Na ⁺ vacuolar.	48
II.16 Microscopía y estadística.	48
III. RESULTADOS	
III.1 Análisis de secuencia de SchMON1 y SchCCZ1.	51
III.2 En <i>Solanum chilense</i> , la transcripción de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> es regulada temporal y espacialmente por estrés salino.	53
III.3 Los genes <i>SchCCZ1</i> y <i>SchMON1</i> restauran el fenotipo de la mutante <i>ccz1a/b</i> y <i>mon1-1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> , respectivamente.	54
III.4 <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> se localizan en parte de la vía endocítica y de tráfico pre-vacuolar en células radiculares de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	56
III.5 Análisis del promotor específico de raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> en condiciones de estrés salino y ABA.	58
III.6 Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> , que expresan y co-expresan <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> , toleran diferencialmente el estrés salino, afectando la expresión de genes de respuesta a estrés.	59
III.7 La expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> afecta la respuesta fenotípica de <i>Arabidopsis thaliana</i> frente a ABA.	63
III.8 La expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> modifica la tasa de endocitosis de células radiculares de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	65
III.9 La expresión y co-expresión de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> promovería cambios en el contenido y localización subcelular de H ₂ O ₂ durante estrés salino.	70
III.10 La expresión y co-expresión <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> modifica la actividad autofágica y la capacidad de acumulación de Na ⁺ durante estrés salino.	76
IV. DISCUSIÓN	
IV.1 <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> de <i>Solanum chilense</i> codifican para una proteína con características de Factor Intercambiador del Nucleótido de Guanina (GEF), y con patrones de expresión que sugieren la participación de ambos durante estrés salino.	82
IV.2 La expresión de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> restaura el tráfico de vesicular y el	85

fenotipo de mutantes de <i>Arabidopsis thaliana mon1-1</i> y <i>ccz1a/b</i> , respectivamente.	
IV.3 El promotor <i>pRaíz</i> mantiene su patrón de expresión y especificidad radicular frente a estrés salino y ácido abscísico, siendo el candidato más adecuado para dirigir la expresión de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	87
IV.4 La expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> le confiere a <i>Arabidopsis thaliana</i> tolerancia a estrés salino e incrementada insensibilidad a ácido abscísico.	89
IV.5 La endocitosis es modulada positivamente en las raíces de los genotipos transgénicos.	92
IV.6 Reducción del contenido de H ₂ O ₂ en raíces y cambios en la expresión de genes involucrados en mecanismos detoxificadores de ROS son evidenciados en los genotipos transgénicos	95
IV.7 Vacuolas de células radiculares de genotipos transgénicos tienen capacidad aumentada para compartimentar Na ⁺ producto del incremento de la fagocitosis y la expresión de <i>AtNHX1</i> .	98
V. CONCLUSIONES	101
VI. BIBLIOGRAFÍA	104
ANEXO	125

ÍNDICE DE TABLAS y FIGURAS

	Página
Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados en esta tesis.	37
Figura 1. Mecanismos generales para la reducción citoplasmática de Na ⁺ .	16
Figura 2. Vías de tráfico de vesículas desde el TGN a la vacuola.	21
Figura 3. Tráfico vesicular pre-vacuolar dependiente del intercambio entre RabF y RabG.	27
Figura 4. Tipos de endocitosis durante estrés salino.	29
Figura 5. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida de SchMON1, SchCCZ1 y sus proteínas homólogas.	52
Figura 6. Evaluación de la expresión relativa de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en <i>S. chilense</i> sometida a estrés salino.	53
Figura 7. Efecto de la complementación de la mutante <i>mon1-1</i> de <i>A. thaliana</i> con el gen <i>SchMON1</i> .	54
Figura 8. Efecto de la complementación de la mutante <i>ccz1a/b</i> de <i>A. thaliana</i> con el gen <i>SchCCZ1</i> .	55
Figura 9. Localización subcelular de SchMON1 y SchCCZ1 en células radiculares de <i>A. thaliana</i> .	57
Figura 10. Caracterización de <i>Arabidopsis thaliana</i> que contiene la construcción <i>pRaíz::GUS</i> .	59
Figura 11. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> sobre la tolerancia a estrés salino de <i>A. thaliana</i> .	62
Figura 12. Perfil transcripcional de genes de respuesta a estrés en <i>A. thaliana</i> sometida a estrés salino.	63
Figura 13. Fenotipo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan y co-expresan en sus raíces a <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> frente a la aplicación de ABA exógeno.	64
Figura 14. Efecto de la expresión y co-expresión de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en la dinámica endocítica de FM4-64 en <i>A. thaliana</i> .	67
Figura 15. Perfil transcripcional de genes asociados a los mecanismos de tráfico vesicular en raíces de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> en condiciones de MS (0,5X).	68

Figura 16. Perfil transcripcional de genes asociados a los mecanismos de tráfico vesicular en <i>A. thaliana</i> sometida a estrés salino.	69
Figura 17. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en el contenido de H ₂ O ₂ de <i>A. thaliana</i> durante estrés salino.	71
Figura 18. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en la localización de H ₂ O ₂ de <i>A. thaliana</i> durante estrés salino.	73
Figura 19. Perfil transcripcional de genes asociados a los mecanismos de detoxificación de ROS en <i>A. thaliana</i> sometida a estrés salino.	75
Figura 20. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> sobre la actividad autofágica de <i>A. thaliana</i> durante estrés salino.	77
Figura 21. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> en el contenido de Na ⁺ vacuolar en plantas de <i>A. thaliana</i> durante estrés salino.	78
Figura 22. Perfil transcripcional de genes asociados a los mecanismos de movimiento subcelular de Na ⁺ en <i>A. thaliana</i> sometida a estrés salino.	80
Figura S1. Evaluación de la expresión relativa de marcador de estrés <i>SchAREB1</i> en <i>S. chilense</i> sometida a estrés salino.	125
Figura S2. Localización subcelular de GFP en células radiculares de <i>A. thaliana</i> .	126
Figura S3. Patrón de expresión de UGT (At1g73160)	127
Figura S4. Evaluación de la expresión relativa de <i>pRaíz::GUS</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidas a estrés salino y ABA.	128
Figura S5. Evaluación de la expresión radicular relativa de <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> dirigida por el promotor <i>pRaíz</i> en líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	128
Figura S6. Fenotipo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan y co-expresan en sus raíces a <i>SchMON1</i> y <i>SchCCZ1</i> .	129

RESUMEN

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

A partir de genes obtenidos de especies vegetales halófitas, diversas investigaciones señalan que los mecanismos de endocitosis y el tráfico vesicular pre-vacuolar tendría un rol fundamental en la capacidad de tolerancia a estrés salino. De igual manera, mediante herramientas biotecnológicas, se ha demostrado que esta capacidad puede ser transferida a especies de interés comercial especialmente sensibles a estrés abiótico. En ese contexto, *Solanum chilense*, una especie de tomate silvestre tolerante a sequía y salinidad, evidenció poseer genes homólogos a los de *MON1* y *CCZ1* de *A. thaliana*, ambos denominados *SchMON1* y *SchCCZ1*, y con capacidad para complementar funcionalmente las líneas mutantes de *A. thaliana mon1-1* y *ccz1a/b*. Adicionalmente, la fuerte y coordinada expresión

de ambos genes, en raíces y hojas de plantas de *S. chilense* sometidas a estrés salino, sugirió el involucramiento del complejo y la vía de tráfico pre-vacuolar en la capacidad de tolerancia de esta especie. Para confirmarlo, análisis experimentales de expresión y co-expresión heteróloga de *SchMON1* y *SchCCZ1*, utilizando un promotor específico para raíces, evidenciaron incrementar la tolerancia a estrés salino de *A. thaliana* de forma diferencial. Entre los tres genotipos obtenidos, la expresión radicular de *SchMON1* otorgó mayor tolerancia a estrés salino, debido a una mayor tasa endocítica en sus células radiculares, tanto en condiciones normales como en estrés. Adicionalmente, se reveló la presencia de grandes estructuras endosomales que podrían estar asociadas a esta mejorada capacidad para tolerar el estrés en este genotipo.

El rol modulador que posee el tráfico pre-vacuolar durante estrés abiótico ha sido recientemente investigado en otros ámbitos, como el control hormonal, el movimiento vesicular de especies reactivas de oxígeno y la autofagia. En tal contexto, los tres genotipos transgénicos analizados evidenciaron reducir la expresión de genes involucrados en la vía de señalización por ABA cuando eran sometidos a estrés salino, sugiriendo la activación de la vía independiente a esta hormona. Esto fue confirmado con la reducción de la sensibilidad frente a la aplicación de ABA exógeno. Conjuntamente, se redujo del contenido de H₂O₂ en raíces, lo cual fue coherente con activación transcripcional de genes involucrados en mecanismos enzimáticos de detoxificación, como *AtSOD1* y *AtAPX*, y además al verse contenido en endosomas. Adicionalmente, la reducción en la expresión de los genes de respuesta a estrés oxidativo en tejido aéreo sugirió un menor efecto del estrés salino en los genotipos tolerantes. Por otra parte, resultó evidente el incremento en la actividad autofágica en los tres genotipos, lo cual es coherente con una mayor capacidad de la vacuola para compartimentar el Na⁺. Esto fue confirmado mediante el incremento en la intensidad de la fluorescencia del indicador de Na⁺, Sodium-Green, y la correlación positiva con la inducción transcripcional del gen *AtNHX1*.

Todos estos resultados permiten concluir que *SchMON1* y *SchCCZ1* de *S. chilense* tienen la capacidad de participar del intercambio Rab5-Rab7 y del tráfico pre-vacuolar en *A. thaliana*; y que la expresión o co-expresión radicular de ambos genes incrementa diferencial y significativamente el grado de tolerancia a estrés salino de *A. thaliana*, de una manera independiente de ABA, vía la reducción del estrés oxidativo, el incremento de la actividad

autofágica, y una capacidad superior para compartimentar Na^+ de sus vacuolas, mecanismos potencialmente transferibles a especies agrícolas de interés económico.

SUMMARY

To avoid the detrimental effect of salt stress, plants reduce cytoplasmic Na^+ concentrations by increasing its compartmentalization in the vacuole. To achieve this, an active and efficient vesicle transport mechanism, coming from the Trans-Golgi Network or early endosome, mobilizes proteins and membranes that will fuse with the tonoplast and allow the sequestration of ions. Recently, it was established that this process requires the conversion between members of the RabGTPase family RabF and RabG, which is regulated by the MON1/CCZ1 heterodimeric complex. The MON1 protein acts as an effector of RabF, directing the fusion of vesicles with the late endosome, while the MON1/CCZ1 complex acts as a protein with GEF activity (Guanine Nucleotide Exchanger) activating RabG and allowing the fusion of vesicles from late endosome with the vacuole. In *Arabidopsis thaliana*, the MON1 family has only one member, while the CCZ1 family has two (CCZ1a and CCZ1b). The absence of either of the two proteins involved in the complex causes dwarfism and developmental delay, evidencing the importance of both in plant development. On the other hand, the RabF and RabG families have three and eight members, respectively, and all are MON1 / CCZ1 targets. Among them, RabF1 and RabG3e have been involved in the tolerance to saline stress of *A. thaliana*, by increasing the endocytic rate, and the capacity to compartmentalize Na^+ in the vacuole, which strongly suggests a potential role of the GEF complex in these mechanisms.

From genes obtained from halophytic plant species, various investigations indicate that endocytosis mechanisms and pre-vacuolar vesicular traffic would play a fundamental role in the capacity for tolerance to salt stress. Similarly, using biotechnological tools, it has been shown that this capacity can be transferred to species of commercial interest that are especially sensitive to abiotic stress. In this context, *Solanum chilense*, a species of wild tomato tolerant to drought and salinity, showed homologous genes to those of *MON1* and *CCZ1* of *A. thaliana*, both named *SchMON1* and *SchCCZ1*, and with the capacity to functionally complement mutant lines of *A. thaliana mon1-1* and *ccz1a/b*. Additionally, the strong and

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

All these results allow us to conclude that *SchMON1* and *SchCCZI* from *S. chilense* have the ability to participate in the conversion of Rab5-Rab7 and pre-vacuolar trafficking in *A. thaliana*; and that the radicular expression or co-expression of both genes increases the degree of tolerance to saline stress of *A. thaliana*, in an ABA-independent way, via the reduction of oxidative stress, the increase of autophagic activity, and a superior capacity to compartmentalize Na⁺ into its vacuoles, mechanisms potentially transferable to agricultural species of economic interest.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Estrés salino y su efecto molecular en plantas.

El cloruro de sodio (NaCl) es la sal más común y soluble de nuestro planeta, y su presencia en los suelos cultivables es considerado un grave problema para la agricultura mundial (Deinlein et al., 2014). La salinización en diversos grados de intensidad afecta más de 800 millones de hectáreas, lo que equivale al 12% de las tierras arables e irrigadas del mundo (Muchate et al., 2016). Se espera que esta superficie aumente, debido principalmente a las malas prácticas de riego que utilizan aguas de baja calidad, con concentraciones que pueden llegar hasta los 600 mM de NaCl, lo equivalente al uso de aguas oceánicas (Gupta & Huang, 2014).

El estrés salino tiene un efecto significativo en el desarrollo y crecimiento de las plantas, inhibiendo la germinación de semillas, el largo de raíz, la biomasa y su fructificación (Liang et al., 2018). Las plantas y cultivos de relevancia agrícola presentan diversos grados de tolerancia a la salinidad de los suelos, por ejemplo, el tomate, el maíz o el arroz, entre otros, tienen baja tolerancia, mientras que el algodón o la cebada tienen tolerancia mayor (Flowers et al., 2010). Los de baja tolerancia son categorizados como glicófitos, es decir, requieren de agua fresca para su crecimiento y desarrollo normal, el cual puede verse severamente inhibido con bajas concentraciones de sal, las que pueden variar entre 20 a 40 mM aproximadamente. Muchos de estos cultivos son destruidos o no producen frutos a concentraciones que superen los 100 o 200 mM de NaCl (Park et al., 2016a). Por otro lado, los de alta tolerancia son denominados halófitos y crecen naturalmente a altas concentraciones de sal, superiores incluso a 200 mM. Por ejemplo, *Atriplex*, *Salicornia*, *Suaeda*, o especies silvestres de tomate como *Solanum chilense*, *peruvianum* y *pennellii*, entre otras, que pueden tolerar entre 400 mM y 1 M de NaCl. Las halófitas son encontradas en todas las taxas vegetales, no obstante, constituyen sólo el 5% de todas las angiospermas conocidas y tienen hasta ahora baja relevancia económica (Yensen, 2006; Park et al., 2016a).

La presencia de Na^+ en el entorno de las raíces tiene un efecto inmediato. La sal disuelta en el suelo ejerce una alta presión osmótica y una reducción del potencial de los solutos, lo cual disminuye la conductancia hidráulica de la planta e impide la absorción de agua y nutrientes (Assaha et al., 2017). Frente a esto, las raíces responden rápidamente irradiando señales internas de larga distancia que involucran a segundos mensajeros, como las

especies reactivas de oxígeno (ROS), Ca^{2+} y otras de origen eléctrico, básicamente para establecer un estado de alerta en toda la planta (Choi et al., 2014). Recientemente se identificó una proteína transmembrana denominada MOCA1, una glucuronosil-transferasa de esfingolípidos del tipo glicosil-inositol-fosforil-ceramida, capaz de censar la presencia de Na^+ extracelular e internar el primer influjo citoplasmático de Ca^+ (Jiang et al., 2019). Esta y otras señales activan diversos mecanismos de tolerancia al estrés osmótico inicial, como el cierre de estomas, la detención de la división celular, la reducción de la tasa fotosintética, el aumento de la síntesis de osmolitos compatibles y el retiro de aquaporinas desde la membrana plasmática (MP) para disminuir, en parte, la pérdida de agua y permitir el ajuste osmótico interno (Assani et al., 2009). Sin embargo, el Na^+ comienza a ingresar a las células, acumulándose lentamente hasta llegar a concentraciones que superan el límite homeostático, llegando a niveles tóxicos para cada una de las células en toda la planta (Munns & Tester, 2008; Hasegawa, 2013). Su ingreso genera un desequilibrio iónico severo en las células, al reemplazar las funciones de otros iones como, por ejemplo, el K^+ . Esto provoca que se inhiba la absorción de nutrientes y la actividad de enzimas, se reduzca el metabolismo y se active la producción de altas concentraciones de ROS, lo cual gatilla la oxidación de proteínas, lípidos y ADN. Un daño prologado interrumpe funciones celulares vitales, provocando finalmente la muerte de tejidos y órganos de la planta. No obstante, la célula vegetal ha sido capaz de desarrollar tres mecanismos para reducir las concentraciones de Na^+ citoplasmático y evitar el escenario descrito: (1^{ero}) minimizando la entrada de Na^+ a la célula; (2^{do}) incrementando su salida; y (3^{ero}) maximizando su compartimentación vacuolar (**Figura 1**) (Zhu, 2003; Roy et al., 2014; Gupta & Huang, 2014, Isayenkov & Maathuis, 2019).

Una concentración citoplasmática de Na^+ que varía entre 0-20 mM le permite a la mayoría de las plantas sobrevivir (Kader et al., 2010). Durante una condición de estrés salino, el Na^+ entra pasivamente a las células de la raíz mediante receptores de glutamato (GLR), canales cerrados por nucleótidos cíclicos (CNGCs), canales de cationes no selectivos voltaje independiente (NSCC), o por medio de algunos transportadores de K^+ de alta afinidad (HKT), llegando a concentraciones similares a la del suelo. Se ha determinado mediante microscopía confocal basada en indicadores fluorescentes que la concentración citoplasmática de Na^+ puede variar entre 5 y 70 mM cuando la concentración externa varía entre 5 y 100 mM de NaCl (Isayenkov & Maathuis, 2019). El Na^+ se distribuye rápidamente en los distintos tejidos

que componen la raíz, en cantidades que se van reduciendo progresivamente desde las células corticales hacia la endodermis, pero que se incrementan nuevamente en los tejidos vasculares que movilizan los iones hacia los tejidos aéreos (Munns & Tester, 2008). Evitar o reducir el libre desplazamiento del Na^+ entre los órganos o tejidos de la planta, es uno de los grandes desafíos en la biotecnología de cultivos. Se ha descrito que un mecanismo que permite minimizar el ingreso pasivo de Na^+ , y reducir su contenido citoplasmático, es la presencia de nucleótidos cíclicos como cAMP o cGMP en el entorno de la raíz. Estas moléculas son capaces de bloquear o modular el influjo de iones que realizan los canales CNGC, otorgándole tolerancia a plántulas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a 100 mM de NaCl. (Maathuis & Sander, 2001).

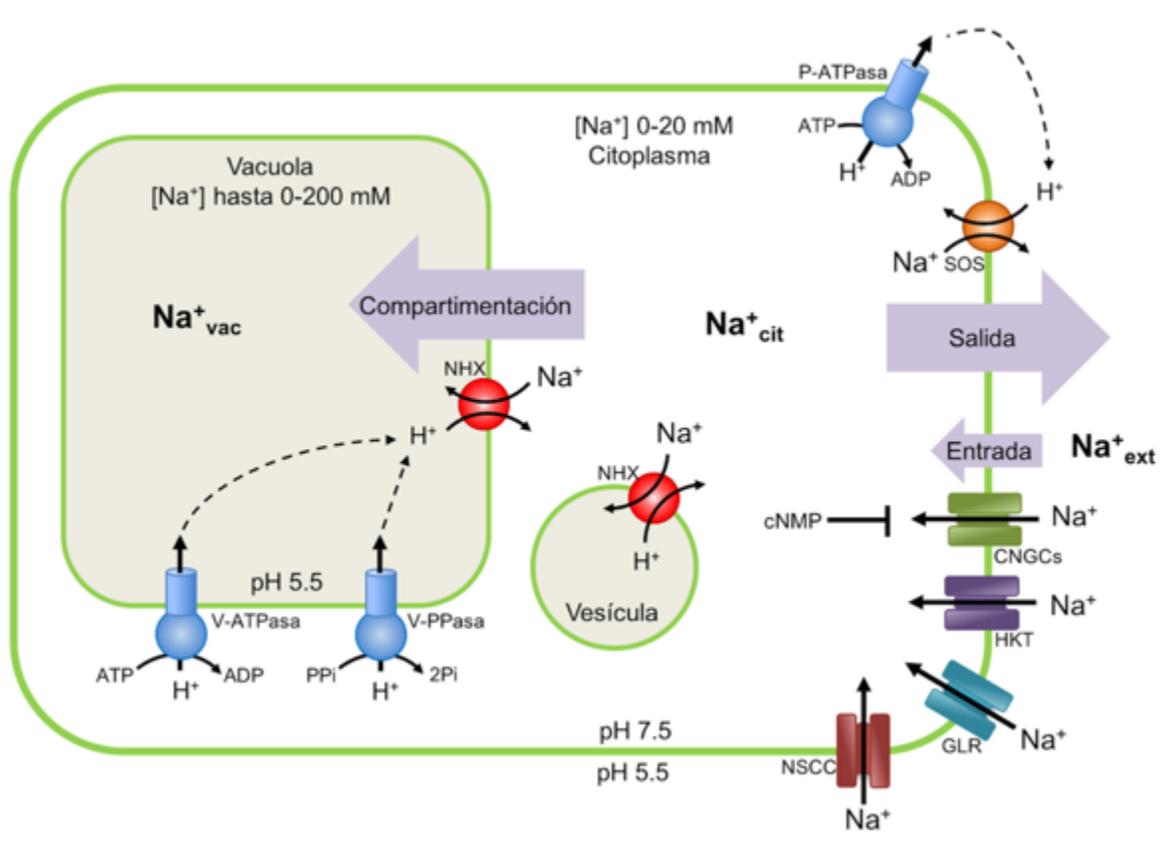


Figura 1. Mecanismos generales para la reducción citoplasmática de Na^+ . Para reducir el sodio citoplasmático (Na^+ cit) y mantener concentraciones homeostáticas que varían entre 0 y 20 mM, la célula activa tres mecanismos principales (indicados en las flechas de color morado): I) incrementando la salida de Na^+ cit al medio extracelular mediante el sistema SOS (SOS1, SOS2 y SOS3), II) evitando la entrada de Na^+ ext mediante el bloqueo de canales CNGCs, utilizando nucleótidos cíclicos (cNMP), y retirándolos de la membrana plasmática mediante endocitosis, y III) compartimentando el exceso de Na^+ cit en la vacuola y vesículas mediante el sistema NHX o por endocitosis. Modificado de Nieves-Cordones et al. (2016).

Por otra parte, Na^+ citoplasmático puede ser excretado de la célula mediante un sistema de antiportadores Na^+/H^+ de MP, pertenecientes a la familia SOS1 (“Salt-Overly-Sensitive 1”), no obstante, su funcionamiento es energéticamente costoso. En *A. thaliana*, SOS1 es parte de la ruta de señalización y eflujo de Na^+ denominada SOS, que involucra además a las proteínas SOS2 y SOS3 (Park et al., 2016a). SOS3 es una proteína de unión a Ca^{2+} , que detecta indirectamente el aumento de la concentración de Na^+ , producto del co-transporte con Ca^{2+} hacia el citoplasma. Bajo esta condición, SOS3 interactúa físicamente con la proteína quinasa SOS2, induciendo la fosforilación, estabilización y activación de SOS1 (Ji et al., 2013). La sobreexpresión constitutiva de *SOS1*, *SOS2* o *SOS3* ha sido asociada con el aumento de la tolerancia a estrés salino, pero sólo la sobreexpresión de *SOS2* o *SOS3* disminuye el contenido de Na^+ radicular (Yang et al., 2009). Esto se debe a que SOS1 se asociaría en alto grado con el eflujo y depósito de Na^+ en tejido vascular, mientras que la sobreexpresión de los genes *SOS2* y *SOS3* estaría alterando la función de otras proteínas (Shi et al., 2002). No obstante, la pérdida de función de SOS1 genera hipersensibilidad al estrés salino en la especie halófila *Thellungiella salsuginea*, una especie emparentada a *A. thaliana*, lo cual confirma su importante rol en la exclusión de Na^+ y la tolerancia a estrés salino (Oh et al., 2010). Por otro lado, interesantemente, aprovechando la capacidad del Na^+ de ingresar a las células a través de proteínas HKT, se ha propuesto que algunos miembros de esta familia también pueden excluirlo y limitarlo a tejidos específicos (Wu et al., 2018). En ese sentido, se ha demostrado que TmHKT1;5 y TmHKT1;4 son capaces de reducir el contenido de Na^+ en hojas de *Triticum monococcum*, mediante su exclusión desde el floema y acumulación en la vaina, incrementando la tolerancia a estrés salino de esta especie (Byrt, et al., 2014; Tounsi, et al., 2016).

Aunque se impida su entrada o incremente su salida, el Na^+ inevitablemente ingresa a todas las células de la raíz, y eventualmente a todos los tejidos y órganos de la planta (Jiang et al., 2010). En ese escenario, las células activan el mecanismo de compartimentación de Na^+ para reducir su concentración citoplasmáticas, confinándolo en la vacuola (Apse & Blumwald, 2007). Diversos estudios han demostrado que su inclusión vacuolar es mediada por antiportadores Na^+/H^+ , denominados NHX (“ Na^+-H^+ eXchanger”), localizados en el tonoplasto (Deinlein et al., 2014). *A. thaliana* posee seis miembros (NHX1-NHX6), reportándose que la sobreexpresión de NHX1 aumenta la tolerancia a estrés salino al

compartimentar activamente Na^+ en la vacuola (Apse & Blumwald, 2002; Bassil et al., 2012). Otros dos miembros, NHX5 y NHX6, también participan en la tolerancia a estrés salino, no obstante, ambos antiportadores se localizan en endosomas (Bassil et al., 2011). Esta localización sugiere la posibilidad de compartimentar Na^+ en organelos pre-vacuolares, que serían movilizados posteriormente a la vacuola. Si bien, Bassil et al., (2011) no determinaron que NHX5 ni NHX6 realizan inclusión endosomal de Na^+ , esta opción sería considerada como una estrategia para la reducción de su concentración citoplasmática y su desplazamiento a otros tejidos (Bassil et al., 2012). En este sentido, los mecanismos que controlan la endocitosis y el tráfico pre-vacuolar estarían aportando al mecanismo de compartimentación de Na^+ , y al aumento del grado de tolerancia a condiciones de estrés salino mediante estrategias que aún no están del todo claras (Mazel et al., 2004; Leshem et al., 2006; Hamaji et al., 2009; Tarte et al., 2015).

I.2 Endocitosis y tráfico vesicular pre-vacuolar.

En plantas, la MP y los organelos que componen el sistema de endo-membranas, como el retículo endoplásmico (RE), el complejo de Golgi (CG), el endosoma, y la vacuola, entre otros, están física y funcionalmente interconectados a través de diversas y específicas rutas de tráfico vesicular (Pizarro & Norambuena, 2014). En términos generales, las membranas utilizan un complejo mecanismo para formar, movilizar y fusionar vesículas que cargarán proteínas, iones, lípidos y/o nutrientes, entre otras moléculas (Reynolds et al., 2018). Los principales elementos involucrados en estos procesos son: lípidos, proteínas receptoras de membrana, proteínas del tipo SNARE (“Soluble Nsf Attachment protein Receptor”), proteínas de recubrimiento de vesícula (Clatrin y COP), complejos HOPS (complejos de clasificación y fusión homeotípicos) o CORVET (Núcleo de clase C para la fusión de endosoma y vacuola), y proteínas GTPasas (Rop, Ran, Arf y Rab), entre muchas otras (Saito & Ueda, 2009; Reyes et al., 2011). En vegetales, existe una alta relación entre la mantención de las funciones vitales y el eficiente tráfico vesicular, dependiente de cada uno de estos componentes, más aún frente a las diversas condiciones ambientales.

A diferencia de la célula animal, en vegetales se han estudiado y descrito solo dos vías principales de endocitosis: una mediada por clatrin (CME) y otra independiente de clatrin

(CIE) (Bandmann & Homann, 2012). La CME se caracteriza por el reconocimiento de proteínas cargo específicas, y ser mediado por proteínas de cubierta (tales como los complejos adaptadores AP-2, TPLATE, Epsinas y proteínas con dominio repetido WD40/YVTN) y proteínas accesorias (AP180, SH3P o EHD2, entre otras) (Reynolds, et al., 2018). Estas proteínas inicialmente se acoplan y forman una cubierta sobre la membrana de la vesícula a medida que ella comienza a tomar forma. Interesantemente, diversas evidencias sugieren que el mecanismo de reconocimiento de proteínas de membrana en el participa específicamente la subunidad $\mu 2$ del complejo AP-2, sería mediado por procesos, aún no bien definidos, de fosforilación o ubiquitinación (Martins et al., 2015). No obstante, motivos específicos YXXØ (Y, tirosina; X, cualquier aminoácido; Ø, un aminoácido con una cadena lateral grande e hidrofóbica) o [DE]XXXL[LI] presentes en distintas proteínas estarían permitiendo su internación, tales como, en receptores quinasa ricos en repeticiones de leucinas (RLKs), transportadores de brasinosteroides (BRI1), de boro (NIP5;1), de hierro (IRT1), de agua (PIP2;1), de amonio (AMT1;3), o proteínas intrínsecas sensibles a flagelina 2 (FLS2) (Schwihla & Korbei, 2020). Durante ese proceso, AP-2 guía la fusión de triadas de clatrin a los complejos formados, estableciendo una segunda cubierta o revestimiento (Di Rubbo et al., 2013). Luego, un conjunto de proteínas denominadas dinaminas se unen al cuello de la invaginación de la vesícula para la escisión final y su liberación al medio intracelular (Chen et al, 2011). Todo este revestimiento de proteínas se desacopla rápidamente, en segundos, para dar paso a los mecanismos de tráfico y fusión de la vesícula con el endosoma temprano (EE) o la red trans-Golgi (TGN, Valencia et al., 2016). Entre otras características, las vesículas formadas por la CME promedian 70 nm de diámetro y poseen un alto porcentaje de lípidos del tipo insaturados y fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato [PI(4,5)P2], aportándole especificidad a la ruta (Uemura, 2016).

La CIE, por otro lado, es una ruta endocítica asociada a microdominios de membrana (MD) (Baral et al., 2015a, Fan et al., 2015). Los MD se caracterizan por poseer propiedades distintas a la membrana que los rodea, tanto a nivel de composición, como de organización de lípidos y proteínas. Entre estas diferencias destacan la asociación con remorinas y flotilinas, y la resistencia al fraccionamiento mediado por detergentes, producto de su arquitectura rica en esteroides y esfingolípidos. Se ha descrito que las Flotilinas son capaces de inducir la curvatura de la membrana, y promover la formación y recubrimiento de vesículas que promedian hasta

130 nm de diámetro (Li et al., 2012). Recientes evidencias sugieren que la CIE estaría participando de tres importantes procesos fisiológicos y moleculares en plantas, siendo estos: a) la toma de nutrientes, mediante la internalización de transportadores de sacarosa SUT2 de *S. lycopersicum*, o directamente de moléculas de hexosas en células BY-2 de *Nicotiana tabacum* (Bandmann & Homann, 2012); b) la regulación del flujo de agua y de amonio, mediante la endocitosis parcial de los canales PIP2;1 y AMT1;3 en *A. thaliana* (Wang et al., 2013; Li et al., 2011); c) la regulación de la actividad de proteínas a través de la formación de *clusters* que median la dimerización o tetramerización, como en los casos de los canales de K⁺ KAT1, del canal PIP2;1, y del NADPH oxidasa dependiente de calcio (RbohD), en *A. thaliana*, o del transportador de sacarosa SUT1, en *Solanum tuberosum* (Hao et al., 2014, Fan et al., 2015).

A nivel fisiológico, como ha sido evidenciado en *A. thaliana*, la CME actúa en todas las capas celulares de la raíz, internando proteínas transmembranas o ancladas a lípidos, mientras que CIE opera endocitando solo proteínas ancladas a lípidos en la epidermis (Baral et al., 2015a). Las vesículas generadas por ambos mecanismos convergen en la TGN o el EE, desde donde tres vías de tráfico vesicular permiten movilizar elementos como proteínas, lípidos, iones o metabolitos hacia la vacuola: 1) la vía dependiente de AP-3; 2) la vía dependiente de RabF; y 3) la vía dependiente del intercambio RabF-RabG (**Figura 2**) (Uemura & Ueda, 2014). AP-3 es un complejo proteico similar a AP-2, localizado parcialmente en el TGN y en estructura puntuadas citoplasmáticas (Kelly et al., 2014). Análisis de mutantes de *A. thaliana ap-3β* revelan la importancia de esta ruta durante el proceso germinación, específicamente en la biogénesis y transición entre la vacuola almacenadora de proteínas y la vacuola lítica (Krüger & Schumacher, 2018). Igualmente se ha evidenciado el arresto del desarrollo de estas mutante en condiciones de deficiencia de sacarosa provocado por la pérdida de localización vacuolar de transportadores SUC4 (Feraru et al., 2010).

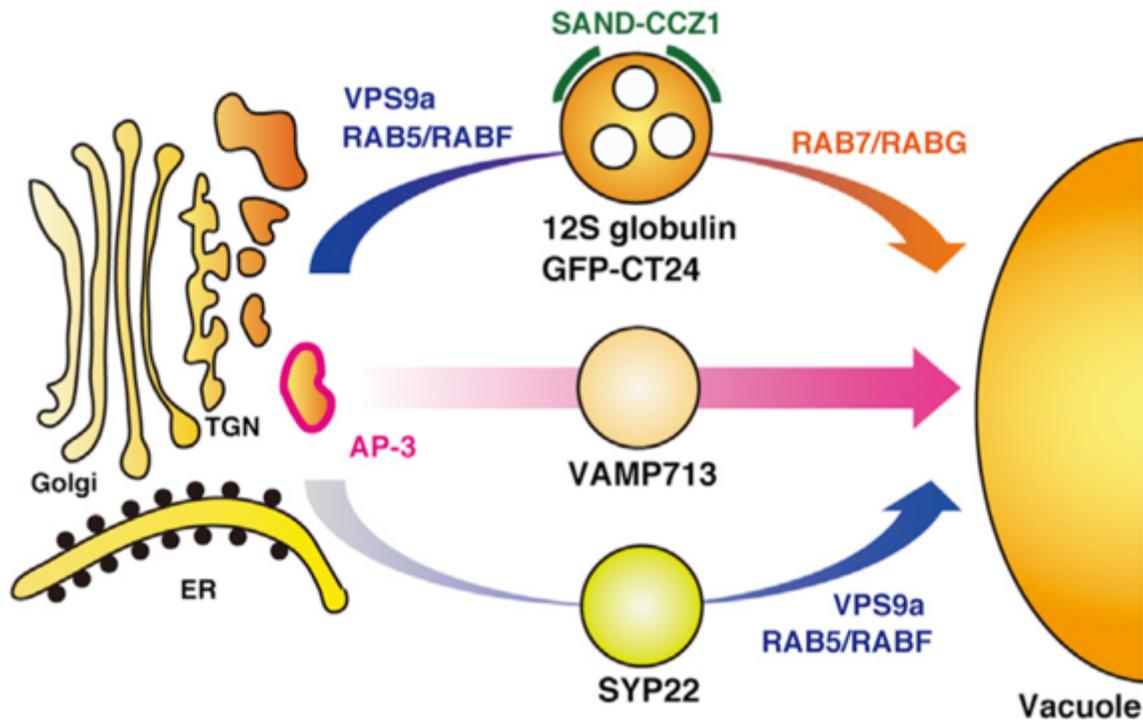


Figura 2. Vías de tráfico de vesículas desde el TGN a la vacuola. Tres vías de tráfico vesicular hacia la vacuola han sido descritas: I) la dependiente del intercambio entre RabF y RabG (canónica para eucariontes), en donde, RabF activado por VPS9 dirige el tráfico vesicular hacia los cuerpos multivesiculares. En este organelo, MON1 (SAND) y CCZ1 activan a RabG, el cual dirige el tráfico de vesículas hacia la vacuola; II) la dependiente de AP-3, mecanismo asociado a vesículas recubiertas de clatras y a su fusión mediada por la SNARE VAMP713; y III) la dependiente de RabF y mediada por SYP22 (Ebine et al., 2014).

La vía dependiente de RabF es una ruta altamente específica y relevante para el desarrollo de *A. thaliana*, aunque ha sido poco estudiada. Ella fue recientemente identificada en mutantes *vps9a-2* dada por la ausencia del activador de RabF, VPS9 (“Vacuolar Protein Sorting 9”), y al evidenciarse la pérdida de la localización vacuolar de la proteína SNARE SYP22, pero no la de VAMP721 o RabG, las cuales son parte del endosoma tardío (LE) (Ebine et al., 2014). Por otro lado, también se ha demostrado que RabF, en coordinación con el complejo CORVET y el complejo SNARE que contiene a VAMP727, estaría mediando directamente la fusión de cuerpos multivesiculares (MVB) con la vacuola en células de epidermis de la raíz, como un mecanismo específico de plantas (Takemoto et al., 2018). La vía dependiente del intercambio RabF-RabG es, por el contrario, una ruta canónica en eucariontes y ha sido mejor estudiada (Cui et al., 2014; Ebine et al., 2014). Esta vía de tráfico comienza en

el TGN con vesículas RabF-positivas que dan origen al LE. En él, el complejo ESCRT (“Endosomal Sorting Complexes Required for Transport”) regula la formación de vesículas luminales formando el MVB, y desde ahí vesículas RabG-positivas, activadas por el complejo heterodímero MON1/CCZ1, se forman y movilizan con destino a la vacuola (Baral et al., 2015b). Por esta vía de tráfico son movilizadas proteínas residentes del MVB, como la NHX5 o NHX6 (Reguera et al., 2015); proteínas de MP que se dirigen a la vía de reciclaje o la de degradación con dirección a la vacuola, como transportadores de auxina, de boro, o de componentes asociados a la señalización por ácido abscísico (ABA) (Takano et al., 2005; Pérez-Henríquez et al., 2012; Belda-Palazón et al., 2016); aquellas que son depositadas en el lumen vacuolar, como globulinas, proteasas, o aleuronas (Ebine et al., 2014; Cui et al., 2016b); y también las residentes del tonoplasto, como transportadores de hierro, manganeso y sodio (Agorio et al., 2017). Lo anterior revela la gran importancia de esta ruta de tráfico vesicular en el desarrollo de *A. thaliana*.

I.3 Rol de la endocitosis y el tráfico vesicular en la modulación de la percepción hormonal.

