
**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE UN GEN SNARE-LIKE INVOLUCRADO
EN TRÁFICO VESICULAR, PARA MODULAR LA TOLERANCIA A ESTRÉS
SALINO EN SOLANUM LYCOPERSICUM**

**JOSSELYN ANDREA SALINAS CORNEJO
DOCTORADO EN CIENCIAS
(MENCIÓN EN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL)**

RESUMEN

El tráfico vesicular intracelular asegura el intercambio de lípidos y proteínas entre los compartimentos membranosos. Bajo estrés salino esto cobra gran importancia, ya que tanto la remoción de transportadores y canales iónicos de la membrana plasmática como la compartimentación de los iones tóxicos requiere de la formación de vesículas, que pueden ser mantenidos como cuerpos multivesiculares, o bien, ser fusionados a la vacuola central. Uno de los componentes participantes incluye a la familia de proteínas SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor), que actúan en el proceso de fusión de vesículas, otorgándole especificidad al destino final de éstas. Es por ello que las SNAREs son un blanco interesante de investigación que permitiría entender el rol que tienen éstas durante el estrés salino en plantas. Las evidencias descritas hasta la fecha en *Arabidopsis thaliana* muestran que la sobreexpresión de determinados SNAREs conducen a un aumento de la tolerancia al estrés salino. Este efecto podría ser consecuencia de un aumento en la acumulación de sodio en la vacuola o que ocurra una compartimentación de especies reactivas de oxígeno en cuerpos multivesiculares, evitando con ello la alcalinización y pérdida de viabilidad de la vacuola. Por otra parte, el análisis de los genomas de plantas ha revelado una superfamilia de genes que codifican para proteínas denominadas SNARE-like, que al igual que las anteriores parecen estar participando en el tráfico vesicular con funciones semejantes. La participación de estas proteínas durante el estrés abiótico es prácticamente desconocida, a excepción de los estudios recientemente descritos con la sobreexpresión en tabaco de un gen SNARE-like de la planta halófila *Salicornia brachiata*, que es capaz de otorgar tolerancia a múltiples tipos de estrés abiótico, incluyendo el estrés salino. Los estudios de la participación de SNARE-like en plantas de importancia económica, como tomate

son desconocidos. Por lo anterior, en esta tesis se propuso estudiar los efectos de la sobreexpresión de un gen SNARE-like, denominado SISLSP6, en plantas de *Solanum lycopersicum* sometidas a condiciones de alta salinidad. Se realizó una búsqueda de putativos genes homólogos al SNARE-like de *S. brachiata* en el genoma de *S. lycopersicum*, identificándose aquellos que tienen expresión diferencial bajo estrés salino y se seleccionó aquel que mostró una mejor respuesta, tanto en hojas como en raíces. El análisis *in silico* de SISLSP6 permitió la predicción de un dominio Longin-like, que la categorizó como una SNARE-like. Además, mediante análisis filogenético se determinó una relación de SISLSP6 con proteínas SNARE-like de *S. brachiata*, *Zostera marina* y *Solanum pennelli*, plantas tolerantes a la salinidad. Junto con esto, se predijo un putativo dominio de un complejo adaptador de clatrina y un sitio de palmitoilación. La localización subcelular indicó que SISLSP6 se ubica en la membrana plasmática, manifestando su posible participación en la endocitosis. Los efectos de la sobreexpresión de SISLSP6 en plantas de tomate frente a estrés salino fueron evidentes al observarse una mejora de los parámetros fisiológicos y bioquímicos, tales como un mayor contenido de clorofila, índice de rendimiento, eficiencia del fotosistema II y contenido relativo de agua, y un menor contenido de MDA, mejorando la tolerancia de estas plantas bajo estrés salino. La sobreexpresión de SISLSP6 también aumentó la tasa endocítica, aumentando el tráfico vesicular. Además, se observó una disminución en la acumulación de especies reactivas de oxígeno, lo que se correlacionaría con el aumento de la compartimentación del sodio en las vacuolas de células de raíces de tomate. Estos resultados contribuyen a comprender el rol de esta proteína SNARE-like durante el estrés salino. Se espera que esta investigación sirva de base para el uso de estos genes en programas de mejoramiento genético de la tolerancia a estrés salino en tomate.

ABSTRACT

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

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