
**EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE RabGDI1 DE SOLANUM CHILENSE
EN EL TRÁFICO VESICULAR Y EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS SALINO EN
ARABIDOPSIS THALIANA**

**ÁLEX DAVID SAN MARTÍN DAVISON
DOCTOR EN CIENCIAS
(MENCIÓN EN INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL)**

RESUMEN

Bajo situaciones de estrés las plantas desarrollan estrategias que le permiten incrementar sus niveles basales de tolerancia. Algunas de las estrategias identificadas contemplan la activación de genes implicados en las vías de tráfico vesicular, este argumento encuentra sustento en investigaciones que demuestran un aumento en las dinámicas endocíticas cuando las plantas se someten a estrés salino. Adicionalmente se ha comprobado que la expresión constitutiva de algunos genes del tráfico vesicular en plantas modelo mostraron resultados satisfactorios en el incremento de la tolerancia a la salinidad. Investigaciones preliminares en la especie de tomate silvestre *Solanum chilense* (Dunal) Reiche, tolerante a la salinidad, han permitido la identificación de un transcrito que es inducido en respuesta al estrés salino. Análisis informáticos revelaron que la secuencia nucleotídica de este transcrito poseía un alto grado de identidad con el gen que codifica para la proteína del inhibidor de la disociación de GDP (GDI), del tipo RabGDI y debido a su homología con el gen de *Arabidopsis* (AtGDI1), se denominó *Solanum chilense* RabGDI1 (SchRabGDI1). La funcionalidad de esta proteína se relaciona con los procesos de tráfico vesicular, permitiendo la extracción de las RabGTPasas desde la membrana de destino y luego manteniéndolas solubles en el citoplasma, como una reserva, para un próximo movimiento de vesículas. Para desarrollar esta investigación se propusieron los siguientes objetivos; (1) determinar el perfil transcripcional órgano específico de SchRabGDI1 y durante el estrés salino, (2) identificar las características estructurales y filogenéticas de la proteína codificada por SchRabGDI1. (3) determinación de la identidad funcional del producto génico de SchRabGDI1. (4) determinar la capacidad de interacción de SchRabGDI1 y una RabGTPasa involucrada en el tráfico de membranas entre el endosoma y la vacuola. (5) determinar el efecto de la expresión heteróloga de

SchRabGDI1 sobre los parámetros fisiológicos en plantas transgénicas de *A. thaliana* durante el estrés salino. Adicionalmente, se (6) determinó el efecto de la expresión heteróloga de este gen sobre la endocitosis en condiciones no estresantes y sobre la (7) distribución intracelular del sodio en raíces de plantas de *A. thaliana* control y heterólogas para SchRabGDI1 durante el estrés salino. Nuestros resultados muestran que SchRabGDI1 tiene un mayor nivel de acumulación de transcritos en tejido radicular y que comparte las características filogenéticas y los dominios estructurales característicos presente en este grupo de proteínas. Además, la complementación de la levadura mutante *sec19-1* con SchRabGDI1 permitió corregir el fenotipo termosensible, demostrando la actividad funcional de SchRabGDI1. Mediante los estudios de BiFC se logró comprobar que SchRabGDI1 es capaz de interactuar in-vivo con una RabGTPasa clave de la ruta endosoma-vacuola. Adicionalmente, la sobreexpresión de SchRabGDI1 evidenció una mejora en parámetros fisiológicos como, la disminución en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs), mayor peso fresco de las plántulas, lo cual estaba acompañado de un aumento en la tasa de endocitosis y un aumento en el contenido de Na⁺ en sus vacuolas comparado a lo exhibido por las plantas silvestres, bajo las mismas condiciones de estrés salino. Este trabajo aporta nuevas evidencias acerca del papel del tráfico vesicular intracelular, y su participación durante el estrés salino, en relación con la expresión heteróloga de SchRabGDI1 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

ABSTRACT

Under stress situations, plants develop strategies which allow them to increase their basal tolerance levels. Some strategies include the activation of genes involved in the vesicular traffic routes. This argument is supported by researches that show an increase in vesicular dynamics when plants are subjected to salt stress. Additionally, it has been proved that the constitutive expression of some vesicular trafficking genes in model plants showed satisfactory results in the increasing of salt tolerance. Previous researches (of our team) on the wild tomato species *Solanum chilense* (Dunal) Reiche, high tolerant to salinity, have permitted the identification of a transcript which it is induced in response to salt stress. Databases analysis revealed that the nucleotide sequence of this transcript had a high identity degree with the gene that codifies for a GDP dissociation inhibitor (GDI) protein, of Rab-GDI type and due to its homology with the gene of *Arabidopsis* (*AtGDI1*), it was named SchRabGDI1. The functionality of this codified protein is related to the vesicular trafficking processes, allowing the RabGTPases extraction from the target membrane and afterwards keeping them soluble in cytoplasm, like a reservoir, for a future vesicles movement. To carry out this research, following objectives were set: (1) to determinate organspecific transcriptional profile and (2) to identify the structural and phylogenetic characteristics of the codified protein by SchRabGDI1. (3) to determine the functional identity of SchRabGDI1 gene product. (4) to determinate the in vivo interaction capacity of SchRabGDI1 and a RabGTPase involved in membrane trafficking between the endosome and the vacuole. (5) to determine the variation of physiological parameters in SchRabGDI1 *A. thaliana* heterologous plants during salt stress. In addition it was (6) determined the effect of heterologous expression of this gene on endocytosis under non-stressful conditions and on the (7) intracellular distribution of sodium in roots of *A. thaliana* control and SchRabGDI1 heterologous plants during salt stress. Our results show that SchRabGDI1 has a higher-level accumulation of transcripts in root tissue and it shares the phylogenetic characteristics and characteristic structural domains present in this group of

proteins. Furthermore, the complementation of mutant yeast *sec19-1* strain with SchRabGDI1 allowed to correct the thermosensitive phenotype, demonstrating the functional activity of SchRabGDI1. Due to the BiFC studies, it was possible to verify that SchRabGDI1 can interact in-vivo with a SchRabGTPase, key protein of the endosome-vacuole pathway. Additionally, the overexpression of SchRabGDI1 showed an improvement in physiological parameters such as the decrease in the accumulation of reactive oxygen species (O₂⁻), higher seedlings fresh weight together with an increase in the endocytosis rate and increase in the Na⁺ content in its vacuoles compared to what control plants exhibited under the same conditions of salt stress. This research provides with new evidence about the role of intracellular vesicular trafficking, as well as its participation during saline stress, in relation to the heterologous expression of SchRabGDI1 in the *Arabidopsis thaliana* model plant.