Diversos trabajos han evidenciado que el sistema de tráfico de endo-membranas resulta fundamental para que las plantas logren ajustar su respuesta a estímulos internos y externos (Sutter et al., 2007; Belda-Palazón et al., 2016). Auxinas y ABA han sido las principales hormonas estudiadas en este contexto (Semeradova et al., 2020). No obstante, ABA tendría un rol preponderante en este caso, al estar íntimamente relacionada con la interacción de las plantas y su entorno, especialmente durante el estrés abiótico (Zhu, 2002). Recientemente, se ha demostrado que la endocitosis es un modulador de la percepción de ABA. En ese sentido, se ha evidenciado que el exportador de ABA, ABCG25, disminuye su presencia en la MP utilizando la CME, producto de la aplicación de diversos estreses abióticos de una manera independiente de ABA. No obstante, la aplicación exógena de ABA es capaz de gatillar su reciclaje desde los EE, en una manera dependiente, justamente para modular los niveles intracelulares de esta hormona (Park et al., 2016b). De la misma manera, la endocitosis y el tráfico vesicular controlan el número de receptores de ABA en la MP (Schwihla & Korbei, 2020). Entre ellos, PYL4, quien en ausencia de ABA, es endocitado y movilizado hacia la

vacuola para su degradación, luego de ser ubiquitinado por RSL1, una ubiquitin-ligasa de MP (Bueso et al., 2014). En esta misma línea, mutantes de los componentes del complejo ESCRT, tal como *fyve1* o *vps23a*, presentan hipersensibilidad a la aplicación de ABA, producto del incremento de la presencia de los receptores PYL4 no degradados en la periferia de los MVB (Belda-Palazón et al., 2016; Belda-Palazón & Rodríguez, 2020; Yu et al., 2016). Interesantemente, también se ha demostrado que proteínas FYVE/FREE1, pertenecientes al antes mencionado complejo ESCRT, son fosforiladas por SnRK2 en presencia de ABA, y translocadas al núcleo. Ahí, esta proteína es capaz de interactuar con factores de transcripción ABF4 y ABI5, inhibir su propia actividad transcripcional, y atenuar la respuesta frente ABA (Li et al., 2019, Pan et al., 2020). Igualmente, se ha evidenciado que sobreexpresión de reguladores del tráfico vesicular, como RabGTPasas en estado siempre activas, como Rab11 y RabF, son capaces de reducir la sensibilidad a ABA, pero a través de un mecanismo desconocido (Chen & Heo, 2018; Ueda et al, 2001). Hasta ahora, la significancia biológica y el conocimiento de la mayoría de los mecanismos asociados con la endocitosis y el tráfico vesicular involucrado en la regulación hormonal es incipiente, de manera que resulta interesante su estudio y evaluación en el contexto ambiental.

I.4 Regulación de la endocitosis y del tráfico vesicular pre-vacuolar

En plantas, la regulación maestra del tráfico de vesículas está en manos de las pequeñas GTPasas de la super-familia Rab. En *A. thaliana*, 57 genes codifican proteínas Rab, las que son divididas en ocho familias denominadas desde RabA hasta RabH (Nielsen, 2020). Las familias RabA y RabE regulan la exocitosis desde el EE y el CG a la MP, respectivamente; la familia RabB entre las cisternas del CG; la familia RabD lo hace en la ruta anterógrada entre ER y el CG, mientras RabH en la ruta retrógrada. Por otra parte, entre la MP y el LE, la ruta endocítica es regulada por la familia RabF; mientras que RabG se ha especializado en la regulación de la vía de tráfico entre LE y la vacuola (Vernoud et al., 2003). Centrándonos inicialmente en la endocitosis, la familia RabF se compone de tres proteínas ARA6 (alias RabF1), RHA1 (alias RabF2a) y ARA7 (alias RabF2b), las cuales cumplen roles totalmente distintos (Ueda et al., 2001). RHA1 y ARA7 han sido asociadas a la CME y tráfico vesicular pre-vacuolar hasta el LE, mientras que el rol de ARA6 ha sido ampliamente

discutido (Uemura & Ueda, 2014). Se ha evidenciado que esta proteína no está presente en animales, y que actúa de manera independiente de RHA1 y ARA7, en la vía CIE como un mecanismo alternativo y exclusivo de plantas (Ueda et al., 2001; Grebe et al., 2003; Ito et al., 2018). Por otra parte, ARA6 se ha evidenciado que también estaría controlando el tráfico exocítico de proteínas SOS1 (Ebine et al., 2011), participaría de un tipo de transporte MP–vacuola directo para proteínas cargo, y además realizaría el reciclaje de proteínas del tipo receptoras desde el LE al EE en células de tabaco (Bottanelli et al., 2011). Estos estudios describen la multifuncionalidad de ARA6 tanto en diversos tejidos, como entre diferentes especies vegetales.

La familia RabG, por el contrario, le otorga continuidad a la vía de tráfico endocítico con dirección a la vacuola. En *A. thaliana* hay tres sub-grupos, filogenéticamente divididos, de proteínas RabG (RabG1, G2, y G3a-f), con 8 proteínas totales, localizadas en el LE y el tonoplasto. Se ha evidenciado que la mutante dominante negativo de *A. thaliana* para *RabG3f* provoca un aumento considerable del volumen del LE y la deformación y fraccionamiento de la vacuola, efecto también observado en protoplastos de tabaco (Cui et al., 2014). Lo mismo sucede con la séxtuple mutante de *A. thaliana* *rabg3a,b,c,d,e,f*, que además exhibe semienanismo en sus estados de desarrollo más tempranos (Cui et al., 2016a). Además, RabG3f sería capaz de interactuar con VPS35 y constituir un punto de control del tráfico, previo a la fusión de PVCs o de autofagosomas con la vacuola, acción también mediada por el complejo HOPS (Rodríguez-Furlan et al., 2019). Otro miembro de esta familia, RabG3b, ha sido ampliamente caracterizado como un regulador de la autofagia, contribuyendo con la diferenciación celular para formar los elementos conductores de agua en el xilema de *A. thaliana*, como también para constituir parte importante de respuesta sensitiva frente al ataque de patógenos o la respuesta subcelular frente a agentes abióticos (Kwon et al., 2010, Kwon et al., 2013). Estos antecedentes son evidencia del rol fundamental de esta familia, junto a la familia RabF, en el desarrollo de *A. thaliana* y la interacción con su entorno.

Las proteínas Rab-GTPasas para pasar de un estado inactivo a un estado activo necesitan intercambiar la molécula de GDP (guanósín difosfato) asociada a su estructura, por una de GTP (guanósín trifosfato). Tal actividad no la ejercen solas, sino que requieren de la asistencia de proteínas GEF (Factores Intercambiadores GDP/GTP), revelando un nuevo nivel de regulación del tráfico vesicular (Uejima et al., 2010). Sobre la familia RabF, análisis *in-*

in vitro evidencian que la conversión de un estado inactivo a uno activo es mediada por la proteína VPS9 (Bottanelli et al., 2012). *A. thaliana* posee 2 genes que codifican para VPS9, *VPS9a* y *VPS9b*. El primero es transcrito en todos los tejidos, mientras que transcritos del segundo no han sido identificados. Dos mutantes para *VPS9a*, *vps9a-1* y *vps9a-2*, han permitido comprender la importancia de la activación de la familia RabF (Goh et al., 2007). El primer mutante en estado homocigoto, de pérdida completa de la actividad GEF, es inviable, y en estado heterocigoto provoca una reducción en la germinación del 25%, asociado con un desarrollo anormal del embrión. El mutante *vps9a-2*, por otra parte, presenta una raíz principal más corta respecto de la silvestre, reducida hasta en un 60%, debido a una elongación celular defectuosa (Inoue et al., 2013). En este último caso, la proteína codificada por el gen mutado pierde cerca de 200 aminoácidos, a continuación del dominio con actividad GEF para RHA1 y ARA7. (Goh et al., 2007). Análisis bioinformáticos, observaciones tridimensionales del cristal de VPS9-ARA7 (PDB: 2EFC) y estudios funcionales de la región perdida, han revelado que este dominio permitiría la homo-dimerización de VPS9a y, finalmente, la unión y activación de ARA6 (Uejima et al., 2010; Sunada et al., 2015).

La fusión de vesículas con LE, y luego con la vacuola, es dependiente de la acción secuencial de activación de RabF y RabG. En *A. thaliana*, primero, RabF-activado es reclutado en el LE, seguido por el complejo MON1/CCZ1 y, finalmente, RabG-desactivado (**Figura 3**) (Ebine et al., 2014). El complejo MON1/CCZ1 es un heterodímero con actividad GEF que activa a RabG, y provoca el reemplazo gradual de RabF para formar nuevas vesículas que tendrán como destino la vacuola (Cui et al., 2014). Durante tal evento, es posible observar mediante microscopía confocal la movilización de RabG al tonoplasto (Cui et al., 2016a). *A. thaliana* posee sólo un gen que codifican para MON1 (Monensin sensitivity protein 1) y dos para CCZ1 (caffeine, calcium, zinc sensitivity 1), denominados *CCZ1a* y *CCZ1b* (Singh et al., 2014). Adicionalmente, ambas proteínas poseen un dominio Longin involucrado en la dimerización y actividad del complejo, al igual que muchas especies eucarionte, evidenciando la conservación evolutiva del mecanismo (Sanchez-Pulido & Ponting, 2020; Kiontke et al., 2017).

Particularmente, MON1 ha mostrado co-localizar con ARA6 y ARA7, constituyendo por si solo un efector, es decir, un modulador de la tasa de fusión de vesículas que llegan al LE (Singh et al., 2014). Dos mutantes de *mon1* han sido caracterizadas: *mon1-1* y *mon1-2*. Ambas

son mutantes nulas con retardo en el crecimiento y desarrollo defectuoso del polen, lo cual se asocia con la formación endosomas y tráfico vesicular defectuoso, y vacuola fragmentada, evidenciando que MON1 es requerido en prácticamente todos los contextos del desarrollo de *A. thaliana* (Singh et al., 2014; Cui et al., 2014; Cui et al., 2016b). La pérdida de la localización de proteínas almacenadas en vacuola, como la subunidad- α de la β -conglucina (CT24), faseolinas, globulina 12S, albúmina 2S o aleurinas, la acumulación parcial y aberrante del transportador de auxinas PIN2 en endosomas, y del transportador de protones VHA en la vacuola, confirman lo anterior (Cui et al., 2014; Singh et al., 2014). Dada su relevancia, actualmente la mutante *mon1-2* está siendo utilizada para la búsqueda de nuevos reguladores del tráfico pre-vacuolar (Zhu et al., 2020). Para lo anterior, *mon1-2* ha sido sometida a mutagénesis con etilmetanosulfonato, obteniéndose y seleccionándose plantas con fenotipo recuperado. El resultado de la retro-cruza entre *mon1-2* y esta nueva mutante denominada *mr* (“*mon1 repressor*”) permitirá, mediante *screening* genético y caracterización molecular, la identificación de los nuevos reguladores.

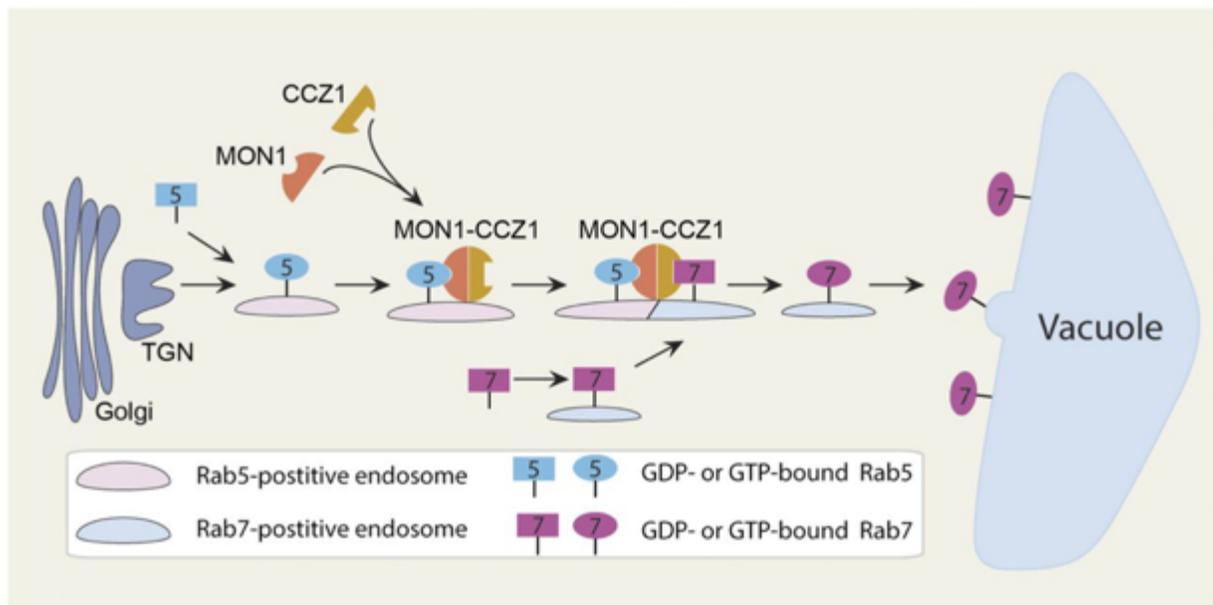


Figura 3. Tráfico vesicular pre-vacuolar dependiente del intercambio entre RabF y RabG. RabF (Rab5) activado es reconocido por el complejo heterodimérico MON1 y CCZ1, actuando como efector y mediador en la fusión de endosomas positivos para RabF activado con aquellos que tienen a RabG (Rab7) desactivado. En estos nuevos endosomas, CCZ1 del complejo RabF-MON1-CCZ1 activa a RabG dándole continuidad al tráfico vesicular hacia la vacuola (Cui et al., 2014).

Aunque CCZ1a y CCZ1b tienen funciones redundantes, ambas proteínas no son menos importantes que MON1. Se ha observado que las mutantes simples de *A. thaliana*, *ccz1a* y *ccz1b*, no presentan un fenotipo defectuoso evidente, pero la doble mutante *ccz1a/ccz1b* (*ccz1a/b*) inhibe significativamente su crecimiento. Esto se debe a que RabG no es reclutado en el LE, si no en estructuras citoplasmáticas con formas de disco, y por presentar una vacuola fragmentada (Ebine et al., 2014). Lo anterior causa la secreción extracelular, en forma de exosomas, de proteínas CT24 o globulinas 12S, las cuales son normalmente acumuladas en la vacuola durante el desarrollo embrionario, limitando la disponibilidad de nutrientes para el desarrollo, efecto similar a lo observado en la mutante *mon1* (Ebine et al., 2014). A lo anterior se suma que la activación de la familia RabG mediada por CCZ1, también ha sido asociada a otros procesos moleculares relevante para el desarrollo vegetal, como el depósito vacuolar de proteasas durante la muerte celular programada del tapetum, la localización polar de proteínas PIN, la mantención del pH intra-luminal de los endosomas y vacuola, mediados por bombas de protones VHA (Goh et al., 2007; Reguera et al., 2015; Zhou et al., 2015; Cui et al., 2016b). No obstante, a pesar de la amplia caracterización molecular de la vía endocítica y tráfico pre-vacuolar dirigido por MON1 y CCZ1, es desconocido el involucramiento que, de forma individual o en conjunto, ambas proteínas tienen en contextos como el estrés abiótico y, en particular, el estrés salino.

I.5 Respuesta de la endocitosis y del tráfico vesicular pre-vacuolar al estrés salino.

El estrés salino induce la tasa endocítica en un 30-40% aproximadamente (Zwiewka et al., 2015). Proteínas transportadoras de auxinas (PIN2), aquaporinas (PIP2;1) o RbohD son endocitadas selectivamente bajo condiciones de estrés (Hao et al., 2014; Ueda et al., 2016). Precisamente, la activación de RbohD por fosforilasas dependientes de Ca^{2+} ha revelado además un nexo entre el estrés oxidativo, el estrés salino y la endocitosis (Kurusu et al., 2015). Bajo condiciones normales RbohD se encuentra asociada a membranas con alto contenido de PI(4,5)P₂ en forma de monómeros inactivos, pero durante estrés abiótico estos monómeros se tetramerizan y activan en asociación con micro-dominios ricos en esteroides, produciendo ion superóxido (O_2^-) (Menzel et al., 2019). ROS tiene un rol fundamental en la señalización y activación de las vías de regulación para la tolerancia a estrés salino; sin embargo, su

prologada y excesiva producción induce la muerte celular programada. Bajo este escenario, la endocitosis de RbohD y compartimentación de ROS es activada, disminuyendo su concentración citoplasmática y su impacto sobre el estrés (Martinière et al., 2019). Esto es consistente con el aumento de la tolerancia a estrés salino de plantas transgénicas que reducen la expresión de un gen que codifica una proteína SNARE VAMP711, causando el incremento del número de compartimentos pre-vacuolares (PVC) ricos en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) marcado con 2',7'-diclorofluorescina diacetato (H₂DCFDA) (Leshem & Levine, 2007). Al respecto, se postula que la reducción de ROS prevendría la alcalinización de la vacuola, promoviendo el uso del gradiente de H^+ e incrementando el secuestro del Na^+ citoplasmático (Baral et al., 2015b).

El estudio detallado de la internación de PIP2;1 y RbohD ha revelado que bajo condiciones normales de crecimiento ambas proteínas son retiradas de la MP por la vía CME, pero que, durante el estrés salino, serían además endocitadas por una nueva vía denominada endocitosis inducida por sal (SIE) (**Figura 4**). Se ha evidenciado que VPS9a cambia su localización subcelular para ubicarse en la MP y endosomas, activar a ARA6, e inducir a SIE en todas las capas celulares de la raíz de *A. thaliana* (Baral et al., 2015a). El objetivo de esta nueva vía, sería internar tanto proteínas trans-membranales como ancladas a lípidos ubicadas en membranas ricas en esteroides, para movilizarlas a la vía de reciclaje o la vacuola, proceso mediado por el intercambio RabF-RaG. A esto, se suma que la mutante *vps9a-2* de *A. thaliana* evidencia mayor sensibilidad a estrés salino que plantas silvestres, debido a la imposibilidad para formar compartimentos ácidos como autofagosomas o de acidificar la vacuola cuando estas estructuras son marcadas con LysoTracker-Red[®], probablemente debido a que enzimas con actividad proteolítica o bombas de iones no estarían siendo dirigidas hacia algunas de estas estructuras (Mitou et al., 2009; Gaxiola et al., 2012). La movilización defectuosa de transportadores al tonoplasto estaría además restringiendo la expansión del volumen vacuolar, prerequisite fundamental para acumular mayores concentraciones de Na^+ (Mimura et al., 2003; Ebine et al., 2011; Baral et al., 2015b).

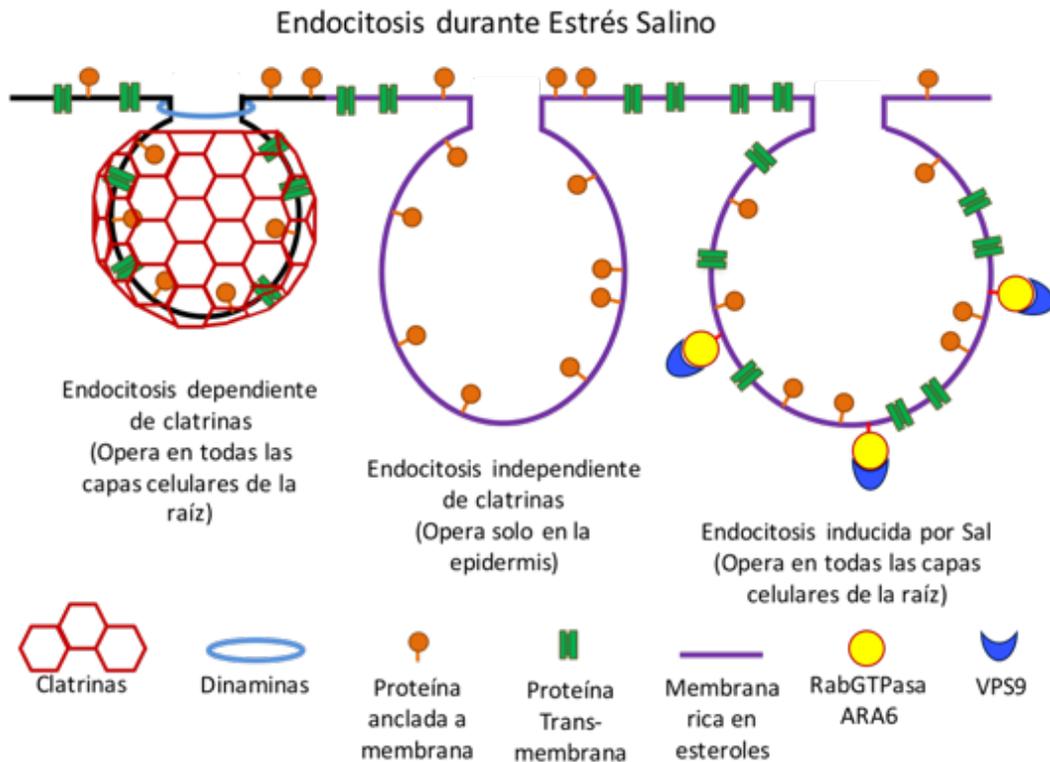


Figura 4. Tipos de endocitosis durante estrés salino en *Arabidopsis thaliana*. Tres tipos de mecanismos endocíticos han sido identificados durante estrés salino, aquella mediada por clatrin (CME), la independiente de clatrin (CIE), y una exclusiva de plantas, inducida por el estrés salino (SIE). La CME (línea negra) permite la internación de proteínas transmembranas y de ancladas a lípidos en membranas ricas PI(4,5)P2. Proteínas transmembrana y ancladas a lípidos en membranas ricas en esteroides son endocitadas por las vías CIE y SIE (línea morada). En la vía SIE, ARA6 es activada por VPS9, regulando este tipo de tráfico vesicular (figura modificada de Baral et al., 2015a).

En la vía pre-vacuolar, el rol de MON1/CCZ1 en el contexto del estrés salino es desconocido, no así el rol de las Rab-GTPasas, que ha sido explorado. La expresión de los genes que codifican a los miembros de las familias *RabF* y *RabG* de *A. thaliana* se ven regulados positivamente por estrés, mientras que la sobreexpresión de *ARA6* o *RabG3e* en *A. thaliana* aumenta la tolerancia a estrés salino (Yin et al., 2017; Ebine et al., 2011). La sobreexpresión de *ARA6* permite que raíces de *A. thaliana* crezcan un 20% más en 150 mM de NaCl. Mientras que la sobreexpresión de *RabG3e*, al promover la reducción de H₂O₂ citoplasmático, el incremento de la endocitosis del indicador lipofílico FM4-64 mediante un mecanismo desconocido, y el aumento de la compartimentación vacuolar de Na⁺ indicado con Sodium-Green[®], permite que el peso fresco de plantas jóvenes aumente hasta un 50% bajo

estrés severo en macetas con 250 mM de NaCl (Mazel et al., 2004). Particularmente, el aumento significativo en la cantidad de Na⁺ compartimentado, ha revelado, en parte, la capacidad almacenadora que posee la vacuola, cuyo límite es desconocido. En ese sentido el aumento del contenido de Na⁺ vacuolar y el incremento de la tolerancia a estrés salino también ha sido reportado con la sobreexpresión de *AtSFT12*, una proteína SNARE que participa en el tráfico vesicular entre el LE y la vacuola, de la misma manera con un gen que codifica para un regulador de las súper-familia de proteínas RabGTPasas de *S. chilense*, *SchRabGDII*, y al sobre-expresar el gen *AtATG8*, el cual codifica para un regulador positivo de la actividad autofágica (Tarte et al., 2015; Luo et al., 2017; San Martin-Davison et al., 2017).

En resumen, se ha evidenciado que las proteínas con actividad GEF poseen un rol fundamental en la regulación de la endocitosis y el tráfico vesicular, al intervenir en la conversión del estado inactivo - activo de las familias de proteínas RabGTPasas. Este proceso se torna aún más relevante cuando las plantas se enfrentan a condiciones ambientales adversas, como el estrés salino, debido a que se requiere del rápido y eficiente movimiento intracelular de diversos elementos, como iones, proteínas, lípidos y nutrientes, entre otros. En ese contexto, el complejo MON1/CCZ1 posee un rol inexplorado, el cual, en base a los antecedentes expuestos, podría estar asociado con el incremento de la endocitosis, la confinación de ROS en endosomas, o modulando la respuesta hormonal mediada por ABA, al igual que la actividad autofágica, todos los cuales podrían permitir el incremento de la capacidad de compartimentación de Na⁺ vacuolar (Fan et al., 2015, Wang et al., 2020). En vista de todo lo anterior, este trabajo de tesis pretende estudiar los efectos ejercidos por la expresión de los genes que codifican para las proteínas del complejo MON1/CCZ1, especialmente sobre la capacidad de tolerancia a estrés salino de *A. thaliana*. Efectos que serán analizados tanto de manera individual para cada gen, como en conjunto.

Recientemente, en nuestro laboratorio han sido identificados dos putativos genes homólogos a *MON1* y *CCZ1a/b* de *A. thaliana* en la especie de tomate silvestre *Solanum chilense*, denominados *SchMON1* y *SchCCZ1*, respectivamente. Evidencias previas señalan que, en raíces de *S. chilense* sometidas a estrés salino, el perfil transcripcional de ambos genes presenta una coordinada y fuerte inducción, la cual no es evidente en sus homólogos de *A. thaliana*. Esto hace posible hipotetizar que a) *SchMON1* y *SchCCZ1* podrían cumplir un rol relevante en la capacidad de tolerancia a estrés salino en *S. chilense*, mediante la modulación

positiva del tráfico pre-vacuolar, y b) que la modulación coordinada de la expresión ambos genes en raíces de *A. thaliana* podría incrementar su capacidad de tolerancia. Para responder a estas hipótesis, la utilización de un promotor específico de raíz que dirija la expresión de ambos genes, como el promotor del gen UDP-glicosiltransferasa (*UGT*, At1g73160) específico de raíz, resulta razonable (Vijaybhaskar et al., 2008). No obstante, se desconoce la actividad de este promotor frente estrés salino, por lo que su comportamiento en tal contexto debe ser evaluado.

Por otra parte, atendiendo a la potencial funcionalidad de SchMON1 y SchCCZ1, respecto de las actividades en el complejo GEF, las capacidades para interactuar con las proteínas RabGTPasas y lo antecedentes previamente señalados, en este trabajo de tesis se ha realizado un análisis demostrativo de la complementación funcional de las mutantes de *A. thaliana mon1-1* y *ccz1a/b*, respectivamente. Luego se ha establecido el efecto de la co-expresión radicular de ambos genes de *S. chilense* sobre la morfología, y el comportamiento celular y molecular de *A. thaliana* durante condiciones de estrés salino. Para lo cual se han analizado aspectos como la tasa endocítica, el contenido y localización de H₂O₂, la actividad autofágica, la respuesta fisiológica a la aplicación de ABA exógeno, y el contenido de Na⁺ que las vacuolas serán capaces de compartimentar, y se ha indagado en la relación que tienen todos estos procesos con los mecanismos regulados por el complejo MON1/CCZ1.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La expresión y co-expresión radicular de los genes *SchMON1* y *SchCCZ1* de *Solanum chilense* en *Arabidopsis thaliana* incrementa su tolerancia a estrés salino al aumentar el contenido de Na⁺ en sus vacuolas, efecto que se ve favorecido por la modulación de la percepción de ABA, el incremento de tasa endocítica, una menor producción de H₂O₂, y una mayor actividad autofágica, respecto de plantas de genotipo silvestre.

Objetivo general:

Evaluar la capacidad para incrementar la tolerancia a estrés salino de plantas de *Arabidopsis thaliana* mediante la expresión y co-expresión radicular de los genes *SchCCZ1* y *SchMON1* de *Solanum chilense*, asociando este aumento con mecanismos moleculares y celulares que permitan potenciar la capacidad de la vacuola para compartimentar Na⁺.

Objetivos específicos:

- 1.- Analizar la presencia de motivos estructurales conservados en la secuencia aminoacídica y el comportamiento transcripcional de los genes *SchMON1* y *SchCCZI* en plantas de *Solanum chilense* sometidas estrés salino.
- 2.- Determinar la identidad funcional de las proteínas codificadas por *SchMON1* y *SchCCZI* mediante complementación de mutantes de *Arabidopsis thaliana mon1-1* y *ccz1a/b*, respectivamente, y localización subcelular.
- 3.- Determinar los efectos de la expresión y co-expresión radicular de *SchMON1* y *SchCCZI* en la capacidad de tolerancia a estrés salino de plantas de *Arabidopsis thaliana* y su respuesta frente a ABA.
- 4.- Relacionar el comportamiento de la endocitosis, el contenido y localización del H₂O₂, y la actividad autofágica, con el contenido de Na⁺ vacuolar en células radiculares de los genotipos transgénicos sometidos a estrés salino.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.

Plantas de *A. thaliana* silvestres ecotipo Columbia-0 (WT); genotipos transgénicos, tales como *pRaíz::GUS* (GUS), *pRaíz::SchMON1* (M), *pRaíz::SchCCZI* (C) y *pRaíz::SchMON1/pRaíz::SchCCZI* (MC); mutantes *mon1-1* (SALK_075382), *ccz1a* (SALK_048984) y *ccz1b* (SAIL_70_D10) (Schubert et al, 2004); o aquellas con cada uno de los siguientes marcadores subcelulares: RabG3f-mCherry (endosoma tardío, CS781670), RabF2a-mCherry (endosoma temprano, CS781672), VTI12-mCherry (trans-Golgi, CS781675), PIP1;4-mCherry (membrana plasmática, CS781687), VAMP711-mCherry (vacuola, CS781673) y SYP32-mCherry (complejo de Golgi, CS781677), fueron cultivadas y crecidas en sustrato compuesto por vermiculita, perlita y turba (1:1:1) bajo fotoperiodo de día largo (16 h luz y 8 h oscuridad), temperatura entre 23 y 25 °C, irrigación de 80 mL de agua cada 3 días y fertilizadas con una solución comercial Hoagland (1/4) cada 20 días.

Semillas de plantas de *A. thaliana* que fueron previamente sometidas a procedimientos de transfección, fueron germinadas y crecidas *in vitro* en medio Murashige Skoog (MS) de media fuerza (0,5X) hasta la edad de 3 semanas. Posteriormente, fueron trasplantadas a invernadero con el sustrato y condiciones medioambientales controladas mencionadas anteriormente.

II.2 Ensayos de estrés salino y ABA.

Plantas de *S. chilense* (Dunal) Reiche fueron utilizadas para estudiar los patrones de expresión de los genes *SchMON1* y *SchCCZI*, junto con el marcador de estrés *SchAREB1*. Las plantas fueron crecidas en invernadero, en macetas que contenían perlita y vermiculita (1:1), a temperatura entre 23 y 25°C, fotoperiodo de día largo (16 h luz y 8 h oscuridad), irrigación 400 mL H₂O cada 5 días y fertilización con una solución comercial Hoagland (1/4) cada 10 días. A la 10^{ma} semana de crecimiento las plantas fueron sometidas a estrés salino 300 mM de NaCl. Hojas y raíces fueron colectadas a 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h después de iniciado el estrés, congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C (San Martín-Davison et al., 2017).

Para el caso de *A. thaliana*, semillas estériles fueron establecidas en medio MS (0,5X). Luego, la germinación de semillas fue coordinada colocándolas a 4 °C y oscuridad, por 48 h. Finalizado este periodo, las semillas fueron traspasadas a cámara de crecimiento con condiciones de temperatura 24 °C con fotoperiodo de día largo. A los 5 días de edad, las plántulas fueron traspasadas a placas verticales con medio MS (0,5X) y 0, 50, 75 o 100 mM de NaCl, hasta cumplir 14 días de edad. En forma paralela, cumplidas 24 h de estrés por sal, el tejido aéreo y radicular de un grupo de plántulas fue colectado e inmediatamente congelado. Los genes *AtRD22* (accesión NM_122472), *AtRD29* (accesión NM_124610) y *AtRab18* (accesión NM_126038) fueron utilizados como marcadores de estrés. Otro grupo de plántulas, también de 5 días de edad, fueron traspasadas a placas verticales con medio MS (0,5X) conteniendo 0 y 25 µM de ABA diluido en DMSO hasta cumplir 10 días de edad.

II.3 Aislamiento de ARN y síntesis de cADN.

Para aislar ARN total desde *S. chilense* y *A. thaliana*, tres extracciones independientes de ARN fueron realizadas desde muestras previamente almacenadas a -80°C. Las extracciones fueron realizadas utilizando el Kit comercial “SV Total RNA Isolation System” (Promega, Wisconsin, USA), siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. La calidad e integridad del ARN total fue verificada con electroforesis en geles de agarosa/formaldehído y relación de absorbancia 260/280, cuyo rango estaba entre 1,8 y 2,0. Cada muestra de ARN fue cuantificada con el espectrofotómetro NanoQuant Infinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, Suiza).

Una cantidad total de 5 µg de ARN fueron purificados mediante tratamiento con DNAsa I del kit “RNase free DNase I” (Ambion, Texas, USA). De ellos, utilizando 2 µg de ARN purificado se sintetizó cADN en un volumen final de 20 µL, empleando el kit “Maxima H Minus First Strand cADN Synthesis” (Thermofisher, Massachusetts, USA). Ambos procedimientos fueron realizados siguiendo las especificaciones de los proveedores. El cADN obtenido fue almacenado a -20 °C.

II.4 Búsqueda y análisis de secuencias.

Considerando que no se dispone del genoma secuenciado de *S. chilense*, para aislar los genes *SchMON1* y *SchCCZ1* se diseñaron partidores utilizando la secuencia genómica de los genes homólogos presentes en *S. lycopersicum* y disponibles en la base de datos de SolGenomics (<https://solgenomics.net/tools/blast/>). Para identificarlos, se emplearon las secuencias descritas y caracterizadas de *A. thaliana*: *AtMON1*, *AtCCZ1a* y *AtCCZ1b*. Luego, con la secuencia de los genes candidatos, partidores fueron diseñados tanto para el análisis de expresión (con una eficiencia calculada mínima del 95%), como para la amplificación de las regiones codificantes (**Tabla 1**).

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados en esta tesis.

Gen	Partidor	Tamaño amplicón (pb)	T° de annealing (°C)
Partidores empleados en RT-qPCR			
<i>SchMON1</i>	Fw: 5'-CCCGGTCGTTGACAGTTCTC-3' Rv: 5'-TCTCGATGGCGTCCAAAGAC-3'	117	60
<i>SchCCZ1</i>	Fw: 5'-GAAAAGCGGCCTTCATTGGA-3' Rv: 5'-ACCATTCCACGCTCCTTCAA-3'	101	60
<i>SchAREB1</i>	Fw: 5'-CAGGTTTAATGGCTGGTAGTATCCC-3' Rv: 5'-GCTGTGATTGTTGGTTCTGTTGC-3'	144	60
<i>SchUbiquitin3</i>	Fw: 5'-GAAGAAGAAGACCTACACCAAGCC-3' Rv: 5'-CACTCCTTACGAAGCCTCTGAAC-3'	123	60
<i>GUS</i>	Fw: 5'-CGCTCACACCGATAACCATCA-3' Rv: 5'-CGGCTGATGCAGTTTCTCCT-3'	146	61
<i>AtMON1</i>	Fw: 5'-ATGGCGACTTCAGATTCGAGGTC-3' Rv: 5'-CGCTAGGTTGAGATAAATTCATTGACTC-3'	139	61
<i>AtCCZ1a</i>	Fw: 5'-GCGTCCATGAGCTCTGGTGA-3' Rv: 5'-CACTGATAACTGCGTTCGAGAAGTC-3'	138	61
<i>AtCCZ1b</i>	Fw: 5'-GAAGAGGCCAACACGAAGGACA-3'	173	60

	Rv: 5'-GGAATGTCTCTCTGCTTCAATTACC-3'		
<i>AtRabG3f</i>	Fw: 5'-ATGCCTTCTCGTAGAAGAACTCTCCTC-3' Rv: 5'-GAACTTCCTTAGTCAAGAAATCAGCC-3'	151	61
<i>AtRab18</i>	Fw: 5'-AAGAAGAACATGGCGTCTTACC-3' Rv: 5'-GTTCCAAAGCCTTCAGTCCC-3'	253	60
<i>AtRD22</i>	Fw: 5'-GCGTTGGCAGCGGAAAA-3' Rv: 5'-GCGTTAGGATCGTCGTGG-3'	210	60
<i>AtRD29A</i>	Fw: 5'-GGACTAAGGTGTTTTCTGTGC-3' Rv: 5'-TCCGATGTAAACGTCGTCC-3'	124	60
<i>AtCHS</i>	Fw: 5'-CTTGCCTTCTATCTGCCTACCTAC-3' Rv: 5'-TCCAGCACATATCACATATCACATC-3'	132	60
<i>AtFLS1</i>	Fw: 5'-CAAGGATTACAGTTACCGCAAGC-3' Rv: 5'-CCACAACCACAAATTATTCTTCTCG-3'	83	60
<i>AtLDOX</i>	Fw: 5'-ACTTCTTTCATCTTGCGTATCCTG-3' Rv: 5'-TCGTTGCTTCTATGTAATCACTTGG-3'	84	60
<i>AtTT12</i>	Fw: 5'-TCGGCAACTGAGAATCAAGAGATG-3' Rv: 5'-GCAGAAGAGAACTAAGTAGGTCGTC-3'	194	60
<i>AtCAT1</i>	Fw: 5'-AGGAGCCAATCACAGCC-3' Rv: 5'-TCAAGACCAAGCGACCA-3'	194	59
<i>AtCAT3</i>	Fw: 5'-TCACAGCCACGCCACTAA-3' Rv: 5'-AGAACCAAGCGACCAACC-3'	183	59
<i>AtSOD</i>	Fw: 5'-AGATGAGTGCTGAGGGTGCT-3' Rv: 5'-GGATCCTGATTGGCAGTTGT-3'	106	59
<i>AtAPX</i>	Fw: 5'-TCCTCCCACAACAACAACA-3' Rv: 5'-GAGGAGGAAGCGGAGAGAGT-3'	123	59
<i>AtNHX1</i>	Fw: 5'-CTACCTATTACCGCACCAGAACG-3' Rv: 5'-CTCAATGAACGAGTCTTGGTCC-3'	103	60
<i>AtSOS1</i>	Fw: 5'-ATGATGGGACGGCGATTGT-3' Rv: 5'-TGCCAAACGCCAGACCAAT-3'	135	60

Partidores empleados para amplificar ORF

<i>SchMON1</i>	Fw: 5'-ATGCCTTCCGATGCTGACTTATC-3' Rv: 5'-TCACCATGAAAAAGGACTGGCT-3'	1854	60
<i>SchCCZ1</i>	Fw: 5'-ATGGGAATTTCCGGCTGCAAG-3' Rv: 5'-TTACAAAGAAAAACGCCACTGC-3'	1572	59

Partidores para localización subcelular

<i>GFP-SchMON1</i>	Fw: 5'-TCTAGAAATGCCTTCCGATGCTGAC-3' Rv: 5'-GGATCCTCACCATGAAAAAGGACTG-3'	1858	60
<i>GFP-SchCCZ1</i>	Fw: 5'-TCTAGAAATGGGAATTTCCGGCTGCA-3' Rv: 5'-GGATCCTTACAAAGAAAAAACGCCA-3'	1575	59

Partidores para expresión estable en plantas

<i>35S::SchMON1</i>	Fw: 5'-AGATCTCGGTCGTTGACAGTT-3' Rv: 5'-GGTCACCCGAAACATGGAGAGAATCA-3'	1904	60
<i>35S::SchCCZ1</i>	Fw: 5'- TCTAGAAATGGGAATTTCCGGCTGCA-3' Rv: 5'- GGATCCTTACAAAGAAAAAACGCCA-3'	1546	60
<i>pRaíz::SchMON1</i>	Fw: 5'-AGATCTCGGTCGTTGACAGTT-3' Rv: 5'-GGTCACCCGAAACATGGAGAGAATCA-3'	1904	59
<i>pRaíz::SchCCZ1</i>	Fw: 5'-AGATCTATGGGAATTTCCGGCTG-3' Rv: 5'-CCTCAGGGGCTACCCAGTTCTATTA-3'	1589	59
<i>pRaíz::GUS</i>	Fw: 5'-AAGCTTGATCCGTGGTTCATGAACATTGA-3' Rv: 5'-GGATCCGGTTTATTTGATTTTTGTGAATTG-3'	418	58

Partidores para genotipado de mutantes

<i>gtf_mon1</i>	Fw: 5'- CGGTTTGCCTGAGTTACTCAG -3' Rv: 5'- AAAAGCCCAACAATATGGGTC -3'	779	55
<i>gtf_ccz1a</i>	Fw: 5'-ATACATTGGCAGGTTGTGGAG-3' Rv: 5'-AATGGCATTGTAGGCATCAG-3'	1137	58
<i>gtf_ccz1b</i>	Fw: 5'-TTCAGGTGGTACATTGCCTTC-3' Rv: 5'-AAACCGTCAAGGGTCAAGTTC-3'	859	58
<i>LBb1.3</i>	Fw: 5'- ATTTTGCCGATTTCCGGAAC-3'		58

Utilizando la secuencia aminoacídica deducida de los genes *SchMON1* y *SchCCZ1* se realizó la búsqueda de secuencias con alto porcentaje de identidad en *N. tabacum* y *Vitis vinifera* utilizando la herramienta BLASTp de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Con estas secuencias, incluyendo las de *A. thaliana* y *S. lycopersicum*, se realizaron alineamientos múltiples con la herramienta ClustalO, específicamente para identificar los aminoácidos conservados asociados con la plataforma de unión MON1/CCZ1, y la actividad GEF (Cabrera et al., 2014). La estructura secundaria de SchMON1 y de SchCCZ1 fue obtenida utilizando el PDB 5LDD (Kiontke et al., 2017), y la diagramación final de los alineamientos múltiples fue realizada con la herramienta ESPript 3 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>).

II.5 Análisis de la expresión génica.

Los niveles de expresión de genes de interés fueron determinados mediante PCR cuantitativo de transcripción reversa (RT-qPCR). Todas las reacciones fueron realizadas con el kit “Brilliant SYBR Green Master Mix” de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Stratagene, California, USA). Cada análisis fue realizado con tres réplicas biológicas, y cada una de ellas con tres réplicas técnicas, en un volumen final de 20 μ L, que contenía: 10 μ L de Master MIX, 0,5 μ L de cada partidor (250 nM), 1 μ L de cADN (25 ng totales) y agua libre de nucleasas. Las condiciones de los ciclos de RT-qPCR fueron los siguientes: 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, temperatura de “melting” de acuerdo con las especificaciones de cada partidor por 20 s, y 72 °C por 20 s. La curva de “melting” fue analizada para verificar la especificidad de los partidores. El método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ fue aplicado para calcular la tasa de cambio de los niveles de transcritos de los genes (Livak & Schmittgen, 2001).

Los niveles de transcritos de los genes de *S. chilense* fueron normalizados respecto de los niveles de expresión del gen de referencia *Ubiquitin3* (accesión X58253, Yáñez et al., 2009). Mientras que, para el análisis de los niveles de transcritos de *A. thaliana*, la normalización de los valores de expresión fue realizada con el gen *AtGAPDH* (At1g13440, Omidbakhshfard et al., 2012). Todos los partidores fueron manualmente diseñados y

verificados utilizando la herramienta web Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Adicionalmente, todos los productos de RT-qPCR fueron secuenciados para corroborar la especificidad de los partidores y la identidad de cada amplicón. Todos los cálculos fueron analizados usando test de ANOVA de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples HSD de Tukey ($p < 0.05$), y junto con ello se estableció el valor relativo de 1 en las gráficas para todas condiciones de crecimiento normal (R Development Team, 2013).

Para evaluar el efecto del estrés salino o de la aplicación de ABA sobre los genes que codifican proteínas asociadas con el mecanismo de activación del tráfico vesicular pre-vacuolar, se analizaron los niveles de transcritos de los genes *AtMON1* (At2g28390), *AtCCZ1a* (At1g16020), *AtCCZ1b* (At1g80910) y *AtRabG3f* (At3g18820). Para el caso de los genes de respuesta asociados al estrés oxidativo en *A. thaliana*, fueron evaluados aquellos asociados al mecanismo enzimático reductor de ROS: *superóxido dismutasa* (*AtSOD1*, At3g10920), *ascorbato peroxidasa S* (*AtAPXS*, At4g08390), *catalasa 1* (*AtCAT1*, At1g20630) y *catalasa 3* (*AtCAT3*, At1g20620), y el no-enzimático asociado a flavonoides, *chalcona sintasa* (*AtCHS*, At5g13930), *flavonol sintasa* (*AtFLS*, At5g08640), *leucocianidin dioxigenasa* (*AtLDOX*, At4g22880) y un *transportador de flavonoides del tipo MATE en tonoplasto* (*AtTT12*, At3g59030). Por otra parte, la respuesta de genes relacionados con los mecanismos de exclusión de Na^+ o su acumulación vacuolar, asociados a los genes *AtSOS1* (Accesión NM_126259) y *AtNHX1* (AT5G27150), respectivamente, también fueron evaluados.

II.6 Reacciones de la Polimerasa en Cadena (PCR).

Las secuencias codificantes de los genes *SchMON1* y *SchCCZ1* fueron amplificadas mediante PCR utilizando partidores específicos (Tabla S1). Para ello se utilizó la enzima ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, california, USA). Cada reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 25 μL siguiendo las indicaciones del proveedor. El perfil térmico del PCR fue: 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95 °C por 45 s, 55 – 60°C por 60 s (**Tabla 1**), 72°C por 60 s y una extensión final de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron separados mediante migración con electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v en Buffer TAE 1X, lo cual permitió rescatar ADN de interés para su posterior purificación y

ligación a vector de clonamiento. La purificación del ADN fue realizada con el sistema EZNA Gel Extraction (Omega Bio-Tek, Georgia, USA), y la ligación de los fragmentos fue realizada sobre el vector pGEM-T siguiendo el protocolo del proveedor (Promega, Wisconsin, USA). A continuación, los productos de ligación fueron introducidos a células de *Escherichia coli* DH5 α mediante transformación química, las que fueron crecidas en medio de selección en base a coloración (0,15 mM de IPTG, 30 μ g/ml de X-Gal) y resistencia a ampicilina (100 μ g/mL). Aquellas bacterias de colonias blancas fueron seleccionadas, y desde ellas el ADN plasmidial fue purificado utilizando el kit EZNA Plasmid Mini siguiendo las indicaciones del proveedor (Omega Bio-Tek, Georgia, USA). La secuencia de los plásmidos recombinantes aislados fue determinada mediante secuenciación (MACROGEN, <http://www.macrogen.com>). Luego, para el análisis de secuencias se utilizó el programa BioEdit, alineado las secuencias obtenidas con otras disponibles en bases de datos, para así establecer posibles cambios en el marco de lectura o mutaciones ocurridas durante la reacción de PCR. Aquellos clones que tenían plásmidos con las secuencias correctas fueron utilizados para los siguientes procedimientos.

II.7 Generación de construcciones genéticas.

Para generar una construcción que permita expresar genes de manera específica en raíces de *A. thaliana*, se utilizó una sección de 415 pb del promotor de *UGT* (At1g73160) denominada para esta tesis *pRaíz* (Vijaybhaskar et al., 2008). La secuencia fue amplificada desde ADN obtenido de *A. thaliana* utilizando partidores específicos que contenían sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Bg*III (**Tabla 1**). Esto permitió liberar el inserto desde el vector pGEM-T, y reemplazar el promotor *CaMV 35S* presente en el vector binario pCAMBIA1303, dejando de esta manera al gen de la β -glucuronidasa (GUS) bajo el control de *pRaíz*. Esta construcción fue denominada *pRaíz::GUS*.

Para generar construcciones con los genes de estudio comandados por *pRaíz*, la región codificante de *SchMON1* y *SchCCZ1* fue amplificada desde cADN obtenido de raíces de *S. chilense* (**Tabla 1**). Luego de secuenciados, ambos genes fueron liberados desde el vector pGEM-T mediante digestión enzimática específica e insertados en orientación de los sitios de

restricción *Bgl*III y *Bst*EII en el vector binario pCAMBIA1303 que contenía previamente la construcción *pRaíz::GUS*. De esta manera, *GUS* fue reemplazado por cada gen, en vectores distintos, obteniéndose las construcciones denominadas *pRaíz::SchMON1* y *pRaíz::SchCCZ1*.

Para los experimentos de complementación fenotípica de plantas mutantes de *A. thaliana*, el CDS de *SchMON1* y *SchCCZ1* fue amplificado utilizando partidores específicos que incluían los sitios de restricción *Xba*I y *Sac*I para el vector binario pBI121 (**Tabla 1**), permitiendo reemplazar la región *GUS* por los genes de interés, y dejarlos bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S. Las construcciones finales fueron denominadas *35S::SchMON1* y *35S::SchCCZ1*.

Para los experimentos de expresión transitoria de plantas de *A. thaliana*, asociados con la evaluación de la localización subcelular de las proteínas *SchMON1* y *SchCCZ1*, el cADN de ambos genes fue amplificado utilizando partidores directos y reversos que incluían sitios de restricción *Xba*I y *Bam*HI, respectivamente (**Tabla 1**). Estos permitieron su liberación desde el vector pGEM-T, e inserción en el vector binario pAM1. El vector pAM1 usado para la expresión transitoria deriva de los vectores pGreen0029 y pA7-GFP (Katrin Czempinski, Universidad de Potsdam, Alemania), conteniendo una versión mejorada del promotor CaMV 35S. Las construcciones finales daban origen a las proteínas de fusión: GFP-*SchMON1* y GFP-*SchCCZ1* (Cui et al., 2014).

II.8 Obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

Los plásmidos conteniendo las construcciones *pRaíz::GUS*, *pRaíz::SchMON1*, *pRaíz::SchCCZ1*, *35S::SchMON1* y *35S::SchCCZ1* fueron introducidas mediante transformación química en cepas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pmp 90 (Koncz & Schell, 1986). Estas bacterias fueron crecidas y seleccionadas en medio YM sólido (0,04% p/v de extracto de levadura, 1% p/v manitol, 1,7 mM NaCl, 0,8 mM MgSO₄·7H₂O, 2,2 mM K₂HPO₄ y 1,5% p/v de agar) con los siguientes antibióticos: 100 mg/L rifampicina, 25 mg/L gentamicina y 50 mg/L kanamicina. Luego de 48 h de incubación a 28 °C, las colonias crecidas fueron analizadas por PCR.

Las bacterias recombinantes fueron utilizadas para transformar *A. thaliana* por medio de infección de yemas florales (“floral-dip”) siguiendo el protocolo descrito por Clough &

Bent (1998) con algunas modificaciones (Logemann et al., 2006). A partir de una colonia única se creció un pre-inóculo en 5 ml de medio YEB líquido (0,1% p/v de extracto de levadura, 0,5% p/v de extracto de carne, 0,5% p/v de peptona, 0,5% p/v de sacarosa y 0,05% p/v de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7.0) con los antibióticos de selección durante 24 horas a 28°C. Posteriormente, éste cultivo fue utilizado para inocular 500 ml de medio YEB líquido hasta alcanzar una OD_{600} de 1. Las células fueron centrifugadas a 4000 rpm por 5 min, luego de lo cual el sedimento bacteriano fue mezclado en igual volumen de medio de infiltración (5% p/v de sacarosa, 2,2 g/L de MS y 0,02% v/v de Silwet L77). La transformación de flores de *A. thaliana* consistió en sumergir durante 3-5 s inflorescencias en estado de pre-antesis.

Las transformaciones fueron las siguientes: plantas WT con la construcción *pRaíz::GUS*, plantas WT con la construcción *pRaíz::SchMONI* (alias genotipo M), plantas WT con *pRaíz::SchCCZI* (alias genotipo C), la línea mutante *mon1-1* con *35S::SchMONI* y la línea mutante *ccz1a* con *35S::SchCCZI*. Las semillas obtenidas desde las plantas transformadas fueron desinfectadas con una solución de etanol al 80% por 1 min, luego con hipoclorito de sodio al 2,5% p/v por 45 s y finalmente lavadas 5 veces con agua estéril en cámara de flujo laminar. Se sembraron en medio MS (0,5X) conteniendo 50 mg/L de kanamicina para seleccionar aquellas semillas que contenían las construcciones en pBI121, o 15 mg/L de higromicina para aquellas con las construcciones en pCAMBIA1303. Adicionalmente, fueron agregados 250 mg/L de cefotaxima para eliminar el *Agrobacterium*. Las plantas seleccionadas posteriormente fueron establecidas *ex-vitro* y analizadas por PCR para detectar la inserción del transgen, así como los niveles de transcritos mediante RT-qPCR (Tabla 1). Las semillas generadas por estas plantas fueron sembradas nuevamente en medio de selección con los mismos antibióticos, ciclo que se continuó hasta obtener una segunda generación, las cuales fueron usadas en esta tesis para su evaluación molecular y fenotípica.

Para obtener plantas Col-0 doble transgénicas con ambas construcciones (*pRaíz::SchMONI/pRaíz::SchCCZI* – alias genotipo MC), flores de plantas M fueron emasculadas y cruzadas utilizando polen de plantas C. Las semillas fueron colectadas y sembradas en medio MS (0,5X) conteniendo 15 mg/L de higromicina y 250 mg/L de cefotaxima. Estas plantas posteriormente fueron establecidas *ex-vitro* y analizadas por PCR para detectar la inserción de cada transgen.

Para el caso de plantas mutantes complementadas, para obtener plantas *ccz1a/b* complementadas con *35S::SchCCZ1*, flores de líneas mutantes *ccz1a* complementadas con *35S::SchCCZ1* fueron emasculadas y cruzadas utilizando polen de plantas mutante *ccz1b*. Las semillas fueron sembradas en tierra, crecidas y posteriormente analizadas por PCR para detectar la presencia de los T-DNA, mientras que la presencia del transgen fue determinada mediante el uso de partidores específicos (**Tabla 1**). Por autopolinización, las semillas producidas de estas plantas volvieron a ser sembradas y crecidas, y posteriormente seleccionadas aquellas que poseían en estado de homocigoto el T-DNA.

Para obtener plantas *mon1-1* complementadas con *35S::SchMON1*, plantas mutantes transformadas fueron germinadas en medio MS (0,5X) conteniendo 50 mg/L de kanamicina. Aquellas que evidenciaban desarrollo normal fueron traspasadas a *ex-vitro*. Mediante PCR, se identificó en estas plantas la presencia del T-DNA en estado homocigoto (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) y del transgen, y sus semillas fueron utilizadas en análisis posteriores.

II.9 Localización subcelular de SchMON1 y SchCCZ1.

Para establecer la localización subcelular de las proteínas codificadas por los genes *SchMON1* y *SchCCZ1* en células radiculares de *A. thaliana*, se utilizó microscopía confocal para visualizar a la proteína fluorescente verde (GFP) fusionada a cada una. Para ello, ambos genes fueron clonados de manera independiente en el plásmido pAM1, según lo descrito en la sección II.7, generándose las siguientes proteínas de fusión: GFP-SchMON1 y GFP-SchCCZ1. Se utilizó como control negativo la localización subcelular de GFP sin fusionar.

Para incrementar la precisión de este análisis, fueron empleadas plántulas que sobre-expresan de manera constitutiva los siguientes marcadores subcelulares: RabG3f-mCherry, RabF2a-mCherry, VTI12-mCherry, PIP1;4-mCherry, VAMP711-mCherry o SYP32-mCherry. Cada una de ellas fue transformada utilizando el método modificado de transformación transitoria denominado AGROBEST (Wu et al., 2014). Este método consistió en tomar una alícuota de *A. tumefaciens* GV3101, conteniendo la construcción de interés (*GFP-SchMON1* o *GFP-SchCCZ1*), y ubicarla en un medio de crecimiento 523 sólido (caseína hidrolizada 8 g/L, MgO₄S 0,0358 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, sacarosa 10 g/L, extracto de levadura 4 g/L, agar 8 g/L,

pH 6.9) con los antibióticos respectivos por dos días a 28°C. Las colonias crecidas fueron utilizadas para inocular 5 mL de medio líquido 523 con los antibióticos apropiados, y puestas a crecer por 24 horas en agitación a 220 rpm a 28°C. Luego, las bacterias fueron centrifugadas y suspendidas en 5 mL de medio AB-MES (K₂HPO₄ 2,99 g/L, NaH₂PO₄ 0,99 g/L, NH₄Cl 1 g/L, KCl 1,5 g/L, MgSO₄ 1,5g/L, CaCl₂ 0,14 g/L, FeSO₄ 0,28 g/L, glucosa 2 g/L, MES 10,66 g/L, pH 5.5), con acetosiringona 200 µM, durante 16 h a 22 rpm y 28 °C. Para el proceso de co-cultivación y transformación transitoria, plántulas de 4 días, previamente germinadas y crecidas en medio sólido MS (0,5X, 0,5% sacarosa), fueron sumergidas en medio ABM-MS líquido (AB-MES 0,5X, MS 0,25X y acetosiringona 200 µM) conteniendo las bacterias con una OD₆₀₀ inicial de 0,02. Luego de tres días, cada plántula fue transferida a medio MS (0,5X) líquido fresco conteniendo timentina 100 µM para un proceso de desinfección de dos días. Para la visualización microscópica, GFP y mCherry fueron excitados con láseres a 488- y 561-nm, respectivamente, en células corticales de la zona de transición y elongación de la raíz.

II.10 Tinción GUS de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Para evaluar el comportamiento del promotor pRaíz en condiciones de estrés salino y ABA, la actividad GUS fue analizada en plántulas de *A. thaliana pRaíz::GUS*. Previamente, estas plántulas fueron germinadas en medio sólido MS (0,5X) y crecidas en medio sólido por 5 días y transferidas a medio MS líquido (0,5X) con 0, 75 mM de NaCl o 25 µM de ABA (disuelto en DMSO) durante 24 h. Para establecer la actividad GUS, cada una de ellas fueron sumergidas en una solución que contenía 100 mM de fosfato de sodio pH 7.0, 10 mM de EDTA pH 8.0, 0,1% Tritón X-100, 0,5 mM beta-mercaptoetanol y 1 mg/ml de X-Gluc, por 4 h a 37 °C, luego tratadas durante 15 min con una solución de fijación que contenía: 7:7:2:4 de etanol absoluto:agua destilada:ácido acético glacial:formalina 37%, y posteriormente traspasadas a una solución 3:1 de metanol:acetona, cuyo objetivo era remover la clorofila y otros pigmentos que pudiesen impedir la formación del compuesto cromogénico azul producto de la actividad de la proteína GUS sobre el compuesto X-Gluc. Esta solución se reemplazó hasta la aparición de coloración azul.

II.11 Estimación de parámetros morfométricos.

Para establecer la tasa de crecimiento de las raíces se utilizaron plantas de *A. thaliana* sometidas a estrés salino y ABA como fue indicado en la sección II.2. En ambos casos, a cada planta se le midió el largo inicial, y después de 10 o 14 días, según corresponda, se midió el largo final. Todos los datos fueron obtenidos de 3 experimentos independientes con nueve plántulas cada uno, y los cálculos fueron realizados utilizando el método de Baral et al (2015a).

Para determinar el peso fresco de las plantas, fue estimado el peso del material vivo y verde. Luego de la aplicación del estrés salino *in-vitro*, 9 plantas de 14 días de edad para cada genotipo fueron seleccionadas desde tres ensayos independientes (Huang et al., 2019).

II.12 Estimación de la internación de FM4-64.

Plántulas de *A. thaliana* de 5 días de edad fueron teñidas durante 15 min con FM4-64 5 μ M (Thermo Fisher Scientifics, Massachusetts, USA) en un 1 mL de medio líquido MS (0,5X) con o sin NaCl 75 mM a 4°C. La visualización de las membranas y la internación del FM4-64 (excitación/emisión máxima 515/640-734 nm) en las células radiculares fue realizada en una cinética temporal que consideraba los tiempos 5, 15 y 30 min a temperatura ambiente.

Para la cuantificación de la internación de FM4-64, medida como la relación entre el promedio de la intensidad de los pixeles del lado intracelular de una célula y el promedio de la intensidad de los pixeles la membrana plasmática de la misma célula, se utilizó el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los promedios obtenidos de cada célula fueron considerados como un dato, y luego estos fueron promediados siguiendo la fórmula descrita por Baral et al. (2015a).

II.13 Tratamiento de Brefeldin-A en plantas de *Arabidopsis thaliana SchMON1*.

Para verificar que los cuerpos endosomales presentes en las células radiculares de las plántulas de *A. thaliana pRaiz::SchMON1* correspondían a endosomas tardíos, plántulas de 5

días de edad, previamente teñidas con FM4-64 según lo descrito en la sección II.10, fueron traspasadas e incubadas en Brefeldin-A (BFA, Sigma-Aldrich, Misuri, USA) 50 μ M por 30 min a temperatura ambiente en medio MS líquido (0,5X).

II.14 Cuantificación y localización del H₂O₂ y autofagosomas.

Para cuantificar el contenido de H₂O₂ y establecer su localización subcelular en células radiculares durante estrés salino, plántulas de *A. thaliana* de 5 días de edad fueron incubadas por 5 min con H₂DCFDA 10 μ M (excitación 492 nm, emisión 517 nm, Thermo Fisher Scientifics, Massachusetts, USA) luego de 1 h de estrés salino a 0 o 75 mM de NaCl, o co-incubadas junto a FM4-64 durante 5 min luego de 48 h de estrés salino con 0 o 75 mM de NaCl. Por otra parte, para determinar la actividad autofágica se evaluó la presencia de compartimentos ácidos en raíces plántulas de *A. thaliana* de 5 días de edad, incubadas con LysoTracker-green 2 μ M (excitación 504 nm, emisión 511 nm, Thermo Fisher Scientifics, Massachusetts, USA) en medio MS líquido (0,5X) con 0 o 75 mM de NaCl por un periodo de 1 h.

II.15 Detección del Na⁺ vacuolar.

Para detectar la presencia de Na⁺ vacuolar en células radiculares, plántulas de 5 días de edad fueron incubadas por un periodo de 24 h en medio MS líquido (0,5X) con 0 o 75 mM de NaCl, y luego transferidas a otro medio similar que incluía el indicador Sodium-green 5 μ M (excitación 507 nm y emisión 532 nm, Thermo Fisher Scientifics, Massachusetts, USA), y Pluronic F-127 20% p/v (Thermo Fisher Scientifics, Massachusetts, USA) por 1h.

II.16 Microscopía y estadística.

Para la detección de todas las proteínas fluorescentes, indicadores o marcadores subcelulares, se visualizaron células de la región de transición o elongación de las raíces de plántulas de *A. thaliana*, utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 700 con objetivo de inmersión 40X (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), y zoom digital según corresponda.

Para la cuantificación de los indicadores y marcadores se estimó la intensidad de cada pixel o pixeles utilizando el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Para la estadística, los experimentos en cada genotipo fueron repetidos 3 veces, y en cada uno de ellos se evaluaron aproximadamente 5-7 plántulas o entre 30 a 50 células. La significancia estadística fue establecida mediante ANOVA de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples HSD de Tukey ($p < 0.05$).

III. RESULTADOS

III.1 Análisis de secuencia de SchMON1 y SchCCZ1.

Usando el proteoma de *S. lycopersicum*, disponible en la base de datos de Sol-Genomics, se identificó una única proteína con alta homología a AtMON1 de *A. thaliana*, denominada SIMON1 (Solyc03g115810). De la misma manera, se identificó un único homólogo a AtCCZ1a y AtCCZ1b (AtCCZ1a/b), denominado SICZ1 (Solyc02g062110). Con la secuencia de cada gen, partidores específicos fueron diseñados para amplificar y clonar la región codificante de los homólogos presentes en la especie de tomate silvestre *S. chilense*. El CDS secuenciado de *SchMON1* tiene un largo de 1860 pb, codificando una proteína predicha de 620 aminoácidos, mientras que el CDS de *SchCCZ1* posee 1533 pb y codifica una proteína de 510 aminoácidos.

A partir del alineamiento múltiple de secuencia (**Figura 5**), dos características esenciales fueron abordadas con relación a ambas proteínas: i) los aminoácidos presentes en la plataforma de unión del complejo MON1/CCZ1, y ii) los aminoácidos asociados con la actividad GEF en cada una de ellas. Respecto de la primera característica, mediante el alineamiento múltiple entre SchMON1 y sus homólogas presentes en *A. thaliana*, *S. lycopersicum*, *N. tabacum* y *V. vinifera* (**Figura 5A**), se evidenció que su plataforma estaría constituida por los aminoácidos F217, N220 y el motivo “NLVRAG” presente en la sábana beta 2. Junto con lo anterior se observó que, entre las diferentes especies analizadas, tres de los ocho residuos que conforman la plataforma de unión presentaban sustituciones del tipo N228Q, V229I, R231K, cuyas características fisicoquímicas son análogas y sus tamaños relativamente similares. También, se evidenció que entre la secuencia de la plataforma de unión de SchMON1 y su homólogo AtMON1 hay una sustitución del tipo R231K. Por otra parte, en relación con los residuos asociados con la actividad GEF, se observó que la secuencia aminoacídica en todas las especies analizadas se mantiene totalmente conservada, y está constituida por G191, K192, T210 e I214.

Respecto del análisis de la secuencia proteica de SchCCZ1, se evidenció la conservación de todos los residuos asociados con ambas actividades analizadas anteriormente (**Figura 5B**). En el primer caso, los aminoácidos que constituirían la plataforma de unión a MON1 son S48, L52, F59, ubicados en la alfa-hélice 1, y el motivo “CEVIEAE” presente la

sábana beta 2. Mientras que los aminoácidos asociados con actividad GEF corresponderían a G51 y G55.

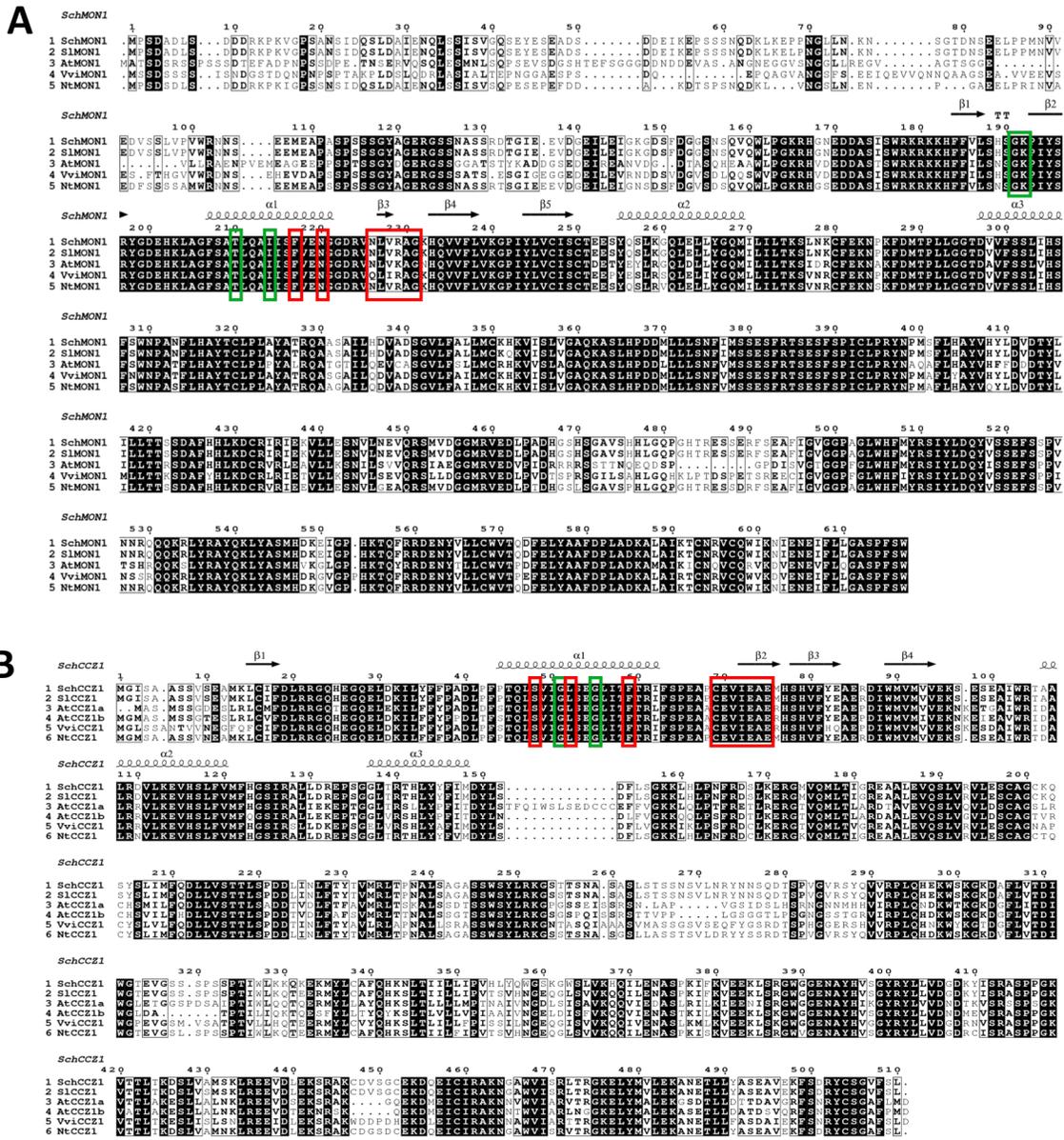


Figura 5. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida de SchMON1, SchCCZ1 y sus proteínas homólogas. Los residuos con 100% de identidad son destacados con fondo negro. Alineamiento múltiple con secuencias homólogas a SchMON1 (A) y SchCCZ1 (B). La estructura secundaria de SchMON1, como de SchCCZ1, fue obtenida del PDB 5LDD. Los residuos que conforman la plataforma de unión a MON1/CCZ1 están destacadas en rojo y aquellos que están asociados a la actividad GEF están destacados en verde. Código GenPept de secuencias alineadas: A.- SIMON1 (NP_001333813), AtMON1 (NP_029426), VviMON1 (XP_002285170), NtMON1 (XP_016438498); B.- SICCZ1 (XP_004233560), AtCCZ1a (NP_563989), AtCCZ1b (NP_849674), VviCCZ1 (XP_002285170) y NtCCZ1 (XP_016497747).

III.2 En *Solanum chilense*, la transcripción de *SchMON1* y *SchCCZ1* es regulada temporal y espacialmente por estrés salino.

Con el propósito de comprender el efecto que ejerce el estrés salino sobre el mecanismo de activación del tráfico vesicular pre-vacuolar en *S. chilense*, fue evaluado el patrón de expresión espacio-temporal de *SchMON1* y *SchCCZ1* mediante RT-qPCR. Los niveles de transcritos fueron cuantificados en hojas y raíces en una dinámica que incluyó tiempos tempranos (0, 3, 6 y 12 h) y tiempos tardíos (24, 48 y 72 h) de estrés salino 300 mM de NaCl, utilizándose como marcador de estrés el patrón de expresión de *SchAREB1* (Figura S1).

Los resultados evidenciaron que la expresión de *SchMON1* y *SchCCZ1* fue modulada tanto temporal como espacialmente durante el estrés salino respecto del tiempo inicial (Figura 6). En ese sentido, tanto en hojas como en raíces la regulación de ambos genes fue positiva y coordinada, evidenciándose una máxima inducción a tiempos tempranos, incrementada hasta 3 veces entre las 3 y 6 h luego de iniciado el estrés. Interesantemente, en ambos órganos la expresión de ambos genes se ve reducida luego de las 6 h, para alcanzar entre las 24 y 48 h niveles similares a las presentes al inicio el estrés salino. Estos antecedentes son claves para sugerir el rol de *SchMON1* y *SchCCZ1* en la activación del tráfico vesicular como posible mecanismo protector temprano frente al estrés salino en *S. chilense*.

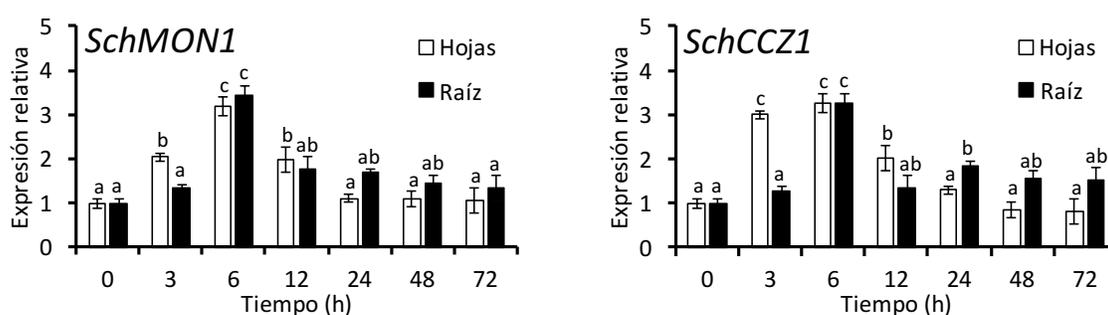


Figura 6. Evaluación de la expresión relativa de *SchMON1* y *SchCCZ1* en *S. chilense* sometida a estrés salino. Nivel de expresión relativa de *SchMON1* (A) y *SchCCZ1* (B) fue obtenida mediante RT-qPCR a partir de cADN sintetizado desde ARN extraído de hojas (barras blancas) y raíces (barras negras) colectadas a los tiempos 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h de iniciado el ensayo de estrés salino 300 mM de NaCl. Tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas fueron analizadas en cada tiempo y órgano. Los niveles de transcritos son relativos al tiempo 0 h en ambos casos. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples HSD de Tukey ($p < 0.05$).

III.3 Los genes *SchCCZ1* y *SchMON1* restauran el fenotipo de la mutante *ccz1a/b* y *mon1-1* de *Arabidopsis thaliana*, respectivamente.

Para demostrar que las proteínas SchMON1 y SchCCZ1 de *S. chilense* presentan un comportamiento funcional similar al de sus homólogos AtMON1 y AtCCZ1a/b de *A. thaliana*, respectivamente, ensayos de complementación génica de las mutantes de *A. thaliana mon1-1* y *ccz1a/b* fueron realizados. De acuerdo con lo observado en la **Figura 7**, la mutante *mon1-1* exhibe un fenotipo de desarrollo defectuoso severo tanto a nivel de raíz como tejido aéreo, el cual, se debería en parte a una reducida tasa endocítica e incapacidad de formar vesículas entre el LE y la vacuola (Ebine et al., 2014). La complementación constitutiva de *mon1-1* con *35S::SchMON1* fue capaz de restablecer el desarrollo normal de la raíz y el tejido aéreo de la mutante (**Figura 7A**), y recuperar la capacidad de internación del indicador FM4-64 a niveles equivalentes al de WT (**Figura 7B**). Lo anterior sugiere que la actividad GEF del complejo MON1/CCZ1 es conservada entre ambas especies, y que, por lo tanto, SchMON1 sería capaz de interactuar con AtCCZ1a/b, promoviendo la endocitosis y el tráfico vesicular en *A. thaliana*.

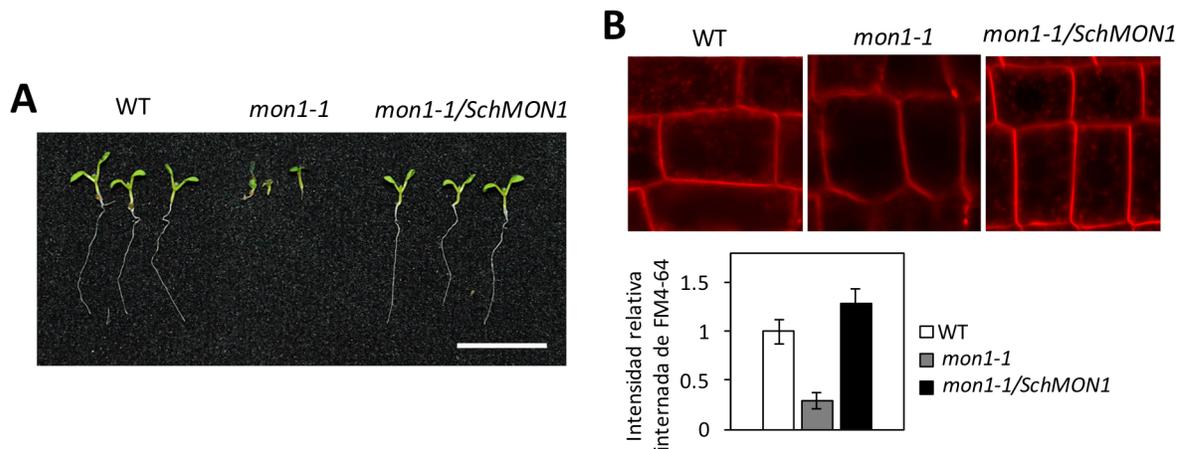


Figura 7. Efecto de la complementación de la mutante *mon1-1* de *A. thaliana* con el gen *SchMON1*. A. Fenotipos de plántulas de 5 días de edad de WT, mutante *mon1-1* y mutante *mon1-1* complementada con *35S::SchMON1*. Barra blanca = 0,5 cm B. Visualización y cuantificación de la tasa de internación relativa del indicador FM4-64 (en rojo) en células radiculares de los genotipos antes mencionados. 10 imágenes de 5 plántulas fueron analizadas para cada genotipo.

De manera equivalente, se evaluó la capacidad de *35S::SchCCZ1* para restituir el fenotipo de desarrollo defectuoso de la mutante *ccz1a/b* de *A. thaliana*. En este caso, como se observa en la **Figura 8**, el fenotipo de la mutante presenta un desarrollo defectuoso donde las plántulas son evidentemente más pequeñas que la WT (**Figura 8A**), lo cual puede ser asociado a la reducción de la tasa endocítica (**Figura 8B**). En este contexto, la expresión constitutiva de *SchCCZ1* sobre el genotipo de la mutante *ccz1a/b* sería suficiente para recuperar su fenotipo y restablecer la tasa endocítica de células radiculares, indicando que la función de *SchCCZ1* sería conservada. Adicionalmente, este resultado sugiere que *SchCCZ1* sería capaz de conformar el complejo GEF con *AtMON1* y, de esta manera, activar el tráfico vesicular mediado por *RabGTPasas* en *A. thaliana*.

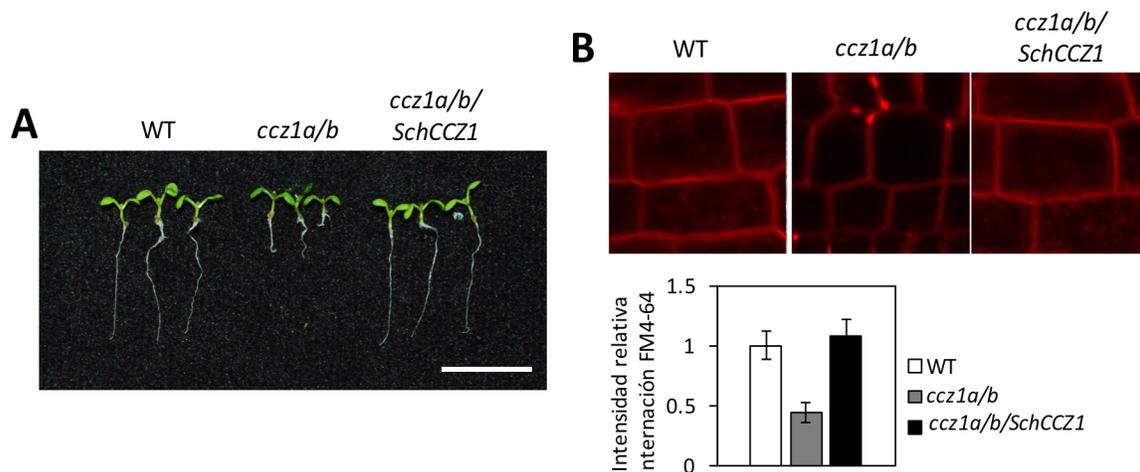


Figura 8. Efecto de la complementación de la mutante *ccz1a/b* de *A. thaliana* con el gen *SchCCZ1*. **A.** Fenotipos de plántulas de 5 días de edad de WT, mutante *ccz1a/b* y mutante *ccz1a/b* complementada con *35S::SchCCZ1*. Barra blanca = 0,5 cm **B.** Visualización y cuantificación de la tasa de internación relativa del indicador FM4-64 (en rojo) en células radiculares de los genotipos antes mencionados. 10 imágenes de 5 plántulas fueron analizadas para cada genotipo.

III.4 SchMON1 y SchCCZ1 se localizan en parte de la vía endocítica y de tráfico pre-vacuolar en células radiculares de *Arabidopsis thaliana*.

Considerando las evidencias asociadas con la localización subcelular y función de AtMON1 y AtCCZ1a/b de *A. thaliana* establecidas en endosomas tempranos y tardíos de la vía de tráfico pre-vacuolar (Cui et al., 2014), y las diferencias que SchMON1 y SchCCZ1 tendrían a nivel de secuencias aminoacídica respecto de sus homólogos, se decidió investigar y precisar la localización subcelular de estas últimas proteínas. Mediante la utilización de técnicas de microscopía confocal fueron co-localizados GFP-SchMON1 y GFP-SchCCZ1 con distintos marcadores subcelulares en células radiculares de *A. thaliana*. Cada uno de estos marcadores se encontraba asociado a un organelo y compartimento subcelular en particular, permitiendo identificar e inferir el tramo de la ruta de endocitosis y tráfico vesicular en la cual participa SchMON1 o SchCCZ1. Adicionalmente, se utilizó la localización GFP como control negativo (**Figura S2**).

Como se observa en la **Figura 9A**, GFP-SchMON1 no co-localizó con el marcador del complejo de Golgi, SYP32-mCherry, ni con el de tonoplasto, VAMP711-mCherry, en células radiculares de *A. thaliana*. No obstante, si lo hizo, aunque de manera parcial, con PIP1;4 en la membrana plasmática, VTI12-mCherry en la región TGN/EE, y, con mayor claridad, con RHA1-mCherry entre el EE/LE y RabG3F-mCherry en la vía LE/vacuola. Estos resultados confirman que GFP-SchMON1 localiza en la membrana plasmática, la TGN, el EE y el LE, sugiriendo fuertemente su potencial papel en parte importante de la vía endocítica y la vía de tráfico pre-vacuolar en este tipo de células.

Por su parte, como se observa en la **Figura 9B**, GFP-SchCCZ1 se ubicó en la mayoría de los sitios en los que también se ubicó GFP-SchMON1, ya sea en la región TGN, el EE y el LE, co-localizando con VTI12-mcherry, RHA1-mCherry y RabG3F-mCherry, respectivamente. Estos datos sugieren que SchCCZ1 podría ser capaz de interactuar con SchMON1 en estos organelos, de estar ambos co-expresados, y así ambos podrían activar proteínas RabGTPasa relacionadas principalmente con el tráfico vesicular pre-vacuolar de células radiculares de *A. thaliana*, como las familias RabF y RabG.

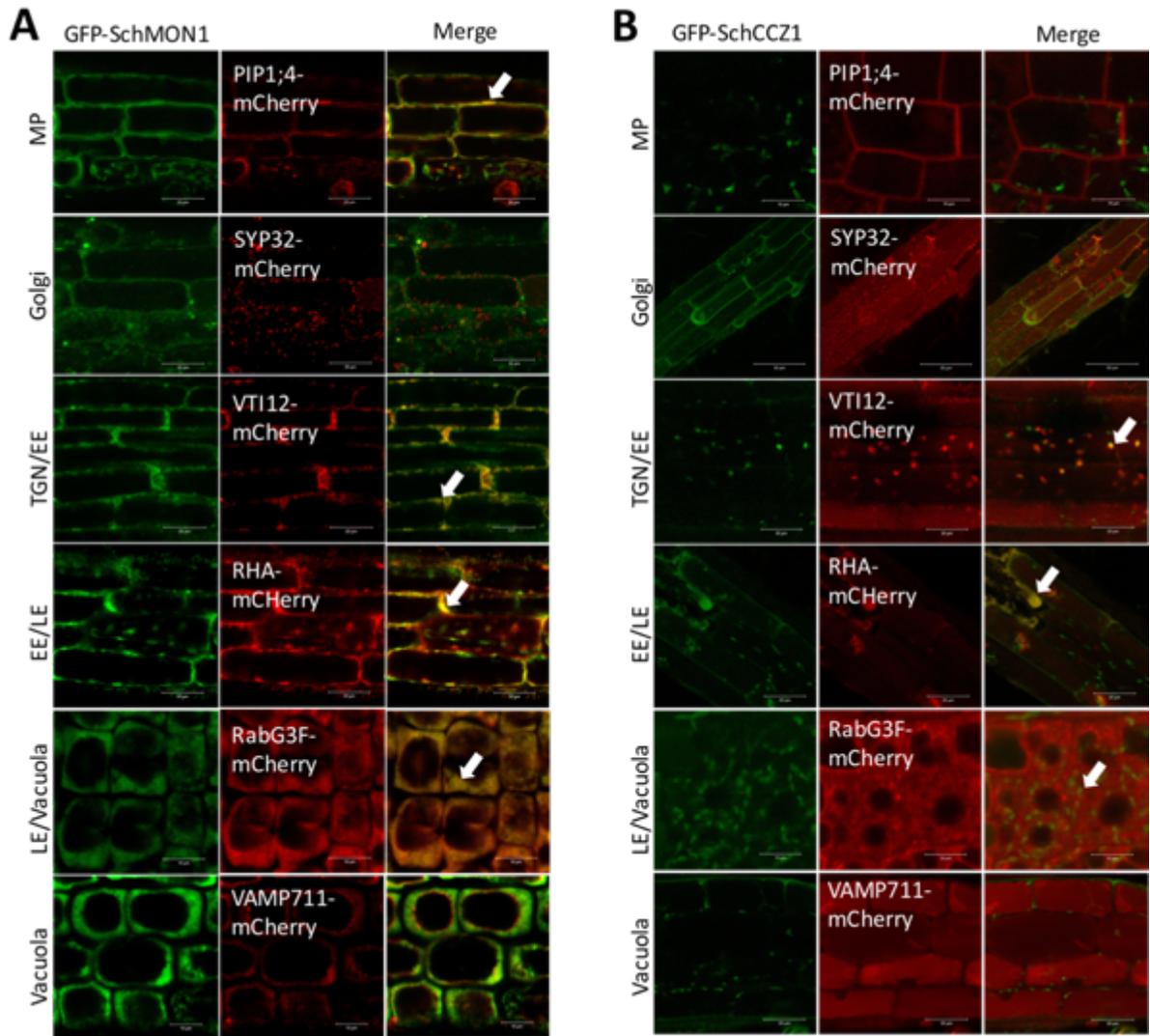


Figura 9. Localización subcelular de SchMON1 y SchCCZ1 en células radiculares de *A. thaliana*. En verde la localización de SchMON1 (**A**) y SchCCZ1 (**B**) fusionada a la Proteína Fluorescente Verde (GFP-SchMON1 y GFP-SchCCZ1) en células radiculares de *A. thaliana*. En rojo, localización de marcadores subcelulares: PIP1;4-mCherry, SYP32-mCherry, VTI12-mCherry, RHA-mCherry, RabG3F-mcherry y VAMP711-mcherry. La co-localización de GFP y mCherry es señalada y precisada con flechas blancas. MP: Membrana plasmática, TGN: Trans-Golgi, EE: Endosoma temprano, LE: Endosoma tardío.

III.5 Análisis del promotor específico de raíz de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de estrés salino y ABA.

Considerando que el objetivo de este trabajo de tesis es aumentar la capacidad de tolerancia a estrés salino de *A. thaliana* mediante el incremento de la capacidad de compartimentar Na^+ en sus vacuolas presentes en células radicular radicales, se optó por utilizar un promotor específico de raíz. De acuerdo con lo presentado por Vijaybhaskar et al. (2008), 418 pb del promotor del gen *UDP-glicosiltransferasa* (*UGT*, At1g73160), eran suficientes para mantener y dirigir, de manera específica, la expresión de genes en raíces de *A. thaliana* (*pRaíz*). Análisis transcriptómicos disponibles en bases de datos son congruentes con este comportamiento (**Figura S3**). No obstante, al no existir evidencias que demostraran el efecto que tendría la aplicación de estrés abiótico sobre su actividad, el comportamiento del promotor *pRaíz* fue evaluado de manera cuantitativa y cualitativa. Para esto, plántulas de *A. thaliana* transformadas con la construcción *pRaíz::GUS* fueron sometidas a condiciones de estrés 75 mM de NaCl o ABA 25 μM , determinándose en ellas el número de transcritos del gen *GUS* en hojas y raíces mediante RT-qPCR, y la actividad de β -Glucuronidasa mediante tinción histoquímica. Los resultados mostraron que, en condiciones control, las plantas presentaban un patrón de expresión y tinción GUS específico para raíces. Luego, bajo condiciones de estrés salino o ABA, la coloración azul de la reacción mediada por GUS mantuvo el patrón radicular, lo cual fue confirmado con los niveles de expresión del mismo gen (**Figura 10 y S4**). Esto confirmó que el promotor *pRaíz*, además de tener especificidad radicular durante condiciones normales, no presenta cambios en su comportamiento bajo ninguna de las condiciones aplicadas. Con todos estos antecedentes, el promotor *pRaíz* fue utilizado para conducir la expresión de genes *SchMON1* y *SchCCZ1* en los siguientes análisis.

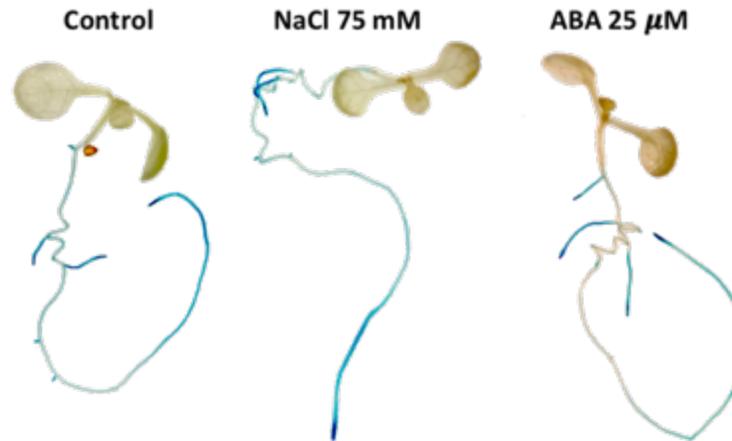


Figura 10. Caracterización de *Arabidopsis thaliana* que contiene la construcción *pRaíz::GUS*. Patrón de actividad de β -glucuronidasa en plántulas de 5 días de sometidas a MS (0,5X) suplementado con 0 (Control), 75 mM de NaCl ó 25 μ M de ABA por 24 h.

III.6 Plantas de *Arabidopsis thaliana*, que expresan y co-expresan *SchMON1* y *SchCCZ1*, toleran diferencialmente el estrés salino, afectando la expresión de genes de respuesta a estrés.

Considerando el potencial rol que posee el complejo SchMON1/SchCCZ1 para activar los mecanismos de regulación del tráfico pre-vacuolar en *S. chilense*, y su rápida y coordinada inducción transcripcional durante estrés salino en la especie de tomate silvestre tolerante a estrés salino, resultó de interés traspasar esta capacidad a plantas sensibles a estrés. En ese sentido, se optó por *A. thaliana* para evaluar los efectos morfológicos, celulares y moleculares, y los mecanismos de respuestas y tolerancia asociados a la expresión individual y en conjunto de *SchMON1* y *SchCCZ1* durante estrés salino. Para esto fueron generadas plantas transgénicas que expresaban y co-expresaban ambos genes en sus raíces de manera específica utilizando el promotor *pRaíz*. Al menos 5 líneas transgénicas homocigotas para cada gen fueron obtenidas a partir de 4 eventos de transformación independientes. En ellas, se evidenciaron distintos niveles de expresión radicular, seleccionándose tres líneas que presentaban niveles contrastantes de transcritos (**Figura S5**). Las líneas M9, M12 y M13 fueron seleccionadas del grupo de plantas que expresaban *SchMON1*, mientras C17, C18 y C19, fueron las elegidas de aquellas que expresaban *SchCCZ1*. La cruce de las líneas M13 y

C19 fue realizada considerando los más altos niveles de expresión, junto con el desempeño fenotípico frente a estrés salino, generándose la línea transgénica M13C19 que co-expresaba *SchMON1* y *SchCCZ1*.

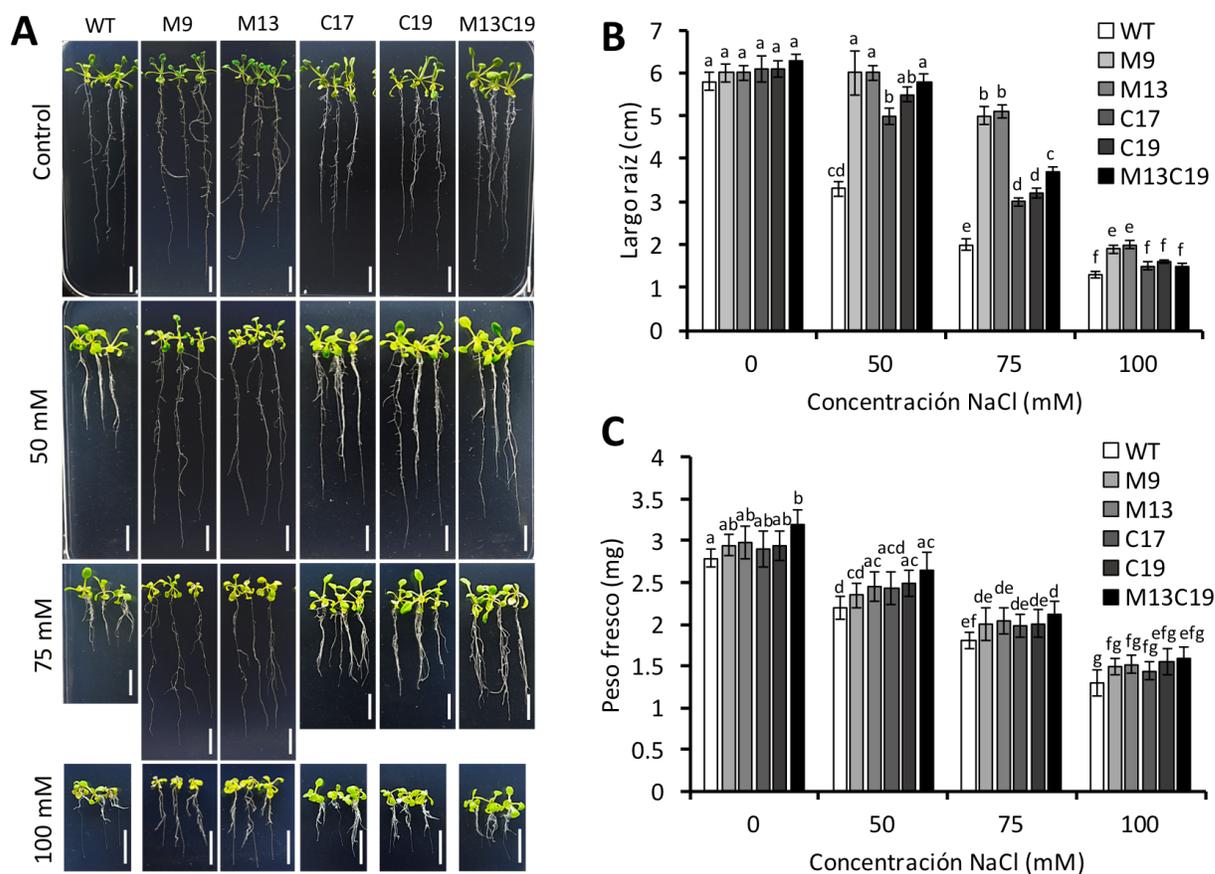


Figura 11. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de *SchMON1* y *SchCCZ1* sobre la tolerancia a estrés salino de *A. thaliana*. A. Fenotipo de líneas transgénicas homocigotas de 14 d de edad que expresan radicularmente *SchMON1* (líneas M9 y M13), *SchCCZ1* (líneas C17 y C19) y co-expresan ambos genes (M13C19), y que fueron previamente sometidas a condiciones de MS (0,5X) suplementado con 0 (Control), 50, 75 y 100 mM de NaCl durante 9 d. Plantas silvestres (WT) fueron utilizadas como control negativo. Barra blanca: 1 cm. B. Cuantificación del largo de raíz de las líneas de los genotipos sometidas a las condiciones analizadas en (A). n = 27. C. Evaluación del peso fresco de las líneas de los genotipos sometidas a las condiciones analizadas en (A). n=18. Letras distintas sobre cada barra indica diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples HSD de Tukey ($p < 0.05$).

Como se observa en la **Figura 11A-11B**, en condiciones de crecimiento normal, los distintos genotipos mostraron tener el igual largo de raíz; no obstante, se evidenció que el peso fresco de plantas M13C19 era mayor al de plantas WT (**Figura 11C**), tendencia que se mantuvo frente a los otros genotipos transgénicos durante el crecimiento en maceta (**Figura S6**). En condiciones de estrés salino, 50 mM de NaCl, el largo de raíz de WT se vio reducido en un 50% aproximadamente (**Figura 11B**), mientras que las raíces de los tres genotipos transgénicos mantuvieron un largo estadísticamente similar a lo observado en la condición normal, lo que evidenciaría una menor sensibilidad de ellos al estrés salino aplicado. Lo anterior fue confirmado en el estrés moderado, 75 mM de NaCl, particularmente con las líneas M9 y M13 (línea M12 no mostrada), que toleraron de mejor manera la aplicación del estrés. Les siguieron en esta capacidad el genotipo M13C19, luego las líneas C17 y C19 (línea C18 no mostrada), y finalmente WT. El análisis cuantitativo y estadístico reveló que las raíces de las plantas que expresaban *SchMONI* mostraron una reducción del largo de raíz del 20%, de las plantas *SchCCZI* y la doble transgénica entre un 40 a 50%, y de las plantas WT un 70 a 75%, aproximadamente. En este mismo sentido, a 100 mM de NaCl, las raíces de líneas transgénicas *SchMONI* también mantuvieron un largo significativamente mayor al de los otros genotipos, los cuales evidenciaron tener, entre ellos, el mismo largo. Interesantemente, durante estrés salino 50 mM y 75 mM, el peso fresco del genotipo M13C19 mostró ser superior que el de WT, no así con los genotipos transgénicos, entre los cuales no se presentaron diferencias significativas (**Figura 11C**). Esto indicó el efecto positivo que tendría la expresión radicular de genes asociados a mecanismos de activación de tráfico vesicular en la raíz, al permitirle a *A. thaliana* continuar con su desarrollo especialmente durante estrés salino.

Considerando que se evidenció una reducción diferencial del largo de raíz entre los distintos genotipos con 75 mM de NaCl, se realizó frente a este nivel de estrés salino la caracterización de la respuesta molecular y subcelular en los distintos genotipos. En primer lugar, se evaluó mediante RT-qPCR el patrón de expresión de los genes de respuesta a estrés abiótico *AtRD22*, *AtRD29A* y *AtRab18*, típicamente modulados por la vía de señalización de ABA (**Figura 12**). Como se observa en la Figura 12A, tanto en hojas como en raíces de los todos los genotipos, la expresión de *AtRD22* fue incrementada durante el estrés salino. No obstante, en raíces de los genotipos M9, M13, C17 y C19, la inducción es significativamente

menor a lo evidenciado por WT. Específicamente, el genotipo M13C19 presentó una menor inducción que WT, pero esta no fue significativamente distinta a ella, ni a la de los otros genotipos transgénicos. El patrón de expresión de *AtRD29A* evidenció ser similar al anterior. En hojas de los genotipos transgénicos, su expresión presentó una leve reducción, solo siendo significativamente menor en M13 y M13C19, mientras que, en raíces, los cinco genotipos transgénicos vieron reducida su expresión de manera homogénea en un 50%, aproximadamente. Diferencias más evidentes entre los genotipos transgénicos fueron observadas en el patrón de expresión de *AtRab18*. Solo en hojas de las líneas M9 y M13 se evidenció una reducción significativa de su expresión respecto de lo evidenciado en WT, mientras que en raíces de todos los genotipos transgénicos su expresión fue reprimida a niveles menores que la condición control sin estrés. Particularmente, los genotipos SchCCZ1 presentaron el menor número de transcritos, luego fue el genotipo M13C19, y finalmente los genotipos SchMON1, todos respecto de raíces de plantas WT. Esto sugirió que, SchMON1 y SchCCZ1, ya sea de manera individual o en conjunto, modularían la tolerancia a estrés salino en plantas de *A. thaliana*, afectando negativamente la respuesta molecular a la fitohormona ABA.

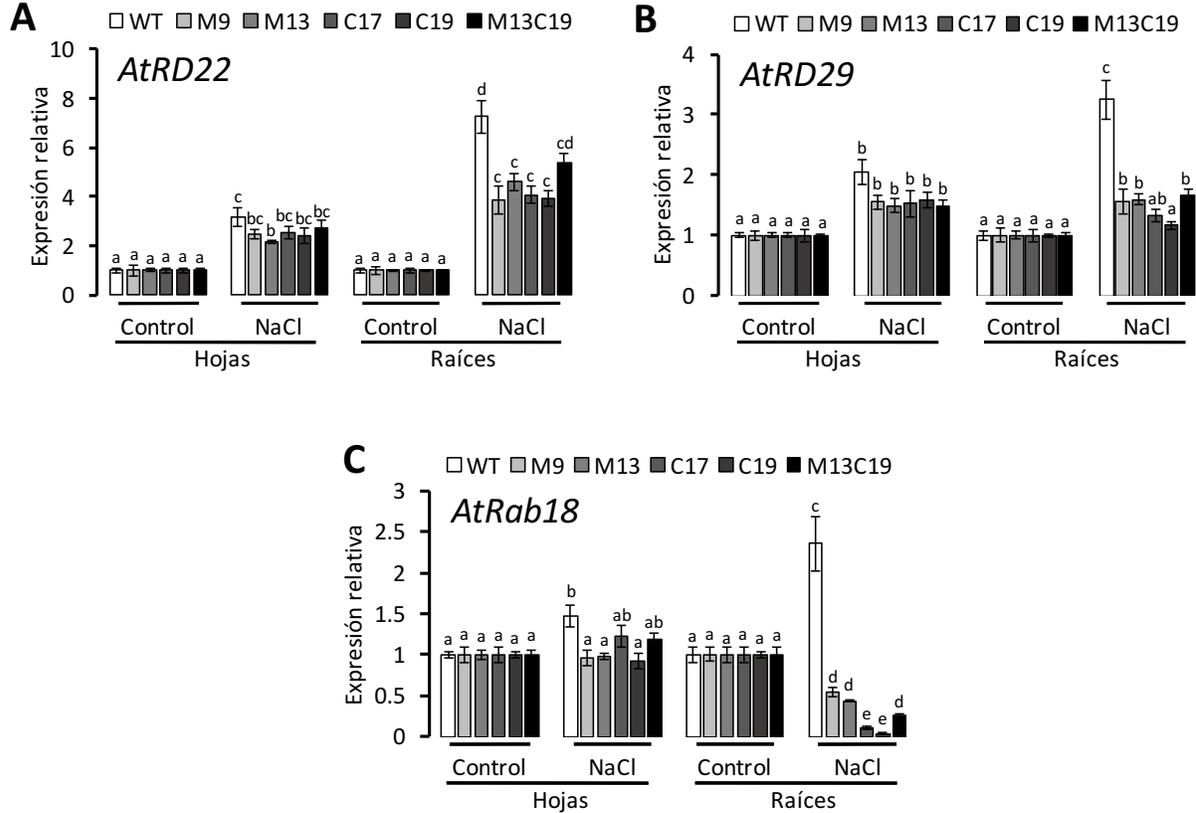


Figura 12. Perfil transcripcional de genes de respuesta a estrés en *A. thaliana* sometida a estrés salino. Perfil transcripcional de los genes *AtRD22* (A), *AtRD29A* (B), *AtRab18* (C), en hojas y raíces de líneas transgénicas homocigotas de 6 días de edad que expresan radicularmente *SchMON1* (líneas M9 y M13), *SchCCZ1* (líneas C17 y C19) y co-expresan ambos genes (M13C19), previamente sometidas a condiciones de MS (0,5X) suplementado con 0 (control) y 75 mM de NaCl por 24 h. n=27. Letras distintas sobre cada barra indica diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples HSD de Tukey ($p < 0.05$).

III.7 La expresión y co-expresión radicular de *SchMON1* y *SchCCZ1* afecta la respuesta fenotípica de *Arabidopsis thaliana* frente a ABA.

La endocitosis y el tráfico vesicular son mecanismos capaces de modular la percepción de ABA y la respuesta frente a estímulos ambientales (Belda-Palazón & Rodríguez, 2020). En ese sentido, se analizó el comportamiento de los genotipos transgénicos de *A. thaliana* frente a la aplicación de ABA exógeno, considerando el efecto observado en los patrones de expresión

de los genes de respuesta a estrés (**Figura 13**). Para evaluarlo, las líneas con mejor desempeño para cada genotipo frente a condiciones de estrés salino 75 mM fueron seleccionadas en condiciones *in-vitro* normales. Luego, a los 5 días de edad las plántulas fueron transplantadas a un medio suplementado con 25 μM de ABA hasta la edad de 10 días. Tal como se presenta en la **Figura 13A**, los tres genotipos transgénicos y el genotipo WT crecidos en condiciones normales no presentaron diferencias respecto de su largo de raíz. Luego, frente a la aplicación exógena de ABA, los tres genotipos evidenciaron tener un largo de raíz significativamente mayor que el de plantas WT, sugiriendo que todos presentaron una menor sensibilidad a la presencia de la hormona (**Figura 13B**). En ese sentido, lo anterior indicaría que el tráfico vesicular modulado por SchMON1 y/o SchCCZ1 favorece la tolerancia a estrés salino de los genotipos transgénicos de *A. thaliana*, al afectar negativamente la percepción de ABA.

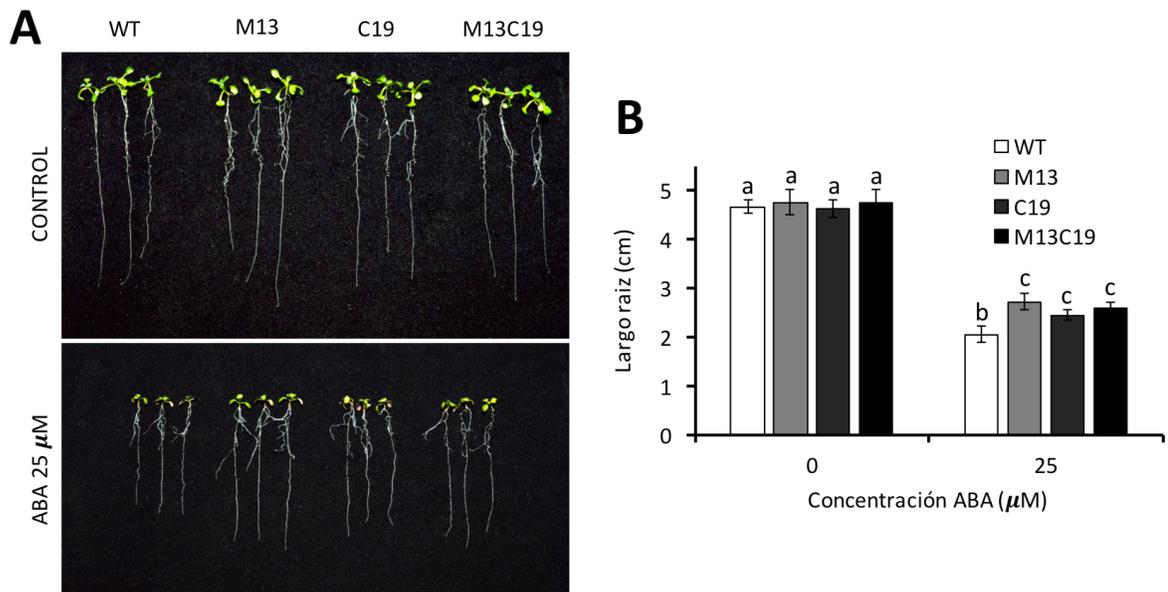


Figura 13. Fenotipo de plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan y co-expresan en sus raíces a *SchMON1* y *SchCCZ1* frente a la aplicación de ABA exógeno. A. Fenotipo de líneas transgénicas homocigotas de 10 d de edad postgerminación, que expresan radicularmente *SchMON1* (línea M13) *SchCCZ1* (líneas C19) y coexpresan ambos genes (M13C19), previamente sometidas a condiciones de MS (0,5X) suplementado con 0 (Control) o 25 μM de ABA en DMSO por 5 d. **B.** Cuantificación del largo de raíz de las líneas de los genotipos sometidas a las condiciones analizadas en (A). Letras distintas sobre cada barra indica diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples HSD de Tukey ($p < 0.05$).

III.8 La expresión y co-expresión radicular de *SchMON1* y *SchCCZ1* modifica la tasa de endocitosis de células radiculares de *Arabidopsis thaliana*.

La endocitosis es el proceso de internación de proteínas y lípidos de membrana plasmática, moléculas, partículas y fluidos, entre otros elementos extracelulares (Samaj et al., 2004). Para establecer el efecto de la expresión de *SchMON1* y *SchCCZ1* sobre ella se realizó una cinética temporal de la internación del indicador y trazador endocítico FM4-64 en células radiculares de *A. thaliana* durante condiciones normales de crecimiento. Como muestra la **Figura 14A-14B**, se evidenció un incremento significativo de la velocidad en la internación de FM4-64 en los tres genotipos transgénicos respecto de WT. A 5 min y 15 min, la tasa endocítica de las líneas transgénicas M13, C19 y M13C19 superaba al establecido en plantas WT (líneas M9 y C17 no presentadas). Mientras que, a los 30 min, la línea M13 mostró una tasa de internación del indicador superior a todos los otros genotipos, sugiriendo la presencia de una activa endocitosis en condiciones normales. Junto con esto, también se evidenció en el genotipo M13 la presencia de una población de estructuras endosomales de gran tamaño, no presentes en las células radiculares de los otros genotipos transgénicos (**Figura 14A**). Para verificar la naturaleza de estas estructuras, la vía de tráfico entre el EE y el LE fue bloqueada con Brefeldin-A (BFA), cuyo efecto provoca la agregación de compartimentos endosomales incluyendo TGN y EE en estructuras denominadas cuerpos BFA (Viotti et al., 2010). Sobre el genotipo M13, su presencia provocó el incremento del tamaño de los EE teñidos con FM4-64, formando los cuerpos BFA, de manera similar que en WT (**Figura 14D**), lo cual indicó que las estructuras de gran tamaño observadas en condiciones normales corresponden a LE.

Diversos trabajos han demostrado que el estrés salino acelera la endocitosis a tiempos tempranos, con el objetivo de incrementar la internación y recambio de proteínas y lípidos desde la membrana plasmática para mantener la homeostasis interna (Baral et al., 2015b; Golani et al., 2013). Para evidenciar este comportamiento, fue evaluada la endocitosis en plantas transgénicas calculando cinética de internación de FM4-64 en raíces de *A. thaliana* sometidas a estrés salino 75 mM de NaCl. Según lo presentado en la **Figura 14B**, la tasa de internación de FM4-64 en células radiculares de plántulas WT, 5 min después de iniciado el estrés salino, se vio incrementada un 30%, aproximadamente. No obstante, este aumento fue significativamente superado por los genotipos transgénicos, duplicándose en todos los casos

respecto del genotipo WT. Adicionalmente, entre los genotipos transgénicos, se evidenciaron diferencias, dado que el genotipo M13 presentó una tasa de internación superior al estimado para C19 y M13C19. Luego, con estos antecedentes, se estimó el aporte porcentual que la expresión de los transgenes y el estrés salino tienen sobre la actividad endocítica total (**Figura 14C**). Los resultados evidenciaron tres aspectos relevantes. Primero que la endocitosis total en las raíces de los genotipos transgénicos sería producto de la suma de los efectos de la expresión de los transgenes y la aplicación del estrés salino. En ese sentido, en células radiculares de plantas WT, la endocitosis fue acelerada en un ~73%, mientras que en el genotipo M13 el incremento fue el doble, superior al 150%. De la misma manera, en las células radiculares de plantas C19 y M13C19, los porcentajes de incremento de la tasa endocítica total superaron el 130% en estrés salino. Segundo, la endocitosis inducida por la co-expresión de los genes *SchMON1* y *SchCCZ1* en las raíces de M13C19 (~77%) fue similar a la suma de sus efectos individuales (~45% en M13 y ~36% en C19). Y tercero, la endocitosis inducida por estrés salino se vio incrementada en los genotipos M13 y C19 (~108% y ~97%, respectivamente), mientras que en el genotipo M13C19 sólo alcanzó un 61,2%, alcanzando una inducción total del ~240%, y sugiriendo que la endocitosis tendría una cota máxima de inducción, cercano al 70% por sobre el valor evidenciado para plantas WT.

Con el objetivo de comprender la razón del comportamiento acelerado del tráfico vesicular en condiciones normales producto del efecto de la expresión de los transgenes, la respuesta transcripcional de los genes GEF endógenos de *A. thaliana* que participan de los mecanismos de tráfico vesicular: *AtMON1*, *AtCCZ1a* y *AtCCZ1b* y de la RabGTPasa *AtRabG3f* fue analizado mediante RT-qPCR (**Figura 15**). Al respecto, se evidenció un efecto positivo sobre la expresión de los genes endógenos. En raíces de plantas M13, la expresión de *AtCCZ1a*, *AtCC1b* y *AtRabG3f* fue inducida significativamente; por su parte, en C19, se observó un incremento de la expresión de todos los genes analizados; y en plantas M13C19 se vieron inducidos *AtMON1*, *AtCCZ1b* y *AtRabG3f*. Todo lo anterior sugiere que, en las raíces de plantas transgénicas, la aceleración de la endocitosis en condiciones normales sería producto de la expresión de los transgenes y a cambios positivos en la expresión de genes involucrados en el tráfico de vesículas.

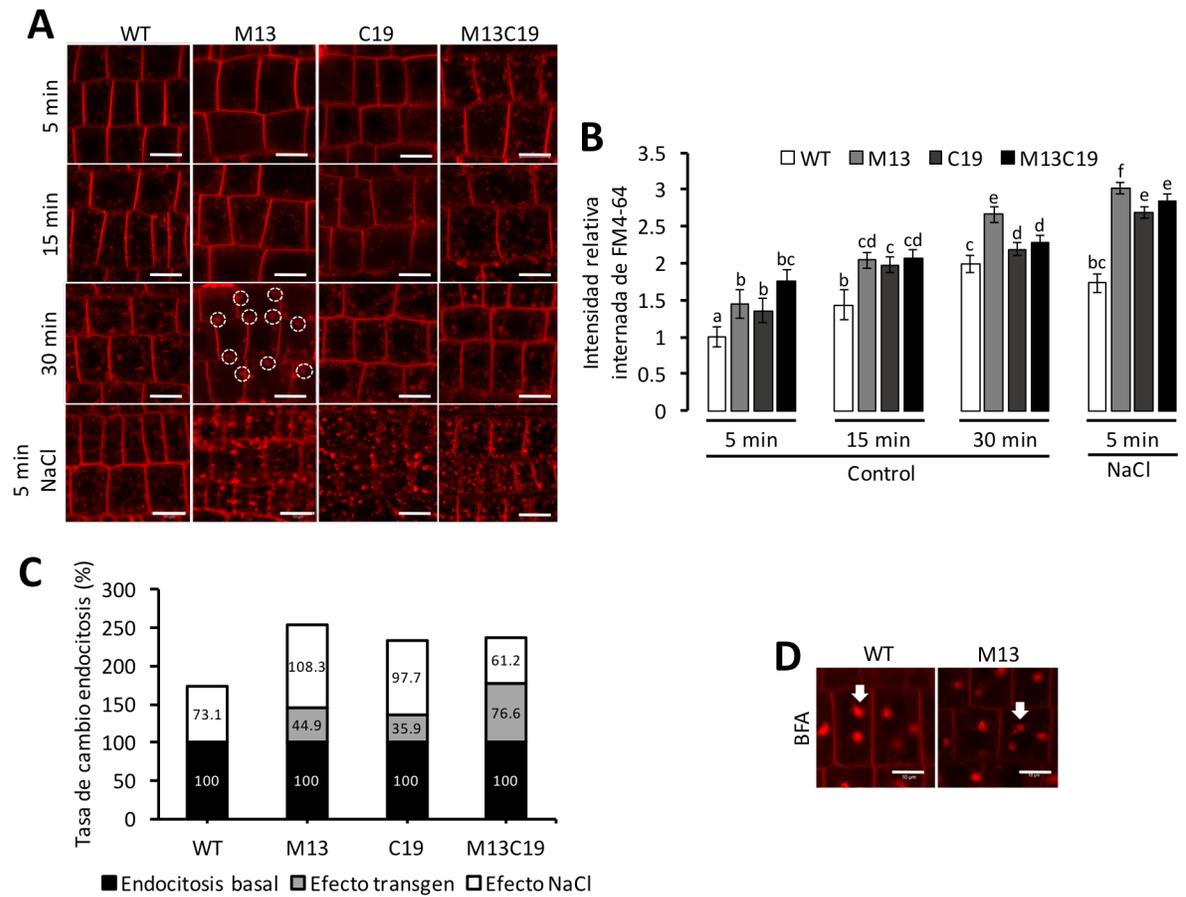


Figura 14. Efecto de la expresión y co-expresión de *SchMON1* y *SchCCZ1* en la dinámica endocítica de FM4-64 en *A. thaliana*. **A.** Imágenes de dinámica de internación de FM4-64 (rojo) en raíces de líneas silvestre (WT) y transgénicas (M13, C19, M13C19) sometidas a condiciones de MS (0,5X) suplementado con 0 (control) y 75 mM de NaCl durante los 5, 15 y 30 min. Círculos blancos punteados encierran estructuras endosomales **B.** Cuantificación de la tasa de internación de FM4-64 en los genotipos y tiempos analizados. 20 imágenes de 5 plántulas fueron analizadas para cada genotipo en cada tiempo. Letras distintas sobre cada barra indica diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples HSD de Tukey ($p < 0.05$). **C.** Tasa de cambio de la endocitosis en condiciones de estrés salino. **D.** Co-tratamiento de Brefeldin-A y FM4-64. flechas blancas señalan cuerpos BFA. Barras blancas: 10 μ m.

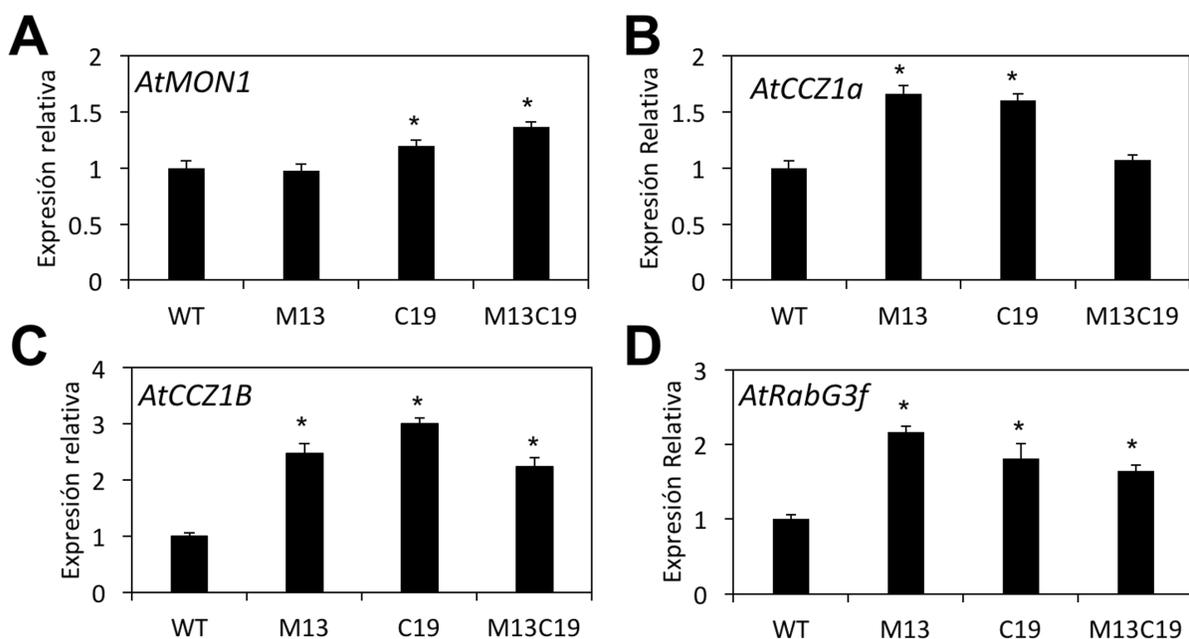


Figura 15. Perfil transcripcional de genes asociados a los mecanismos de tráfico vesicular en raíces de plantas transgénicas de *A. thaliana* en condiciones de MS (0,5X). Análisis de RT-qPCR de los genes *AtMON1* (A), *AtCCZ1a* (B), *AtCCZ1b* (C) y *AtRabG3f* (D), en raíces de las líneas WT y transgénicas de 6 días de edad en condiciones de MS (0,5X). n=27. Asteriscos sobre cada barra indica diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

De la misma forma, fue evaluado el patrón de expresión de los genes analizados anteriormente, tanto en hojas y raíces de plantas sometidas a estrés salino (75 mM de NaCl), esto para determinar relaciones entre de la expresión de los transgenes y la aceleración de la endocitosis inducida por estrés (**Figura 16**). Para el caso de *AtMON1* (**Figura 16A**), no se observaron cambios significativos en su expresión durante el estrés salino, ya sea en hojas o raíces de plantas WT o transgénicas. Esto sugiere que *AtMON1* no se relacionaría con la inducción de la endocitosis en estrés salino en ninguno de los casos. Por su parte, el análisis del perfil transcripcional de las dos isoformas de *AtCCZ1*, *AtCCZ1a* y *AtCCZ1b*, en plantas *A. thaliana* WT reveló que la respuesta a estrés salino de ambos genes era diferente (**Figura 16B-16C**). En hojas de todos los genotipos, se observó que *AtCCZ1a* no respondió a estrés salino, mientras que *AtCCZ1b* incrementó su expresión 1,5 veces. Por su parte, en raíces WT, *AtCCZ1a* fue reprimida, y su homóloga se mantuvo inducida. En el caso de los genotipos transgénicos, se observó un incremento de la expresión de *AtCCZ1a* en raíces, no así de *AtCCZ1b*, revelándose una relación positiva entre la inducción de *AtCCZ1a* y el incremento de

la tasa endocítica en raíces de los genotipos transgénicos durante condiciones estresantes. Luego, para aportar más información, fue evaluado el patrón de expresión de *AtRabG3f* (Figura 16D). Este evidenció una fuerte inducción en hojas y raíces de plantas WT sometidas a estrés salino. No obstante, en hojas de plantas transgénicas la inducción de la expresión de *AtRabG3f* fue menor, sugiriendo que, probablemente, la percepción del estrés en el tejido aéreo podría estar disminuida. Por el contrario, en raíces de los tres genotipos transgénicos, la inducción de *AtRabG3f* fue significativamente superior, lo cual se asociaría efectivamente con el notable aumento de la internación de FM4-64 en células radiculares de este genotipo sometido a estrés salino. Todos estos antecedentes sugieren una relación positiva entre la expresión de los transgenes, la expresión de los genes *AtCCZ1a* y *AtRabG3e*, y el incremento en la inducida endocitosis producto del estrés salino en las plantas transgénicas.

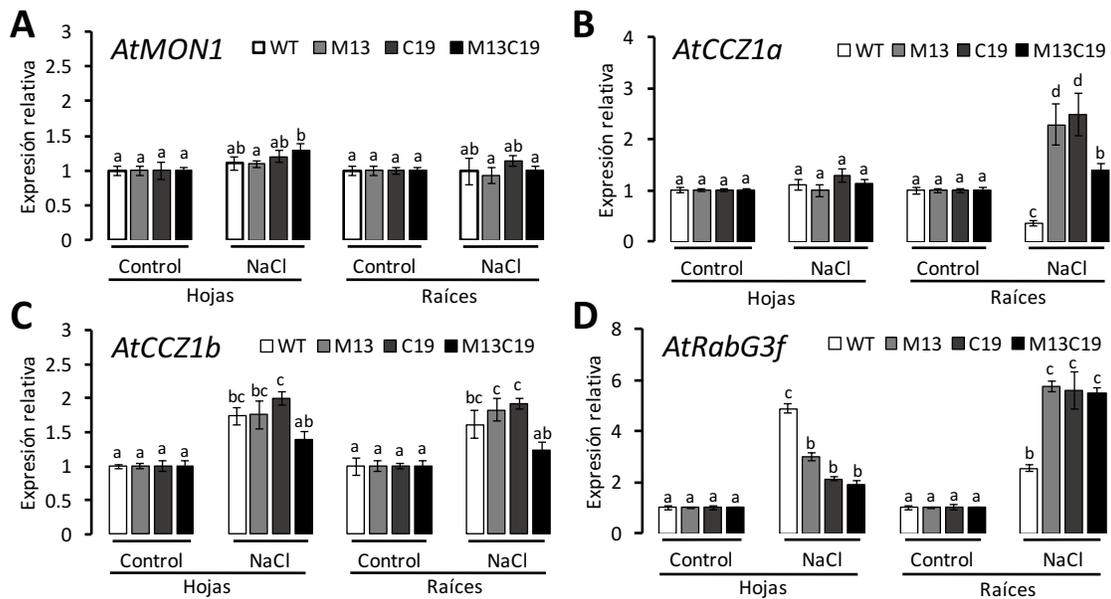


Figura 16. Perfil transcripcional de genes asociados a los mecanismos de tráfico vesicular en *A. thaliana* sometida a estrés salino. Análisis de RT-qPCR de los genes *AtMON1* (A), *AtCCZ1a* (B), *AtCCZ1b* (C) y *AtRabG3f* (D), en hojas y raíces de las líneas WT y transgénicas de 6 días de edad sometidas previamente a condiciones de MS (0,5X) suplementado con 0 (control) y 75 mM de NaCl durante 24 h. n=27. Letras distintas sobre cada barra indica diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples HSD de Tukey ($p < 0.05$).

III.9 La expresión y co-expresión de *SchMON1* y *SchCCZ1* en raíces de *Arabidopsis thaliana* promovería cambios en el contenido y localización subcelular de H₂O₂ durante estrés salino.

Para determinar si el incremento de la tasa endocítica en las células radiculares de los genotipos transgénicos involucra cambios en el contenido de ROS generado por el estrés salino, se realizó un ensayo de cuantificación y localización de H₂O₂ a nivel subcelular (**Figura 17**). El co-tratamiento con 75 mM NaCl y 2',7'-diclorodihidrofluorescina-diacetato (H₂DCFDA), el cual es sensible a H₂O₂, produciendo un compuesto fluorescente denominado 2',7'-dichlorofluoresceína (DCF), evidenció el incremento de la producción de H₂O₂ durante estrés salino en plantas WT (**Figura 17A**). No obstante, en las líneas transgénicas, la intensidad de la fluorescencia de DCF fue aproximadamente un 30% menos al determinado en plantas silvestres, sugiriendo que el contenido de H₂O₂ en las raíces de las líneas M13, C19 y M13C19 fue significativamente menor durante estrés salino que el evidenciado en raíces de plantas WT (**Figura 17B**).

A tiempos tempranos de estrés salino, la producción de ROS en la PM es, en parte, internado vía endocitosis, movilizado en vesículas y compartimentado en la vacuola. A tiempos avanzados, el Na⁺ alcanza a las mitocondrias, convirtiéndola en una fuente importante de ROS y en una señal de la severidad del estrés (Jacoby et al, 2011). En ese contexto, se analizó con precisión la vinculación entre la localización subcelular del H₂O₂ y el tráfico vesicular a tiempos tardíos del estrés salino, mediante la colocación de FM4-64 y DCF (**Figura 18**). Luego de 48 h de estrés, en plantas silvestres, el indicador DFC no co-localizó con FM4-64, sugiriendo que el H₂O₂ no está siendo compartimentado en estructuras asociadas a tráfico endocítico. Interesantemente, en raíces del genotipo M13, se evidenció ampliamente la colocación de los indicadores FM4-64 y DCF (en amarillo), tanto en vacuolas como endosomas. No obstante, en el caso de células radiculares de los genotipos C13 y M13C19 la localización de DCF en vacuolas no fue tan evidente como en el genotipo anterior, aunque fueron observados en menor medida endosomas y vacuolas acumulando ROS. Todo lo anterior indicaría que los efectos del estrés salino sobre los genotipos transgénicos se han visto retrasados o reemplazado por la compartimentación del H₂O₂, lo cual se asociaría

positivamente con el incremento de la tasa endocítica y la tolerancia de los genotipos transgénicos.

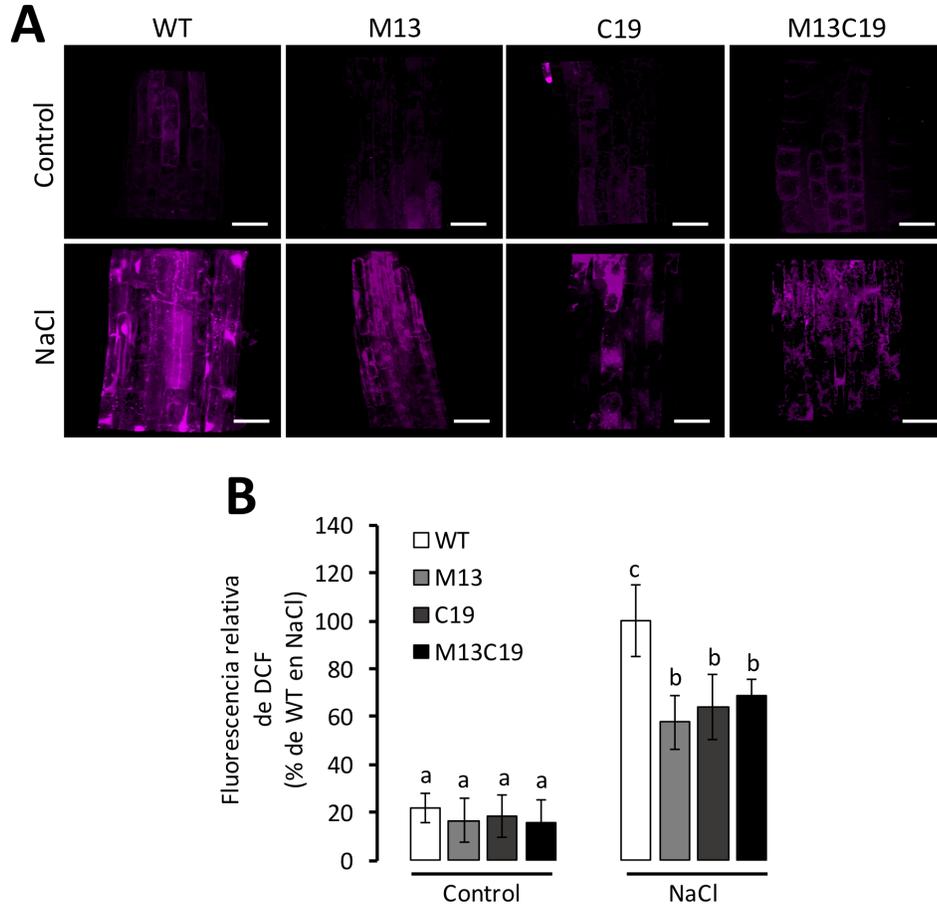


Figura 17. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de *SchMON1* y *SchCCZ1* en el contenido de H_2O_2 de *A. thaliana* durante estrés salino. A. Representación de la presencia de H_2O_2 mediante visualización de la fluorescencia del indicador DCF (en fucsia) en plantas silvestres (WT) y líneas transgénicas M13, C19 y M13C19 sometidas a condiciones de MS (0,5X) suplementado con 0 (control) o 75 mM de NaCl. Barra blanca: 20 μ m. **B.** Cuantificación de la intensidad relativa del indicador DCF en los genotipos y condiciones antes señaladas. Imágenes de 5 plántulas fueron analizadas para cada genotipo en tres ensayos independientes. Letras distintas sobre cada barra indica diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples HSD de Tukey ($p < 0.05$).

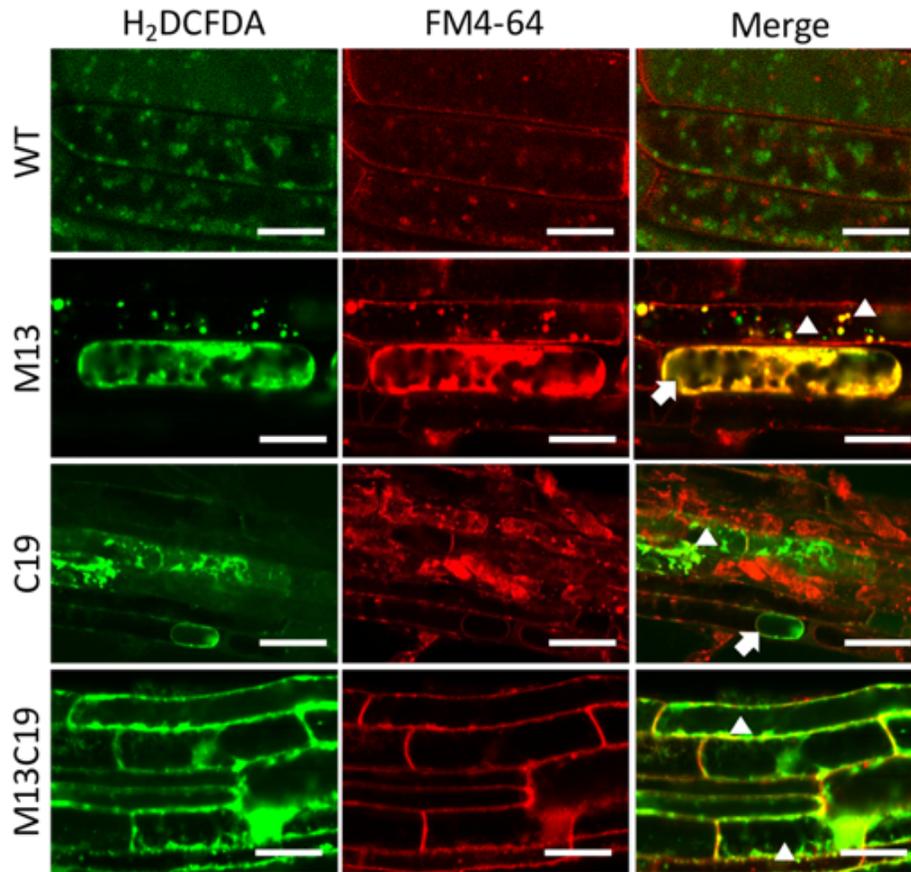


Figura 18. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de *SchMON1* y *SchCCZ1* en la localización de H_2O_2 de *A. thaliana* durante estrés salino. Co-localización de la fluorescencia del indicador DCF (verde) y FM4-64 (rojo) para demarcar las membranas celulares en células radiculares de la línea WT y líneas transgénicas sometidas a estrés salino 75 mM de NaCl. Flecha blanca indica vacuola y triángulos blancos señalan endosomas. Barra blanca: 20 μ m.

Para obtener mayor información acerca de las razones de la reducción del contenido de H_2O_2 en los genotipos transgénicos, el patrón de expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo durante estrés salino fue analizado. Mediante RT-qPCR fueron analizados los perfiles de transcritos de los genes del sistema de detoxificación enzimático: *AtSOD*, *AtAPXS*, *AtCAT1* y *AtCAT3*; y de genes de la ruta de flavonoides: *AtCHS*, *AtFLS*, *AtLDOX* y *AtTT12* (**Figura 19**).

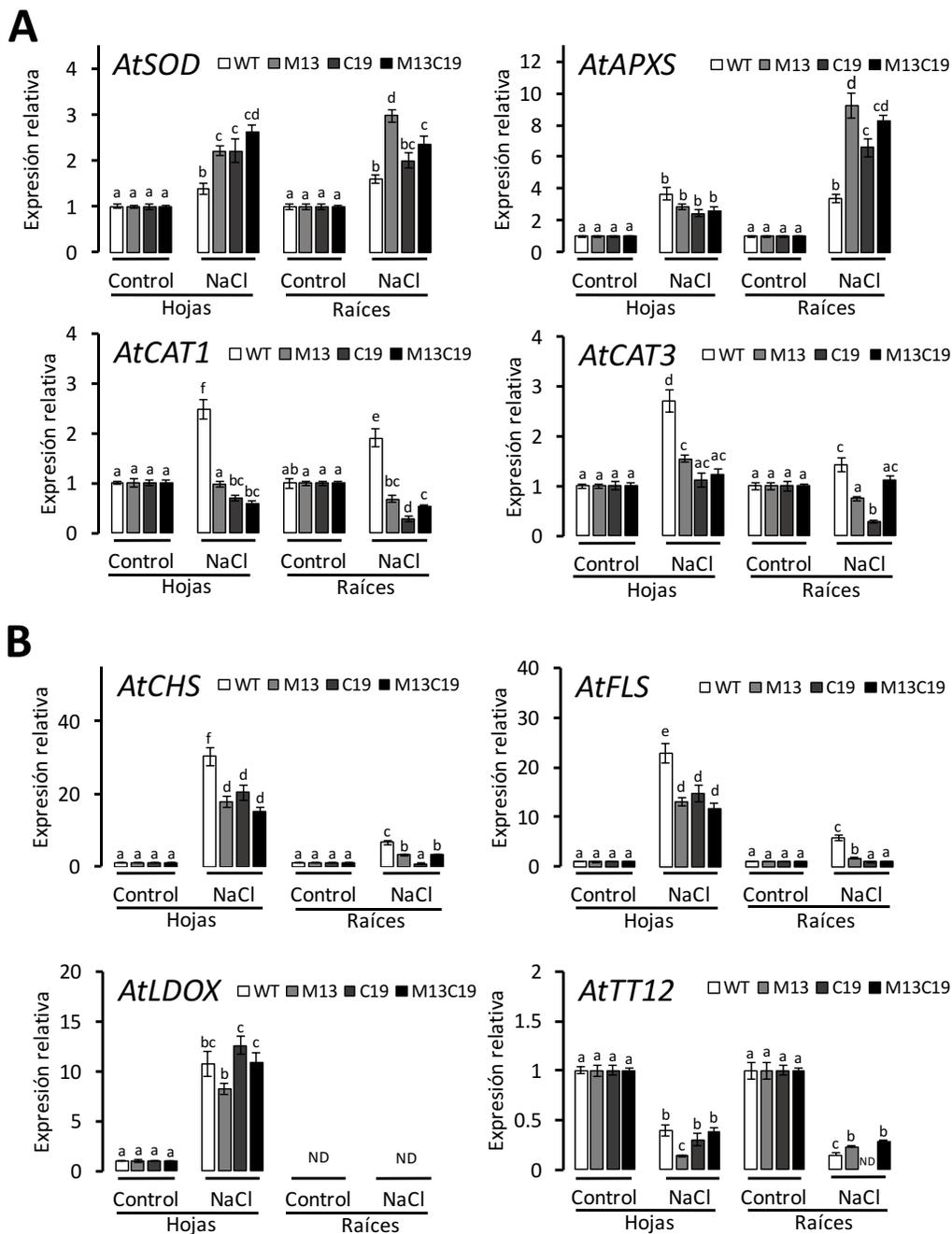


Figura 19. Perfil transcripcional de genes asociados a los mecanismos de detoxificación de ROS en *A. thaliana* sometida a estrés salino. Análisis de RT-qPCR de genes involucrados en mecanismos de detoxificación enzimática (A) y no enzimática basada en flavonoides (B) en hojas y raíces de las líneas WT y transgénicas sometidas a condiciones de MS (0,5X) suplementado con 0 (control) y 75 mM de NaCl. Letras distintas sobre cada barra indica diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples HSD de Tukey ($p < 0.05$).

Tanto en hojas como en raíces de plantas WT sometidas a condiciones de 75 mM de NaCl, se evidenció que *AtSOD*, cuyo producto codifica una superóxido-dismutasa, incrementó su expresión relativa 1,5 veces respecto de la condición control (**Figura 19A**). No obstante, en los genotipos transgénicos, la inducción por estrés salino en ambos órganos fue significativamente superior al de WT. En hojas de la línea M13 y M13C19, la expresión relativa de *AtSOD* se incrementó hasta 2,5 veces, mientras que en raíces su expresión relativa se triplicó en comparación a la condición control. Al mismo tiempo, se observó una relación positiva con el incremento de la expresión del gen *AtAPXS* en los genotipos transgénicos, una ascorbato-peroxidasa encargada de la reducción del H₂O₂ en H₂O en mitocondria y plastidios (Cheng et al., 2020, Filiz et al., 2018). En hojas y raíces de plantas WT, se evidenció que el estrés salino no indujo la expresión de *AtAPXS*. Sin embargo, en hojas y raíces de los genotipos transgénicos sometidos a estrés su expresión se vio incrementada entre tres y hasta nueve veces, respectivamente, en especial en el genotipo M13 cuya diferencia fue significativamente mayor. Por lo tanto, en general, la inducción de la expresión de *AtSOD* y *AtAPXS* en raíces del genotipo M13 respecto de C19, se relacionaría con la mayor capacidad de tolerancia del primero.

De una manera opuesta a lo observado con *AtSOD* y *AtAPXS*, la expresión relativa de *AtCAT1* y *AtCAT3* se vio reducida en los tres genotipos transgénicos, respecto de WT. *AtCAT1* codifica para una catalasa peroxisomal con presencia en el citoplasma, mientras que *AtCAT3* codifica para una isoforma con localización en MP y mitocondrias. Los resultados evidenciaron que, tanto en hojas como en raíces de plantas WT, ambos genes fueron inducidos de manera significativa por estrés salino, duplicando su expresión relativa, y sugiriendo su participación como mecanismo de respuesta a estrés salino en estas plantas (**Figura 19A**). No obstante, sólo en hojas del genotipo M13 hubo una leve pero significativa inducción de *AtCAT3* respecto de WT. En los demás órganos y genotipos ambos genes no fueron inducidos o evidenciaron ser reprimidos. Lo anterior indicaría que, en estos genotipos, el mecanismo de protección mediado por catalasas no estaría relacionado con la disminución del H₂O₂.

La síntesis de flavonoides mediada por estrés es un mecanismo de protección no enzimático que permite reducir la cantidad de compuestos que generan toxicidad en la célula. Esta síntesis es órgano dependiente, ya que en hojas la producción está centrada en la síntesis de antocianinas, mientras que en raíces es la de flavonoles (Chen et al., 2019). En ese

contexto, para asociar la reducción del contenido de H₂O₂ en los genotipos transgénicos con la modulación en la expresión de los genes estructurales de la ruta de flavonoides, fue evaluado los perfiles de transcritos de los siguientes genes: *chalcona sintasa* (*AtCHS*), *flavonol sintasa* (*AtFLS*), *leucocianidin dioxigenasa* (*AtLDOX*) y un *transportador de flavonoides del tipo MATE en tonoplasto* TT12 (*AtTT12*). Los análisis evidenciaron que, en hojas y raíces de los distintos genotipos transgénicos, la expresión de *AtCHS* y *AtFLS* fue inducida en menor grado que en plantas WT, producto del estrés salino 75 mM de NaCl (**Figura 19B**). No obstante, en hojas de la línea C19 se evidenció que *AtCHS* fue inducida en forma superior y significativa respecto de lo estimado en los otros dos genotipos transgénicos, sugiriendo que la síntesis de antocianinas debiese estar más activada en hojas de este genotipo, lo cual se asociaría con su mayor sensibilidad al estrés salino.

Para verificar lo anterior, fue evaluada la expresión de *AtLDOX*. El análisis de su expresión evidenció que, en hojas de la línea C19, se mantiene la inducción de este gen a niveles similares al de su par en plantas WT. Considerando que en raíces la producción de flavonoides está restringida a la síntesis de flavonoles, y que en hojas se encuentra compartida junto a la de antocianinas, fue evaluado el comportamiento transcripcional del gen *AtTT12*. *AtTT12* mostró ser reprimido durante estrés salino en hojas y raíces de todas las líneas, sugiriendo que los flavonoides sintetizados no estarían siendo compartimentados en la vacuola por esta vía, sino que probablemente podrían estar en mayor disponibilidad en el citoplasma para ejercer su efecto protector. Todo lo anterior apunta a que la expresión de estos genes asociados a los mecanismos de producción y transporte de flavonoides podrían estar actuando como un indicador del estrés salino a nivel radicular y aéreo en los distintos genotipos analizados.

III.10 La expresión y co-expresión *SchMON1* y *SchCCZ1* en raíces de *Arabidopsis thaliana* modifica la actividad autofágica y la capacidad de acumulación de Na⁺ vacuolar durante estrés salino.

Reportes previos han mostrado que la relación entre la tolerancia a estrés salino y el incremento del número de organelos acidificados, estaría asociada con una mayor capacidad de compartimentación vacuolar de Na⁺ (Baral et al., 2015b). Para verificar y analizar esta relación, primero asociada con la acidificación, se realizó tinción de las raíces de los genotipos transgénicos y WT con LysoTracker-green, una sonda acidotrópica que permite visualizar organelos ácidos cuyo origen son producto de la actividad autofágica (**Figura 20A**). El análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal reveló que, en células corticales de la zona de transición de raíces WT sometidas a estrés salino 75 mM de NaCl, el número de estructuras punteadas fue incrementada aproximadamente hasta en cinco veces respecto de la condición control (**Figura 20B**). No obstante, las raíces de plantas M13 y M13C19 sometidas a estrés salino superaron de manera significativa la cantidad de estructuras presentes en plantas WT, aunque raíces de plantas C19 se comportaron de una manera intermedia. Esto indica que los genotipos transgénicos tienen un mayor número de compartimentos ácidos producto de la mayor actividad autofágica, y sugiere que ellos tendrían una mayor capacidad para compartimentar Na⁺ en sus vacuolas. Para demostrarlo, plántulas de los distintos genotipos fueron sometidas a estrés salino 75 mM de NaCl e incubadas junto a Sodium-GreenTM, un indicador permeable y excitable a luz visible que permite monitorear variaciones de los niveles de Na⁺ intracelular. En ese sentido, en las raíces de *A. thaliana* WT, el Na⁺ se acumuló en células corticales de la región de transición, sino más bien lo hizo en células epidérmicas (**Figura 21A**). Por el contrario, en los genotipos transgénicos, la fluorescencia de Sodium-Green reveló que el Na⁺ fue compartimentado en vacuolas de células tanto epidérmicas como corticales. La cuantificación de la fluorescencia del indicador en estas últimas células confirmó que las diferencias observadas entre plantas WT y las transgénicas eran significativas (**Figura 21B**). Igualmente, la fluorescencia cuantificada entre los genotipos transgénicos también presentó diferencias. El genotipo M13 evidenció mayor fluorescencia respecto de lo cuantificado en C19 y M13C19, sugiriendo que este genotipo tendría la mayor capacidad para compartimentar Na⁺ en sus vacuolas. De esta manera, la expresión radicular de

SchMON1 y/o *SchCCZ1*, estaría favoreciendo la acumulación de Na^+ en células radicuales de *A. thaliana*, cuya capacidad era evidentemente reducida.

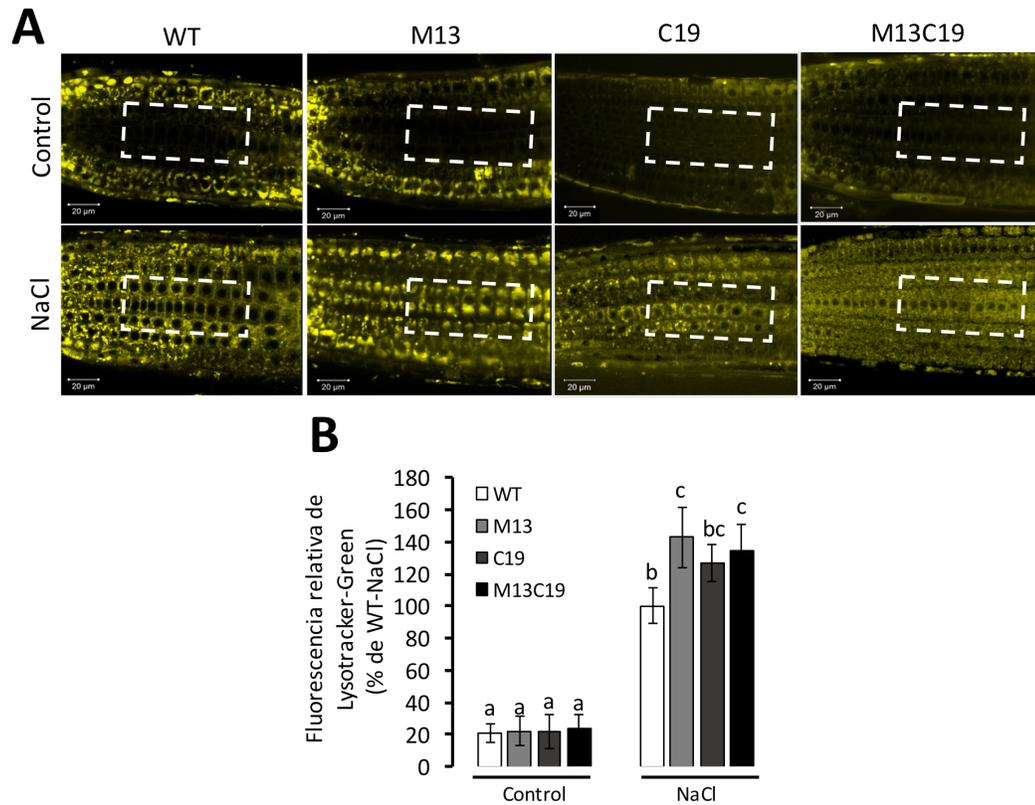


Figura 20. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de *SchMON1* y *SchCCZ1* sobre la actividad autofágica de *A. thaliana* durante estrés salino. A. Determinación de la presencia de compartimentos ácido o autofagosomas en raíces de plantas silvestres (WT) y transgénicas (M13, C19 y M13C19) sometidas a condiciones de MS (0,5X) suplementado con 0 (control) y 75 mM de NaCl, utilizando el indicador LysoTracker-green (en amarillo). **B.** Cuantificación de regiones puntuadas del indicador en los genotipos y condiciones antes señaladas. Imágenes de 5 plántulas fueron analizadas para cada genotipo en tres ensayos independientes. Letras distintas sobre cada barra indica diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples HSD de Tukey ($p < 0.05$).

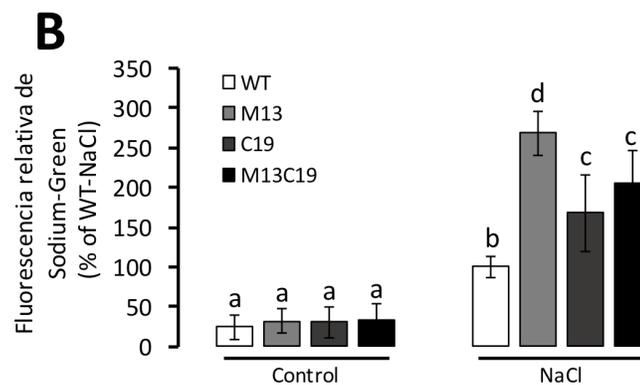
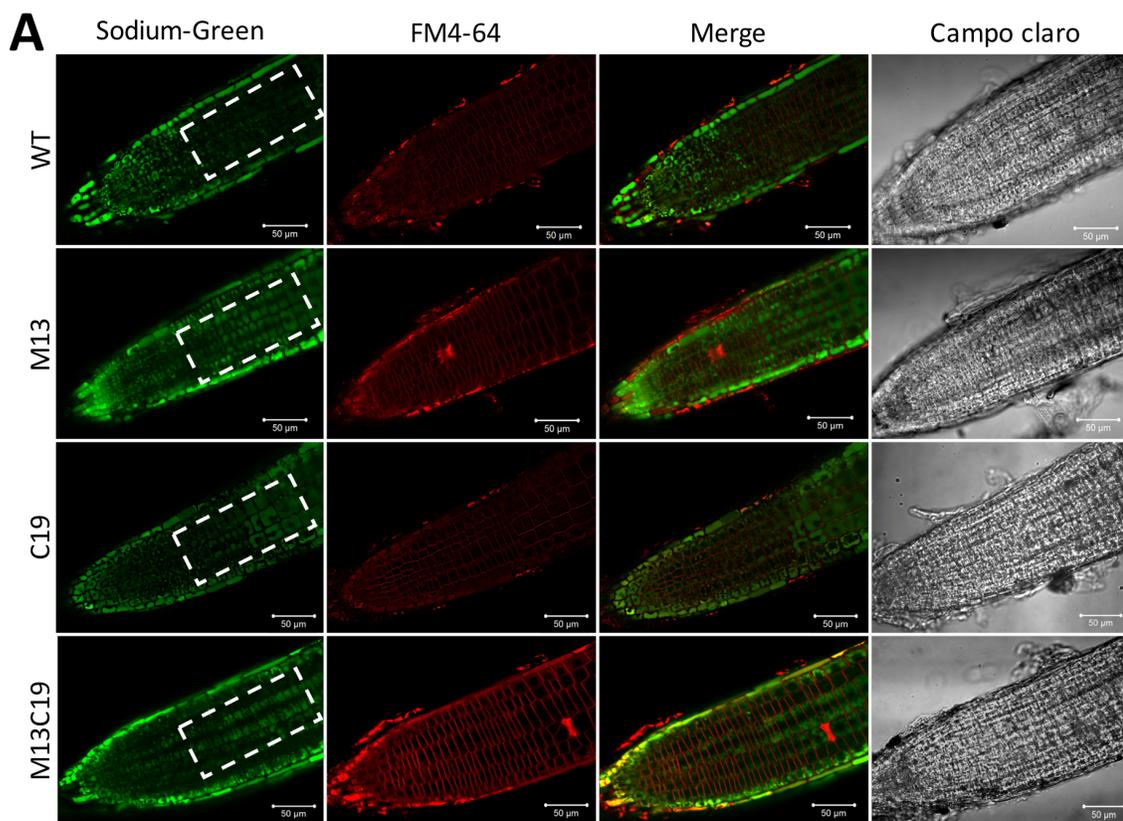


Figura 21. Efecto de la expresión y co-expresión radicular de *SchMON1* y *SchCCZ1* en el contenido de Na^+ vacuolar en plantas de *A. thaliana* durante estrés salino. A. Representación de la presencia de Na^+ en vacuolas de células raíces de plantas silvestres (WT) y transgénicas (M13, C19 y M13C19) sometidas a estrés salino 75 mM de NaCl durante 24 h, luego teñidas con el indicador Sodium-Green (en verde) por 1 h, y posteriormente con FM4-64 por 5 min (rojo). **B.** Cuantificación de la intensidad relativa del indicador Sodium-Green presente en la región demarcada por cada cuadro punteado blanco en (A) para ambos genotipos crecidos en condiciones de MS (0,5X) suplementado con 0 (control) y 75 mM de NaCl. Imágenes de 5 plántulas fueron analizadas para cada genotipo en tres ensayos independientes. Letras distintas sobre cada barra indica diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples HSD de Tukey ($p < 0.05$).

Con la finalidad de comprender la participación de los mecanismos moleculares que, asociados al incremento de la tasa endocítica y la acidez aportarían a la compartimentación de Na^+ y la tolerancia a estrés salino de los genotipos transgénicos, se realizó un análisis de la expresión de genes involucrados en el movimiento subcelular de Na^+ . Mediante RT-qPCR se analizó el perfil de expresión de *AtNHX1*, un antiportador Na^+/H^+ de tonoplasto con un rol crítico en la compartimentación de Na^+ en la vacuola, y *AtSOS1*, un antiportador de Na^+/H^+ de MP, siendo el principal mecanismo de extrusión de Na^+ hacia el apoplasto. Los resultados evidenciaron que, en hojas y raíces de plantas WT, la expresión de *AtNHX1* fue inducida por estrés salino (**Figura 22A**). Particularmente en hojas su expresión fue incrementada en seis veces, mientras que en raíces se duplicó. Interesantemente, en hojas de los genotipos transgénicos, la inducción de la expresión de *AtNHX1* fue inferior a lo observado en WT, mientras que en raíces la inducción fue significativamente superior. Los análisis para el genotipo M13 evidenciaron que la expresión de *AtNHX1* también se vio significativamente inducida, hasta seis veces en raíces, respecto de la condición control, mientras que en raíces de los genotipos C19 y M13C19 la inducción fue sólo de cuatro veces, sugiriendo la activa participación del antiportador NHX1 en la mayor capacidad de acumulación de Na^+ vacuolar en las raíces de los genotipos transgénicos. Por otra parte, como se observa en la **Figura 22B**, la inducción de expresión de *AtSOS1* tanto en hojas como en raíces de los genotipos transgénicos fue significativamente menor que en plantas WT. Incluso en raíces del genotipo M13 no se evidenciaron diferencias respecto de la condición control. Lo cual sugiere que la extrusión de Na^+ no sería el mecanismo preferido para protección frente al estrés salino en el grupo de plantas transgénicas.

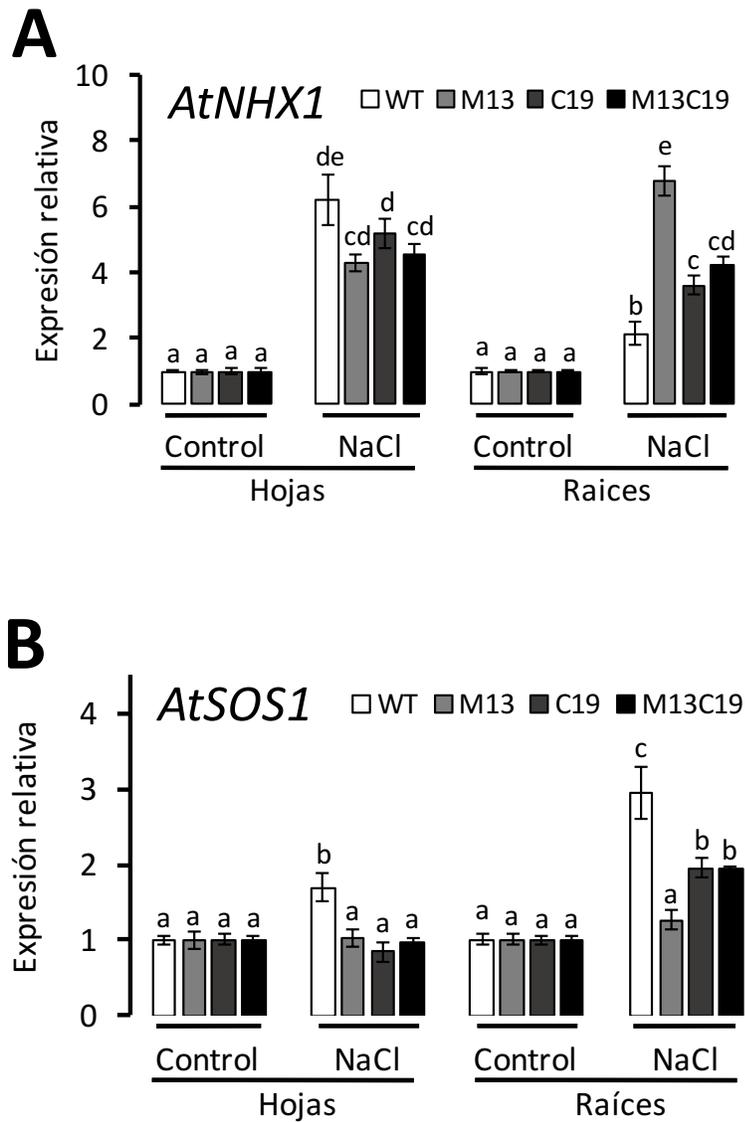


Figura 22. Perfil transcripcional de genes asociados a los mecanismos de movimiento subcelular de Na^+ en *A. thaliana* sometida a estrés salino. Análisis de RT-qPCR de genes involucrados en mecanismos de compartimentación de Na^+ , *AtNHX1*, (**A**) y de exclusión de Na^+ , *AtSOS1*, (**B**), en hojas y raíces de las líneas WT y transgénicas (M13, C19 y M13C19) sometidas a condiciones de MS (0,5X) suplementado con 0 (control) y 75 mM de NaCl. Letras distintas sobre cada barra indica diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA de una vía seguido por un test de comparaciones múltiples HSD de Tukey ($p < 0.05$).

IV. DISCUSIÓN

IV.1 *SchMON1* y *SchCCZ1* de *Solanum chilense* codifican para una proteína con características de Factor Intercambiador del Nucleótido de Guanina (GEF), y con patrones de expresión que sugieren la participación de ambos durante estrés salino.

S. chilense es una especie silvestre emparentada al tomate comercial, que habita el desierto de Atacama desde el sur de Perú hasta Chile central. Su lugar de crecimiento corresponde a regiones costeras, en ambientes extremadamente secos y alcalino/sódicos, hasta en altitudes que bordean hasta los 3000 metros de altura (Stam et al., 2017). Distintos estudios han revelado la alta complejidad de la respuesta molecular de *S. chilense* frente a condiciones de estrés salino, siendo el tráfico vesicular uno de los mecanismos que parecen ser fundamentales en su capacidad de tolerancia a los estreses abióticos. Análisis proteómicos y transcriptómicos obtenidos a partir de raíces de plantas sometida a estrés salino, han evidenciado una tasa de cambio positiva de la proteína VTI12, un miembro de la familia SNARE asociada con tráfico pre-vacuolar, y de otros genes asociados a diversas rutas de tráfico vesicular (Zhou et al., 2011; Salinas-Cornejo et al., 2019; Kashyap et al., 2020). La caracterización funcional del gen *SchRabGDII*, aislado desde esta misma especie, confirma el involucramiento y la habilidad del tráfico pre-vacuolar para incrementar la tolerancia a estrés salino, cuando es expresado en plantas de *A. thaliana* (San Martín-Davison, 2017). Interesantemente, se ha descrito que la principal vía de tráfico pre-vacuolar es dirigida por un mecanismo evolutivamente conservado en eucariontes, y por ende en plantas, al involucrar el intercambio entre miembros de las familias de proteínas RabF y RabG, para otorgarle continuidad al tráfico de vesículas desde el EE, pasando por el LE, hasta llegar a la vacuola (Cui et al., 2014). Notablemente, este proceso de intercambio requiere de la participación de solo dos proteínas esenciales, denominadas MON1 y CCZ1, las que conforman un complejo heterodimérico con actividad efectora para Rab5 y GEF (intercambiadora del nucleótido de guanina) para Rab7 (Singh et al., 2014). De tal manera, la función del complejo MON1/CCZ1 es esencial para la gran mayoría de las actividades celulares que requiere de la movilización de elementos que se dirigen hacia la vacuola, mecanismo fundamental para el desarrollo vegetal, como para enfrentar las presiones que ejerce el medio ambiente (Ebine et al., 2014).

En *S. chilense*, como en Solanáceas en general, sólo un gen codifica para MON1 y otro para CCZ1. Igualmente, todos los genomas eucariontes poseen sólo un miembro para *MON1*,

excepto *Homo sapiens*, el cual posee dos. Diferente es la situación de *CCZ1*, con al menos dos copias de este gen en diversas especies vegetales, como *A. thaliana* (Singh et al., 2014). No obstante, la presencia y conservación evolutiva del bajo número de copias de ambos genes sugiere que ha existido una fuerte presión de selección sobre este esencial mecanismo (Han et al., 2014). Al respecto, *SchMON1* y *SchCCZ1* mantendrían similar o igual función a la de sus homólogos, como reguladores del tráfico vesicular pre-vacuolar, ya que, en ambas proteínas, los residuos presentes en la plataforma de unión del heterodímero, como en el dominio asociado con la actividad GEF, son altamente conservados (**Figura 5**). Las principales evidencias acerca de la relevancia de los residuos asociados con la actividad GEF de *MON1*, han sido evidenciadas mediante evaluaciones de mutaciones puntuales, tales como G191P y K192D, realizadas sobre su homólogo de levadura, *ScMON1*. Estas mutaciones provocan la pérdida de la actividad GEF del complejo *MON1/CCZ1*, la pérdida de la localización de *Rab7* y la generación vacuolas morfológicamente defectuosas (Cabrera et al., 2014). Efectos similares se evidencian en mutantes *CCZ1* para residuos G47W y G51M, ambos asociados a la actividad GEF y también presentes en *SchCCZ1* (Cabrera et al., 2014). Igualmente, cuando el mecanismo de activación de *RabGTPasas* mediada por *MON1/CCZ1* es bloqueado en *A. thaliana*, por mutaciones puntuales sobre *RabGTPasas*, resultan en la defectuosa morfología y biogénesis de los PVC y la vacuola (Ebine et al., 2014). Este último caso sido confirmado con mutantes dominantes negativas de un miembro de la familia *RabG*, que se encuentra en un estado “siempre desactivado” (Cui et al., 2014). También se evidenció que los aminoácidos que se encuentran en la putativa plataforma de unión, y que permiten el ensamblaje del complejo *MON1/CCZ1* entre *SchMON1* y *SchCCZ1*, son también altamente conservados (**Figura 5**). De acuerdo con lo evaluado en los homólogos presentes en levadura, estos se ubican en un dominio denominado *Longin* el cual corresponde a la sección entre los aminoácidos 1-168 en el caso de *MON1*, y entre el residuo 159-318 en *CCZ1*. La ausencia de este dominio *Longin* imposibilita la capacidad de interactuar entre ambas proteínas, siendo fundamental además para su actividad GEF (Nordmann et al., 2010). Recientemente, en *Chaetomium thermophilum*, se determinó que el complejo *MON1/CCZ1* sería capaz de interactuar de manera asimétrica con otro complejo *MON1/CCZ1*, formando nuevas unidades. Esto sería producto de la participación un dominio ubicado en la alfa hélice 3 de *MON1*, formando una estructura similar a los complejos *TRAPP*, y comprometiendo la unión de más

proteínas de la familia Rab7 que podrían estar siendo activadas (Kiontke et al., 2017). En consecuencia, se sugiere que SchMON1 y SchCCZ1 de *S. chilense* poseen características altamente conservadas en su secuencia aminoacídica que serían típicas de los complejos MON1/CCZ1 con actividad GEF.

Por otra parte, el patrón de expresión de *SchMON1* y *SchCCZ1* muestra una inducción espacio-temporal coordinada a tiempos tempranos durante el estrés salino (**Figura 6**). En más de 200 tejidos y órganos de solanáceas emparentadas a *S. chilense*, *MON1* destaca por presentar una alta estabilidad transcripcional (Zouine et al., 2017). Sin embargo, recientemente, mediante RNAseq, también se evidenció la inducción de *SchMON1* en plantas *S. chilense* sometidas a estrés salino, respecto de la condición sin estrés, confirmando el patrón de expresión aquí presentado (Kashyap et al., 2020). Este comportamiento es similar al ensayo tomado como referencia y reportado previamente por nuestro grupo (San Martín- Davison et al., 2017), y además se relaciona con lo evidenciado para distintas familias de genes asociadas a las mismas vías de tráfico pre-vacuolar en raíces de *S. chilense* durante estrés salino, tales como *SNAREs* o *RabGAPs* (Salinas-Cornejo et al., 2019; Madrid-Espinoza et al., 2019). Tal patrón es, además, equivalente con el evidenciado para *SchSNAP33* o *SchVAMP727*, ambos miembros de la familia SNARE, localizados en la MP y la vacuola, respectivamente; también con el de *SchRabGAP3* y *SchRabGAP18*, ambos pertenecientes a la familia RabGAP, y posiblemente involucrados en el sistema de desactivación de las RabGTPasas de la vía endocítica y pre-vacuolar; y con *SchRabGDII*, involucrado en el reciclaje de RabGTPasas (San Martín-Davison et al., 2017; Salinas-Cornejo et al., 2019; Madrid-Espinoza et al., 2019). También se ha observado para las Rab-GTPasas *AtRabG3e* y *AtRabA1*, los cuales son elementos fundamentales para la tolerancia a estrés salino en *A. thaliana* (Mazel et al., 2004; Asaoka et al., 2013). Igualmente, *AtATG8*, un regulador de los mecanismos de autofagia íntimamente relacionado con RabG y MON1/CCZ1, y con la capacidad de tolerancia a salinidad de *A. thaliana*, también se ve inducido por estrés salino a tiempos tempranos (Luo et al., 2017), de una manera similar a *MdATG8i* en *Malus domestica*, el cual de la misma manera otorga tolerancia a estrés salino cuando es sobre-expresado (Huo et al., 2020). Por estas razones, la inducción de los genes *SchMON1* y *SchCCZ1* estaría siendo requerida por los mecanismos que regulan y modulan el tráfico vesicular pre-vacuolar en *S. chilense* durante el estrés salino.

IV.2 La expresión de *SchMON1* y *SchCCZ1* restaura el tráfico de vesicular y el fenotipo de mutantes de *Arabidopsis thaliana mon1-1* y *ccz1a/b*, respectivamente.

Considerando la necesidad de profundizar en el conocimiento del papel funcional que ejercen *SchMON1* y *SchCCZ1* sobre el mecanismo de tráfico vesicular, la mutante *mon1-1* y *ccz1a/b* de *A. thaliana* fueron respectivamente complementadas. Plantas *mon1-1*, caracterizadas por ser mutantes *knockout*, dado que no es posible detectar la presencia de *AtMON1* a nivel de ARN o proteína, evidenciaron un fenotipo defectuoso, con raíces cortas y crecimiento retardado (**Figura 7**), similar al observado en reportes anteriores (Cui et al., 2014). Al respecto, la complementación constitutiva con *SchMON1* recuperó el fenotipo de las mutantes de *A. thaliana* de manera satisfactoria. Esta restauración es coincidente con el efecto que ejerce la complementación del mutante con el gen endógeno *AtMON1* (Singh et al., 2014). De la misma manera, la doble mutante *ccz1a/b*, proveniente de la cruce entre la mutante *knockout ccz1b* y la dominante negativa *ccz1a*, evidenció, al igual que *mon1-1*, un fenotipo de raíz corta y desarrollo retardado (Ebine et al., 2014). En este caso, su complementación con *SchCCZ1* logró rescatar fenotipo de *A. thaliana*, resultando además indistinguible respecto del fenotipo de plantas WT (**Figura 7A, 8A**). Este efecto es coincidente al observado con la complementación de los genes endógenos de *A. thaliana*, *AtCCZ1A* o *AtCCZ1B*, sobre la doble mutante (Ebine et al., 2014), al igual que en distintos mutantes para genes que codifican proteínas con actividad GEF, y que presentan desarrollo defectuoso. Tal es el caso de GNOM o algunos miembros de la familia BIG, ambas proteínas con actividad GEF sobre ARF-GTPasas (Mayer et al., 1993, Geldner et al., 2003, Kitakura et al., 2017; Xue et al., 2019), o de VPS9, una proteína GEF específica de plantas activadora de Rab-GTPasa cuyos miembros son de la familia RabF (Goh et al., 2007). En ese contexto, *SchMON1* y *SchCCZ1* son capaces de restaurar el tráfico vesicular que median sus homólogos presentes en *A. thaliana*.

A nivel subcelular, se evidenció la reducción de la tasa endocítica en células radiculares de las mutantes de *A. thaliana mon1-1* y *ccz1a/b*, la cual también fue rescatada en ambos genotipos mediante la expresión de *SchMON1* y *SchCCZ1*, respectivamente (**Figura 7B, 8B**). Esto indicaría la participación de ambas proteínas en el mecanismo de internación de FM4-64, y eventualmente en el proceso de intercambio RabF-RabG y de la maduración de los endosomas en *A. thaliana* (Ebine et al., 2014). Efectos similares han sido observados en

plantas mutantes *ehd1*, al verse recuperada la tasa de internación del indicador FM4-64 mediante la sobreexpresión de *EHD1*, un gen que codifica para una proteína que reside en endosomas maduros junto a FYVE (Bar et al., 2013). Interesantemente, la proteína FYVE, miembro del complejo ESCRT, media la formación de vesículas lumbinales durante la formación del LE, mecanismo que está íntimamente relacionado con el intercambio RabF-RabG mediada por el complejo MON1/CCZ1 (Paul, et al., 2014; Gao et al., 2014).

Considerando que el paso de RabF a RabG mediado por el complejo MON1/CCZ1 ocurre sobre endosomas maduros, la localización subcelular de SchMON1 y SchCCZ1 fue evaluada utilizando diversos marcadores subcelulares de la ruta endocítica y pre-vacuolar, permitiendo dar cuenta del amplio rango de acción de ambas proteínas (**Figura 9**). SchMON1 además de evidenciar localización en el LE con RabG3f en células radiculares de *A. thaliana*, presentó localización en el EE con la RabGTPasas de la familia RabF, RHA1, relacionándose con la potencial capacidad efectora que tendría sobre esta última. Previamente, ha sido demostrada la co-localización entre RabG3e (homólogo de RabG3f) y RHA1 en una subpoblación de endosomas (Cui et al., 2014), de manera que SchMON1 podría estar mediando el proceso de intercambio de ambas proteínas de *A. thaliana* (**Figura 9A**). También ha sido evidenciada la co-localización entre ARA7 y RabG3f en protoplastos de *A. thaliana*, como también la de ARA6 y MON1, relacionando además la actividad GEF del complejo MON1/CCZ1 con la CIE (Ueda, et al., 2001; Singh et al., 2014; Baral et al., 2015a). Interesantemente, RHA1 co-localiza con FM4-64 (Ueda et al., 2004), conectado a SchMON1 con la ruta de CME, lo cual fue confirmado al evidenciarse en este trabajo la co-localización parcial entre el marcador de MP, PIP1-4, y el indicador de TGN, VTI12. No obstante, AtMON1 a diferencia de SchMON1, no presenta localización en la MP (Ebine et al., 2014), lo cual podría deberse a factores asociados con la afinidad de acoplamiento o interacción con las distintas RabGTPasas de *A. thaliana*. Además, un número importante de diferencias a nivel de aminoácidos que se evidencian entre ambas proteínas en dominios cuyas funciones aún son desconocidas (**Figura 5**), lo cual debería ser investigado con mayor detalle.

Por su parte, la localización de SchCCZ1 en células radiculares de *A. thaliana* se encuentra limitada principalmente entre la EE y el LE, co-localizando con RHA1 y RabG3f, coincidiendo con la localización de SchMON1 y con lo reportado con su homólogo AtCCZ1a (Ebine et al., 2014). Esto sugiere que SchCCZ1 y SchMON1 tendrían la potencial capacidad

de actuar sobre el tráfico pre-vacuolar y en el mecanismo de intercambio RabF-RabG sobre los LE en células radiculares de *A. thaliana*.

IV.3 El promotor *pRaíz* mantiene su patrón de expresión y especificidad radicular frente a estrés salino y ácido abscísico, siendo el candidato más adecuado para dirigir la expresión de *SchMON1* y *SchCCZ1* en *Arabidopsis thaliana*.

Los promotores constituyen una sección de ADN que determina el apropiado patrón de expresión de los genes a nivel espacial y temporal (Porto et al., 2014). Recurrentemente los elementos básicos de esta secuencia regulatoria se encuentran hasta 2000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, no obstante, pequeñas secciones son suficientes para regular la expresión de un gen (Potenza et al., 2014). Por ejemplo, el promotor 35S proveniente del virus del mosaico de la coliflor, utilizado de manera extensiva para fuerte y constitutiva expresión de transgenes en especies dicotiledóneas, posee un largo de 345 pb (Bhullar et al., 2007); el promotor constitutivo UBI-1, utilizado en monocotiledóneas, contiene 899 pb del promotor total del gen *Ubiquitina-1* de *Zea mays* (Christensen & Quail, 1996); o una sección del promotor del gen *AtSCPL30* de 456 pb de largo es suficiente para dirigir la expresión constitutiva de un transgen en *A. thaliana*, incluso a niveles similares al promotor 35S (Jiang et al., 2018). No obstante, a pesar de su amplio uso en investigación, no es siempre deseable para la aplicación biotecnológica el uso de promotores fuertes, ya que esta resulta en una carga metabólica alta, que puede derivar en efectos tóxicos debido la acumulación de grandes cantidades de proteína o por producir el silenciamiento génico basado en homología de secuencia (Amack & Antunes 2020).

Durante los últimos 20 años, diversas secuencias capaces de dirigir la expresión de genes de una manera específica han sido identificadas en plantas. El objetivo ha sido caracterizar nuevos promotores con potencial uso en biotecnología de cultivos, especialmente para la producción de proteínas específicas bajo condiciones de estrés. En ese sentido, se han evaluado distintos promotores inducibles entre los cuales se encuentran: el promotor de *RD29A* de *A. thaliana* (Behnam et al., 2006); el de *ZO3-11*, *RD29A*, o *Rab16A* en *Oryza sativa* (Peethambaran et al., 2018; Ganguly et al., 2011; Datta et al., 2012); el de *Zmap* o *ZmMYB30* de *Zea mays* (Jin et al., 2019; Luo et al., 2020), o el promotor *p270* del

retrotransposón *TCL1.1* de *S. chilense* (Salazar et al., 2007), entre otros. Otro grupo de promotores es aquel expresado de manera específica en determinados tejidos u órganos vegetales, como por ejemplo el promotor de *TobRB7* en raíces de *Nicotiana tabacum* (Yamamoto et al., 1991); el de *SK2* en pistilos de *Solanum tuberosum* (Ficker et al., 1997); el de beta-faseolina en semillas de *Pisum sativum* (Chandrasekharan et al., 2003); o el de una UDP-glicosiltransferasa en células radiculares en *A. thaliana* (UGT, At1g73160; Vijaybhaskar et al., 2008). Interesantemente, este último grupo de promotores tiene un potencial uso, aún no explorado, relacionado con la capacidad que pueden ofrecer para incrementar de la tolerancia a estrés abiótico y, en particular, frente a estrés salino. En este sentido, se ha evidenciado que la expresión radicular del gen *TmHKT1;4-A2*, localizado en un locus denominado *Nax1* presente en trigo, es capaz de contribuir en la prevención de la transferencia de iones Na^+ hacia tejido verde, y al incremento de su tolerancia (Tounsi et al., 2016; Tounsi et al., 2018).

Entre los promotores caracterizados en *A. thaliana* como, por ejemplo, *pPHT1* (Koyama et al., 2005), *pAt2g18140* (Kakrana et al., 2017) y *pTPS* (Chen et al., 2004), destaca el promotor de *pUGT* (*pRaíz*) de 418 pb de largo, el cual es capaz de dirigir la expresión *GUS* particularmente en tejido cortical, endodermis y tejidos vasculares de la raíz (Vijaybhaskar et al., 2008). Justamente, estos tejidos radiculares son poco eficientes en su capacidad para acumular Na^+ , en comparación a lo observado en células epidérmicas, lo cual ha sido reportado ampliamente en especies o genotipos sensibles, entre ellos, la misma planta modelo *A. thaliana* (Munns & Tester, 2008), por lo que resultan ser blancos interesantes para su mejoramiento e incremento de la tolerancia a estrés salino (Chen et al., 2018). Considerando que el promotor *pRaíz* no había sido analizado en el contexto del estrés abiótico, fue previamente evaluado en este trabajo de tesis su comportamiento frente a estrés salino y ABA. Al respecto, se evidenció no ser afectado por la aplicación de ningún tratamiento (**Figura 10**), lo cual fue confirmado mediante análisis de RT-qPCR (**Figura S4**). Por este motivo, la estrategia se centró en evaluar los efectos fenotípicos, subcelulares y moleculares de la expresión radicular dirigida por *pRaíz*, en conjunto y de manera individual, de *SchMON1* y *SchCCZ1*, en plantas de *A. thaliana* sometidas a estrés salino.

IV.4 La expresión y co-expresión radicular de *SchMON1* y *SchCCZ1* le confiere a *Arabidopsis thaliana* tolerancia a estrés salino e incrementada insensibilidad a ácido abscísico.

El estrés salino representa un complejo escenario de respuestas fisiológicas, celulares y moleculares para hacer frente al estrés osmótico, iónico y oxidativo de manera coordinada en toda la planta (Zhu, 2000). Particularmente, *A. thaliana*, una especie glicófita, responde rápidamente al estrés reduciendo su crecimiento, al provocar el cierre de estomas e inhibir la expansión celular (Isayenkov & Maathuis, 2019). En ese sentido, diversas investigaciones han demostrado que, a niveles moderados de estrés salino, *A. thaliana* presenta una evidente sensibilidad (Moller & Teste, 2007). Esto es claramente observado en nuestros resultados, con la significativa inhibición del desarrollo de sus raíces (genotipo WT) expuestas a condiciones de 50, 75 o 100 mM de NaCl (**Figura 11A**), efecto que se deben a cambios en la arquitectura y anatomía de la raíz, incluyendo la reducción de la división celular, mecanismo finamente regulado a nivel transcripcional (Jiang et al., 2016). En ese contexto, al cuantificar el largo de raíz de los genotipos transgénicos de *A. thaliana* que expresan y co-expresan a *SchMON1* y *SchCCZ1* se evidenció claramente el incremento en la tolerancia a estrés salino (**Figura 11A, 11B**). Esto correspondería al primer análisis en el que proteínas con actividad Rab-GEF están involucradas en la capacidad de tolerancia a estrés salino en plantas. Efectos similares, en esta misma línea, han sido observados al expresar o sobre-expresar genes cuyas proteínas se encuentran asociadas a mecanismos similares, etapas y/o rutas del tráfico vesicular, en las que se incluye RabGTPasas como *OsRab7* en *O. sativa* (Peng et al., 2014), *PgRab7* de *Pennisetum glaucum* en *A. thaliana* (Agarwal et al., 2008), o *ARA6* en *A. thaliana* (Yin et al., 2017); las proteínas SNARE *AtSFT12* en *A. thaliana* (Tarte et al., 2015), *SbSLSP* de *Salicornia brachiata* en *N. tabacum* (Singh et al., 2016), o *GsSNAP33* de *Glycine soja* de en *A. thaliana* (Nisa et al., 2017); o la proteína GDI *SchRabGDII* de *S. chilense* en *A. thaliana* (San Martín et al., 2017). Estos antecedentes confirman que la expresión o co-expresión radicular de *SchMON1* y *SchCCZ1* de *S. chilense* es capaz de incrementar la tolerancia a estrés salino moderado a plantas de *A. thaliana*. Por otra parte, la simultanea expresión radicular de *SchMON1* y *SchCCZ1* en este trabajo provocó un grado intermedio de la tolerancia a estrés salino de *A. thaliana*, en comparación con los genotipos transgénicos de expresión individual

(Figura 11). Resultados similares han sido reportados con la co-sobreexpresión de *GhSOD1* y *GhAPX1* en plantas de *Gossypium hirsutum* (Luo et al., 2013) o co-expresión de *AtAVP1* y *AtNHX1* de *A. thaliana* en *Glycine max* (Nguyen et al., 2019). No obstante, en este caso, es probable que la presencia de *SchCCZI*, el cual otorga menor tolerancia al ser expresado individualmente, esté disminuyendo los efectos de los mecanismos que, por su sola presencia, *SchMON1* dirige en *A. thaliana*.

Considerando la mayor capacidad de tolerancia al estrés salino de las líneas transgénicas, fue evaluada la respuesta molecular frente al estrés salino analizándose el comportamiento transcripcional de los genes marcadores en estrés *AtRD22*, *AtRD29A* y *AtRab18*. Sorprendentemente, la expresión de *AtRD29A* y *AtRD22* en los genotipos transgénicos tolerantes fue inducida con menor intensidad que en WT, e incluso reprimida en el caso de *Rab18*. El patrón de expresión de estos genes es una evidencia de la activación de programas genéticos mediados por ABA, y dan cuenta de la capacidad de adaptación de las plantas para tolerar el estrés. Particularmente, tanto *RD22* como *RD29A* son genes activados por las vías dependiente e independiente de ABA, mientras que la expresión de *Rab18* depende casi exclusivamente de la ruta dependiente de esta hormona (Lee et al., 2016; Msanne et al., 2011; Nylander et al., 2001). Los análisis muestran que en plantas WT, el número de transcritos de los genes *AtRD22*, *AtRD29A* y *AtRab18* fue claramente incrementado durante estrés salino 75 mM, lo cual se correlaciona con lo observado en diversos ejemplos (Figura 12) (Tuteja, 2007; Jia et al., 2012). No obstante, este inesperado comportamiento en los genotipos transgénicos ha sido reportado previamente en plantas de *A. thaliana* tolerantes a estrés salino que sobre-expresan a *OsPP2C*, una fosfatasa de *O. sativa* reguladora negativa de la señalización y percepción por ABA (Singh et al., 2015); también en plantas que sobre-expresan a *AtRHI7*, ARN helicasa DEAD-box (Nguyen et al., 2018); en mutantes *knockout rd29a* y *rd29b*, cuyas raíces exhiben un largo superior al de plantas WT durante condiciones de estrés salino 50 mM (Msanne et al., 2011); y en la mutante *abi4*, la cual presenta también insensibilidad a ABA (Shkolnik-Inbar et al., 2013). En este sentido, la expresión y co-expresión radicular de los genes *SchMON1* y *SchCCZI* en los genotipos transgénicos, además de incrementar la tolerancia a estrés salino, estarían modulando negativamente la respuesta frente a ABA.

Las plantas *SchMON1* y *SchMON1/SchCCZ1* efectivamente evidenciaron una reducción de la sensibilidad frente ABA exógeno (**Figura 13**), siendo coherente con la sobreexpresión de miembros de la familia RAN-GTPasa, entre ellas *RANI*, asociada con el movimiento núcleo-citoplasmático de proteínas, la cual reduce la sensibilidad a ABA, y a la vez incrementa la tolerancia a estrés salino (Xu et al., 2016). También se correlaciona con lo evidenciado en plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan la anexina AnnBj2 de *Brassica juncea* (Ahmed et al., 2017), la fosfatasa OsPP2C de *O. sativa* (Singh et al., 2015), o el factor de transcripción PeWRKY83 de *Phyllostachys edulis* (Wu et al., 2017). Interesantemente, una familia de proteínas con actividad GEF sobre ROP-GTPasas, involucradas en la transducción de señales externas (Feiguelman et al., 2018), entre ellas *ROPGEF1* y *ROPGEF4*, evidenció la capacidad de reducir la sensibilidad a ABA, al regular negativamente su percepción mediante la estabilización del complejo PP2C-ROP cuando es sobre-expresada constitutivamente (Li et al., 2016). Sin embargo, la sobreexpresión de *ROPGEF1* promueve el incremento de la apertura de los estomas en sus hojas, afectando de manera negativa la tolerancia a estrés abiótico de plantas transgénicas (Li & Liu, 2012). Probablemente, sólo su expresión radicular hubiese permitido el incremento de la tolerancia. En el caso de *SchMON1* y *SchCCZ1*, ambas favorecen la modulación negativa de la respuesta frente a ABA. Esto es coherente con las evidencias relacionadas con el estudio de *FREE1*, un componente del complejo ESCRT esencial en la biogénesis y maduración de los MVB, el cual juega un rol adicional en la inhibición de la señal dirigida por ABA. No obstante, en este caso la sobreexpresión de *FREE1* provoca la reducción en la tolerancia a estrés salino (Pan et al., 2020). Por el contrario, *VPS23a*, otro componente del complejo ESCRT-I, es capaz de interactuar con receptores de ABA del tipo *PYL* en los MVB y mediar su movilización y degradación en la vacuola, atenuando la percepción de ABA durante estrés por sequía (Yu et al., 2016). En esta misma línea, *VPS23a* también interactúa con proteínas *SOS2*, participando en la mantención de la tolerancia a estrés salino (Lou et al., 2020). La diferencia observada en ambos casos, a pesar de ser elementos que participan de la misma vía de tráfico vesicular, incluso del mismo complejo proteico, revela una fina regulación entre los mecanismos moduladores de tolerancia a sal y de la percepción intracelular de ABA. En esta misma línea, distintas proteínas Rab-GTPasas mutadas en estado “siempre activas”, como *OsRab11* o *ARA6*, simulando la acción del complejo GEF, son capaces de conferir tolerancia a estrés salino y reducir la sensibilidad

frente a la aplicación de ABA de una manera similar a lo evidenciado en este trabajo de tesis (Chen & Heo, 2018; Ueda et al, 2001). Todos estos antecedentes sugieren que MON1/CCZ1 estaría jugando un rol relevante en una intersección de señales intracelulares y ambientales altamente compleja durante el estrés por sal.

IV.5 La endocitosis es modulada positivamente en las raíces de los genotipos transgénicos.

Durante el estrés salino, las células epidérmicas de la raíz de *A. thaliana* comienzan rápidamente a evitar la entrada de Na^+ , a incrementar su salida y a compartimentarlo en la vacuola (**Figura 1**). Del mismo modo actúan las células de los tejidos corticales y endodérmicos, aunque con reducida eficiencia (Munns & Tester, 2008). Al mismo tiempo, en cada uno de estos tejidos radiculares, la endocitosis, como el tráfico de vesículas, juega un rol fundamental en la movilización de proteínas, lípidos y otras partículas entre los distintos organelos, para hacer frente al daño provocado por el estrés. De acuerdo con lo observado, los genotipos transgénicos tolerantes de *A. thaliana* *SchMON1*, *SchCCZ1* y *SchMON1/SchCCZ1*, evidenciaron un incremento superior de la endocitosis respecto de plantas WT en condiciones normales y estresantes, cuantificada mediante la tasa de internación del indicador lipofílico FM4-64 (**Figura 14**). Este efecto fue coincidente con lo observado en plantas de *A. thaliana* tolerantes a estrés salino que sobre-expresan a la Rab-GTPasa *AtRabG3e* (Mazel et al., 2004), o *SchRabGDII* (San Martín-Davison et al, 2017), y en plantas de *O. sativa* que sobre-expresan a *OsRab7* (Peng et al., 2014). También se relaciona con el incremento de la tolerancia a otros tipos de estrés como, por ejemplo, frente a frío cuando es expresada la proteína *APYRASE2* de *Populus trichocarpa* en plantas de *A. thaliana* (Deng et al., 2015). En ese contexto, se confirma el positivo involucramiento de *SchMON1* y *SchCCZ1* en la endocitosis de *A. thaliana*. En esta misma línea, FM4-64 es un indicador de la CME en células radiculares, que cuando incrementa su internación se asocia a una remoción superior de los canales de agua, aquaporinas, básicamente para evitar la pérdida de agua y facilitar la mantención del equilibrio del potencial hídrico intracelular durante el estrés. Respecto de esto, se ha evidenciado que la CME modula de la internación de aquaporinas PIP2, siendo esto un mecanismo basal de tolerancia frente al estrés salino (Ueda et al., 2016). Cabe señalar también, que por esta misma

vía endocítica, transportadores de Na^+ como los canales HKTs o AKTs podrían ser endocitados, lo cual ha sido reportado para transportadores BOR-1 y AMT1;3 durante el exceso de boro y amonio, respectivamente (Takano et al., 2005). No obstante, no hay reportes que confirmen esta hipótesis en el caso de los transportadores de Na^+ .

Para entregar mayores antecedentes que expliquen el incremento de la tasa endocítica en los genotipos tolerantes en condiciones normales, resultó interesante evaluar el perfil transcripcional de los genes que codifican para *AtMON1*, *AtCCZ1a/b* y *AtRabG3f* de *A. thaliana* (**Figura 15, 16**). La evaluación del comportamiento de estos genes evidenció una relación positiva entre la inducción transcripcional de estos genes y el aumento de la tasa de internación de FM4-64, incrementada por el sólo efecto de la expresión de *SchMON1* y/o *SchCCZ1*, debido probablemente por una mayor presencia del complejo GEF en los genotipos transgénicos capaces de activar los mecanismos de tráfico vesicular. Esto sería coherente con ensayos de actividad realizados entre MON1/CCZ1 y RabG3f, que han concluido que la cantidad de proteína activada dependería proporcionalmente de la cantidad de complejos GEF formados (Cui et al., 2014). De la misma manera, la inducción de la expresión de RabG3f en los genotipos transgénicos sugiere una mayor presencia de RabGTPasas para ser activadas y, por ende, una tasa endocítica superior. Lo anterior ha sido confirmado en trabajos en que se han evaluado la expresión o sobreexpresión genes de esta familia, como RabG3e, en condiciones normales, con niveles significativamente mayores de internación de FM4-64 respecto de genotipos silvestres (Mazel et al., 2004).

En condiciones de estrés salino, células radiculares de plantas WT, evidenciaron un incremento cercano al ~70% de la tasa endocítica, mientras que en los genotipos transgénicos superaron el ~150%, lo cual sería resultado de la suma entre la endocitosis inducida tanto por el transgen, como por el estrés salino (**Figura 14C**). Esto es consecuente con el incremento de la internación de FM4-64 en células radiculares de plantas de *A. thaliana* que sobre-expresan a *APYRASE2* durante condiciones normales (Deng et al., 2015), o con el incremento de la internación de del transportador PIN2-Venus durante estrés salino (Galvan-Ampudia et al., 2013). También se relaciona con que FM4-64 es utilizado como un trazador de la endocitosis en masa en *A. thaliana* (Baral et al., 2015a). Lo anterior ha sido observado en plantas mutantes *pip5k2* sensibles a estrés salino que, al sobre-expresar a PIP5K2, son capaces recuperar tanto

la endocitosis en masa, indicada con FM4-64, como su capacidad de tolerancia a estrés salino (Mei, 2014).

Para indagar en las razones del incremento de la tasa endocítica en condiciones de estrés salino fue analizado el comportamiento transcripcional de genes de *A. thaliana* que participan del tráfico vesicular: *AtMON1*, *AtCCZ1a*, *AtCCZ1b* y *AtRabG3f*. Respecto de ellos se evidenció que *AtMON1* no presentó variaciones en sus niveles de expresión, de manera que evidencia una relación con el importante incremento de la endocitosis inducida por el estrés en los genotipos transgénicos. Esto es coherente con diversos trabajos que han señalado que su expresión es altamente estable en plantas de *A. thaliana* sometidas a 100 mM o 125 mM de NaCl, llegando a ser utilizado incluso como gen de referencia para ensayos de RT-qPCR (Sutka et al., 2011; Ueda et al., 2019). Lo mismo ocurrió con *AtCCZ1b*, cuyo patrón de expresión no varió significativamente. No obstante, el incremento significativo de la expresión de *AtCCZ1a* y *AtRabG3f* en raíces de los genotipos transgénicos, especialmente en el genotipo SchMON1, se relaciona positivamente con el incremento superior de la tasa endocítica en estrés salino.

La dinámica de internación el indicador FM4-64 también ha revelado la presencia de grandes estructuras al interior de las células radiculares del genotipo SchMON1. Al someter a estas plantas al tratamiento con BFA se evidenció que correspondían a LE (**Figura 14D**). La ausencia de estas estructuras en los dos genotipos transgénicos restantes indicaría que sólo la expresión individual de *SchMON1* sería capaz de afectar la morfología del LE. Esto probablemente se relacionaría con el rol que posee MON1 como efector de RabGTPasas de la familia RabF, especialmente para dirigir la fusión de EE en el LE (Cui et al., 2014). Estructuras similares, en forma de anillo, han sido visualizadas en protoplastos de *A. thaliana* que sobre-expresaban la RabGTPasa de la familia Rab5 ARA6-GFP (Ueda et al., 2001). En este sentido, es probable que en el genotipo de co-expresión, la formación de nuevos o más complejos GEF le estaría otorgando continuidad al proceso de intercambio entre Rab5-Rab7, reduciendo el tamaño de estas estructuras. No obstante, la presencia de las grandes endosomas podría estar involucrada en el incremento de la tolerancia a estrés salino del genotipo SchMON1, pero para definirlo se requieren mayores evidencias relacionadas con su ultraestructura y otras características funcionales.

IV.6 Reducción del contenido de H₂O₂ en raíces y cambios en la expresión de genes involucrados en mecanismos detoxificadores de ROS son evidenciados en los genotipos transgénicos.

Frente a estrés abiótico, una de las respuestas más frecuentes es la generación de ROS (Choudhary et al., 2019). Sus principales fuentes son organelos como cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias, no obstante, se han identificado proteínas de membrana NADPH oxidasas que sobre-reaccionan rápidamente frente a estrés, especialmente el salino, generando grandes cantidades de ROS en el apoplasto y citoplasma (Leshem et al. 2006). En primera instancia, ROS actúa en mecanismos de señalización secundaria, jugando un rol central en la activación de la endocitosis, principalmente en la de carácter masiva (Martinière, 2019). En ese sentido, los resultados revelaron que los genotipos transgénicos, que poseen mayor tasa de internación de FM4-64, también poseen una menor cantidad de H₂O₂ en sus raíces (**Figura 17**), sugiriendo que, en ellos, la endocitosis actuaría como mecanismo protector frente a ROS. Esto es coherente con los resultados obtenidos por Mazel et al. (2004), quien evidenció una menor producción de ROS en raíces de plantas tolerantes de *A. thaliana* que sobre-expresaban a *AtRabG3e* y poseían a la vez una mayor tasa endocítica.

Interesantemente, en los genotipos transgénicos, luego de estar sometidos por 48 h a estrés salino, se evidenció la colocalización entre los marcadores FM4-64 y DCF, confirmando la presencia de H₂O₂ en endosomas (**Figura18**). Esto es coherente con lo evidenciado en plantas de *A. thaliana* que evitan la fusión de vesículas contenedoras de ROS, lo cual permitiría retenerlo, mantener por mayor tiempo la integridad y viabilidad de la célula, e incrementar la tolerancia a estrés salino (Leshem et al, 2006). En este mismo sentido, diversos trabajos han demostrado que el H₂O₂, producido a partir de superóxido de manera espontánea o vía enzimática, es capaz de ingresar desde el apoplasto al citoplasma vía transportadores (Aquaporinas) o endosomas que permitirán su compartimentación y la reducción de sus efectos (Golani et al, 2013). Probablemente los endosomas que ingresan podrían contener NADPH oxidasas que continúan produciendo ROS en el lumen de los endosomas, los cuales, con posterioridad, son movilizados a la vacuola para depositar su contenido (Baral et al., 2015b). Por el contrario, en plantas WT se evidenció que ambos indicadores no colocalizaban, sugiriendo que, probablemente, la producción de ROS estaría centrada en otros organelos,

tales como mitocondrias. Esto se relaciona con lo evidenciado en estados prologados de estrés salino, en donde la cadena transportadora de electrones ha sido dañada y se ha dado inicio a los mecanismos de muerte celular programada (Leshem et al., 2007), lo cual es coherente con lo visualizado en plantas WT y su sensibilidad a estrés salino.

Durante el estrés salino, el sistema reductor de ROS busca mantener la homeostasis celular para permitir la continuidad de los procesos metabólicos básicos de la planta. Este sistema incluye mecanismos enzimáticos y no-enzimático que buscan disminuir el exceso de metabolitos oxidantes en los diversos sectores de la célula (Ahmad et al., 2010; Choudhary et al., 2019). Para indagar en ellos, fue evaluado el patrón de expresión de genes relacionados con el sistema enzimático basado en superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasas (CAT), y con el no enzimático basado en flavonoides. Respecto del primero, fue posible evidenciar que el comportamiento transcripcional de *AtSOD*, *AtAPXS*, *AtCAT1* y *AtCAT3* en plantas silvestres (**Figura 19**) concuerda con lo evidenciado en diversas investigaciones, en donde, por ejemplo, *APX1* no presenta una inducción significativa (Nguyen et al., 2017), y las catalasas *CAT1* y *CAT3*, evidencian patrones de inducción significativamente superiores respecto de condiciones control (Sagor et al., 2016). Respecto de los genotipos transgénicos, se evidenciaron cambios positivos en el perfil transcripcional de los genes *AtSOD1* y *AtAPXS* y negativos para ambas catalasas (**Figura 19A**). Esto es coincidente con el efecto observable en plantas de arroz tolerantes a estrés salino que sobre-expresan a un factor de transcripción bZIP, en donde se observó una evidente reducción de la expresión y actividad de las catalasas y una inducción e incremento importante de la actividad de *SOD* y *APX*, lo que también va acompañado, interesantemente, de la insensibilidad frente a ABA (Das et al., 2019). En este sentido, se ha evidenciado que en plantas de *A. thaliana* insensibles a esta fitohormona, los niveles de expresión de *SOD* y *APX* se ven incrementados (Yang et al., 2019). Esto sugiere, que la capacidad de evitar el exceso de ROS en las raíces de estos genotipos durante estrés salino es mediante la reducción de H_2O_2 , dirigida por el sistema enzimático basado en *APX*, lo cual puede ser de una manera independiente de ABA. En tal escenario, es destacable que el genotipo SchMON1 presentara mayor expresión de ambos genes (*AtSOD1* y *AtAPXS*) en la medida que también posee mayor endocitosis, tolerancia a estrés salino e insensibilidad a ABA.

Respecto del comportamiento transcripcional de genes de sistema no enzimático, fue evaluado el patrón de expresión de genes estructurales de la familia de flavonoides, tales como *AtCHS*, que da inicio a todo el proceso de biosíntesis; *AtFLS*, permite drenar la vía hacia la biosíntesis de flavonoles en hojas y raíces; *AtLDOX* participa en la biosíntesis de antocianinas en hojas; y *AtTT12* actúa como un transportador de tonoplasto para el almacenamiento vacuolar (Biała & Jasiński, 2018). Según los resultados obtenidos, sólo la expresión de *AtCHS* y *AtFLS* fue inducida, aunque débilmente, en raíces de plantas silvestres por el efecto del estrés salino, mientras que la expresión de *AtLDOX* no fue detectada y la de *AtTT12* se vio fuertemente inhibida (**Figura 19B**). Este efecto es coincidente con lo observado previamente por Li et al. (2019), quienes evidenciaron la inducción de *AtCHS* y *AtFLS* durante estrés salino. Sin embargo, esto contrasta con lo evidenciado en los genotipos transgénicos, en donde la expresión de ambos genes, aunque incrementadas, fueron significativamente menores a lo observado en plantas WT, en especial en el genotipo SchCCZ1. Estos resultados confirmarían que la expresión y co-expresión radicular de los transgenes provoca efectos negativos en el comportamiento transcripcional de los genes asociados a la biosíntesis de flavonoides. Lo anterior es coherente con lo reportado en genotipos tolerantes a estrés salino de *O. sativa*, en los cuales no se observó cambios en el patrón de expresión de esta familia de genes cuando las plantas fueron sometidas a estrés salino, versus genotipos sensibles, en donde hubo fuerte expresión de una importante cantidad de genes relacionados (Walia et al., 2005). Interesantemente, esto contrasta con lo observado en plantas con incrementado contenido de flavonoides, producto de la sobreexpresión de genes que participan en su biosíntesis, y que presentaron mayor capacidad de tolerancia a estrés salino (Chen et al., 2019). Se ha evidenciado que la sobreexpresión de *AtCHS*, pero no así la sobreexpresión de *FLS1*, aportarían a esta capacidad (Nguyen et al., 2016). Respecto de esto, la comunidad científica se encuentra en una amplia discusión (Saini et al., 2017; Bielach et al., 2017), ya que se ha documentado ampliamente el rol de modulador negativo de algunos flavonoides, en especial de los flavonoles, en el transporte de auxinas, las cuales a su vez son reconocidos reguladores del tráfico vesicular (Brown et al., 2001; Peer & Murphy, 2007; Peer et al., 2011). El transporte polar de auxinas juega un rol crítico en la regulación del crecimiento vegetal, de manera que la apropiada expresión y distribución de las proteínas implicadas en su movilización, a nivel intracelular y en la MP, son determinantes de la morfología y elongación

celular, especialmente en raíces (Bielach et al., 2017). En ese sentido, un adecuado contenido de flavonoides permite mantener el correcto funcionamiento de las señales internas que las auxinas, junto a citoquininas y ROS, integran para controlan los mecanismos asociados con proliferación celular y el crecimiento de las raíces en el contexto del estrés abiótico (Silva-Navas et al., 2016). Por estas razones, los resultados sugieren que la tolerancia de los genotipos transgénicos podría estar definida, en parte, por un adecuado balance entre la respuesta subcelular frente al estrés abiótico y la regulación hormonal, permitiéndole a estas plantas mantener funcionando mecanismos asociados en el crecimiento y desarrollo de la raíz.

IV.7 Vacuolas de células radiculares de genotipos transgénicos tienen aumentada la capacidad para compartimentar Na^+ producto del incremento de la endocitosis, la autofagia y la expresión de *AtNHX1*.

La vacuola es un organelo versátil que asume diversas funciones en plantas. En raíces su participación se centra principalmente en actividades de reciclaje, detoxificación, defensa, y almacenamiento (Zhang et al., 2014). Para lograr realizar estas funciones, como mantener de manera efectiva la actividad de enzimas y metabolitos localizados en su interior, el pH de la vacuola es particularmente bajo respecto del resto de los organelos en la célula (Shen et al., 2013). El mecanismo de acidificación de la vacuola radicular por dos diferentes tipos de bombas de protones: las V-H^+ -ATPasas y las H^+ -pirofosfatasas. Durante el estrés salino, ha sido bien documentado, que el incremento de la actividad de las V-H^+ -ATPasas provee la fuerza impulsora de los intercambiadores de catión Na^+/H^+ , como *NHX1*, en la medida en que se presente una mayor disponibilidad de protones al interior de la vacuola (Sze & Chanroj, 2018). No obstante, esto se ve negativamente afectado por el incremento de la basicidad vacuolar, producto del ROS inducido por el estrés salino (Leshem et al., 2007). En ese contexto, se planteó que la reducción del estrés oxidativo incidiría positivamente sobre la acidificación de la vacuola de los genotipos transgénicos (Luo et al., 2017). De esta manera, utilizando Lysotracker se identificaron estructuras ácidas al incrementarse significativamente la intensidad de su fluorescencia (Mitou et al., 2009). Los resultados evidenciaron que los tres genotipos transgénicos presentaban un número mayor de estructuras ácidas respecto del WT (**Figura 20**). Este resultado es coherente con lo evidenciado por Baral et al. (2015a), cuyas

raíces de plantas WT incrementaban la presencia de compartimentos ácidos, no así en plantas con reducida endocitosis. Por otra parte, los resultados también son consistentes con la mayor actividad de la Rab-GTPasa RabG3b y el principal regulador de la autofagia en plantas, ATG8a, ya que Lysotracker es un buen indicador de este tipo de actividad. Mediante microscopía confocal fue determinada la colocalización de ambas proteínas, sugiriendo el rol de familia RabG en la regulación del tráfico y fusión de autofagosomas con el tonoplasto (Kwon et al., 2013). Otros antecedentes confirman que la sobreexpresión de genes de la familia ATG favorece el incremento de la intensidad y el número de cuerpos Lysotracker que colocalizan con las proteínas ATG, la acumulación de Na^+ vacuolar y la tolerancia a estrés salino (Luo et al., 2017). En ese sentido, el incremento de la tolerancia evidenciada por los genotipos transgénicos se debería al aumento de la actividad autofágica e incremento de la acidez vacuolar de sus células radiculares.

Para verificar el efecto del incremento de la acidez de los compartimentos vacuolares sobre la capacidad para compartimentar Na^+ de los genotipos transgénicos, sus vacuolas fueron marcadas con el indicador de Na^+ Sodium-Green. Los resultados evidenciaron que ellas, en especial las presentes en células de tejidos corticales y endodérmicos, presentaron mayor intensidad del indicador (**Figura 21**). Esto es coherente con lo evidenciado en plantas de *A. thaliana* tolerantes a estrés salino que expresan genes asociados a tráfico vesicular como *AtRabG3e*, *AtATG8* o *AtSFT12*, en las que se observa mayor intensidad del indicador (Mazel et al., 2004; Tarte et al., 2015; Luo et al., 2017). Interesantemente, cuando la raíz se ve enfrentada a condiciones de estrés salino, sus células utilizan diversas estrategias para reducir la presencia de Na^+ en el citoplasma. A las conocidas, el tráfico vesicular ha sido recientemente asociado con la capacidad de su compartimentación vacuolar, aunque los mecanismos no han sido bien definidos (Mazel et al., 2004; Tarte et al., 2015). Al respecto, surgen dos posibles hipótesis: primero, que la presencia de nuevos y más transportadores de Na^+ de tonoplasto, producto de su inducción transcripcional, favorezca su secuestro en la vacuola o, segundo, que debido a una incrementada endocitosis se contribuya con la internación de líquido extracelular con altas concentraciones de Na^+ . Respecto de la primera hipótesis, fue evaluada la expresión de *AtNHX1* (**Figura 22**). En los tres genotipos transgénicos se evidenció la inducción de la expresión transcripcional de este gen, en especial en el genotipo SchMON1, lo cual se relaciona con lo observado en otros genotipos tolerantes a

estrés salino que tienen incrementada expresión de este tipo de intercambiadores vacuolares (Sottosanto et al., 2007). Respecto de la segunda hipótesis, recientes antecedentes, utilizando cultivos celulares de *A. thaliana*, han demostraron que el Na^+ es posible captarlo desde el apoplasto o el medio extra-celular vía endocitosis y proveer un transporte directo hacia la vacuola, evitando su entrada y acumulación en el citoplasma (Orlova et al., 2019). Justamente, en genotipos tolerantes a estrés salino de plantas de ají habanero, a diferencia de lo observado en genotipos sensibles, ha sido posible observar estructuras endosomales ricas en Na^+ , las cuales eventualmente se fusionan con la vacuola (Bojorquez-Quintal et al., 2017). Esto guarda sentido con los resultados obtenidos respecto del incremento de la tasa endocítica en los genotipos transgénicos sometidos a estrés salino (**Figura 14**), y la mayor capacidad de acumulación de Na^+ vacuolar que presentan. Todo lo anterior, nos permite sugerir que el incremento de la tolerancia de los genotipos transgénicos estaría asociado con la mayor capacidad de compartimentación vacuolar de Na^+ , favorecida por tres mecanismos: vía transportadores AtNHX1, la autofagia de Na^+ citoplasmático y el secuestro del Na^+ extracelular mediado por endocitosis.

V. CONCLUSIONES

- En *Solanum chilense*, el estrés salino induce de manera coordinada temporal y espacialmente la expresión de los genes *SchMON1* y *SchCCZ1*.
- Los genes *SchMON1* y *SchCCZ1* de *Solanum chilense* codifican para monómeros del complejo heterodimérico MON1/CCZ1 con actividad GEF sobre la vía de tráfico vesicular dependiente del intercambio entre Rab5-Rab7 al complementar, respectivamente, las mutantes *mon1-1* y *ccz1a/b* de *A. thaliana*.
- Las proteínas codificadas por los genes *SchMON1* y *SchCCZ1* mostraron localizaciones subcelulares coincidentes en los endosomas tempranos y endosomas tardíos, lo que sugiere que ambas podrían actuar sobre la vía de tráfico pre-vacuolar.
- La actividad órgano específica del promotor *pRaíz* (*pUGT*) de *Arabidopsis thaliana* no se ve afectada por estrés salino ni por la aplicación exógena de ABA.
- La expresión y co-expresión radicular de *SchMON1* y *SchCCZ1* incrementa la tolerancia a estrés salino de *A. thaliana* de manera independiente de la fitohormona ABA, mediante mecanismos aún desconocidos.
- En los tres genotipos transgénicos, la tasa endocítica de células radiculares se ve incrementada, y favorecida producto de cambios positivos en la expresión de genes involucrados en ella como, por ejemplo, *AtRabG3f*.
- Las raíces de los tres genotipos transgénicos tienen reducido contenido de H₂O₂, lo cual se correlaciona con el incremento en la expresión de genes relacionados con mecanismo de detoxificación enzimática, como *AtSOD1* y *AtAPX*.

- Mayor capacidad para compartimentar Na^+ presentan las vacuolas en las raíces de los genotipos transgénicos debido al incremento de la tasa endocítica, la actividad autofágica y cambios positivos en la expresión de *AtNHX1*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, P.K., Agarwal, P., Jain, P., Jha, B., Reddy, M.K., & Sopory, S.K.** (2008). Constitutive overexpression of a stress-inducible small GTP-binding protein PgRab7 from *Pennisetum glaucum* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* **27**:105–115.
- Agorio, A., Giraudat, J., Bianchi, M.W., Marion, J., Espagne, C., Castaings, L., Lelièvre, F., Curie, C., Thomine, S., Merlot, S.** (2017). Phosphatidylinositol 3-phosphate-binding protein AtPH1 controls the localization of the metal transporter NRAMP1 in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **114**:E3354–E3363.
- Ahmad, P., Jaleel, C.A., Salem, M.A., Nabi, G., Sharma, S.** (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol* **30**:161–175.
- Ahmed, I., Yadav, D., Shukla, P., Vineeth, T.V., Sharma, P. C., Kirti, P.B.** (2017). Constitutive expression of *Brassica juncea* annexin, *AnnBj2* confers salt tolerance and glucose and ABA insensitivity in mustard transgenic plants. *Plant Sci* **265**:12–28.
- Amack, S.C., & Antunes, M.S.** (2020). CaMV35S promoter – A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Curr Plant Biol* **24**:100179.
- Apse, M., Blumwald, E.** (2002). Engineering salt tolerance in plants. *Curr Opin Biotechnol* **13**:146-150.
- Apse, M., Blumwald, E.** (2007). Na⁺ transport in plants. *FEBS Lett* **581**:2247-2254.
- Asaoka, R., Uemura, T., Ito, J., Fujimoto, M., Ito, E., Ueda, T., Nakano, A.** (2013). Arabidopsis RABA1 GTPases are involved in transport between the trans-Golgi network and the plasma membrane, and are required for salinity stress tolerance. *Plant J* **73**:240–249.
- Assaha, D., Ueda, A., Saneoka, H., Al-Yahyai, R., Yaish, M. W.** (2017). The role of Na⁺ and K⁺ transporters in salt stress adaptation in glycophytes. *Front Physiol* **8**:509.
- Assani, A., Moundanga, S., Beney, L., Gervais, P.** (2009) Vesicle formation in the membrane of onion cells (*Allium cepa*) during rapid osmotic dehydration. *Ann Bot* **104**:1389–1395.
- Biała, W., Jasiński, M.** (2018). The Phenylpropanoid Case - It Is Transport That Matters. *Front Plant Sci* **9**:1610.
- Bandmann, V., Homann, U.** (2012). Clathrin-independent endocytosis contributes to uptake of glucose into BY-2 protoplasts. *Plant J* **70**:578–584.
- Bar, M., Leibman, M., Schuster, S., Pitzhadza, H., Avni, A.** (2013) EHD1 Functions in Endosomal Recycling and Confers Salt Tolerance. *PLoS ONE* **8**:e54533.

- Baral, A., Irani, N., Fujimoto, M., Nakano, A., Mayor, S., Mathew, M.** (2015a). Salt-induced remodeling of spatially restricted clathrin-independent endocytic pathways in Arabidopsis root. *Plant Cell* **27**:1297-1315.
- Baral, A., Shruthi, K., Mathew, M.** (2015b). Vesicular trafficking and salinity responses in plants. *IUBMB Life* **67**:677-686.
- Bassil, E., Coku, A., Blumwald, E.** (2012). Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na⁺/H⁺ antiporters in plant growth and development. *J Exp Bot* **63**:5727–5740.
- Bassil, E., Ohto, M., 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. *Plant Cell* **23**:224-239.
- Behnam, B., Kikuchi, A., Celebi-Toprak, F., Yamanaka, S., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. Watanabe, K.** (2006) The Arabidopsis DREB1A gene driven by the stress-inducible rd29A promoter increases salt-stress tolerance in tetrasomic tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) in proportion to its copy number. *Plant Biotechnol* **23**: 169–177.
- Belda-Palazon, B., Rodriguez, L., Fernandez, M.A., Castillo, M. C., Anderson, E. M., Gao, C., Gonzalez-Guzman, M., Peirats-Llobet, M., Zhao, Q., De Winne, N., Gevaert, K., De Jaeger, G., Jiang, L., León, J., Mullen, R.T., Rodriguez, P.L.** (2016). FYVE1/FREE1 interacts with the PYL4 ABA receptor and mediates its delivery to the vacuolar degradation pathway. *Plant Cell* **28**:2291–2311.
- Belda-Palazón, B., Rodriguez, P.L.** (2020). Degradation of abscisic acid receptors through the endosomal pathway. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2177, 35–48.
- Bhullar, S., Datta, S., Advani, S., Chakravarthy, S., Gautam, T., Pental, D., Burma, P.K.** (2007). Functional analysis of cauliflower mosaic virus 35S promoter: re-evaluation of the role of subdomains B5, B4 and B2 in promoter activity. *Plant Biotech J* **5**:696–708.
- Bielach, A., Hrtyan, M., Tognetti, V.B.** (2017). Plants under Stress: Involvement of Auxin and Cytokinin. *Int J Mol Sci* **18**:1427.
- Bojorquez-Quintal, E., Velarde-Buendia, A., Ku-González, Á., Carillo-Pech, M., Ortega-Camacho, D., Echevarría-Machado, I., Pottosin, I., Martínez-Estévez, M.** (2014). Mechanisms of salt tolerance in habanero pepper plants (*Capsicum chinense* Jacq.): proline accumulation, ions dynamics and sodium root-shoot partition and compartmentation. *Frontiers in Plant Science* **5**: 605.

- Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L., Muday, G.K. (2001).** Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in arabidopsis. *Plant Physiol* **126**:524–535.
- Bottanelli, F., Foresti, O., Hanton, S., Denecke, J. (2011).** Vacuolar transport in tobacco leaf epidermis cells involves a single route for soluble cargo and multiple routes for membrane cargo. *Plant Cell* **23**:3007-3025.
- Bottanelli, F., Gershlick, D. C., Denecke, J. (2012).** Evidence for sequential action of Rab5 and Rab7 GTPases in prevacuolar organelle partitioning. *Traffic* **13**:338–354.
- Bueso, E., Rodriguez, L., Lorenzo-Orts, L., Gonzalez-Guzman, M., Sayas, E., Muñoz-Bertomeu, J., Ibañez, C., Serrano, R., & Rodriguez, P.L. (2014).** The single-subunit RING-type E3 ubiquitin ligase RSL1 targets PYL4 and PYR1 ABA receptors in plasma membrane to modulate abscisic acid signaling. *Plant J* **80**:1057–1071.
- Byrt, C.S., Xu, B., Krishnan, M., Lightfoot, D. J., Athman, A., Jacobs, A. K., Watson-Haigh, N. S., Plett, D., Munns, R., Tester, M., Gilliam, M. (2014).** The Na⁽⁺⁾ transporter, TaHKT1;5-D, limits shoot Na⁽⁺⁾ accumulation in bread wheat. *The Plant J* **80**:516–526.
- Cabrera, M., Nordmann, M., Perz, A., Schmedt, D., Gerondopoulos, A., Barr, F., Piehler, J., Engelbrecht-Vandré, S., Ungermann, C. (2014).** The Mon1-Ccz1 GEF activates the Rab7 GTPase Ypt7 via a longin-fold-Rab interface and association with PI3P-positive membranes. *J Cell Sci* **127**:1043–1051.
- Chandrasekharan, M.B., Bishop, K.J., Hall, T.C. (2003).** Module-specific regulation of the beta-phaseolin promoter during embryogenesis. *Plant J* **33**:853–866.
- Chen, C., Heo, J.B. (2018)** Overexpression of Constitutively Active OsRab11 in Plants Enhances Tolerance to High Salinity Levels. *J Plant Biol* **61**:169–176.
- Chen, F., Ro, D. K., Petri, J., Gershenzon, J., Bohlmann, J., Pichersky, E., Tholl, D. (2004).** Characterization of a root-specific Arabidopsis terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole. *Plant Physiol* **135**:1956–1966.
- Chen, M., Yang, Z., Liu, J., Zhu, T.T., Wei, X.C., Fan, H., Wang, B. (2018).** Adaptation mechanism of salt excluders under saline conditions and its applications. *Int J Mol Sci* **19**:3668.
- Chen, S., Wu, F., Li, Y., Qian, Y., Pan, X., Li, F., Wang, Y., Wu, Z., Fu, C., Lin, H., Yang, A. (2019).** NtMYB4 and NtCHS1 Are Critical Factors in the Regulation of Flavonoid Biosynthesis and Are Involved in Salinity Responsiveness. *Front Plant Sci* **10**:178.

- Chen, X., Irani, N. G., Friml, J.** (2011). Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. *Curr Opin Plant Biol* **14**:674–682.
- Cheng, Y.W., Kong, X.W., Wang, N., Wang, T.T., Chen, J., Shi, Z.Q.** (2020). Thymol confers tolerance to salt stress by activating anti-oxidative defense and modulating Na⁺ homeostasis in rice root. *Ecotoxicol Environ Saf* **188**:109894.
- Choi, W. G., Toyota, M., Kim, S. H., Hilleary, R., Gilroy, S.** (2014). Salt stress-induced Ca²⁺ waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. *Proc Natl Acad Sci* **111**:6497–6502.
- Choudhary, A., Kumar, A., Kaur, N.** (2019). ROS and oxidative burst: Roots in plant development. *Plant Divers* **42**:33–43.
- Christensen, A.H., Quail, P.H.** (1996). Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res* **5**:213–218.
- Clough, S., Bent, A.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**:735-743.
- Cui, Y., Zhao, Q., Gao, C., Ding, Y., Zeng, Y., Ueda, T., Nakano, A., Jiang, L.** (2014). Activation of the Rab7 GTPase by the MON1-CCZ1 complex is essential for PVC-to-Vacuole trafficking and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**:2080-2097.
- Cui, Y., Shen, J., Gao, C., Zhuang, X., Wang, J., Jiang, L.** (2016a). Biogenesis of plant prevacuolar multivesicular bodies. *Mol Plant* **9**:774–786.
- Cui, Y., Zhao, Q., Xie, H., Wong, W., Wang, X., Gao, C., Ding, Y., Tan, Y., Ueda, T., Zhang, Y., Jiang, L.** (2016b) MONENSIN SENSITIVITY 1 (MON1)/CALCIUM CAFFEINE ZINC SENSITIVITY 1 (CCZ1)-mediated Rab7 activation regulates tapetal programmed cell death and pollen development. *Plant Physiol* **73**:206-218.
- Das, P., Lakra, N., Nutan, K.K., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A.** (2019). A unique bZIP transcription factor imparting multiple stress tolerance in Rice. *Rice* **12**:58.
- Datta, K., Baisakh, N., Ganguly, M., Krishnan, S., Yamaguchi Shinozaki, K., Datta, S.K.** (2012). Overexpression of *Arabidopsis* and rice stress genes' inducible transcription factor confers drought and salinity tolerance to rice. *Plant Biotech J* **10**:579–586.
- Deinlein, U., Stephan, A., Hoirie, T., Luo, W., Xu, G., Schroeder, J.** (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends Plant Sci* **19**:371-379.
- Deng, S., Sun, J., Zhao, R., Ding, M., Zhang, Y., Sun, Y., Wang, W., Tan, Y., Liu, D., Ma, X., Hou, P., Wang, M., Lu, C., Shen, X., & Chen, S.** (2015). *Populus euphratica*

APYRASE2 Enhances Cold Tolerance by Modulating Vesicular Trafficking and Extracellular ATP in Arabidopsis Plants. *Plant Physiol* **169**:530–548.

- Di Rubbo, S., Irani, N.G., Kim, S.Y., Xu, Z. Y., Gadeyne, A., Dejonghe, W., Vanhoutte, I., Persiau, G., Eeckhout, D., Simon, S., Song, K., Kleine-Vehn, J., Friml, J., De Jaeger, G., Van Damme, D., Hwang, I., Russinova, E.** (2013). The clathrin adaptor complex AP-2 mediates endocytosis of brassinosteroid insensitive1 in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**:2986–2997.
- Ebine, K., Inoue, T., Ito, J., Ito, E., Uemure, T., Goh, T., Abe, H., Sato, K., Nakano, A., Ueda, T.** (2014). Plant vacuolar trafficking occurs through distinctly regulated pathways. *Curr Bio* **24**:1375-1382.
- Ebine, K., Fujimoto, M., Okatani, Y., Nishiyama, T., Goh, T., Ito, E., Dainobu, T., Nishitani, A., Uemura, T., Sato, M., Thordal-Christensen, H., Tsutsumi, N., Nakano, A., Ueda, T.** (2011) A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat Cell Biol* **13**:853-859.
- Fan, W., Deng, G., Wang, H., Zhang, H., Zhang, P.** (2015) Elevated compartmentalization of Na⁺ into vacuoles improves salt and cold stress tolerance in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Physiol Plant* **154**:560-71.
- Feiguelman, G., Fu, Y., Yalovsky, S.** (2018). ROP GTPases structure-function and signaling pathways. *Plant Physiol* **176**:57–79.
- Feraru, E., Paciorek, T., Feraru, M.I., Zwiewka, M., De Groodt, R., De Rycke, R., Kleine-Vehn, J., Friml, J.** (2010). The AP-3 β adaptin mediates the biogenesis and function of lytic vacuoles in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**:2812–2824.
- Ficker, M., Wemmer, T., Thompson, R.D.** (1997). A promoter directing high level expression in pistils of transgenic plants. *Plant Mol Biol* **35**:425–431.
- Filiz, E., Ilker, I., Adnan, I., Emin, M., Sen, U., Yalcin, B.** (2019). Abiotic stress-induced regulation of antioxidant genes in different Arabidopsis ecotypes: microarray data evaluation. *Biotechnol Biotechnol Equip* **33**:128-143.
- Flowers, S., Galal, H., Bromham, L.** (2010). Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Funct Plant Biol* **37**:604-612.
- Galvan-Ampudia, C. S., Julkowska, M. M., Darwish, E., Gandullo, J., Korver, R. A., Brunoud, G., Haring, M. A., Munnik, T., Vernoux, T., Testerink, C.** (2013). Halotropism is a response of plant roots to avoid a saline environment. *Curr Biol* **23**:2044–2050.
- Ganguly, M., Roychoudhury, A., Sarkar, S.N., Sengupta, D.N., Datta, S.K., Datta, K.** (2011). Inducibility of three salinity/abscisic acid regulated promoters in transgenic rice with gusA reporter gene. *Plant Cell Rep* **30**:1617–1625.

- Gao, C., Luo, M., Zhao, Q., Yang, R., Cui, Y., Zeng, Y., Xia, J., Jiang, L.** (2014). A unique plant ESCRT component, FREE1, regulates multivesicular body protein sorting and plant growth. *Curr Biol* **24**:2556–2563.
- Gaxiola, R., Sanchez, C., Paez-Valencia, J., Elser, J.** (2012). H⁺-PPases and Pi limitation. Genetic Manipulation of a "Vacuolar" H⁺-PPase: From Salt Tolerance to Yield Enhancement Under Phosphorus-Deficient Soils. *Plant Physiol* **159**:3-11.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., Jürgens, G.** (2003). The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**:219–230.
- Goh, T., Uchida, W., Arakawa, S., Ito, E., Dainobu, T., Ebine, K., Takeuchi, M., Sato, K., Ueda, T., Nakano, A.** (2007). VPS9a, the common activator for two distinct types of Rab5 GTPases, is essential for the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19**:3504-3515.
- Golani, Y., Kaye, Y., Gilhar, O., Ercetin, M., Gillaspay, G., Levine, A.** (2013). Inositol polyphosphate phosphatidylinositol 5-phosphatase9 (At5ptase9) controls plant salt tolerance by regulating endocytosis. *Mol Plant* **6**:1781–1794.
- Grebe, M., Xu, J., Möbius, W., Ueda, T., Nakano, A., Geuze, H.J., Rook M.B., Scheres, B.** (2003). Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr Biol* **13**:1378–1387.
- Gupta, B., Huang, B.** (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int. J Genom* **2014**:701596.
- Hamaji, K., Nagira, M., Yoshida, K., Ohnishi, M., Oda, Y., Uemura, T., Goh, T., Sato, M., Morita, M., 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 Physiol* **50**:2023-2033.
- Han, F., Peng, Y., Xu, L., Xiao, P.** (2014). Identification, characterization, and utilization of single copy genes in 29 angiosperm genomes. *BMC genomics* **15**:504.
- Hao, H., Fan, L., Chen, T., Li, R., Li, X., He, Q., Botella, M., Lin, J.** (2014) Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RbohD dynamics and activity in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**:1729–1745.
- Hasegawa, P.** (2013). Sodium (Na⁺) Homeostasis and Salt Tolerance of Plants. *Env Exp Bot* **92**:19-31.

- Huang, W., Ratkowsky, D.A., Hui, C., Wang, P., Su, J., Shi, P.** (2019). Leaf fresh weight versus dry weight: which is better for describing the scaling relationship between leaf biomass and leaf area for broad-leaved plants? *Forests* **10**:256.
- Huo, L. Q., Guo, Z. J., Wang, P., Zhang, Z. J., Jia, X., Sun, Y. M., Sun, X., Gong, X., Ma, F.** (2020). MdATG8i functions positively in apple salt tolerance by maintaining photosynthetic ability and increasing the accumulation of arginine and polyamines. *Environ Exp Bot* **172**:103989
- Inoue, T., Kondo, Y., Naramoto, S., Nakano, A., Ueda, T.** (2013). RAB5 activation is required for multiple steps in *Arabidopsis thaliana* root development. *Plant Cell Physiol* **54**:1648–1659.
- Ito, E., Ebine, K., Choi, S. W., Ichinose, S., Uemura, T., Nakano, A., Ueda, T.** (2018). Integration of two RAB5 groups during endosomal transport in plants. *eLife* **7**:e34064.
- Isayenkov, S.V., Maathuis, F.J.M.** (2019). Plant salinity stress: many unanswered questions remain. *Front Plant Sci* **10**:80.
- Jacoby, R.P., Taylor, N.L., Millar, A.H.** (2011). The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. *Trends Plant Sci* **16**:614–623.
- Ji, H., Pardo, J., Batellic, G., Van Oostend, M., Bressan, R., Li, X.** (2013). The salt overly sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Mol. Plant* **6**:275-286.
- Jia, H., Zhang, S., Ruan, M. Wang, Y., Wang, C.** (2012) Analysis and application of RD29 genes in abiotic stress response. *Acta Physiol Plant* **34**:1239–1250.
- Jiang, K., Moe-Lange, J., Hennet, L., Feldman, L.J.** (2016) Salt stress affects the redox Status of *Arabidopsis* root meristems. *Front Plant Sci* **7**:81.
- Jiang, P., Zhang, K., Ding, Z., He, Q., Li, W., Zhu, S., Cheng, W., Zhang, K., Li, K.** (2018). Characterization of a strong and constitutive promoter from the *Arabidopsis* serine carboxypeptidase-like gene *AtSCPL30* as a potential tool for crop transgenic breeding. *BMC Biotech* **18**:59.
- Jiang, X., Leidi, E., Pardo, J.** (2010). How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? *Plant Sign Beh* **5**:792–795.
- 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., Zhou, W., Swift, G., Zhang, H., Vo-Dinh, T., Hu, Z., Siedow, J., Pei, Z.M.** (2019). Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca²⁺ influx. *Nature* **572**:341–346.

- Jin, B., Sheng, Z., Muhammad, I., Chen, J., Yang, H.** (2019). Cloning and functional analysis of the promoter of a stress-inducible gene (*Zmap*) in maize. *Plos one*. **14**:e0211941.
- Kader, M.A., Lindberg, S.** (2010). Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant Sign Beh* **5**:233–238.
- Kakrana, A., Kumar, A., Satheesh, V., Abdin, M. Z., Subramaniam, K., Bhattacharya, R. C., Srinivasan, R., Sirohi, A., Jain, P.K.** (2017). Identification, validation and utilization of novel nematode-responsive root-specific promoters in arabidopsis for inducing host-delivered RNAi mediated root-knot nematode resistance. *Front Plant Sci* **8**:2049.
- Kashyap, S. P., Prasanna, H. C., Kumari, N., Mishra, P., Singh, B.** (2020). Understanding salt tolerance mechanism using transcriptome profiling and de novo assembly of wild tomato *Solanum chilense*. *Sci Rep* **10**:15835.
- Kelly, B.T., Graham, S.C., Liska, N., Dannhauser, P., Höning, S., Ungewickell, E.J., Owen, D.J.** (2014). Clathrin adaptors. AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science* **345**:459-463.
- Kiontke, S., Langemeyer, L., Kuhlee, A., Schuback, S., Raunser, S., Ungermann, C., Kümmel, D.** (2017) Architecture and mechanism of the late endosomal Rab7-like Ypt7 guanine nucleotide exchange factor complex Mon1–Ccz1. *Nat Commun* **8**:14034.
- Kitakura, S., Adamowski, M., Matsuura, Y., Santuari, L., Kouno, H., Arima, K., Hardtke, C.S., Friml, J., Kakimoto, T., Tanaka, H.** (2017). BEN3/BIG2 ARF GEF is involved in brefeldin A-sensitive trafficking at the trans-Golgi network/early endosome in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **58**:1801–1811.
- Koncz, C., Schell, J.** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molec Gen Genet* **204**:383–396.
- Koyama, T., Ono, T., Shimizu, M., Jinbo, T., Mizuno, R., Tomita, K., Mitsukawa, N., Kawazu, T., Kimura, T., Ohmiya, K., Sakka, K.** (2005). Promoter of *Arabidopsis thaliana* phosphate transporter gene drives root-specific expression of transgene in rice. *J Biosci Bioeng* **99**:38–42.
- Krüger, F., Schumacher K.** (2018). Pumping up the volume – vacuole biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Sem Cell Develop Biol* **80**:106–112.
- Kurusu, T., Kuchitsu, K., Tada, Y.** (2015). Plant signaling networks involving Ca(2+) and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress. *Front Plant Sci* **6**:427.

- Kwon, S.I., Cho, H.J., Jung, J.H., Yoshimoto, K., Shirasu, K., Park, O.K.** (2010). The Rab GTPase RabG3b functions in autophagy and contributes to tracheary element differentiation in Arabidopsis. *Plant J* **64**:151–164.
- Kwon, S.I., Cho, H.J., Kim, S.R., Park, O.K.** (2013). The Rab GTPase RabG3b positively regulates autophagy and immunity-associated hypersensitive cell death in Arabidopsis. *Plant Physiol* **161**:1722–1736.
- Lee, S.Y., Boon, N.J., Webb, A.A., Tanaka, R.J.** (2016). Synergistic activation of RD29A via integration of salinity stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **57**:2147–2160.
- Leshem, Y., Levine, A.** (2007). Intracellular ROS: What does it do there? *Plant Sign Beh* **2**: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. *Plant J* **51**:185–197.
- 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. *Proc Natl Acad Sci* **103**:18008-18013.
- Li, X., Wang, X., Yang, Y., Li, R., He, Q., Fang, X., Luu, D. T., Maurel, C., Lin, J.** (2011). Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of Arabidopsis plasma membrane aquaporin regulation. *Plant Cell* **23**:3780–3797.
- Li, R., Liu, P., Wan, Y., Chen, T., Wang, Q., Mettbach, U., Baluska, F., Samaj, J., Fang, X., Lucas, W.J., Lin, J.** (2012). A membrane microdomain-associated protein, Arabidopsis Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development. *Plant Cell* **24**:2105–2122.
- Li, H., Li, Y., Zhao, Q., Li, T., Wei, J., Li, B., Shen, W., Yang, C., Zeng, Y., Rodriguez, P. L., Zhao, Y., Jiang, L., Wang, X., Gao, C.** (2019). The plant ESCRT component FREE1 shuttles to the nucleus to attenuate abscisic acid signalling. *Nat plant* **5**:512–524.
- Li, Z., Liu, D.** (2012). ROPGEF1 and ROPGEF4 are functional regulators of ROP11 GTPase in ABA-mediated stomatal closure in Arabidopsis. *FEBS Lett* **586**:1253–1258.
- Li, Z., Waadt, R., Schroeder, J. I.** (2016). Release of GTP Exchange Factor Mediated Down-Regulation of Abscisic Acid Signal Transduction through ABA-Induced Rapid Degradation of RopGEFs. *PLoS Biol* **14**:e1002461.

- Liang, W., Ma, X., Wan, P., Liu, L.** (2018). Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochem Biophys Res Commun* **495**:286–291.
- Livak, K., Schmittgen, T.** (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Meth* **25**:402-408.
- Logemann, E., Birkenbihl, R., Ülker, B., Somssich, I.** (2006). An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol. *Plant Methods* **2**:16.
- Lou, L., Yu, F., Tian, M., Liu, G., Wu, Y., Wu, Y., Xia, R., Pardo, J. M., Guo, Y., Xie, Q.** (2020). ESCRT-I Component VPS23A sustains salt tolerance by strengthening the SOS module in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **13**:1134–1148.
- Luo, J., Yu, C.M., Yan, M., Chen, Y.H.** (2020). Molecular characterization of the promoter of the stress-inducible *ZmMYB30* gene in maize. *Biol Plantarum* **64**:200-210.
- Luo, L., Zhang, P., Zhu, R., Fu, J., Su, J., Zheng, J., Wang, Z., Wang, D., Gong, Q.** (2017). Autophagy is rapidly induced by salt stress and is required for salt tolerance in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* **8**:1459.
- Luo, X., Wu, J., Li, Y., Nan, Z., Guo, X., Wang, Y., Zhang, A., Wang, Z., Xia, G., Tian, Y.** (2013). Synergistic effects of *GhSOD1* and *GhCAT1* overexpression in cotton chloroplasts on enhancing tolerance to methyl viologen and salt stresses. *PLoS One* **8**:e54002.
- Maathuis, F., Sanders, D.** (2001) Sodium uptake in *Arabidopsis* roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiol* **127**:1617-1625.
- Madrid-Espinoza, J., Salinas-Cornejo, J., Ruiz-Lara, S.** (2019). The RabGAP gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*) and wild relatives: identification, interaction networks, and transcriptional analysis during plant development and in response to salt stress. *Genes* **10**:638.
- 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 ROS pathways with distinct impacts on protein nanodomains and diffusion. *Plant Physiol* **179**: 1581–1593.
- Martins, S., Dohmann, E. M., Cayrel, A., Johnson, A., Fischer, W., Pojer, F., Satiat-Jeunemaître, B., Jaillais, Y., Chory, J., Geldner, N., Vert, G.** (2015). Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination. *Nat commun* **6**:6151.

- Mazel, A., Leshem, Y., Tiwari, B., Levine, A.** (2004). Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol* **134**:118-128.
- Mayer, U., Buettner, G., Jürgens G.** (1993). Apical-basal pattern formation in the Arabidopsis embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Develop* **117**:149-162
- Menzel, W., Stenzel, I., Helbig, L. M., Krishnamoorthy, P., Neumann, S., Eschen-Lippold, L., Heilmann, M., Lee, J., Heilmann, I.** (2019). A PAMP-triggered MAPK cascade inhibits phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate production by PIP5K6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **224**:833–847.
- Mei Y.** (2014) Arabidopsis PIP5K2 Is Involved in Salt Tolerance. In: Functional Characterization of Arabidopsis Phosphatidylinositol Monophosphate 5-kinase 2 in Lateral Root Development, Gravitropism and Salt Tolerance. Springer Theses (Recognizing Outstanding Ph.D. Research), vol **417**. Springer, Dordrecht.
- Mimura, T., Kura-Hotta, M., Tsujimura, T., Ohnishi, M., Miura, M., Okazaki, Y., Mimura, M., Maeshima, M., Washitani-Nemoto, S.** (2003). Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress. *Planta* **216**:397–402.
- Mitou, G., Budak, H., Gozuacik, D.** (2009). Techniques to study autophagy in plants. *Int J Plant Genomics*, **2009**:451357.
- Moller, I.S., Tester, M.** (2007). Salinity tolerance of Arabidopsis: a good model for cereals? *Trends Plant Sci* **12**:534-540
- Msanne, J., Lin, J., Stone, J. M., Awada, T.** (2011). Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana* *RD29A* and *RD29B* genes and evaluation of transgenes. *Planta* **234**:97–107.
- Muchate, N.S., Nikalje, G.C., Rajurkar, N.S. Suprasanna, P., Nikam, T.** (2016). Plant Salt Stress: Adaptive Responses, Tolerance Mechanism and Bioengineering for Salt Tolerance. *Bot Rev* **82**:371–406.
- Munns, R., Tester, M.** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **59**:651-658.
- Nguyen, H.M., Sako, K., Matsui, A., Suzuki, Y., Mostofa, M.G., Ha, C.V., Tanaka, M., Tran, L.P., Habu, Y., Seki, M.** (2017). Ethanol Enhances High-Salinity Stress Tolerance by Detoxifying Reactive Oxygen Species in *Arabidopsis thaliana* and Rice. *Front Plant Sci* **8**:1001.
- Nguyen, L.V., Seok, H.Y., Woo, D.H., Lee, S.Y., Moon, Y.H.** (2018). Overexpression of the DEAD-Box RNA Helicase Gene *AtRH17* confers tolerance to salt stress in Arabidopsis. *Int J Mol Sci* **19**:3777.

- Nguyen, N.H., Kim, J.H., Kwon, J., Jeong, C.Y., Lee, W., Lee, D., Hong, S.W., Lee, H.** (2016). Characterization of *Arabidopsis thaliana* FLAVONOL SYNTHASE 1 (FLS1) -overexpression plants in response to abiotic stress. *Plant Physiol Biochem* **103**:133–142.
- Nguyen, N.T., Vu, H.T., Nguyen, T.T., Nguyen, L.-A.T., Nguyen, M.-C.D., Hoang, K.L., Nguyen, K.T., Quach, T.N.** (2019). Co-expression of *Arabidopsis AtAVPI* and *AtNHX1* to improve salt tolerance in soybean. *Crop Sci* **59**:1133–1143.
- Nielsen, E.** (2020). The Small GTPase Superfamily in Plants: A Conserved Regulatory Module with Novel Functions. *Ann Rev Plant Biol* **71**:247–272.
- Nieves-Cordones M., Al Shiblawi F.R., Sentenac H.** (2016). Roles and Transport of Sodium and Potassium in Plants. In: Sigel A., Sigel H., Sigel R. (eds) *The Alkali Metal Ions: Their Role for Life. Metal Ions in Life Sciences*, vol **16**. Springer, Cham.
- 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 physiol biochem* **119**:9–20.
- Nordmann, M., Cabrera, M., Perz, A., Bröcker, C., Ostrowicz, C., Engelbrecht-Vandré, S., Ungermann, C.** (2010). The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Curr Biol* **20**:1654–1659.
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T., Welin, B.V.** (2001). Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **45**: 263–279.
- Oh, D.H., Dassanayake, M., Haas, J.S., Kropornika, A., Wright, C., d'Urzo, M.P., Hong, H., Ali, S., Hernandez, A., Lambert, G.M., Inan, G., Galbraith, D.W., Bressan, R.A., Yun, D.J., Zhu, J.K., Cheeseman, J.M., Bohnert, H. J.** (2010). Genome structures and halophyte-specific gene expression of the extremophile *Thellungiella parvula* in comparison with *Thellungiella salsuginea* (*Thellungiella halophila*) and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **154**:1040–1052.
- Omidbakhshfard, M.A., Omranian, N., Ahmadi, F.S., Nikoloski, Z., Mueller-Roeber, B.** (2012). Effect of salt stress on genes encoding translation-associated proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* **7**:1095–1102.
- Orlova, Y.V., Sergienko, O.V., Khalilova, L.A. Voronko, A., Fomemkov, A., Nosov, A., Popova, L., Shuvalov, A., Ryabova, A., Balnokin, Y.** (2019) Sodium transport by endocytic vesicles in cultured *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. cells. *In Vitro Cell Dev Biol* **55**:359–370.

- Pan, W., Zheng, P., Zhang, C., Wang, W., Li, Y., Fan, T., Liu, Y., Cao, S.** (2020). The effect of ABRE BINDING FACTOR 4-mediated FYVE1 on salt stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Sci* **296**:110489.
- Park, H., Kim, W., Yun, D.** (2016a). A new insight of salt stress signaling in plant. *Mol Cell* **39**:447-459.
- Park, Y., Xu, Z.Y., Kim, S. Y., Lee, J., Choi, B., Lee, J., Kim, H., Sim, H.J., Hwang, I.** (2016b). Spatial Regulation of ABCG25, an ABA Exporter, Is an Important Component of the Mechanism Controlling Cellular ABA Levels. *Plant Cell* **28**:2528–2544.
- 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**:e97745.
- Peer, W. A., Murphy, A. S.** (2007). Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators?. *Trends Plant Sci* **12**:556–563.
- Peer, W. A., Blakeslee, J. J., Yang, H., Murphy, A. S.** (2011). Seven things we think we know about auxin transport. *Mol Plant*, **4**:487–504.
- Peethambaran, P.K., Glenz, R., Honinger, S., Shahinul, Islam, S.M., Hummel, S., Harter, K., Kolukisaoglu, U., Meynard D., Guiderdoni, E., Nick, P., Riemann, M.** (2018). Salt-inducible expression of *OsJAZ8* improves resilience against salt-stress. *BMC Plant Biol* **18**:311.
- Peng, X., Ding, X., Chang, T., Wang, Z., Liu, R., Zeng, X., Cai, Y., Zhu, Y.** (2014) Overexpression of a Vesicle Trafficking Gene, *OsRab7*, enhances salt tolerance in rice. *Sci World J* **12**:2014-483526.
- Pérez-Henríquez, P., Raikhel, N. V., Norambuena, L.** (2012). Endocytic trafficking towards the vacuole plays a key role in the auxin receptor SCF(TIR)-independent mechanism of lateral root formation in *A. thaliana*. *Mol Plant* **5**:1195–1209.
- Pizarro, L., Norambuena, L.** (2014). Regulation of protein trafficking: Posttranslational mechanisms and the unexplored transcriptional control. *Plant Sci* **225**:24-33.
- Porto, M.S., Pinheiro, M.P., Batista, V.G., dos Santos, R.C., Filho, P., de Lima, L.M.** (2014). Plant promoters: an approach of structure and function. *Mol Biotechnol* **56**:38–49.
- Potenza, C., Aleman, L. Sengupta-Gopalan, C.** (2014) Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell Dev Bio Plant* **40**:1–22

- Reguera, M., Bassil, E., Tajima, H., Wimmer, M., Chanoca, A., Otegui, M., Paris, N., Blumwald, E.** (2015) pH regulation by NHX-Type antiporters Is required for receptor-mediated protein trafficking to the vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **27**:1200–1217.
- Reyes, F., Buono, R., Otegui, M.** (2011). Plant endosomal trafficking pathways. *Curr Opin Plant Biol* **14**:666–673.
- Reynolds, G.D., Wang, C., Pan, J., Bednarek, S.Y.** (2018). Inroads into internalization: five years of endocytic exploration. *Plant Physiol* **176**: 208–218.
- Rodriguez-Furlan, C., Domozych, D., Qian, W., Enquist, P.A., Li, X., Zhang, C., Schenk, R., Winbigler, H.S., Jackson, W., Raikhel, N. V., Hicks, G.R.** (2019). Interaction between VPS35 and RABG3f is necessary as a checkpoint to control fusion of late compartments with the vacuole. *Proc Natl Acad Sci* **116**:21291–21301.
- Roy, S., Negrão, S., Tester, M.** (2014). Salt resistant crop plant. *Curr Opin Biotechnol* **26**:115-124.
- Sagor, G. H., Zhang, S., Kojima, S., Simm, S., Berberich, T., Kusano, T.** (2016). Reducing Cytoplasmic Polyamine Oxidase Activity in *Arabidopsis* Increases Salt and Drought Tolerance by Reducing Reactive Oxygen Species Production and Increasing Defense Gene Expression. *Front Plant Sci* **7**:214.
- Salazar, M., González, E., Casaretto, J.A., Casacuberta, J.M., Ruiz-Lara, S.** (2007). The promoter of the TLC1.1 retrotransposon from *Solanum chilense* is activated by multiple stress-related signaling molecules. *Plant Cell Rep*, **26**:1861–1868.
- 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 comparative analysis of the response to salt stress with wild relatives. *J Plant Physiol* **242**:153018.
- Saini, K., Abdelgawad, H., Markakis, M. N., Schoenaers, S., Asard, H., Prinsen, E., Beemster, G., Vissenberg, K.** (2017). Perturbation of Auxin Homeostasis and Signaling by PINOID Overexpression Induces Stress Responses in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* **8**:1308.
- Saito, C., Ueda, T.** (2009) Chapter 4: functions of RAB and SNARE proteins in plant life. *Int Rev Cell Mol Biol* **274**:183-233.
- Samaj, J., Baluska, F., Voigt, B., Schlicht, M., Volkmann, D., Menzel, D.** (2004). Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiol*, **135**:1150–1161.
- 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 Sci* **263**:1-11.
- Schubert, D., Lechtenberg, B., Forsbach, A., Gils, M., Bahadur, S., Schmidt, R.** (2004). Silencing in Arabidopsis T-DNA Transformants: The predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *Plant Cell* **16**:2561–2572.
- Schwihla, M., Korbei, B.** (2020). The beginning of the end: initial steps in the degradation of plasma membrane proteins. *Front Plant Sci* **11**:680.
- Semeradova, H., Montesinos, J.C., Benkova, E.** (2020). All roads lead to auxin: post-translational regulation of auxin transport by multiple hormonal pathways. *Plant Comm* **1**.
- Shen, J., Zeng, Y., Zhuang, X., Sun, L., Yao, X., Pimpl, P., Jiang, L.** (2013). Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Mol Plant* **6**:1419–1437.
- Shi, H., Quintero, F., Pardo, J., Zhu, J.** (2002). The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* **14**:465–477.
- Shkolnik-Inbar, D., Adler, G., Bar-Zvi, D.** (2013). ABI4 downregulates expression of the sodium transporter HKT1;1 in Arabidopsis roots and affects salt tolerance. *Plant J* **73**:993–1005.
- Silva-Navas, J., Moreno-Risueno, M.A., Manzano, C., Téllez-Robledo, B., Navarro-Neila, S., Carrasco, V., Pollmann, S., Gallego, F.J., Del Pozo, J.C.** (2016). Flavonols Mediate Root Phototropism and Growth through Regulation of Proliferation-to-Differentiation Transition. *Plant Cell* **28**:1372–1387.
- Singh, A., Jha, S.K., Bagri, J., Pandey, G.K.** (2015). ABA inducible rice protein phosphatase 2C confers ABA insensitivity and abiotic stress tolerance in Arabidopsis. *PLoS one*, **10**:e0125168.
- 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. *Front Plant Sci* **7**:737.
- Singh, M.K., Krüger, F., Beckmann, H., Brumm, S., Vermeer, J., Munnik, T., Mayer, U., Stierhof, Y.D., Grefen, C., Schumacher, K., Jürgens, G.** (2014). Protein delivery to vacuole requires SAND protein-dependent Rab GTPase conversion for MVB-vacuole fusion. *Curr Biol* **24**:1383–1389.
- Sottosanto, J.B., Saranga, Y., Blumwald, E.** (2007). Impact of AtNHX1, a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter, upon gene expression during short- and long-term salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **7**:18.

- Stam, R., Scheickl, D., Tellier, A.** (2017). The wild tomato species *Solanum chilense* shows variation in pathogen resistance between geographically distinct populations. *PeerJ* **5**:e2910
- Sunada, M., Goh, T., Ueda, T., Nakano, A.** (2015) Functional analyses of the plant-specific C-terminal region of VPS9a: the activating factor for RAB5 in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res* **129**:93-102.
- Sutka, M., Li, G., Boudet, J., Boursiac, Y., Dumas, P., Maurel, C.** (2011). Natural variation of root hydraulics in *Arabidopsis* grown in normal and salt-stressed conditions. *Plant Physiol* **155**:1264–1276.
- Sutter, J.U., Sieben, C., Hartel, A., Eisenach, C., Thiel, G., Blatt, M.R.** (2007). Abscisic acid triggers the endocytosis of the arabidopsis KAT1 K⁺ channel and its recycling to the plasma membrane. *Curr Biol* **17**:1396–1402.
- Sze, H., Chanroj, S.** (2018). Plant Endomembrane Dynamics: Studies of K⁺/H⁺ Antiporters Provide Insights on the Effects of pH and Ion Homeostasis. *Plant Physiol* **177**:875–895.
- Takano, J., Miwa, K., Yuan, L., von Wirén, N., Fujiwara, T.** (2005) Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. *Proc Natl Acad Sci* **102**:12276-12281.
- 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*. *Proc Natl Acad Sci* **115**:E2457–E2466.
- Tarte, V., Seok, H., Woo, D., Le, D., Tran, H., Balk, J., Lee, S., Chung, T., Moon, Y.** (2015) *Arabidopsis* Qc-SNARE gene AtSFT12 is involved in salt and osmotic stress responses and Na accumulation in vacuoles. *Plant Cell Rep* **34**:1127–1138.
- Tounsi, S., Ben Amar, S., Masmoudi, K., Sentenac, H., Brini, F., Véry, A.A.** (2016). Characterization of two HKT1;4 transporters from *Triticum monococcum* to elucidate the determinants of the wheat salt tolerance Nax1 QTL. *Plant Cell Physiol* **57**: 2047–2057.
- Tounsi, S., Feki, K., Saïdi, M.N., Maghrebi, S., Brini, F., Masmoudi, K.** (2018). Promoter of the TmHKT1;4-A1 gene of *Triticum monococcum* directs stress inducible, developmental regulated and organ specific gene expression in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *World J Microbiol Biotechnol* **34**:99.
- Tuteja N.** (2007). Abscisic Acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal Behav* **2**:135–138.

- Ueda, M., Matsui, A., Watanabe, S., Kobayashi, M., Saito, K., Tanaka, M., Ishida, J., Kusano, M., Seo, M., Seki, M.** (2019). Transcriptome Analysis of the Hierarchical Response of Histone Deacetylase Proteins That Respond in an Antagonistic Manner to Salinity Stress. *Front Plant Sci* **10**:1323.
- Ueda, M., Tsutsumi, N., Fujimoto, M.** (2016). Salt stress induces internalization of plasma membrane aquaporin into the vacuole in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* **474**:742-6.
- Ueda, T., Uemura, T., Sato, M.H., Nakano, A.** (2004). Functional differentiation of endosomes in *Arabidopsis* cells. *Plant J* **40**:783–789.
- Ueda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., Nakano, A.** (2001). Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* **20**:4730–4741.
- Uejima, T., Ihara, K., Goh, T., Ito, E., Sunada, M., Ueda, T., Nakano, A., Wakatsuki, S.** (2010). GDP-bound and nucleotide-free intermediates of the guanine nucleotide exchange in the Rab5·Vps9 system. *J Biol Chem* **285**:36689–36697.
- Uemura, T., Ueda, T.,** (2014). Plant vacuolar trafficking driven by RAB and SNARE proteins. *Curr Opin Plant Biol* **22**:116–121.
- Uemura, T.** (2016) Physiological roles of plant post-Golgi transport pathways in membrane trafficking. *Plant Cell Physiol* **57**:2013–2019.
- Valencia, J., Goodman, K., Otegui, M.** (2016). Endocytosis and endosomal trafficking in plants. *Annu Rev Plant Biol* **67**:309–335.
- Vernoud, V., Horton, A. C., Yang, Z., Nielsen, E.** (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**:1191–1208.
- Vijaybhaskar, V., Subbiah, V., Kaur, J., Vijayakumari, P., Siddiqi, I.** (2008). Identification of a root-specific glycosyl-transferase from *Arabidopsis* and characterization of its promoter. *J Biosci* **33**:185-193.
- Viotti, C., Bubeck, J., Stierhof, Y.D., Krebs, M., Langhans, M., van den Berg, W., van Dongen, W., Richter, S., Geldner, N., Takano, J., Jürgens, G., Vries, S., Robinson, D., Schumacher, K.** (2010) Endocytic and secretory traffic in *Arabidopsis* merge in the trans-Golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *Plant Cell* **22**:1344–1357.
- Walia, H., Wilson, C., Condamine, P., Liu, X., Ismail, A. M., Zeng, L., Wanamaker, S. I., Mandal, J., Xu, J., Cui, X., Close, T. J.** (2005). Comparative transcriptional profiling

of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiol* **139**:822–835.

- Wang, Q., Zhao, Y., Luo, W., Li, R., He, Q., Fang, X., Michele, R.D., Ast, C., Von Wirén N., Lin, J.** (2013). Single-particle analysis reveals shutoff control of the *Arabidopsis* ammonium transporter AMT1;3 by clustering and internalization. *Proc Natl Acad Sci* **110**:13204–13209.
- Wang, X., Xu, M., Gao, C., Zeng, Y., Cui, Y., Shen, W., Jiang, L.** (2020). The roles of endomembrane trafficking in plant abiotic stress responses. *J Integr Plant Biol* **62**:55–69.
- 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 Meth* **10**:19.
- Wu, H., Zhang, X., Giraldo, J.P., Shabala, S.** (2018). It is not all about sodium: revealing tissue specificity and signaling roles of potassium in plant responses to salt stress. *Plant Soil* **431**:1–17.
- Wu, M., Liu, H., Han, G., Cai, R., Pan, F., Xiang, Y.** (2017). A moso bamboo WRKY gene *PeWRKY83* confers salinity tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *Sci Rep* **7**:11721.
- Xu, P., Zang, A., Chen, H., & Cai, W.** (2016). The Small G protein AtRAN1 regulates vegetative growth and stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *PloS one* **11**:e0154787.
- Xue, S., Zou, J., Liu, Y., Wang, M., Zhang, C., Le, J.** (2019). Involvement of BIG5 and BIG3 in BRI1 trafficking reveals diverse functions of BIG-subfamily ARF-GEFs in plant growth and gravitropism. *Int J Mol Sci* **20**:2339.
- Yamamoto, Y.T., Taylor, C.G., Acedo, G.N., Cheng, C.L., Conkling, M.A.** (1991). Characterization of cis-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco. *Plant Cell* **3**:371–382.
- Yang, Q., Chen, Z., Zhou, X., Yin, H., Li, X., Xin, X., Hong, H., Zhu, J., Gong, Z.** (2009). Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Mol Plant* **2**:22–31.
- Yang, L., Wang, S., Sun, L., Ruan, M., Li, S., He, R., Zhang, W., Liang, C., Wang, X., Bi, Y.** (2019). Involvement of G6PD5 in ABA response during seed germination and root growth in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* **19**:44.

- Yáñez, M., S. Cáceres, S. Orellana, A. Bastías, I. Verdugo, S. Ruiz-Lara, J.A. Casaretto.** (2009). An abiotic stress-responsive bZIP transcription factor from wild and cultivated tomatoes regulates stress-related genes. *Plant Cell Rep* **28**:1497-1507.
- Yensen, N.** (2006). Halophyte uses for the twenty-first century. In *ecophysiology of high salinity tolerant plant tasks for vegetation science*. M.A. Khan and D. Weber eds. (Springer Netherlands). pp 367-396.
- Yin, C., Karim, S., Zhang, H., Aronsson, H.** (2017). Arabidopsis RabF1 (ARA6) is involved in salt stress and dark-induced senescence (DIS). *Int J Mol Sci* **18**:309.
- Yu, F., Lou, L., Tian, M., Li, Q., Ding, Y., Cao, X., Wu, Y., Belda-Palazon, B., Rodriguez, P.L., Yang, S., Xie, Q.** (2016). ESCRT-I component VPS23A affects ABA signaling by recognizing ABA receptors for endosomal degradation. *Mol Plant* **9**:1570-1582.
- Zhang, C., Hicks, G.R., Raikhel, N.V.** (2014). Plant vacuole morphology and vacuolar trafficking. *Frontiers Plant Sci* **5**:476.
- Zhou, A., Bu, Y., Takano, T., Zhang, X., Liu, S.** (2015). Conserved V-ATPase c subunit plays a role in plant growth by influencing V-ATPase-dependent endosomal trafficking. *Plant Biotechnol J* **14**:271-283.
- Zhou, S., Sauvé, 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*. *J Am Soc Hortic Sci* **136**:288–302.
- Zhu, J.** (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis. *Plant Physiol* **124**:941-948.
- Zhu, J.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**:247–273.
- Zhu, J.** (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* **6**:441–445.
- Zhu, Y., Ji, C., Cao, W., Shen, J., Zhao, Q., Jiang, L.** (2020). Identification and characterization of unconventional membrane protein trafficking regulators in Arabidopsis: A genetic approach. *J Plant Physiol* **252**:153229.
- Zouine, M., Maza, E., Djari, A., Lauvernier, M., Frasse, P., Smouni, A., Pirrello, J., Bouzayen, M.** (2017). TomExpress, a unified tomato RNA-Seq platform for visualization of expression data, clustering and correlation networks. *Plant J* **92**:727–735.

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*. *Mol Plant* **8**:1175–1187.

ANEXO

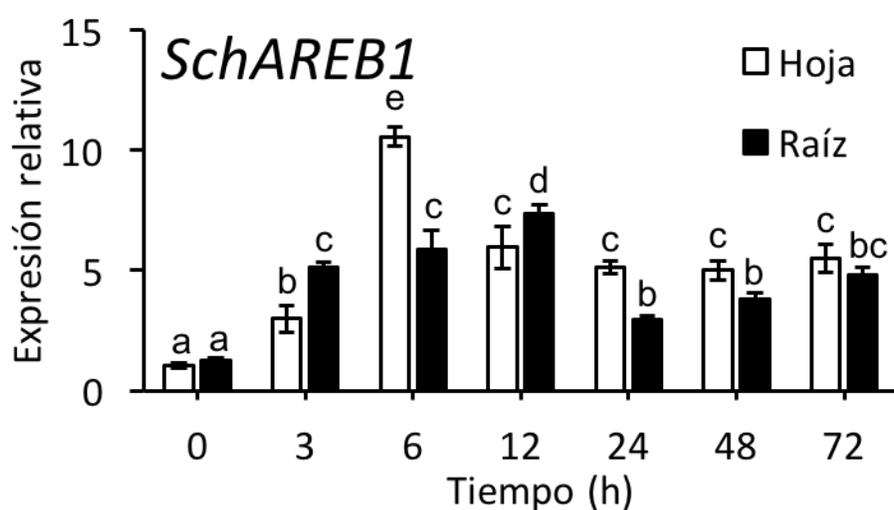


Figura S1. Evaluación de la expresión relativa de marcador de estrés *SchAREB1* en *S. chilense* sometida a estrés salino. Niveles de expresión relativa de *SchAREB1* fue evaluada mediante RT-qPCR a partir de cADN sintetizado desde ARN extraído de hojas (barras blancas) y raíces (barras negras) colectadas a los tiempos 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h de iniciado el ensayo de estrés salino 300 mM de NaCl. 3 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas fueron analizadas en cada tiempo y cada órgano. Los niveles de transcritos son relativos al tiempo 0 h en ambos casos.

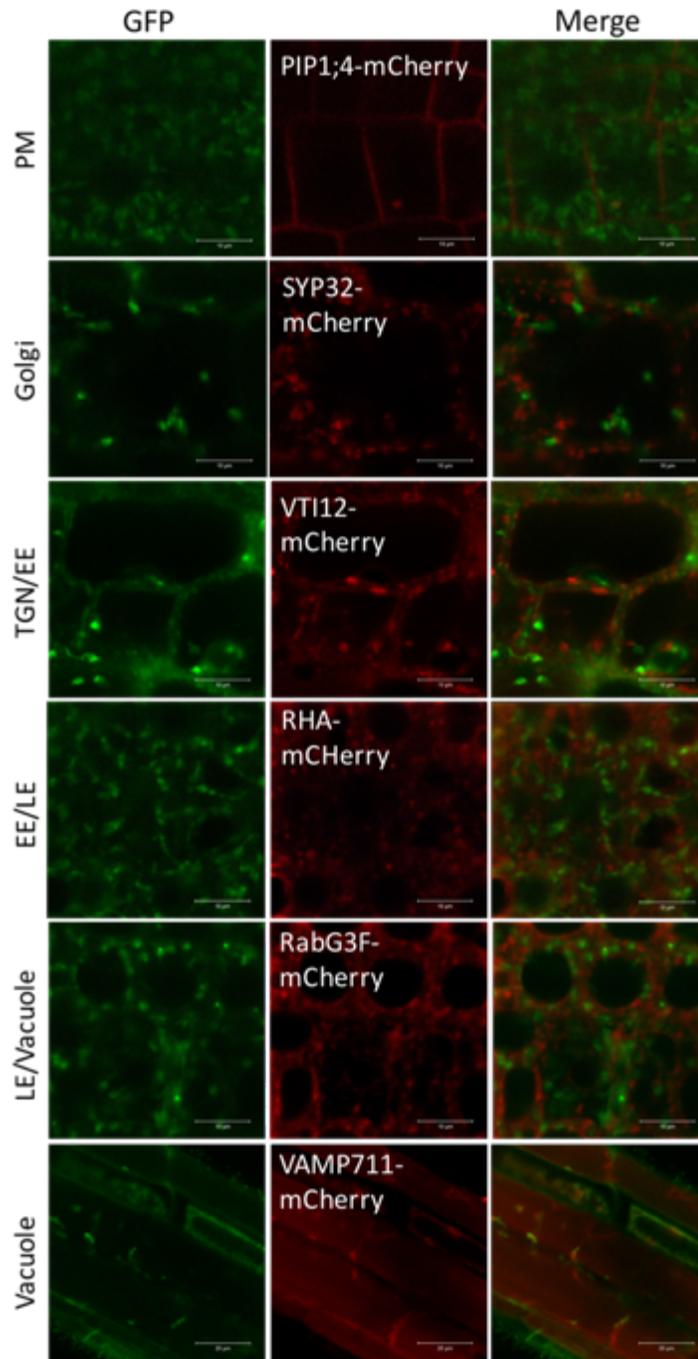
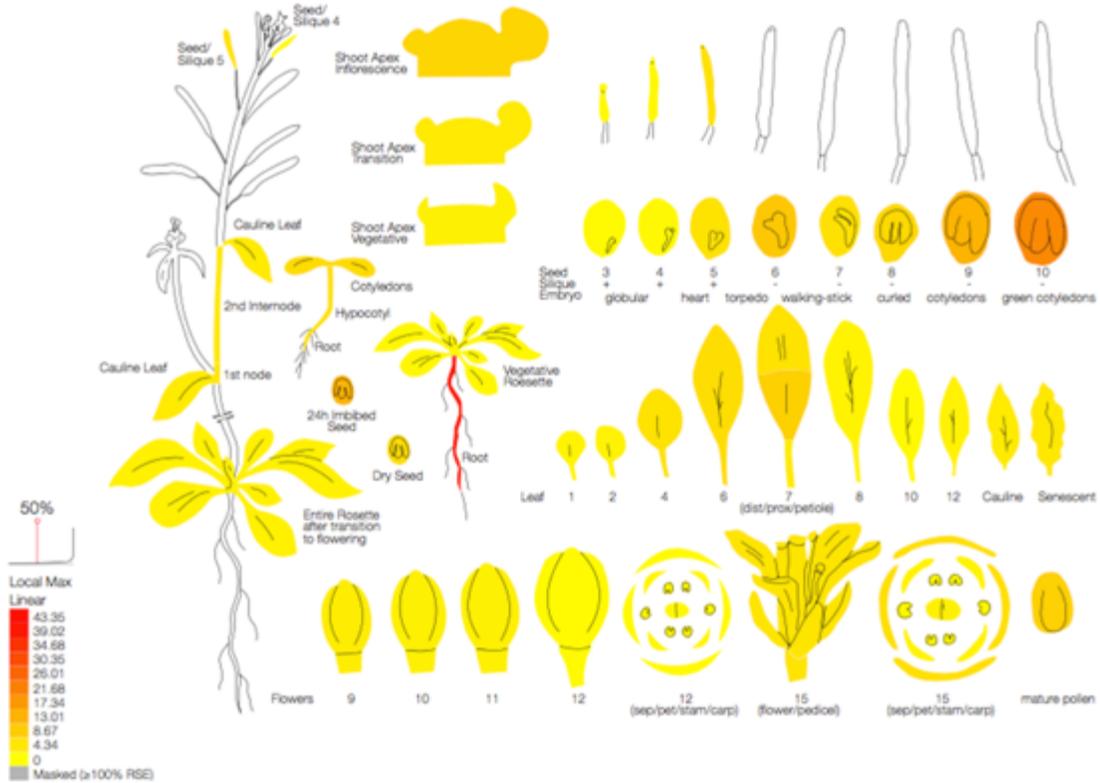


Figura S2. Localización subcelular de GFP en células radiculares de *A. thaliana*. En verde la localización de la Proteína Fluorescente Verde (GFP) en células radiculares de *A. thaliana*. En rojo, localización de marcadores subcelulares: PIP1;4-mCherry, SYP32-mCherry, VTI12-mCherry, RHA-mCherry, RabG3F-mCherry y VAMP711-mCherry. MP: Membrana plasmática, TGN: Trans-Golgi, EE: Endosoma temprano, LE: Endosoma tardío.

AtGenExpress eFP: AT1G73160



Salt Response



Control



140mM NaCl for 1hr



Figura S3. Patrón de expresión de UGT (At1g73160). Imágen superior: en tonalidades rojas se evidencia el patrón de expresión de UGT durante el desarrollo de *A. thaliana*. Imagen inferior izquierda: patrón de expresión de UGT en raíz durante una dinámica temporal de aplicación de 140 mM de NaCl desde 0 a 32 h. Imagen inferior derecha: patrón transcripcional en zonas y tejidos de la raíz en 140 mM de NaCl por 1 h. Datos obtenidos desde la base de datos de <http://bar.utoronto.ca> con la herramienta ePlants.

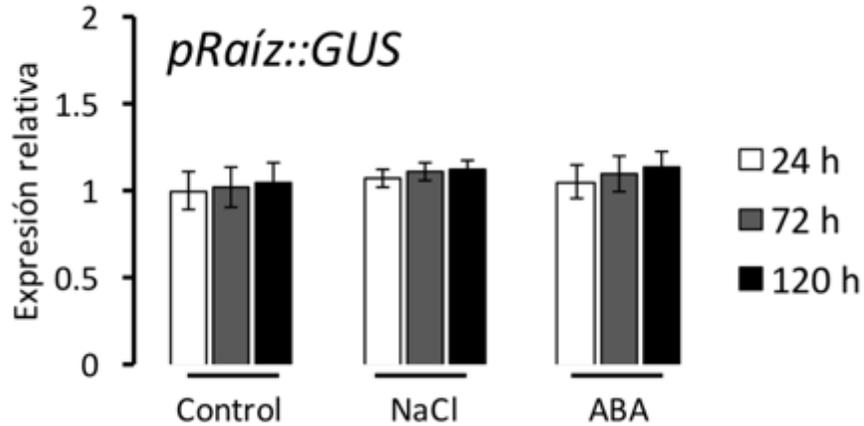


Figura S4. Evaluación de la expresión relativa de *pRaíz::GUS* en plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a estrés salino y ABA. Niveles de expresión relativa de *GUS* dirigido por el promotor *pRaíz* fueron evaluados mediante RT-qPCR a partir de cADN sintetizado desde ARN extraído de hojas y raíces a los tiempos 24 (barra blanca), 72 (barra gris) y 120 h (barra negra) de iniciado el ensayo de estrés salino 75 mM de NaCl o 25 μ M de ABA. Un pool de 30 plántulas fue analizado en cada tiempo. Los niveles de transcritos son relativos al control en tiempo 24 h. Niveles de expresión de *GUS* en hojas (no mostrados) no fueron detectados en ninguna condición.

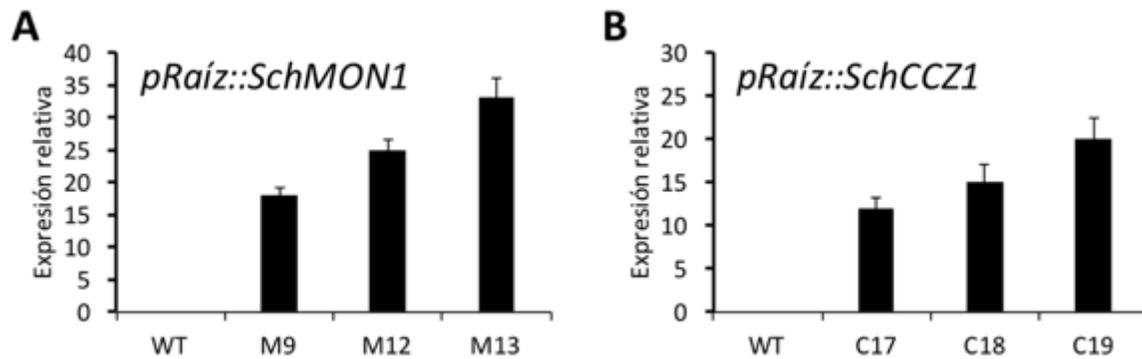


Figura S5. Evaluación de la expresión radicular relativa de *SchMON1* y *SchCCZ1* dirigida por el promotor *pRaíz* en líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Niveles de expresión relativa de *SchMON1* (A) y *SchCCZ1* (B) dirigidos por el promotor *pRaíz* fueron evaluadas mediante RT-qPCR a partir de cADN sintetizado desde ARN extraído de raíces de plantas F1. Niveles de expresión de ambos genes en plantas WT no fueron detectados. 3 replicas técnicas fueron realizadas establecer la desviación estándar.

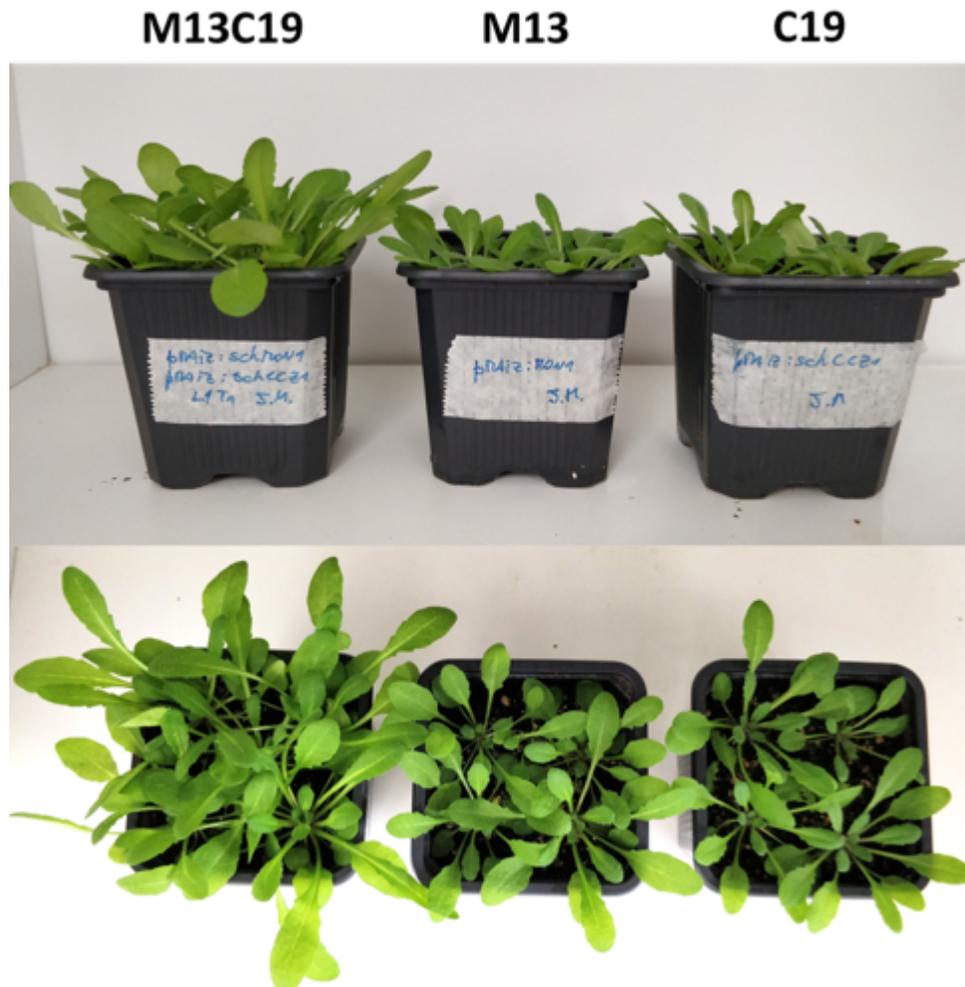


Figura S6. Fenotipo de plantas de *Arabidopsis thaliana* que expresan y co-expresan en sus raíces a *SchMON1* y *SchCCZ1*. Fenotipo de líneas transgénicas homocigotas de 30 días de edad que expresan radicularmente *SchMON1* (línea M13) *SchCCZ1* (líneas C19) y de aquellas que co-expresan ambos genes (M13C19) en condiciones de invernadero.